

Titre: Détection de la dégénérescence du cartilage articulaire par la
Title: distribution spatiale des potentiels d'écoulement

Auteur: Anne Légaré
Author:

Date: 1998

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Légaré, A. (1998). Détection de la dégénérescence du cartilage articulaire par la
Citation: distribution spatiale des potentiels d'écoulement [Master's thesis, École
Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/6905/>

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

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/6905/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Michael D. Buschmann
Advisors:

Programme: Unspecified
Program:

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available

UMI

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉTECTION DE LA DÉGÉNÉRESCENCE DU CARTILAGE
ARTICULAIRE PAR LA DISTRIBUTION SPATIALE DES
POTENTIELS D'ÉCOULEMENT

ANNE LÉGARÉ
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)
NOVEMBRE 1998



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-38691-0

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

DÉTECTION DE LA DÉGÉNÉRESCENCE DU CARTILAGE
ARTICULAIRE PAR LA DISTRIBUTION SPATIALE DES
POTENTIELS D'ÉCOULEMENT

Présenté par: LÉGARÉ Anne

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

au jury d'examen constitué de:

M. GUARDO Robert, Ph.D., président

M. BUSCHMANN Michael, Ph. D, membre et directeur de recherche

M. SAVARD Pierre, Ph.D., membre

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, M. Michael Buschmann, pour m'avoir accueillie dans son équipe de recherche et pour m'avoir fait découvrir la biochimie. Je voudrais plus particulièrement lui témoigner ma reconnaissance pour ses nombreux conseils techniques et scientifiques et pour sa confiance.

Je voudrais également remercier M. Robert Guardo pour son aide au niveau de l'acquisition électronique et pour avoir accepté de présider le jury d'examen. Je tiens aussi à remercier M. Pierre Savard pour ses conseils au niveau des électrodes et pour avoir accepté d'être membre du jury.

J'aimerais souligner les conseils pratiques de M. Pierre LeGuyader sur le plaquage des électrodes. Je voudrais aussi témoigner ma reconnaissance à M. Jean Dumont pour son aide et ses conseils lors des expériences de biochimie.

Je remercie finalement tous les étudiants qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à ce projet : Martin Garon pour son aide avec les mesures de potentiels d'écoulement, Marc Thibault pour son aide avec les tests ELISA, Ève Langelier et Nicolas Tran-Khanh pour leur support et Manuel Fortin pour ses conseils techniques.

Résumé

Le cartilage articulaire est principalement composé d'un réseau de fibres de collagène dans lequel sont encastrées des protéoglycanes qui portent une charge négative fixe. Il y a donc un excès d'ions mobiles positifs dans le fluide interstitiel. Lors de la compression du cartilage, un flux de fluide est induit et entraîne les ions positifs mobiles par rapport aux protéoglycanes chargées négativement, ce qui crée un potentiel d'écoulement. Les potentiels d'écoulement sont particulièrement sensibles au contenu de protéoglycanes et à l'intégrité du réseau de collagène de la matrice extracellulaire. Nous avons développé récemment une technique de mesure des potentiels d'écoulement générés sur la surface articulaire du cartilage lors de la compression non confinée à l'aide d'une microélectrode composée d'une série linéaire de 8 électrodes de platine (80%) et iridium (20%) de 50 μm de diamètre qui sont distancées de 300 μm .

Les cartilages ont été extraits de l'épaule d'un boeuf âgé entre 1 et 2 ans. Les disques de 4 mm de diamètre ont été placés dans un incubateur à 37°C et 5 % de CO_2 . Le milieu de culture DME/F12 a un pH 7.2 et contient 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamycine, 0.01% de BSA (*Bovine Serum Albumin*) et 20 $\mu\text{g/ml}$ d'ascorbate. Les cartilages sont extraits de l'épaule par triplets, c'est-à-dire un disque de contrôle, un cartilage qui a été stimulé par un agent de dégradation et un disque qui a été congelé directement après l'extraction. Nous avons utilisé deux agents de dégradation. L'interleukin-1 α (IL-1 α) est une cytokine qui inhibe la synthèse de protéoglycanes et de collagènes et augmente la production des métalloprotéinases (MMP) qui sont responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire. L'aminophénylmercuric acétate (APMA) active les MMP qui sont sécrétées sous forme latente de proenzyme. Nous avons réalisé trois expériences distinctes. Lors de la première expérience, les cartilages ont été placés en culture avec et sans 5 ng/ml d'IL-1 α pendant 13 jours. Nous avons ensuite effectué une seconde

expérience pour étudier l'effet de l'IL-1 α en fonction de la durée de culture. Au cours d'une troisième expérience, les cartilages ont été traités avec 1 mM d'APMA.

Les pertes de protéoglycanes dans le milieu lors de la culture ainsi que le contenu de protéoglycanes dans les cartilages ont été évalués à l'aide d'une technique de spectrophotométrie avec le colorant DMB. Lors de la première expérience, les cartilages qui ont été traités avec 5 ng/ml d'IL-1 α ont perdu environ 91% de leur contenu de GAG après 13 jours de culture. Au cours de la deuxième expérience, nous avons observé que les cartilages stimulés avec IL-1 α ont perdu respectivement 9, 18, 65 et 74% de leur contenu de GAG après 1, 4, 7 et 11 jours de culture. Lors de la troisième expérience avec APMA, nous avons constaté que la perte de GAG est très rapide. La dénaturation et le clivage des fibres de collagène de type II ont été quantifiés par un essai biochimique de type ELISA. Nous avons observé que l'IL-1 α provoque la dénaturation et le clivage des fibres de collagène de type II. En effet, après 11 jours de culture, les cartilages traités avec 5 ng/ml d'IL-1 α sont caractérisés par 3 fois plus de fibres de collagène de type II dénaturées et 5 fois plus de fibres clivées que les disques de contrôle.

Afin de mesurer les propriétés électromécaniques des cartilages, la série linéaire de 8 électrodes a été intégrée à une chambre de test qui est placée sur un actuateur. La compression non confinée du cartilage s'effectue à l'aide d'une tige qui est fixée à une cellule de charge. Le déplacement de l'actuateur et l'acquisition de la charge et des potentiels d'écoulement sont contrôlés par un ordinateur. Lors des tests électromécaniques, les disques sont d'abord poinçonnés à 3 mm de diamètre. La surface articulaire du cartilage est ensuite placée directement en contact avec les électrodes qui couvrent une distance totale de 2.1 mm. Les électrodes 2 à 6 couvrent le rayon du disque, l'électrode 1 est située de l'autre côté du centre et les électrodes 7 et 8 sont situées dans le bain. La chambre de test est remplie d'une solution saline (0.01 ou 0.15 M NaCl). Un offset de compression de 100 μ m est d'abord appliqué au cartilage par pas de 20 μ m à

une vitesse de 2 $\mu\text{m/s}$ avec un temps de relaxation de 200 ou 300 secondes après chaque pas. Nous effectuons ensuite une série de compressions sinusoïdales de 8, 4 et 2 μm d'amplitude à des fréquences de 1, 0.1, et 0.01 Hz.

Le profil radial d'amplitude et de phase des potentiels d'écoulement est construit en additionnant chaque canal dans le domaine complexe. Selon les modèles théoriques du cartilage, l'amplitude du profil de potentiel est reliée à la pression dans le disque, alors que le gradient est proportionnel à la vitesse du fluide interstitiel. Nous avons constaté qu'un traitement des cartilages avec IL-1 α affecte l'amplitude du profil au centre ainsi que le gradient de potentiel à la périphérie du disque. En effet, lors de la première expérience, nous avons observé que l'amplitude du profil de potentiel mesurée dans la solution de 0.15 M NaCl est réduite d'un facteur 4 après un traitement avec IL-1 α pendant 13 jours. De plus, le gradient de potentiel à la périphérie du disque est environ 6 fois plus faible pour les disques dégradés. Les rigidités statique et dynamique des cartilages traités avec IL-1 α sont respectivement 10 et 3 fois plus faibles que celles des disques de contrôle. Au cours de la deuxième expérience, nous avons étudié l'évolution de la dégradation en fonction de la durée de la culture. Nous avons obtenu des résultats semblables à ceux de la première expérience. Nous avons toutefois observé que le gradient de potentiel à la périphérie des cartilages traités avec IL-1 α est réduit à plus de la moitié de celui des disques de contrôle seulement 1 jour après le début de la culture. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la perte de GAG au début de la culture est plus importante à la périphérie du disque. La diminution de l'amplitude du profil au centre du disque est plus importante entre les jours 4 et 7 de la culture, ce qui est également observé au niveau de la perte de GAG. La rigidité statique est très sensible à la dégradation du cartilage et nous pouvons supposer qu'elle est très sensible au contenu de GAG, mais aussi à la dégradation des fibres de collagène. La rigidité dynamique qui a un comportement semblable à celui de l'amplitude du profil de potentiel au centre du disque est probablement moins influencée par la dénaturation et le clivage du collagène. Les

résultats obtenus au cours de l'expérience avec APMA ne sont pas concluants, car les cartilages sont restés congelés pendant plus d'un an. Nous avons également observé que la concentration de NaCl de la solution de test affecte l'amplitude et la forme du profil de potentiel. De plus, nous avons remarqué que la non linéarité de la rigidité dynamique et de l'amplitude du profil de potentiel est plus importante pour les cartilages dégradés. De façon générale, nous pouvons conclure que les propriétés électromécaniques du cartilage sont des indicateurs précis du degré de dégénérescence du cartilage.

Les profils de potentiel d'écoulement peuvent également être construits à partir des courbes de relaxation. Nous avons par contre observé que le filtrage des potentiels d'écoulement influence l'amplitude et la forme des courbes de relaxation. Les courbes de relaxation peuvent être corrigées à l'aide de la fonction de transfert théorique des filtres passe-haut et passe-bas qui ont respectivement des fréquences de coupure de 0.05 et 200 Hz. Nous avons toutefois observé que la correction des signaux est optimale pour une fréquence du filtre passe-haut de 0.1 Hz. Nous avons constaté que les profils de potentiel construits à partir des courbes de relaxation corrigées sont très semblables aux profils qui ont été mesurés lors des compressions sinusoïdales. Du côté pratique, il est toutefois plus facile d'appliquer un offset de compression de 100 μm au cartilage plutôt que d'effectuer des compressions sinusoïdales. D'ailleurs, un projet vient de débiter pour la construction d'une sonde arthroscopique qui permettrait de mesurer les potentiels d'écoulement directement sur la surface articulaire de patients ostéoarthritiques. Cette sonde serait utilisée pour évaluer localement l'état de dégradation de la matrice extracellulaire et tester les méthodes de régénération du cartilage.

Abstract

Articular cartilage extracellular matrix is primarily composed of proteoglycans entrapped in a collagen network. Due to the fixed negative charge of proteoglycans, there is an excess of mobile positive charge in the fluid. Compression of the cartilage produces streaming potentials via the induction of intersitial flow and the entrainment of positively charged mobile counterions relative to the fixed negatively charged proteoglycans. Streaming potentials are particularly sensitive to the proteoglycan content and the integrity of the collagen network of the extracellular matrix. Recently, we have developed a microelectrode array to measure streaming potentials across the cartilage articular surface in unconfined compression geometry. We have constructed a linear array of 8 platinum (80%) and iridium (20%) wire electrodes of 50 μm diameter separated by 300 μm .

Cartilage disks were isolated from the humeral head of a 1 to 2 year old steer. The 4 mm disks were cultured in an incubator at 37°C and 5 % CO_2 . The serum-free media (DME/F12) was supplemented with 50 $\mu\text{g/ml}$ of gentamycin, 0.01% of bovine serum albumin (BSA) and 20 $\mu\text{g/ml}$ of ascorbate. Cartilage disks were matched in triplets : a control disk, a cartilage explant treated with a degradation agent and a disk frozen immediately after isolation. Two degradation agents were used. The interleukin-1 α (IL-1 α) is a cytokine which inhibits proteoglycan and collagen synthesis and increases metalloproteinase (MMP) production. The MMPs are responsible for extracellular matrix degradation. The aminophenylmercuric acetate (APMA) also activates the latent forms of the MMPs. We did three different experiments. During the first one, disks were placed in culture for 13 days with and without 5 ng/ml of IL-1 α . The second experiment was performed to study the evolution of IL-1 α degradation with time of culture. During a third experiment, cartilage explants were treated with 1 mM of APMA.

The loss of proteoglycan to the media during the culture and the decrease of the proteoglycan content in the disk were measured with DMB dye and spectrophotometry. During the first experiment, the cartilage disks treated with 5 ng/ml of IL-1 α lost 91% of their GAG content after 13 days of culture. During the second experiment, the IL-1 α treated disks lost 9, 18, 65 and 74% of their GAG content after 1, 4, 7 and 11 days of culture respectively. During the third experiment, the disks treated with APMA lost the majority of their GAG content after 3 days of culture. The denaturation and cleavage of the collagen type II fibers was evaluated with an ELISA assay. We have observed that IL-1 α increases the degradation of the collagen fibers. In fact, after 11 days of culture, the IL-1 α treated disks has 3 times more denatured collagen type II and 5 times more cleaved collagen type II than the control explants.

The electromechanical properties of cartilage were evaluated by incorporating the linear array of 8 electrodes into the nonconducting base of a testing chamber. The chamber was mounted on an actuator and the load cell fixed to a steel frame. The computer controled the displacement of the actuator, the acquisition of the position, load and streaming potentials. During electromechanical testing, disks were first punched to 3 mm diameter. The articular surface was placed in contact with the 8 electrodes which cover a total length of 2.1 mm. The electrodes 2 to 6 were covering the 1.5 mm radius, electrode 1 was on the opposite side of the disk center and electrodes 7 and 8 were external to the cartilage in the bath. The testing chamber was filled with saline solution (0.01 M or 0.15 M NaCl). A static compression offset of 100 μ m was applied in a sequence of small step compressions of 20 μ m at 2 μ m/s with a relaxation time of 200 or 300 seconds after each step. Dynamic sinusoidal tests were performed at frequencies of 1, 0.1 and 0.01 Hz with displacement amplitudes of 8, 4 and 2 μ m.

The streaming potential radial profile is constructed by the addition of each channel in the complex domain. Cartilage theoretical models show that the amplitude of

the streaming potential profile is related to the pressure profile in the disk and the potential gradient or equivalently the electrical field is proportional to the fluid velocity. A treatment of the cartilage explants with IL-1 α reduces the profile amplitude at the center and the potential gradient at the periphery of the disk. During the first experiment, we observed that the streaming potential profile amplitude measured in 0.15 M NaCl solution was reduced by about 4 times in IL-1 α treated disks compared to control explants. The potential gradient at the periphery was also reduced by a factor of 6 for the degraded tissue. Static and dynamic stiffness were 10 and 3 times lower for the IL-1 α treated disks compared to control explants. During the second experiment, we studied the evolution of the degradation with the culture time. We obtained results similar to the first experiment. We also observed that the profile potential gradient at the periphery for the IL-1 α treated explants was reduced by half compared to control disks only one day after the beginning of the culture. The reduction of the profile amplitude at the center of the disk was more gradual. The potential profile amplitude was significantly lower for degraded disks compared to control explants after 7 days of culture. Static stiffness was very sensitive to cartilage degradation. The reduction of dynamic stiffness was similar to the decrease of the potential profile amplitude at the center of the disk. The results obtained during the third experiment with APMA were not conclusive because the disks were frozen for more than one year. We have also observed that the salt concentration of the test solution influenced the profile amplitude and shape. Furthermore, we have seen that the nonlinearity of the dynamic stiffness and the potential profile amplitude increases for degraded disks. In a general manner, we can conclude that the cartilage electromechanical properties are sensitive indicators of the state of health or degeneration of articular cartilage.

Radial streaming potential profiles can also be constructed from the relaxation curves. However, the filtering of the electrical signal during the acquisition modifies the amplitude and the shape of the relaxation curve. The distortion of the relaxation curve

can be corrected with a theoretical transfer function of the high-pass and low-pass filters with cut off frequencies of 0.05 and 200 Hz. However, we observed that the relaxation curve correction was optimal for a cut off frequency of the high-pass filter of 0.1 Hz. The streaming potential profiles constructed with the relaxation curves were similar to the profile measured during sinusoidal compressions. From a practical side, it is easier to apply a compression offset of 100 μm than to apply sinusoidal compressions. A project is underway to construct an arthroscopic probe to measure streaming potential directly on the articular surface of patients suffering from osteoarthritis. The arthroscopic probe would be used to evaluate locally the degradation state of the cartilage and to test the methods of regeneration of cartilage.

Table des matières

Remerciements.....	iv
Résumé.....	v
Abstract.....	ix
Table des matières.....	xiii
Liste des tableaux.....	xix
Liste des figures.....	xx
Liste des annexes.....	xxvi
 Introduction.....	 1
 CHAPITRE 1 : Fabrication d'une microélectrode pour mesurer les potentiels d'écoulement générés sur la surface articulaire du cartilage lors de la compression.....	 4
 1.1 Caractéristiques du cartilage articulaire.....	 4
1.1.1 Composition biochimique et structure du cartilage.....	5
1.1.1.1 Les protéoglycanes.....	6
1.1.1.2 Les fibres de collagène.....	7
1.1.1.3 Les chondrocytes.....	8
1.1.1.4 Variation de la structure et de la composition selon la profondeur.....	8
1.1.2 Fonctions physiologiques.....	9
1.1.3 Propriétés mécaniques.....	9
1.2 Les potentiels d'écoulement.....	11
1.2.1 Mécanisme moléculaire.....	11
1.2.2 Techniques de mesure des potentiels d'écoulement.....	12

1.3 Microélectrode.....	14
1.3.1 Fabrication d'une série linéaire de 8 électrodes.....	14
1.3.1.1 Insertion des électrodes dans la grille de nylon.....	15
1.3.1.2 Usinage de la chambre de test.....	16
1.3.2 Autres techniques de fabrication des électrodes.....	18
1.3.3 Caractéristiques électriques des électrodes.....	19
1.3.3.1 Plaquage des électrodes.....	20
1.3.3.2 Mesure de l'impédance des électrodes.....	21
1.3.3.3 Comparaison des résultats avec la littérature.....	25
1.4 Montage électromécanique, acquisition et analyse des signaux électriques...	27
 CHAPITRE 2 : Caractérisation biochimique de cartilages articulaires placés en culture et stimulés par des agents de dégradation.....	 31
2.1 Effets biochimiques des agents de dégradation lors de la culture.....	31
2.1.1 L'Interleukin-1.....	32
2.1.2 L'APMA et les autres agents de dégradation.....	36
2.2 Culture des cartilages.....	36
2.2.1 Extraction et conditions de culture des cartilages.....	37
2.2.2 Description des différentes expériences.....	37
2.2.2.1 Traitement des cartilages avec IL-1 α	38
2.2.2.2 Traitement des cartilages avec APMA.....	39
2.3 Contenu de protéoglycanes.....	39
2.3.1 Spectrophotométrie avec colorant DMB.....	39
2.3.2 Résultats avec IL-1 α	40
2.3.2.1 Perte et contenu de GAG après 13 jours de culture.....	40
2.3.2.2 Perte et contenu de GAG pour différentes durées de culture..	42
2.3.3 Résultats avec APMA.....	46

2.3.4 Discussion sur le contenu de protéoglycanes de cartilages normaux et dégradés.....	47
2.3.4.1 Discussion des résultats des tests DMB.....	47
2.3.4.2 Revue de la littérature.....	51
2.3.4.3 Comparaison des résultats avec la littérature.....	53
2.4 Contenu de collagène.....	54
2.4.1 Description des essais biochimiques.....	54
2.4.1.1 Quantification du collagène dénaturé à l'aide de l'analyse de l'épitope CBIIB.....	54
2.4.1.2 Quantification du collagène clivé à l'aide de l'analyse de l'épitope 3/4c.....	55
2.4.2 Résultats avec IL-1 α	56
2.4.2.1 Contenu de collagène dénaturé.....	56
2.4.2.2 Contenu de collagène clivé.....	57
2.4.3 Discussion sur le contenu de collagène de type II des cartilages traités avec IL-1 α	59
2.4.3.1 Discussion des résultats.....	59
2.4.3.2 Comparaison avec la littérature.....	61
 CHAPITRE 3 : Propriétés électromécaniques de cartilages normaux et dégradés.....	 63
 3.1 Revue de la littérature.....	 63
3.1.1 Les potentiels d'écoulement.....	63
3.1.2 Les modèles théoriques du cartilage.....	65
3.2 Mesure des propriétés électromécaniques.....	67
3.2.1 Protocole des mesures électromécaniques.....	67
3.2.1.1 Cartilages traités avec IL-1 α pour une durée de culture fixe.....	67

3.2.1.2 <i>Cartilages traités avec IL-1α pour des durées de culture variables</i>	68
3.2.1.3 <i>Cartilages traités avec APMA</i>	69
3.2.2 Exemple de résultats bruts.....	70
3.2.3 Mesure de l'épaisseur des cartilages.....	72
3.3 Rigidité statique et dynamique	74
3.3.1 Calcul de la rigidité statique et dynamique.....	74
3.3.2 Résultats avec IL-1 α	75
3.3.2.1 <i>Durée de culture fixe</i>	75
3.3.2.2 <i>Durées de culture variables</i>	77
3.3.3 Résultats avec APMA.....	81
3.4 Profil radial de potentiel d'écoulement	82
3.4.1 Construction mathématique du profil de potentiel d'écoulement.....	83
3.4.2 Résultats avec IL-1 α	83
3.4.2.1 <i>Durée de culture fixe</i>	83
3.4.2.1.1 <i>Variation du profil en fonction de la fréquence</i>	83
3.4.2.1.2 <i>Variation du profil en fonction de l'amplitude sinusoïdale</i>	86
3.4.2.2 <i>Durées de culture variables</i>	87
3.4.2.2.1 <i>Variation du profil en fonction de la durée de culture</i>	88
3.4.2.2.2 <i>Variation de profil en fonction de la fréquence</i>	90
3.4.2.2.3 <i>Variation du profil en fonction de l'amplitude</i>	92
3.4.3 Résultats avec APMA.....	93
3.5 Discussion des résultats	95
3.5.1 Lien entre les mesures de potentiel d'écoulement et les modèles théoriques.....	95
3.5.2 Comparaison des résultats avec la littérature.....	99

3.5.3 Effet de la concentration de NaCl sur les propriétés électromécaniques.....	103
3.5.3.1 Effet de la concentration de NaCl sur les rigidités statique et dynamique.....	103
3.5.3.2 Effet de la concentration de NaCl sur les potentiels d'écoulement.....	104
3.5.4 Non linéarité des propriétés électromécaniques.....	108
3.5.5 Effet de la congélation.....	110
3.5.6 Problèmes rencontrés lors des mesures électromécaniques.....	112
3.6 Conclusion.....	113
3.6.1 Précision et sensibilité des différentes propriétés électromécaniques.....	113
3.6.2 Corrélation entre les caractéristiques biochimiques et les propriétés électromécaniques.....	116
 CHAPITRE 4 : Modélisation du filtrage et construction des profils de potentiel d'écoulement à partir des courbes de relaxation.....	 120
 4.1 Modélisation du filtrage des signaux électriques lors du test de relaxation...	 120
4.1.1 Effet théorique du filtrage sur les potentiels d'écoulement mesurés lors de la relaxation.....	121
4.1.2 Fonction de transfert expérimentale construite à partir d'une courbe de relaxation.....	123
4.1.3 Fonction de transfert expérimentale construite à partir des sinusoïdes...	125
4.1.4 Efficacité des différentes fonctions de transfert pour la correction des potentiels d'écoulement mesurés lors du test de relaxation.....	126
4.1.5 Mesures des potentiels d'écoulement en DC.....	128
4.2 Profils de potentiel d'écoulement construits à partir des courbes de relaxation.....	129
4.2.1 Choix de la méthode de correction des potentiels d'écoulement.....	129

4.2.2 Construction et correction du profil de potentiel d'écoulement à partir des courbes de relaxation.....	131
4.2.3 Profils de potentiel d'écoulement construits à partir des courbes de relaxation pour les deux expériences avec IL-1 α	132
4.2.3.1 Résultats non corrigés de la première expérience avec IL-1 α	133
4.2.3.2 Résultats corrigés de la deuxième expérience avec IL-1 α	134
4.3 Discussion des résultats.....	137
4.4 Travaux futurs.....	139
 Conclusion.....	 142
 Références.....	 145
 Annexes.....	 157

Liste des tableaux

Tableau 2.1 : Perte et contenu de GAG des cartilages lors des expériences avec IL-1 α et APMA.....	48
Tableau 2.2 : Dénaturation et clivage du collagène de type II pour des cartilages normaux et des disques traités avec IL-1 α	59
Tableau 3.1 : Non linéarité de la rigidité dynamique et de l'amplitude maximale des profils de potentiel d'écoulement.....	109
Tableau 3.2 : Propriétés électromécaniques des cartilages normaux et dégradés lors des 3 expériences.....	114
Tableau 3.3 : Caractéristiques biochimiques des cartilages normaux et dégradés lors des 3 expériences.....	117
Tableau 4.1 : Amplitude maximale et gradient à la périphérie du profil de potentiel d'écoulement de cartilages normaux et dégradés lors des compressions sinusoïdales et du test de relaxation de contrainte.....	137

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1 : Structure et composition du cartilage articulaire d'une articulation (Mow V. C. et al., 1992).....	5
Figure 1.2 : Structure détaillée a) d'un aggrécane et b) d'un agrégat de plusieurs aggrécanes (Mankin H. J. et al., 1994).....	6
Figure 1.3 : Mécanisme moléculaire à l'origine de la création d'un potentiel d'écoulement.....	11
Figure 1.4 : Mesure des potentiels d'écoulement à l'aide d'une série linéaire de 8 électrodes dans une géométrie de compression non confinée.....	13
Figure 1.5 : Image au microscope de la surface des 8 électrodes.....	15
Figure 1.6 : Insertion des électrodes dans la grille de nylon.....	16
Figure 1.7 : Usinage de la microélectrode.....	17
Figure 1.8 : Surface de la microélectrode avec la fibre de nylon arrachée.....	18
Figure 1.9 : Circuit électrique équivalent lors des mesures de potentiel d'écoulement	20
Figure 1.10 : Circuit électrique équivalent lors des mesures d'impédance des électrodes.....	22
Figure 1.11 : Variation de l'impédance des électrodes en fonction de la fréquence lors de a) un test préliminaire, b) la première expérience avec IL- 1α et c) la deuxième expérience avec IL- 1α	23
Figure 1.12 : a) Montage électromécanique de mesure de potentiels d'écoulement et b) vue agrandie de la chambre de test.....	28
Figure 1.13 : Circuit électrique d'amplification et de filtrage des signaux.....	29

Chapitre 2

Figure 2.1 : Activateurs et inhibiteurs des enzymes impliqués dans la dégradation du cartilage articulaire stimulée par l'IL-1 (Mankin H. J. et al., 1994)..	33
Figure 2.2 : Effet de l'IL-1 α sur les pertes de GAG dans le milieu.....	40
Figure 2.3 : Concentration de GAG dans les cartilages après 13 jours de culture.....	42
Figure 2.4 : Perte cumulative de GAG dans le milieu selon les jours de culture.....	43
Figure 2.5 : Effet de l'IL-1 α sur les pertes de GAG dans le milieu pour les différents groupes de cartilages après a) 1 jour, b) 4 jours, c) 7 jours, d) 11 jours et e) 14 jours de culture.....	44
Figure 2.6 : Perte cumulative moyenne de GAG dans le milieu.....	45
Figure 2.7 : Concentration totale de GAG dans les cartilages en fonction de la durée de la culture.....	46
Figure 2.8 : Effet de l'APMA sur les pertes de GAG dans le milieu.....	46
Figure 2.9 : Description de l'essai biochimique de type ELISA.....	55
Figure 2.10 : Contenu de collagène de type II dénaturé dans les cartilages.....	56
Figure 2.11 : Contenu total de collagène de type II dans les cartilages.....	57
Figure 2.12 : Contenu de collagène de type II clivé dans l'extrait d' α -chymotrypsin	57
Figure 2.13 : Contenu de collagène de type II clivé dans l'extrait de protéinase K....	58

Chapitre 3

Figure 3.1 : Alignement du cartilage par rapport aux 8 électrodes.....	70
Figure 3.2 : Données brutes d'un test de relaxation de contrainte pour un disque de contrôle dans une solution de 0.15 M NaCl.....	71
Figure 3.3 : Données brutes d'un test de compressions sinusoïdales à 2 Hz et 4 μ m pour un disque de contrôle dans une solution de 0.01 M NaCl.....	72
Figure 3.4 : Mesure de l'épaisseur du cartilage à l'aide d'une technique de microscopie.....	73

Figure 3.5 : Rigidité statique en fonction de la distance de compression pour des solutions de test de a) 0.01 M NaCl et b) 0.15 M NaCl.....	75
Figure 3.6 : Variation de l'amplitude de la rigidité dynamique en fonction de l'amplitude des compressions sinusoïdales dans des solutions de test de a) 0.01 M NaCl et b) et c) 0.15 M NaCl.....	76
Figure 3.7 : Variation de la rigidité statique en fonction de la distance de compression pour a) 1 jour, b) 4 jours, c) 7 jours et d) 11 jours de culture.....	78
Figure 3.8 : Variation de l'amplitude de la rigidité dynamique en fonction de la fréquence pour a) 1 jour, b) 4 jours, c) 7 jours et d) 11 jours de culture.	79
Figure 3.9 : Variation de l'amplitude de la rigidité dynamique en fonction de l'amplitude des compressions sinusoïdales après 11 jours de culture....	80
Figure 3.10 : Variation de la phase de la rigidité dynamique en fonction de la fréquence pour une amplitude de compressions sinusoïdales de 4 μm après 11 jours de culture.....	81
Figure 3.11 : Effet de l'APMA sur a) la rigidité statique et b) l'amplitude de la rigidité dynamique mesurée lors de compressions sinusoïdales de 4 μm à 0.2 Hz.....	82
Figure 3.12 : Profils de potentiel d'écoulement dans une solution de test de 0.01 M NaCl à a) 2 Hz, b) 0.2 Hz et c) 0.02 Hz et dans 0.15 M NaCl à d) 2 Hz, e) 0.2 Hz et f) 0.02 Hz pour une amplitude de compressions sinusoïdales de 4 μm	84
Figure 3.13 : Variation des profils de potentiel d'écoulement selon l'amplitude des compressions sinusoïdales à une fréquence de 0.2 Hz pour une solution de test de 0.01 M NaCl {a) contrôle et b) IL-1 α } et 0.15 M NaCl {c) contrôle et d) IL-1 α }.....	87

Figure 3.14 : Profils de potentiel d'écoulement pour des compressions sinusoïdales de 4 μm à une fréquence de 0.1 Hz après a) 1 jour, b) 4 jours, c) 7 jours, d) 11 jours et e) 14 jours de culture.....	89
Figure 3.15 : Amplitude et phase du profil de potentiel d'écoulement pour des compressions sinusoïdales de 4 μm à a) et b) 1 Hz, c) et d) 0.1 Hz et e) et f) 0.01 Hz après 11 jours de culture.....	91
Figure 3.16 : Variation du profil de potentiel en fonction de l'amplitude des compressions sinusoïdales pour les cartilages a) de contrôle, b) IL-1 α et c) congelés après 11 jours de culture.....	92
Figure 3.17 : Variation de la phase du profil de potentiel d'écoulement en fonction des compressions sinusoïdales pour les cartilages de contrôle après 11 jours de culture.....	93
Figure 3.18 : Profils de potentiel d'écoulement pour des compressions sinusoïdales de 4 μm à 0.1 Hz après 7 jours de culture avec et sans APMA.....	94
Figure 3.19 : Variation du profil de potentiel d'écoulement après 1 an de congélation.....	94
Figure 3.20 : Amplitude et phase du profil de pression prédit par le modèle de Soulhat J. et al., 1998.....	97
Figure 3.21 : Distributions de potentiel normalisées par rapport à Φ_0 pour les cartilages a) de contrôle et b) dégradés dans des solutions de test de 0.01 M NaCl et 0.15 M NaCl.....	107
Figure 3.22 : Évolution des propriétés électromécaniques de disques traités avec 5 ng/ml d'IL-1 α en fonction de la durée de culture.....	115
Figure 3.23 : Évolution des caractéristiques biochimiques a) des cartilages de contrôle et b) des disques traités avec IL-1 α en fonction de la durée de culture.....	118

Chapitre 4

Figure 4.1 : Effet théorique des filtres passe-haut et passe-bas sur les courbes de relaxation.....	122
Figure 4.2 : Signal expérimental de sortie du système d'acquisition électrique pour un signal d'entrée typique.....	123
Figure 4.3 : Comparaison entre a) l'amplitude et b) la phase du modèle théorique et de la fonction de transfert expérimentale construite à partir des courbes de relaxation.....	124
Figure 4.4 : Comparaison entre a) l'amplitude et b) la phase du modèle théorique et de la fonction de transfert calculée à partir de la calibration sinusoïdale.....	126
Figure 4.5 : Correction du signal expérimental de la figure 4.2 à l'aide du modèle théorique pour des fréquences de coupure du filtre passe-haut de 0.05 et 0.1 Hz.....	130
Figure 4.6 : Variation de l'amplitude du signal de sortie en fonction de celle du signal d'entrée.....	130
Figure 4.7 : Profils de potentiel d'écoulement calculés à partir des courbes de relaxation a) sans correction et après correction à l'aide du modèle pour une fréquence de coupure du filtre passe-haut de b) 0.05 Hz et c) 0.1 Hz.....	132
Figure 4.8 : Profils de potentiel d'écoulement non corrigés construits à partir des courbes de relaxation à a) 1, b) 5 et c) 9 secondes pour un offset de compression de 100 μm dans une solution de 0.01 M NaCl et de 200 μm dans une solution de 0.15 M NaCl.....	133
Figure 4.9 : Profils de potentiel d'écoulement corrigés construits à partir des courbes de relaxation à 10 secondes après a) 1 jour et b) 4 jours de culture.....	135

Figure 4.10 : Profils de potentiel d'écoulement corrigés construits à partir des courbes de relaxation après 7 jours de culture à a) 1, b) 5, c) 10 et d) 15 secondes.....	135
Figure 4.11 : Profils de potentiel d'écoulement corrigés construits à partir des courbes de relaxation après 11 jours de culture à a) 1, b) 5, c) 10 et d) 15 secondes.....	136
Figure 4.12 : Évolution de l'amplitude et du gradient des profils de potentiel d'écoulement construits à partir de deux méthodes pour les cartilages traités avec 5 ng/ml d'IL-1 α	138
Figure 4.13 : Schéma simplifié de la sonde arthroscopique de mesure des potentiels d'écoulement sur la surface articulaire de patients ostéoarthritiques.....	140

Liste des Annexes

Annexe I :	Plans de fabrication de la microélectrode.....	157
Annexe II :	Digestion des milieux à la papaïne.....	160
Annexe III :	Profils de potentiel d'écoulement à 100 et 200 μm d'offset de compression.....	163
Annexe IV :	Programme sur <i>mathematica</i> pour observer l'effet théorique des filtres passe-haut et passe-bas.....	164
Annexe V :	Programmes de modélisation du filtrage sur <i>Labview</i>	167
Annexe VI :	Modélisation du filtrage par un bruit blanc non moyenné à zéro.....	170

Introduction

Le cartilage articulaire a deux principales fonctions physiologiques qui sont d'assurer une interface sans friction et une lubrification au niveau de l'articulation pendant les mouvements, et de transmettre et distribuer les contraintes mécaniques aux structures osseuses. L'ostéoarthrite est une maladie associée à la dégénérescence du cartilage. Elle est caractérisée par des réactions inflammatoires et des douleurs au niveau des articulations. Cette maladie touche environ 5 à 10% de la population âgée entre 25 et 65 ans et 80% des personnes qui ont plus de 70 ans. Avec le vieillissement de la population, il devient primordial de développer des techniques pour diagnostiquer et traiter l'ostéoarthrite. Il n'existe pas beaucoup de méthodes efficaces pour soigner l'ostéoarthrite. Les anti-inflammatoires et les injections intra-articulaires sont fréquemment utilisés pour réduire les symptômes sans pour autant empêcher l'évolution de la maladie. Dans les cas extrêmes, le remplacement du cartilage articulaire par une prothèse peut être effectué.

Le cartilage articulaire est principalement composé d'eau, de protéoglycanes, de fibres de collagène, de chondrocytes et de protéines. Puisque les protéoglycanes sont chargés négativement, il y a un excès de charges positives dans le fluide interstitiel. Lorsque le cartilage est comprimé, le flux de fluide entraîne un déplacement des ions positifs par rapport aux charges négatives fixes, ce qui crée un potentiel d'écoulement. Dans ce mémoire, nous allons présenter une technique de mesure des potentiels d'écoulement sur la surface du cartilage articulaire à l'aide d'une série linéaire de 8 électrodes, dans une géométrie de compression non confinée.

La dégénérescence du cartilage est caractérisée par une perte progressive de protéoglycanes, une dégradation des fibres de collagène et une augmentation du contenu d'eau. Les potentiels d'écoulement qui sont mesurés lors de la compression du cartilage

sont très sensibles au contenu de protéoglycanes et à l'intégrité du réseau de collagènes de la matrice extracellulaire. Il existe des agents de dégradation, tels l'interleukin-1 α (IL-1 α) et l'aminophénylmercuric acétate (APMA), qui peuvent être utilisés lors de la culture cellulaire pour induire une dégradation du cartilage. L'utilisation d'agents de dégradation permet d'établir des liens entre les caractéristiques biochimiques et les propriétés électromécaniques de la matrice extracellulaire du cartilage.

Dans ce mémoire, nous allons démontrer que les mesures de potentiels d'écoulement sur la surface articulaire sont sensibles à l'état de santé du cartilage. Dans une perspective d'avenir, les potentiels d'écoulement pourraient être mesurés directement sur la surface articulaire de patients souffrant d'ostéoarthrite à l'aide d'une sonde arthroscopique. Cette méthode de diagnostic permettrait d'abord de détecter la dégradation du cartilage au début de la maladie avant que les douleurs n'apparaissent au niveau de l'articulation. Elle faciliterait l'identification précise des régions dégradées de la surface articulaire du cartilage. De plus, elle pourrait être utilisée pour tester l'efficacité des nouvelles méthodes de régénération du cartilage articulaire.

Dans le premier chapitre de ce mémoire, nous allons d'abord présenter les caractéristiques biochimiques du cartilage articulaire. Nous allons ensuite décrire le mécanisme moléculaire à l'origine de la création d'un potentiel d'écoulement ainsi que les techniques de mesure. Nous allons présenter les techniques de fabrication d'une microélectrode ainsi que les caractéristiques électriques des électrodes. Finalement, le montage électromécanique et le système d'acquisition et d'analyse des signaux électriques seront présentés.

Les caractéristiques biochimiques de cartilages articulaires placés en culture et stimulés par des agents de dégradation seront présentées dans le chapitre 2. Nous allons d'abord discuter de l'effet biochimique de différents agents de dégradation tels que l'IL-

1α et l'APMA. Nous allons ensuite décrire les conditions de culture des cartilages. À l'aide de deux essais biochimiques, nous allons quantifier le contenu de protéoglycanes et l'intégrité du réseau de collagène de type II pour des cartilages normaux et dégradés.

Dans le troisième chapitre, nous allons présenter les propriétés électromécaniques de cartilages normaux et dégradés. Après une brève revue de la littérature sur les potentiels d'écoulement et les modèles théoriques du cartilage, nous allons décrire le protocole de mesures électromécaniques. Nous allons présenter les mesures de rigidités statique et dynamique ainsi que les profils de potentiel d'écoulement qui ont été mesurés sur la surface articulaire de cartilages normaux et dégradés. Nous discuterons ensuite des résultats que nous avons obtenus. Nous parlerons finalement de la précision et de la sensibilité des différentes propriétés électromécaniques par rapport au degré de dégradation de la matrice extracellulaire et nous établirons des liens entre les caractéristiques biochimiques et les propriétés électromécaniques.

Le quatrième chapitre sera consacré à la modélisation du filtrage des signaux électriques et à la construction des profils de potentiel d'écoulement à partir des courbes de relaxation. Nous allons d'abord décrire l'effet de filtrage des potentiels d'écoulement et les méthodes de correction. Nous allons ensuite présenter les profils de potentiel d'écoulement construits à partir des courbes de relaxation corrigées. Finalement, nous allons discuter de résultats et des travaux futurs.

CHAPITRE 1 : Fabrication d'une microélectrode pour mesurer les potentiels d'écoulement générés sur la surface articulaire du cartilage lors de la compression

Le cartilage articulaire possède une structure et une composition très particulières qui lui permettent d'assurer une lubrification au niveau de l'articulation pendant les mouvements et de distribuer les contraintes mécaniques aux structures osseuses. La matrice extracellulaire du cartilage est principalement composée de protéoglycanes, de collagènes, de protéines, de glycoprotéines et d'eau. Les chondrocytes sont responsables de la balance entre la synthèse, l'assemblage et la dégradation de la matrice extracellulaire. Les mesures de potentiel d'écoulement qui sont effectuées sur la surface articulaire du cartilage à l'aide d'une microélectrode sont sensibles à la structure et à la composition de la matrice extracellulaire du cartilage.

Dans ce chapitre, nous allons d'abord présenter un résumé de la composition, la structure, les fonctions physiologiques et les propriétés mécaniques du cartilage articulaire. Nous décrirons ensuite le mécanisme moléculaire à l'origine de la création d'un potentiel d'écoulement ainsi que les techniques de mesure pour différentes géométries de compression. Dans une troisième section, nous présenterons la méthode de fabrication d'une série linéaire de 8 électrodes. Nous discuterons ensuite des caractéristiques électriques des électrodes en fonction du plaquage et nous comparerons nos résultats avec la littérature. Finalement, nous allons présenter le montage électromécanique et le système électronique d'acquisition des potentiels d'écoulement.

1.1 Caractéristiques du cartilage articulaire

Dans cette première section, nous allons présenter un résumé des caractéristiques du cartilage articulaire. Ce résumé est principalement tiré du premier chapitre du livre

Orthopaedic Basic Science (Mankin H. J. et al., 1994) ainsi que du polycopié *Fields, Forces and Flows in Biological Tissues and Membranes* (Grodzinsky A. J., 1997).

1.1.1 Composition biochimique et structure du cartilage

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif dense qui recouvre l'os des articulations. Il est caractérisé par des phases fluide et solide qui occupent respectivement 65 à 80% et 20 à 35 % du volume total. La phase solide est composée de 60% de collagène, 30% de protéoglycanes et 10% de protéines et de glycoprotéines. La densité cellulaire des chondrocytes est de 10 à 100 millions/ml.

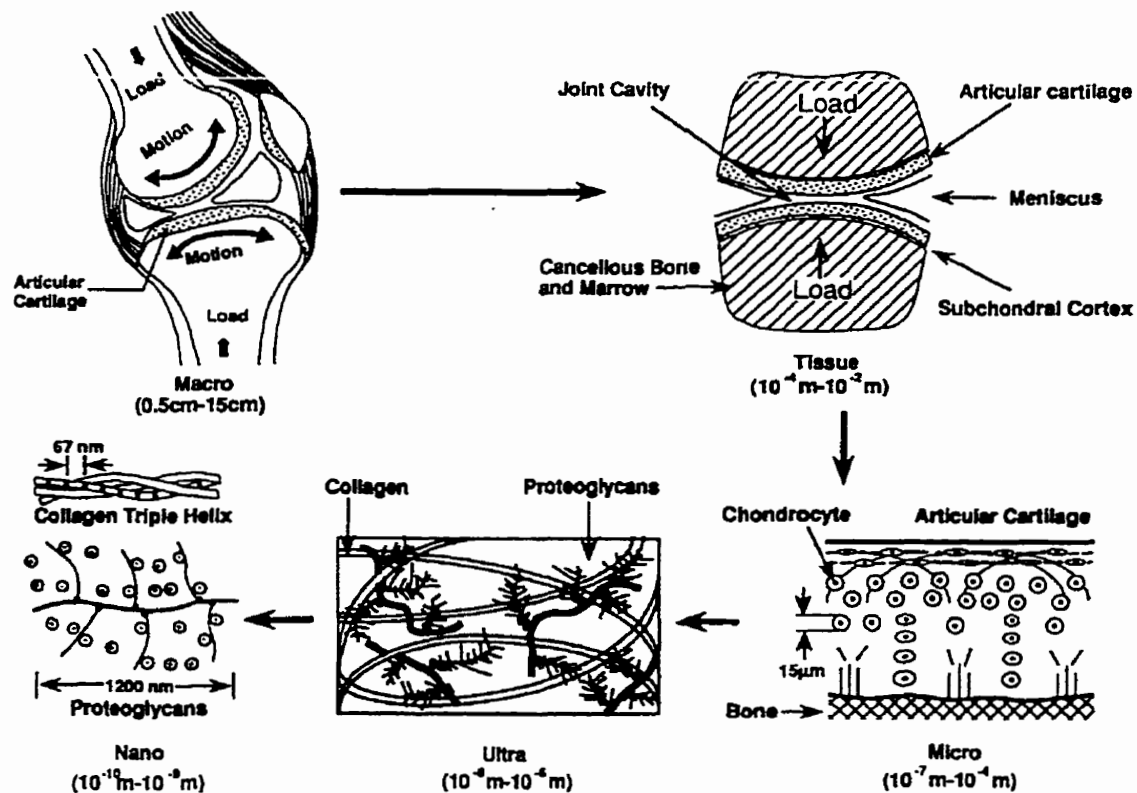


Figure 1.1 : Structure et composition du cartilage articulaire d'une articulation (Mow V. C. et al., 1992)

La figure 1.1, qui est tirée d'un article de Mow V. C. et al., présente une vue d'ensemble de la structure et la composition du cartilage articulaire d'une articulation (Mow V. C. et al., 1992). Les protéoglycanes sont en partie responsables de la pression osmotique et de la résistance en compression du cartilage. La matrice de collagène procure au cartilage une résistance renforcée en tension, alors que les chondrocytes contrôlent la balance homéostatique de la matrice extracellulaire, c'est-à-dire la synthèse, l'assemblage et le renouvellement des composantes de la matrice extracellulaire.

1.1.1.1 Les protéoglycanes

La figure 1.2 a) présente la structure d'un aggrécane. Environ 90% des protéoglycanes dans le cartilage se retrouvent sous forme d'aggrécanes. Les aggrécanes sont des polysaccharides composés de plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) qui sont reliées à une protéine centrale. Les aggrécanes ont une longueur typique de 200 à 400 nm et un diamètre de 40 nm. Les GAG sont des chaînes polymériques linéaires composées de différents types monomères de disaccharide. Les principales unités de disaccharide sont : chondroïtine-4 et -6 sulfate, kératane sulfate, dermatane sulfate et acide hyaluronique. Chaque chaîne de GAG ne comprend qu'un seul

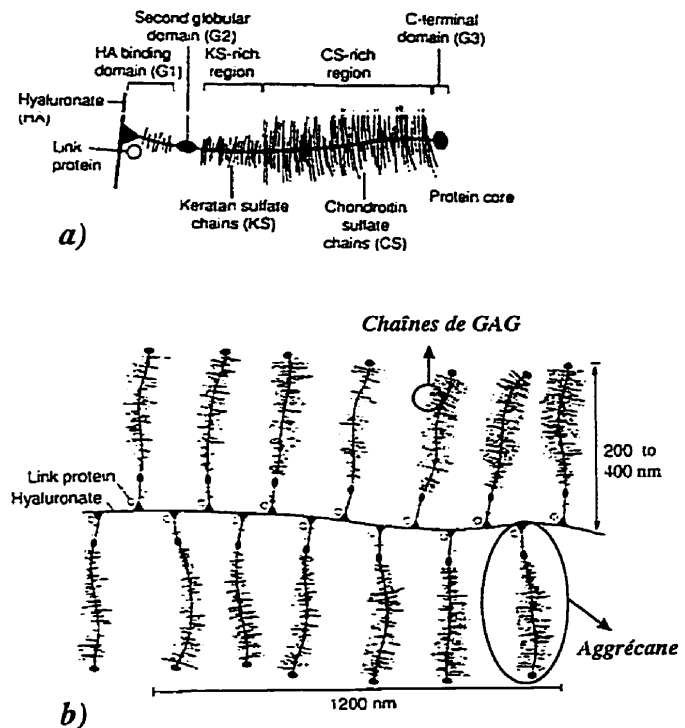


Figure 1.2 : Structure détaillée a) d'un aggrécane et b) d'un agrégat de plusieurs aggrécanes (Mankin H. J. et al., 1994)

type de disaccharide. Les chaînes de GAG ont une longueur typique de 40 nm et un

diamètre d'environ 1 nm (Comper W. D. et al., 1978). Les disaccharides comprennent des groupements anioniques chargés de carboxyle (COO^-) ou de sulfate (SO_3^-) dont les pKa sont respectivement autour de 4 et 2. Par conséquent, sous des conditions physiologiques, c'est-à-dire à pH neutre, tous les groupements sont ionisés et les protéoglycanes portent une charge nette négative dense. Les forces de répulsion entre les protéoglycanes qui sont encastrées dans le réseau de collagène procurent au cartilage une résistance en compression. De plus, le fluide interstitiel contient des ions mobiles chargés positivement tel que le sodium. Les aggrécanes peuvent être combinées pour former un agrégat qui peut contenir autour de 200 sous-unités (figure 1.2 b)). Le poids moléculaire, la conformation et l'agrégation des aggrécanes varient significativement selon l'âge et l'espèce.

1.1.1.2 Les fibres de collagène

Le collagène se retrouve sous forme fibrillaire et il assure une résistance en tension au cartilage. Il existe plusieurs types de collagène qui sont caractérisés par différentes séquences d'acides aminés. Le cartilage est principalement composé de fibres de collagène de type II, mais il contient aussi du collagène de types VI, IX et XI. Le collagène forme un réseau dans lequel sont encastrées les protéoglycanes. La structure moléculaire du collagène est caractérisée par trois chaînes polypeptidiques enroulées sous forme de triple hélice. Chaque chaîne contient environ 1000 acides aminés. Les fibres de collagène sont caractérisées par un contenu important d'acides aminés dont la séquence typique est Gly-X-Y avec X et Y qui sont souvent la proline ou l'hydroxyproline. La triple hélice a une longueur approximative de 300 nm et un diamètre de 1.4 nm. La fibre de collagène est formée, après la coupure des portions terminales globulaires, par l'agrégation et la réticulation des triples hélices. La fibre de collagène a un diamètre qui varie entre 10 et 200 nm selon l'âge.

Le collagène est une protéine polyampholyte, c'est-à-dire qu'elle peut être chargée positivement ou négativement selon le pH de la solution. Chaque molécule de collagène comprend approximativement 230 groupements acides carboxyles et 250 groupements basiques amines qui ont respectivement des pKa de 4 et 10. Sous des conditions physiologiques, tous les groupements sont ionisés et la charge nette est presque nulle. Par conséquent, dans la plupart des tissus, le collagène ne contribue que très faiblement à la charge fixe nette.

1.1.1.3 Les chondrocytes

Les chondrocytes sont impliquées dans la régulation de la balance dynamique entre la synthèse, l'assemblage et la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC). Par contre, puisque le cartilage est aneural et avasculaire, le transport de messages est limité. Nous savons que les chondrocytes sont sensibles à une pression ou à une déformation. Toutefois, la façon dont les chondrocytes reçoivent l'information provenant de l'environnement mécanique et convertissent celle-ci pour changer l'expression de gènes spécifiques du noyau est encore peu connue. Le chargement du cartilage est nécessaire pour maintenir la composition et la structure du cartilage. Lorsque l'intensité ou la fréquence du chargement dépasse un certain seuil, la balance entre la synthèse et la dégradation peut être modifiée et des changements au niveau de la microstructure ou de la composition du cartilage peuvent survenir.

1.1.1.4 Variation de la structure et de la composition selon la profondeur

La structure et la composition du cartilage, c'est-à-dire la forme des cellules, le diamètre et l'orientation des fibres de collagène et la concentration des protéoglycanes, varient en fonction de la profondeur. Le cartilage peut être divisé en quatre zones : zone superficielle (tangentielle), zone de transition, zone profonde (radiale) et zone du cartilage calcifié. Le cartilage non calcifié est séparé du cartilage calcifié par le *tidemark*. Dans la

zone superficielle, les fibres de collagène sont parallèles à la surface, les chondrocytes ont une forme allongée discoïdale avec l'axe long parallèle à la surface et le contenu de protéoglycanes est à son plus bas niveau. Dans la zone de transition, les fibres de collagène ont un diamètre plus important et sont moins bien organisées, alors que les chondrocytes ont une forme plus ronde. Dans la zone profonde, la concentration de protéoglycanes est plus élevée, alors que celle de l'eau est plus faible. Les fibres de collagène ont un grand diamètre et sont orientées verticalement par rapport à la surface. Les chondrocytes ont une forme sphérique et sont arrangées en colonnes. La zone calcifiée sépare le cartilage hyalin de l'os subchondral.

1.1.2 Fonctions physiologiques

Une des principales différences entre l'os et le cartilage est le contenu d'eau. Puisque le cartilage contient entre 65 et 80% d'eau, il peut remplir ses deux principales fonctions physiologiques qui sont d'assurer une interface sans friction et une lubrification au niveau de l'articulation pendant les mouvements et de transmettre et distribuer les contraintes mécaniques aux structures osseuses sous-jacentes. Contrairement à l'os, le cartilage ne possède pas la capacité de se réparer, car il est avasculaire, aneural et sa réponse immunologique est très faible.

1.1.3 Propriétés mécaniques

Le cartilage peut être décrit comme un matériau composite car il est composé de phases solide et liquide. En effet, il contient 65 à 80% d'eau qui se situe dans les pores microscopiques du tissu. La taille de ces pores correspond à la distance entre deux chaînes de GAG voisines qui est d'environ 5 nm. L'eau peut s'écouler à travers la matrice solide lorsqu'un gradient de pression ou une compression est appliqué au cartilage. Le cartilage est caractérisé par un comportement viscoélastique. Lorsqu'il est soumis à une charge (fluage) ou à une déformation constante (relaxation), il a un comportement

dépendant du temps, jusqu'à ce que l'état d'équilibre soit atteint. Lors de la compression du cartilage, la matrice se déforme et devient plus compacte, ce qui augmente la pressurisation et force le fluide à s'écouler vers l'extérieur du tissu par les pores de la matrice.

Le module de compression à l'équilibre de la matrice solide du cartilage varie entre 0.4 et 1.5 MPa. Le module de tension varie entre 5 et 50 MPa selon la profondeur, l'endroit et l'orientation du cartilage. La perméabilité hydraulique diminue de façon non linéaire en fonction de la compression. De plus, elle est directement proportionnelle au contenu d'eau et inversement proportionnelle au contenu de protéoglycanes. Lors d'une compression, la concentration de protéoglycanes augmente et la porosité et la perméabilité hydraulique de la matrice diminuent.

L'ostéoarthrite est une maladie liée à la dégénérescence du cartilage. Elle est caractérisée par une augmentation du contenu d'eau dans le cartilage, une diminution du contenu de protéoglycanes ainsi que des changements dans la grandeur et l'arrangement des fibres de collagène. La dégradation du cartilage est liée à une augmentation de la perméabilité hydraulique de la matrice extracellulaire qui se traduit par une diminution de la pressurisation du fluide et de la force de la matrice de collagène et de protéoglycanes. Plusieurs auteurs ont étudié en détail les processus de dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage (Woessner J. F. et al., 1993) et (Buckwalter J. A. et al., 1997b). Dans cette section, nous avons présenté un bref résumé des caractéristiques du cartilage articulaire. Plusieurs ouvrages de référence peuvent être consultés pour avoir une analyse plus détaillée des différentes composantes de la matrice extracellulaire du cartilage (Heinegard D. et al., 1989), (Hay E. D., 1991) et (Buckwalter J. A. et al., 1997a)

1.2 Les potentiels d'écoulement

Les premières mesures de potentiel d'écoulement sur le cartilage ont été effectuées en 1969 (Maroudas A. et al., 1969). Dans cette section, nous allons présenter le mécanisme moléculaire qui est à l'origine de la création d'un potentiel d'écoulement ainsi que les différentes techniques de mesure.

1.2.1 Mécanisme moléculaire

La figure 1.3 décrit la façon dont un potentiel d'écoulement est créé lors de la compression du cartilage.

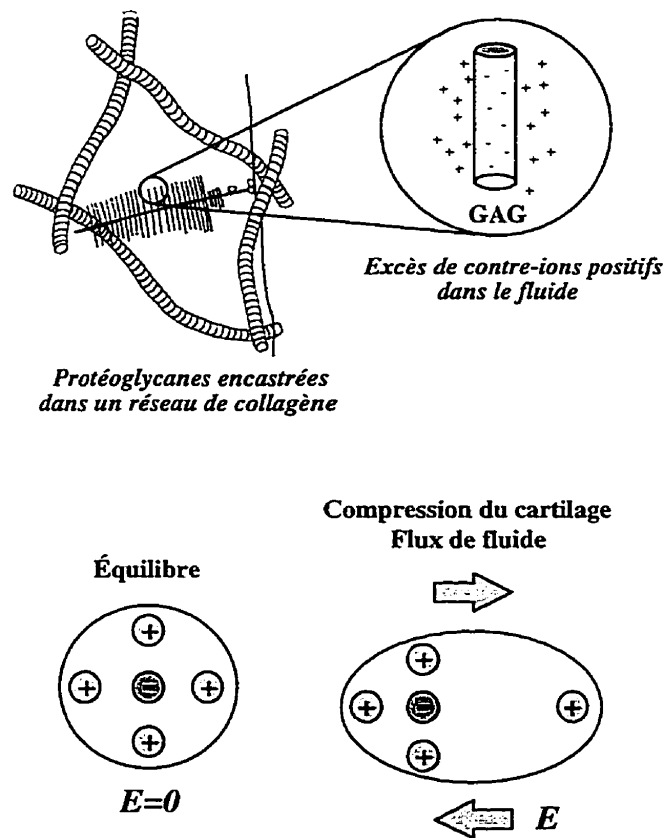


Figure 1.3 Mécanisme moléculaire à l'origine de la création d'un potentiel d'écoulement

Dans le cartilage, les protéoglycanes sont encastrées dans le réseau de collagènes. Puisque les protéoglycanes sont chargées négativement, il y a un excès de charges positives mobiles dans le fluide. Sous des conditions d'équilibre, c'est-à-dire lorsqu'il n'y a pas de chargement appliqué au cartilage ou de flux de fluide, les ions positifs sont organisées de façon symétrique par rapport aux protéoglycanes et aucun champ électrique macroscopique net n'existe. Lorsque le cartilage est comprimé, le flux de fluide entraîne un déplacement des ions positifs par rapport aux charges négatives fixes. Un champ électrique et un potentiel d'écoulement sont alors créés.

1.2.2 Techniques de mesure des potentiels d'écoulement

La technique habituelle de mesure des potentiels d'écoulement est caractérisée par une compression confinée du cartilage. Dans cette géométrie, le cartilage est placé entre une électrode de référence et une électrode poreuse. Puisque le cartilage est confiné dans la direction radiale, le fluide s'écoule dans la direction axiale en entraînant les ions positifs mobiles par rapport aux protéoglycanes fixes et chargées négativement. La différence de potentiel est mesurée entre les deux électrodes.

Les potentiels d'écoulement peuvent également être mesurés dans la géométrie de compression non confinée. Dans cette configuration, le cartilage prend de l'expansion dans la direction radiale lorsqu'il est comprimé. Le fluide s'écoule également dans la direction radiale en entraînant les ions positifs mobiles. Les électrodes peuvent être situées de part et d'autre du tissu ou à la surface du cartilage. Les mesures de potentiels d'écoulement dans une géométrie de compression confinée ou non confinée à l'aide de deux électrodes placées de part et d'autre du tissu présente le désavantage de ne pas pouvoir être applicables cliniquement, car le cartilage doit être extrait de l'articulation.

Il existe un troisième type de test qui est utilisé pour évaluer les propriétés mécaniques du cartilage : le test d'indentation. Dans ce cas, la compression du cartilage

est effectuée en appliquant directement une tige sur la surface du cartilage. Cette méthode présente l'avantage d'être non destructive. Ce type de test n'est toutefois pas encore utilisé pour mesurer les potentiels d'écoulement.

Nous avons choisi une géométrie de compression non confinée pour mesurer les potentiels d'écoulement à la surface articulaire du cartilage. La figure 1.4 présente un schéma simplifié du montage électromécanique que nous utilisons. Le cartilage est placé en contact avec une série linéaire de 8 électrodes. Lors de la compression du cartilage, nous mesurons les différences de potentiel entre deux électrodes voisines. L'utilisation d'une série linéaire de plusieurs électrodes plutôt que deux électrodes placées de part et d'autre du cartilage présente l'avantage d'être une méthode de mesure non destructive, car le cartilage ne doit pas être extrait de l'articulation pour être testé. De plus, elle permet d'obtenir la distribution spatiale des potentiels d'écoulement sur la surface articulaire du cartilage. Les premières mesures de potentiels d'écoulement ont été effectuées à l'aide de 4 électrodes (Garon M. et al., 1997). Nous avons ensuite construit une deuxième microélectrode composée de 8 électrodes. Nous présenterons en détail, dans le chapitre 3, les mesures de potentiels d'écoulement que nous avons effectuées sur des cartilages normaux et dégradés (Légaré A. et al., 1998).

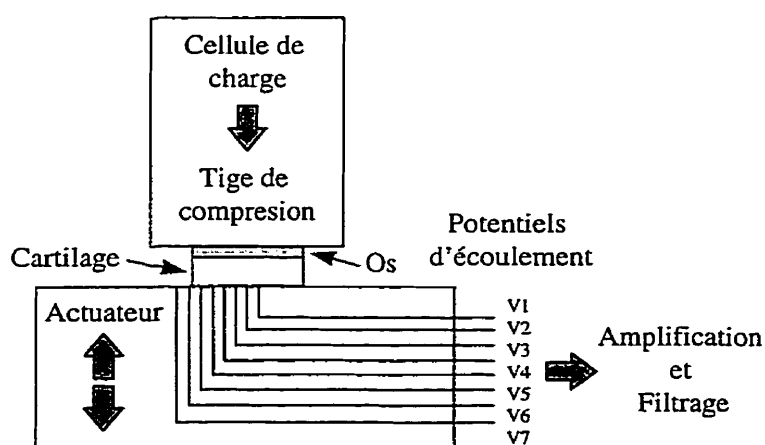


Figure 1.4 : Mesure des potentiels d'écoulement à l'aide d'une série linéaire de 8 électrodes dans une géométrie de compression non confinée

1.3 Microélectrode

Les électrodes sont utilisées depuis déjà longtemps pour étudier les phénomènes électrophysiologiques du corps humain. Par conséquent, les méthodes de fabrication sont nombreuses et les applications sont très variées. Il existe deux principales catégories d'électrodes qui peuvent servir à enregistrer des événements bioélectriques ou à stimuler des tissus. Contrairement aux électrodes de stimulation, les électrodes qui enregistrent des signaux électriques, tels que les potentiels d'écoulement, sont caractérisées par une densité de courant très faible pour éviter les problèmes de polarisation. L'impédance de contact entre les électrodes et le tissu doit être minimale afin que des signaux électriques de faible amplitude soient mesurables sur la plage de fréquences considérées. De plus, pour une application clinique, les électrodes doivent être biocompatibles avec le corps humain.

Dans cette section, nous allons d'abord décrire la technique de fabrication d'une série linéaire de 8 électrodes. Nous allons également présenter d'autres méthodes de fabrication qui peuvent être utilisées pour construire une microélectrode. Nous discuterons ensuite des caractéristiques électriques des électrodes, c'est-à-dire l'influence du plaquage sur les mesures d'impédance des électrodes. Finalement, les résultats que nous avons obtenus seront comparés avec la littérature.

1.3.1 Fabrication d'une série linéaire de 8 électrodes

Nous avons développé une technique de mesure des potentiels d'écoulement, dans une géométrie de compression non confinée, à l'aide d'une série linéaire de 8 électrodes. La figure 1.5 présente une photo de la surface des 8 électrodes de 50 μm de diamètre qui sont distancées d'environ 300 μm . Lors de la compression du cartilage, les potentiels

d'écoulement peuvent être mesurés sur une distance totale de 2.1 mm, ce qui permet de couvrir un peu plus que le rayon d'un disque de 3 mm de diamètre.

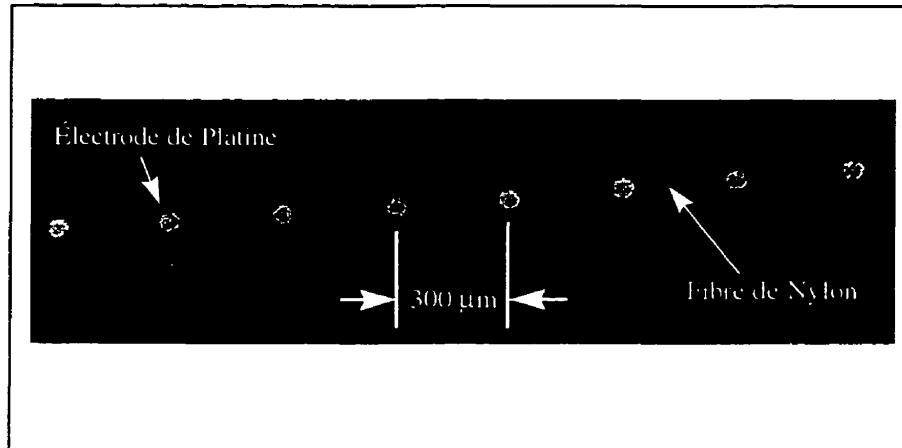


Figure 1.5 : Image au microscope de la surface des 8 électrodes

Lors de la fabrication de la microélectrode, 8 fils de platine ont été faufileés dans une grille de nylon. Sur la photo précédente, nous pouvons voir des points de plus faible intensité qui représentent les fibres de nylon parallèles aux électrodes. La grille de nylon a ensuite été encastrée dans un cylindre d'époxy qui a été placé dans la chambre de test fabriquée en delrin, un matériau plastique très résistant.

1.3.1.1 Insertion des électrodes dans la grille de nylon

Les fils utilisés pour la fabrication de la microélectrode sont en platine 80% et iridium 20% et ont un diamètre de 50 μm . La grille dans laquelle les fils sont entrelacés est composée de fibres de nylon de 60 μm de diamètre qui sont espacées de 88 μm . À l'aide de la figure 1.6, nous pouvons observer que les fils de platine sont insérés dans la grille de façon précise, c'est-à-dire à toutes les 7 mailles, sur une longueur d'environ 5 mm. La région supérieure imprécise et la région de test permettent de faire des essais lors de l'usinage de la chambre de test. La distance entre chaque électrode est de 2 mailles ou

296 μm . Les 8 fils de platine sont soudés à des connecteurs qui sont reliés à des fils de cuivre 36 AWG engainés de téflon.

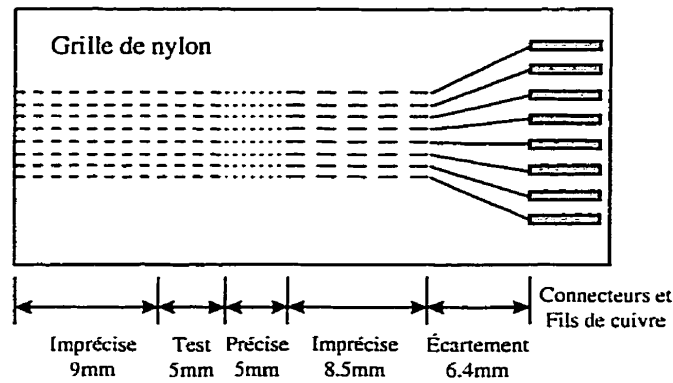


Figure 1.6 : Insertion des électrodes dans la grille de nylon

1.3.1.2 Usinage de la chambre de test

La figure 1.7 présente les étapes de fabrication de la microélectrode. Lors de l'assemblage, la grille de nylon dans laquelle sont insérées les électrodes est collée au noyau d'époxy. Elle doit être centrée et parallèle à la surface. Le noyau d'époxy est ensuite placé à l'intérieur de la pièce de delrin. Le coulage de l'époxy se fait à l'aide d'une aiguille goutte par goutte pour éviter la formation de bulles. L'époxy doit sécher pendant plusieurs jours pour favoriser le durcissement et la libération de contraintes internes.

Lors de l'usinage de la chambre de test, nous avons utilisé un tour qui effectue une coupe de l'objet, de la périphérie vers le centre. La vitesse de rotation du tour a été fixée à 1100 rpm (high) et la vitesse de l'outil (carbure ACT AL6 370 3/8 de pouce) à 15 pi-min. Il est préférable d'arroser la pièce avec de l'alcool ou de l'eau lors de la coupe pour éviter l'augmentation de chaleur. Nous avons coupé la surface supérieure dans la zone de test jusqu'à ce que la zone précise soit atteinte (figure 1.6). Nous avons ensuite sablé la

surface à une vitesse de 370 rpm (low) avec du papier 400 puis 600 grains (enroulé sur un bloc) en arrosant avec de l'eau. Un sablage final a été effectué à la main avec du papier 600 grains. Nous avons utilisé une loupe binoculaire pour vérifier la surface de la microélectrode après chaque coupe. La résistance moyenne des 8 électrodes est de 5.3Ω . Il serait probablement préférable d'utiliser un outil nommé *high speed* plutôt que celui en carbure lors de l'usinage d'une prochaine microélectrode. Il est à noter que l'électrode a été fabriquée par Antoine Deslauriers. De plus, le cylindre de delrin qui a été utilisé pour fabriquer la chambre de test ainsi que le noyau d'époxy ont été usinés selon les plans qui sont présentés à l'annexe I.

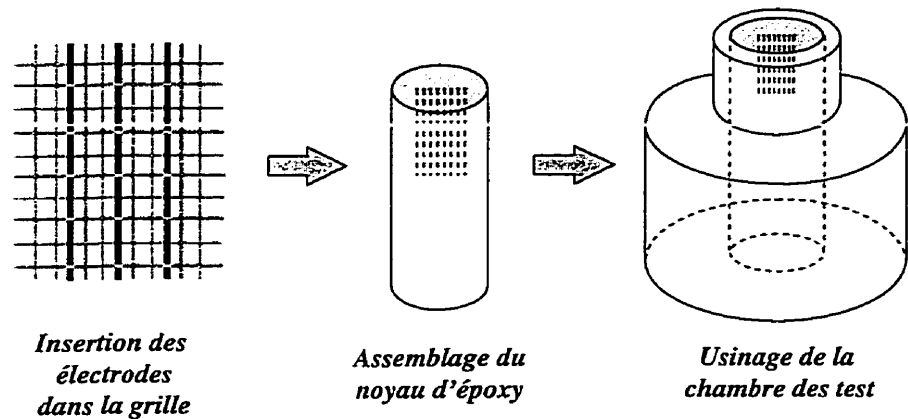


Figure 1.7 : Usinage de la microélectrode

Nous avons noté plusieurs paramètres qui peuvent influencer la fabrication de la microélectrode. En effet, lors de l'assemblage, il est important de laisser durcir l'époxy pendant plusieurs jours. Après 24 heures de durcissement, nous avons remarqué, lors de la coupe, que l'outil déplace les 2 électrodes situées à proximité du centre de la pièce et laisse des traces circulaires de platine vis à vis chacune des électrodes. De plus, après la coupe, les électrodes sont ovales avec un diamètre supérieur à $50 \mu\text{m}$. Il faut alors sabler la surface jusqu'à ce que les traces circulaires de platine disparaissent et que le diamètre des électrodes soit retrouvé.

Si la grille de nylon bouge lors de l'assemblage ou s'il y a une distorsion dans la grille lors du coulage de l'époxy, il est possible que les fibres de nylon ne soient plus perpendiculaires et parallèles à la surface. Dans ce cas, la coupe et le sablage peuvent arracher la fibre de nylon et laisser une rainure dans certaines régions de la surface des électrodes. Ces régions doivent être le plus éloignées possible des 8 électrodes, car elles peuvent influencer l'écoulement de fluide lors de mesures sur le cartilage. Nous avons d'ailleurs observé ce phénomène lors des mesures de potentiel d'écoulement que nous avons effectuées avec une microélectrode différente. La figure 1.8 présente une photo de la surface des 4 électrodes. Nous pouvons constater que la fibre de nylon qui est parallèle à la surface des électrodes est arrachée.

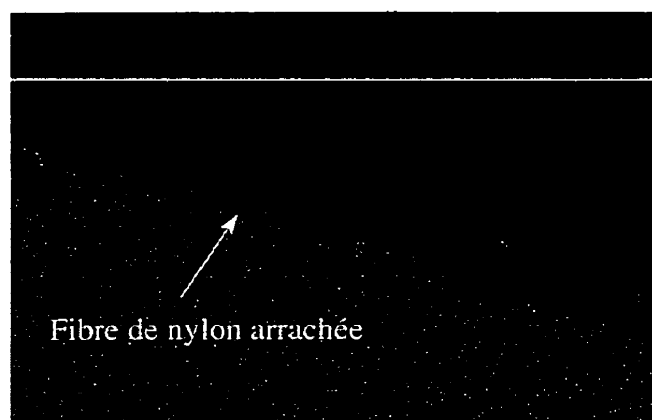


Figure 1.8 : Surface de la microélectrode avec la fibre de nylon arrachée

1.3.2 Autres techniques de fabrication des électrodes

La technique de fabrication que nous avons utilisée est basée sur la méthode qui a été développée en 1992 pour mesurer le courant transmembranaire du tissu cardiaque. Pour cette application, différentes configurations d'électrodes ont été réalisées à partir de fils d'argent de 25 et 75 μm de diamètre. Les fils ont été enfilés perpendiculairement dans 3 grilles de nylon successives, de façon à isoler chacune des électrodes. Les fils d'argent

ont ensuite été reliés à des câbles multibrins flexibles et la grille de nylon a été encastrée dans une matrice d'époxy. Un électroplaquage avec chlorure a été réalisé afin de diminuer l'impédance des électrodes. Les signaux électriques mesurés sur le tissu cardiaque ont une amplitude qui varie entre -90 mV et 30 mV. Le système d'acquisition des signaux est caractérisé par une impédance d'entrée de l'amplificateur de l'ordre $10^{12} \Omega$ et des filtres passe-haut et passe-bas qui ont respectivement des fréquences de coupure de 0.2 et 500 Hz (Witkowski et al., 1992). Dans notre cas, les fils ont été entrelacés dans une grille de nylon parallèle et non perpendiculaire aux fils. L'utilisation d'une grille de nylon parallèle permet d'éviter tout court-circuit éventuel entre deux électrodes voisines. De plus, nous mesurons des signaux de plus faible amplitude (surtout pour les cartilages dégradés) et à des fréquences beaucoup plus basses que les mesures qui sont effectuées sur le tissu cardiaque. Nous utilisons donc un système d'acquisition qui est différent et qui sera présenté à la section 1.4.

Plusieurs autres méthodes peuvent être utilisées pour fabriquer les électrodes. Certaines équipes de recherche ont développé des techniques de microlithographie pour construire un réseau sophistiqué d'électrodes en platine ou en or (Chidsey C. E. et al., 1986) et (Drake K. L. et al., 1988). D'autres ont choisi d'utiliser une aiguille de seringue pour faire passer une douzaine électrodes d'argent (Moore K. B. et al., 1990).

1.3.3 Caractéristiques électriques des électrodes

Les potentiels d'écoulement qui sont mesurés sur la surface articulaire du cartilage, lors de la compression sinusoïdale, sont de l'ordre du millivolt pour des fréquences entre 0.01 et 1 Hz. Il est donc primordial que l'impédance de contact entre les électrodes et le tissu soit beaucoup plus faible que l'impédance d'entrée des préamplificateurs. À l'aide du circuit électrique qui est présenté à la figure 1.9, nous pouvons constater que, lorsque l'impédance d'entrée du préamplificateur est beaucoup

plus élevée que celle des électrodes, l'amplitude du signal mesuré correspond à celle du signal d'entrée ($V_{out} = V_{in}$ pour $Z_{\text{électrode}} < R_{\text{préamp}}$).

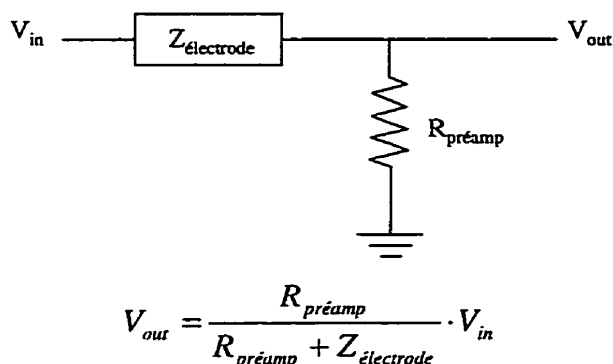


Figure 1.9 : Circuit électrique équivalent lors des mesures de potentiel d'écoulement

L'impédance est inversement proportionnelle à la surface des électrodes et elle augmente lorsque la fréquence diminue. Si le diamètre des électrodes est petit, la résolution spatiale est bonne, mais l'impédance est plus élevée. Puisque nous sommes intéressé au comportement du cartilage à basse fréquence et que nous voulons détecter les potentiels d'écoulement sur des cartilages qui ont été traités avec des agents de dégradation comme l'IL-1 α ou l'APMA, il est important de s'assurer que l'impédance des électrodes est minimale.

1.3.3.1 Plaquage des électrodes

Il existe différentes techniques de plaquage afin de minimiser l'impédance de contact des électrodes. Le but du plaquage est d'augmenter la surface des électrodes et par conséquent, de diminuer l'impédance de contact. En 1970, Feltham A. M et al. ont publié un article sur le noir de platine. Ils ont déterminé que les conditions optimales d'électroplaquage au noir de platine sont obtenues pour une densité de courant de 100 à 200 mA/cm² pendant 1 à 3 minutes à travers une solution d'acide chloroplatinique 1 à 3%

avec 0.08% d'acétate de plomb (Feltham A. M. et al., 1971). Il a également été démontré que l'utilisation des ultrasons lors du plaquage permet d'augmenter la surface des électrodes ainsi que l'adhérence du dépôt qui résiste donc plus longtemps (Marrese C. A., 1987). Il est important de noter que les conditions de plaquage peuvent être différentes selon la géométrie et le matériau des électrodes.

Avant d'effectuer des mesures de potentiel d'écoulement sur la surface articulaire du cartilage, nous avons plaqué les électrodes à l'aide d'une solution d'acide chloroplatinique qui a été mise au point par Pierre Le Guyader et Pierre Savard. Cette solution de plaquage est composée de 3% PtCl_4 + 0.025% AcPb + 0.5 N HCl . Lors du mélange des ingrédients, il est préférable de dissoudre préalablement l'acétate de plomb dans le HCl pour augmenter la résistance de la couche de noir de platine. Afin d'augmenter l'adhérence du noir de platine sur la surface des électrodes, le plaquage est effectué dans un bain à ultrasons. La surface des électrodes est placée en contact avec une solution d'acide chloroplatinique. Une électrode de platine sert de référence dans la solution d'acide chloroplatinique. Lors du plaquage, une densité de courant de 400 mA/cm^2 est appliquée entre les électrodes de mesure et l'électrode de référence pendant 1 ou 2 fois 1 minute. L'électrode de référence agit comme l'anode alors que les électrodes de mesure représentent la cathode d'une cellule électrolytique contenant une solution d'acide chloroplatinique. Nous avons observé que le plaquage augmente significativement l'aire des électrodes. Toutefois, il semble qu'une partie du noir de platine se dépose à la surface du cartilage lors des mesures de potentiel d'écoulement. L'adhérence de noir de platine à l'électrode est primordiale car la solution de plaquage qui contient du plomb n'est pas biocompatible.

1.3.3.2 Mesure de l'impédance des électrodes

L'impédance de contact des électrodes est mesurée en plaçant une électrode de référence d'Ag-AgCl de 1.3 mm de diamètre à la surface des 8 électrodes. Lorsque les

mesures sont effectuées à basses fréquences, la résistivité de la solution saline de test et l'impédance de contact de l'électrode d'Ag-AgCl sont négligeables. L'impédance de contact des électrodes ($Z_{\text{électrode}}$) peut donc être calculée en mesurant la tension de sortie (V_{out}) du circuit présenté à la figure 1.10 lorsque la tension d'entrée (V_{in}) est connue pour différentes fréquences. Il est important de noter que la résistance R doit être du même ordre de grandeur que l'impédance des électrodes.

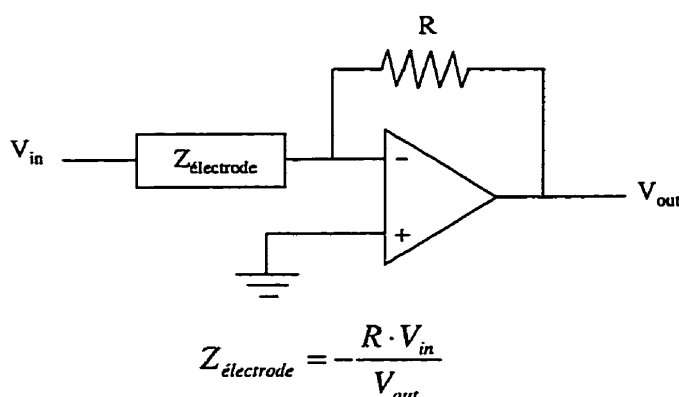


Figure 1.10 : Circuit électrique équivalent lors des mesures d'impédance des électrodes

Avant chacune des séries de mesures électromécaniques qui seront décrites en détail dans le chapitre 3, nous avons effectué un plaquage des électrodes. La figure 1.11 présente les mesures d'impédance qui ont été réalisées sur les électrodes dans une solution saline de 0.15 M NaCl. Chaque courbe représente l'impédance moyenne des 8 électrodes. La figure 1.11 a) présente les résultats d'un test préliminaire que nous avons effectué pour vérifier l'effet du plaquage sur les mesures d'impédance. Nous avons observé que l'impédance des électrodes directement après le plaquage est de 0.2 MΩ à 0.5 Hz. Après une mesure des potentiels d'écoulement sur un cartilage, l'impédance a augmenté à 1.1 MΩ. Nous avons également observé qu'une partie du noir de platine s'est déposée à la surface du cartilage. La façon la plus efficace d'enlever le plaquage est de passer délicatement une efface à la surface des électrodes. Lorsque nous avons effacé le

plaquage, les électrodes ont retrouvé leur impédance initiale qui se situe autour de 8.6 M Ω .

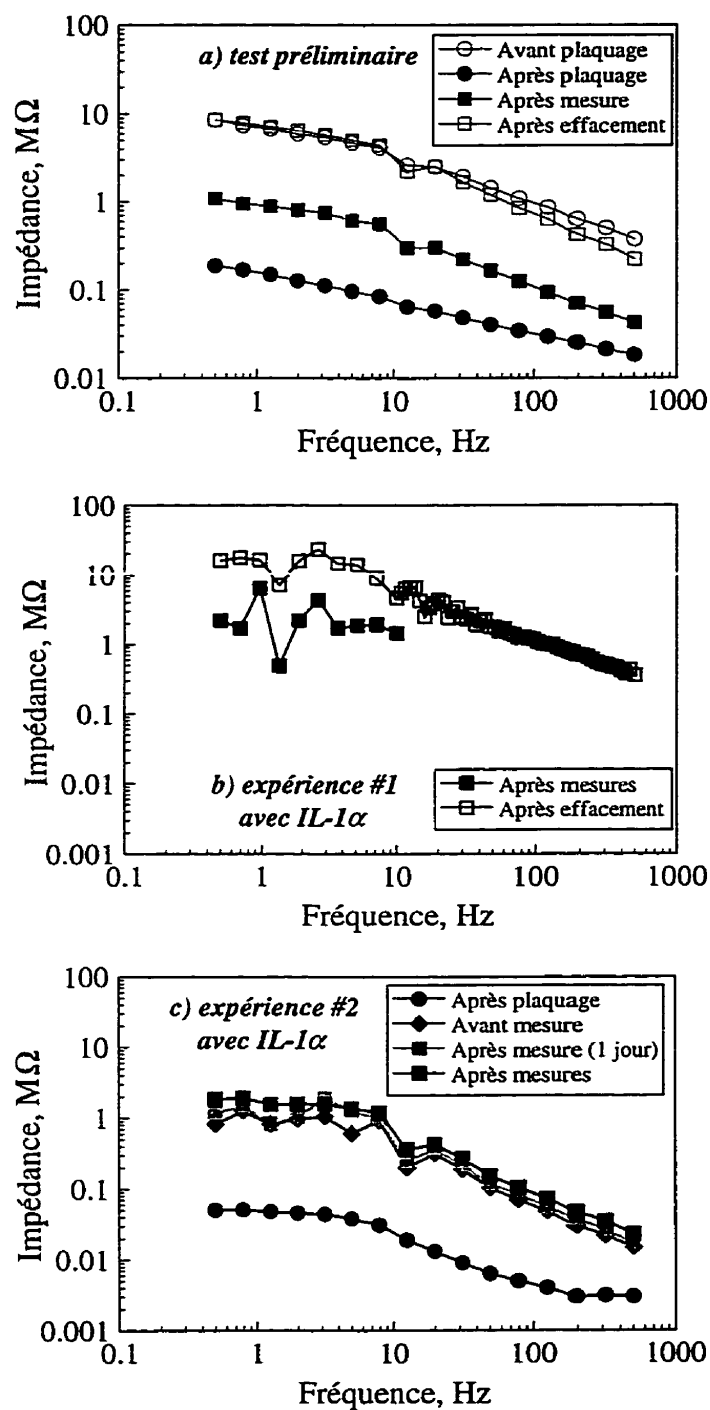


Figure 1.11 : Variation de l'impédance des électrodes en fonction de la fréquence lors de a) un test préliminaire, b) la première expérience avec IL-1 α et c) la deuxième expérience avec IL-1 α .

La figure 1.11 b) présente l'impédance des électrodes lors de la première expérience avec IL-1 α qui sera décrite dans les chapitres 2 et 3. L'impédance des électrodes avec plaquage à la fin des mesures est autour de 2.2 M Ω à 0.5 Hz. L'effacement des électrodes augmente l'impédance à environ 16 M Ω . La figure 1.11 c) présente les mesures d'impédance qui ont été effectuées lors de la deuxième expérience avec IL-1 α . Nous pouvons constater qu'après le plaquage, l'impédance est autour de 0.05 M Ω à 0.5 Hz. Contrairement aux résultats qui ont été présentés en a), nous avons passé un kleenex mouillé sur la surface des électrodes avant les mesures pour éviter que le noir de platine se dépose sur la surface articulaire du cartilage, ce qui a eu pour effet d'augmenter l'impédance à 0.8 M Ω . Après le premier jour de mesure, l'impédance a augmenté à 1.2 M Ω et elle est restée stable jusqu'à la fin des mesures.

À l'aide des résultats précédents, nous pouvons conclure que le plaquage diminue significativement l'impédance des électrodes d'un facteur 10 (~1 M Ω pendant les mesures avec plaquage et ~10 M Ω après l'effacement, à 0.5 Hz). Puisque l'impédance d'entrée du préamplificateur est de 1.5 G Ω à 20 Hz et que l'impédance des électrodes pendant les mesures est d'environ 0.5 M Ω à la même fréquence, nous pouvons supposer que l'impédance de contact des électrodes est négligeable et n'influence pas les signaux électriques mesurés. L'impédance des électrodes sans plaquage (~5 M Ω à 20 Hz) est également faible par rapport à l'impédance d'entrée des préamplificateurs. Nous avons donc effectué des mesures de potentiel d'écoulement avec les électrodes sans plaquage. Nous avons constaté que le plaquage diminuait l'amplitude du bruit lors des mesures de potentiel d'écoulement. En effet, lorsque l'acquisition des mesures se fait à un taux de 10000 points par seconde et que le moyennage est effectué sur 200 points, l'amplitude du bruit dans les signaux pour des électrodes avec et sans plaquage est respectivement de 0.005 et 0.05 mV. Nous pouvons donc supposer que le plaquage des électrodes est nécessaire lors des mesures de potentiel d'écoulement pour minimiser la contamination

des signaux par le bruit et ce, d'autant plus quand les cartilages sont dégradés. Toutefois, il est probable que le plaquage ne soit pas nécessaire pour des signaux avec une amplitude plus élevée, comme les potentiels d'écoulement mesurés lors du test de relaxation de contrainte.

1.3.3.3 Comparaison des résultats avec la littérature

De Boer R. W. et Van Oosterom A. ont établi un modèle pour étudier la variation de l'impédance des électrodes en fonction de la fréquence. L'impédance des électrodes de platine est modélisée par une résistance en série avec une capacitance. Ce modèle prédit une relation linéaire décroissante entre l'impédance et la fréquence, ce qui correspond à ce que nous avons observé à la figure 1.7. En déterminant l'équation de la droite qui relie l'impédance des électrodes avec la fréquence, nous pouvons déduire le comportement des électrodes à très basse fréquence (De Boer R. W. et al., 1978).

Les caractéristiques électriques des électrodes changent selon le matériau de fabrication qui est utilisé. En 1978, les propriétés électriques des électrodes de platine (Pt) 70% et iridium (Ir) 30% ont été étudiées in vivo et in vitro. Au cours de cette étude, l'impédance d'une électrode de 0.25 mm de diamètre variait entre 200 et 60 Ω pour des fréquences de 9 Hz à 10 kHz, après un plaquage pendant 100 ms dans une solution de 0.1% H_2PtCl_6 , 0.25% acétate de plomb et 0.025 N HCl avec un voltage de 5 à 15 volts (Zeuthen T., 1978). Les électrodes que nous utilisons pour mesurer les potentiels d'écoulement ont une dimension très inférieure (50 μm de diamètre). En multipliant les valeurs d'impédance que nous avons obtenues par l'inverse du rapport des aires des électrodes, nous observons que l'impédance mesurée par cette équipe est environ 80 fois plus élevée.

En 1982, une étude de l'impédance des électrodes de Pt, PtIr et Ir et de l'influence d'un traitement de l'iridium avec un procédé de gravure électrolytique a été réalisée. Il a été démontré que, pour une géométrie de 4 électrodes de 100 μm de diamètre, l'impédance des électrodes de Pt et de Pt 90% et Ir 10% est d'environ 1.3 $\text{M}\Omega$ à 10 Hz. Les électrodes d'Ir ont une impédance qui est 2 fois plus faible. Le traitement de gravure électrolytique diminue significativement l'impédance des électrodes d'Ir et de PtIr (Gielen F. L. H. et al., 1982). Ces résultats sont comparables à ceux que nous avons obtenus pour des électrodes de Pt 80% et Ir 20% de 50 μm de diamètre (1 $\text{M}\Omega$ à 10 Hz, pendant les mesures).

Les électrodes d'Ag-AgCl sont utilisées régulièrement pour mesurer les propriétés électriques des tissus biologiques, car elles sont caractérisées par une impédance de contact faible. Par contre, il a été démontré que les électrodes d'Ag-AgCl peuvent être toxiques pour certains tissus biologiques (Jackson W. F. et al., 1983). Une étude a été réalisée, en 1987, pour comparer les propriétés des électrodes de Pt 90% et Ir 10% par rapport aux électrodes d'Ag-AgCl. L'électrode de PtIr qui est insérée dans un tube de verre a un diamètre de 0.38 mm. Elle a une impédance de 10 $\text{k}\Omega$ à 0.1 Hz après un plaquage avec une densité de courant de 0.45 mA/mm^2 dans une solution d'acide chloroplatinique 3% (H_2PtCl_6) et 0.025% d'acétate de plomb. Il a été démontré que les électrodes de PtIr plaquées ont des propriétés électriques comparables aux électrodes d'Ag-AgCl (Cote K. R. et al., 1987). Les impédances qui ont été mesurées par cette équipe sont environ 3 fois plus élevées que celles que nous avons obtenues en tenant compte de l'aire des électrodes.

En 1990, une étude détaillée des propriétés électriques des électrodes de platine, d'argent, d'aluminium, de cuivre et de palladium a été réalisée. Dans cet article, l'interface entre l'électrode et l'électrolyte est modélisée par une résistance et une capacitance en série. La variation de la résistance et de la capacitance en fonction de la

fréquence et de la densité de courant a été mesurée pour les différents types d'électrodes (Ragheb T. et al., 1990).

Les propriétés électriques du tissu cardiaque ont été analysées dans les mémoires de maîtrise de Pierre Le Guyader et Luc Pouliot qui présentent deux techniques de fabrication de microélectrodes. Ils ont également étudié l'influence du plaquage sur les mesures d'impédance des électrodes (Le Guyader P., 1992) et (Pouliot L., 1994).

1.4 Montage électromécanique, acquisition et analyse des signaux électriques

La figure 1.12 a) présente une photo du montage électromécanique qui est principalement composé d'un actuateur, d'une cellule de charge et d'un bâti en acier inoxydable. Le déplacement de l'actuateur et l'acquisition des données sont effectués par l'entremise d'un ordinateur. En effet, une interface GPIB permet de contrôler le déplacement de l'actuateur, une carte digitale assure la lecture de la position et une carte analogue effectue l'acquisition de la charge et des signaux électriques mesurés. Des programmes écrits en *Labview* permettent de contrôler le déplacement de l'actuateur et l'acquisition des données.

Une chambre de test circulaire et non conductrice est fixée sur l'actuateur. Lors des mesures de potentiels d'écoulement, la surface articulaire du cartilage est placée en contact avec les électrodes et la chambre de test est remplie d'une solution de 0.01 M ou 0.15 M NaCl. Quatre électrodes d'Ag-AgCl d'environ 0.8 mm de diamètre sont placées dans la solution de la chambre de test (figure 1.12 b)). Une première électrode d'Ag-AgCl sert de référence alors que les trois autres sont utilisées pour l'asservissement. En effet, tout au long des mesures, le potentiel dans la solution de test est mesuré à l'aide d'une des trois électrodes et de l'électrode de référence. Les deux autres électrodes injectent un courant de façon à ce que le potentiel dans la solution de test soit toujours nul.

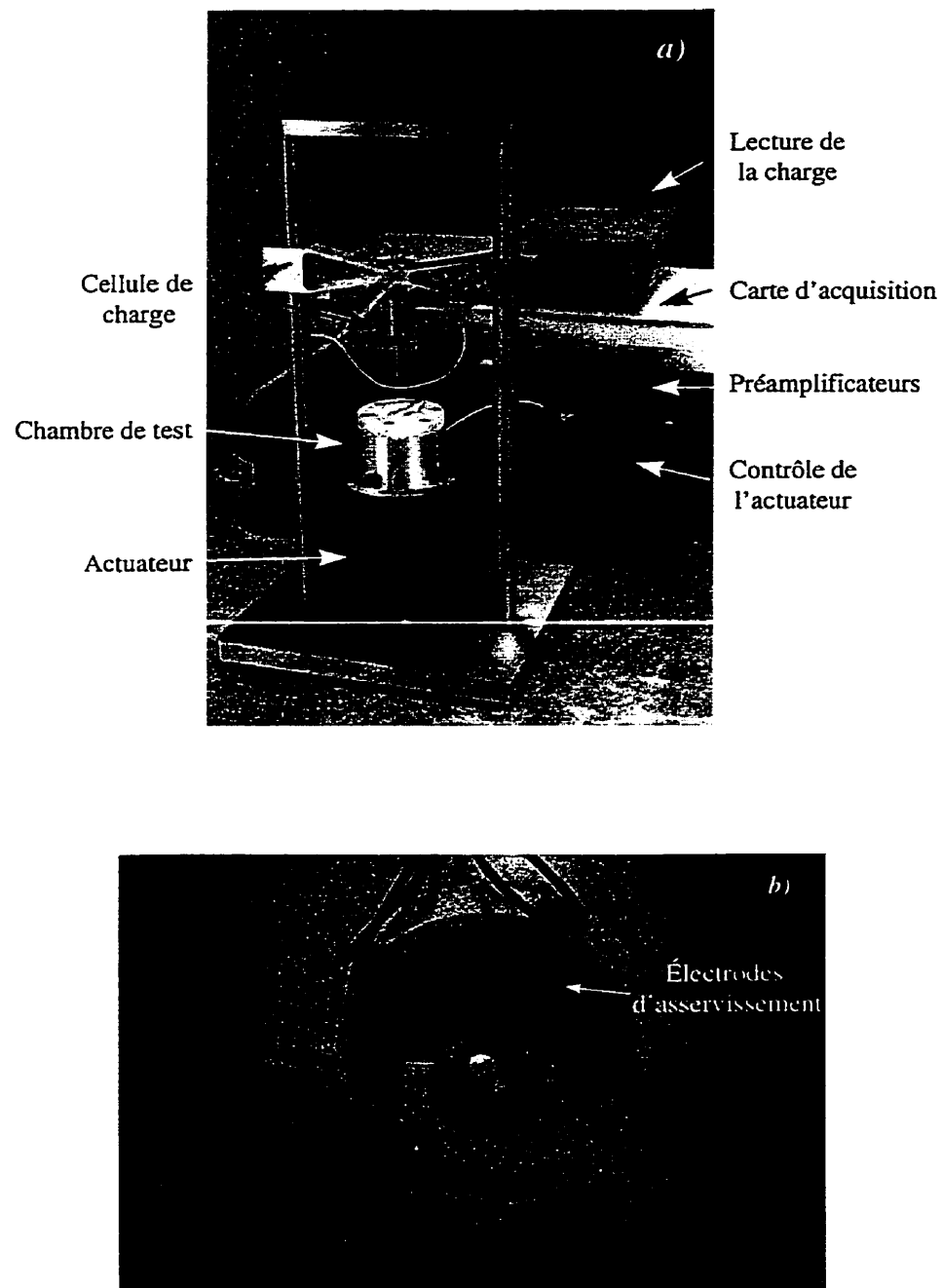


Figure 1.12 : a) Montage électromécanique de mesure des potentiels d'écoulement et b) vue agrandie de la chambre de test

Lors de la compression non confinée du cartilage, les potentiels d'écoulement qui sont mesurés à l'aide des électrodes ont une amplitude de l'ordre du millivolt. Par conséquent, avant d'être transférés à l'ordinateur, les signaux électriques doivent passer par un préamplificateur, un amplificateur d'instrumentation et des filtres passe-haut et passe-bas. La figure 1.13 présente un schéma simplifié du circuit électronique de prétraitement des potentiels d'écoulement qui a été réalisé sous la supervision de Robert Guardo.

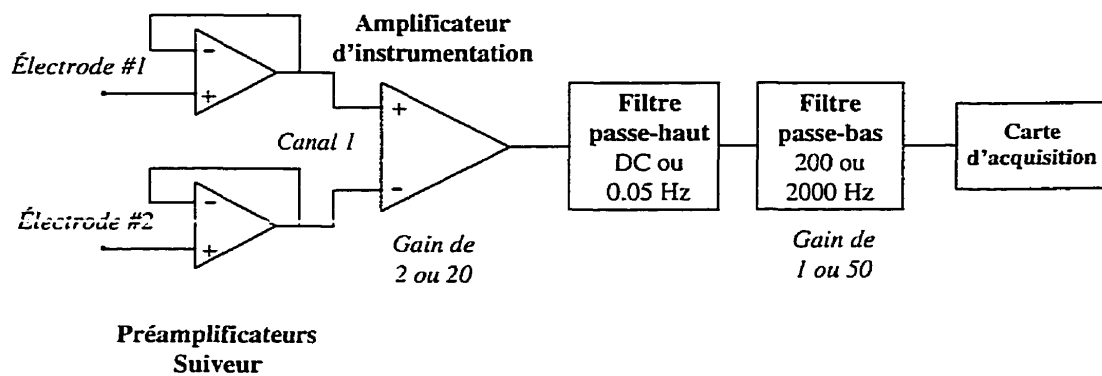


Figure 1.13 : Circuit électrique d'amplification et de filtrage des signaux

Les potentiels d'écoulement qui sont mesurés à l'aide des électrodes doivent d'abord passer par un préamplificateur suiveur qui est caractérisé par une impédance d'entrée très élevée ($1.5 \text{ G}\Omega$ à 20 Hz) et un courant de biais très faible ($\sim 1 \text{ pA}$). Les préamplificateurs suiveurs doivent avoir une impédance d'entrée beaucoup plus élevée que l'impédance de contact entre les électrodes et le cartilage pour ne pas perturber les signaux électriques. De plus, le courant de biais doit être minimum pour éviter une polarisation au niveau des électrodes. Les préamplificateurs doivent être situés le plus près possible des électrodes pour minimiser la contamination des signaux électriques par le bruit environnant. Les potentiels d'écoulement qui représentent la différence de potentiel entre deux électrodes voisines passent ensuite par un amplificateur d'instrumentation programmable qui permet d'amplifier le signal avec un gain de 2 ou de

20. Les potentiels d'écoulement sont filtrés avant d'être transférés à l'ordinateur. Le filtre passe-haut peut être programmé en DC ou avec une fréquence de coupure de 0.05 Hz, alors que le filtre passe-bas peut avoir des fréquences de coupure de 200 ou 2000 Hz. Le signal peut également être amplifié une seconde fois par un gain de 1 ou 50. Lorsque nous avons effectué les mesures électromécaniques, les filtres passe-haut et passe-bas avaient des fréquences de coupure respectives de 0.05 et 200 Hz et le gain était de 1000. Le filtre passe-haut permet d'éliminer la composante continue du signal, alors que le filtre passe-bas coupe le bruit à haute fréquence.

CHAPITRE 2 : Caractérisation biochimique de cartilages articulaires placés en culture et stimulés par des agents de dégradation

Dans ce chapitre, nous allons présenter une analyse détaillée des caractéristiques biochimiques de cartilages articulaires bovins qui ont été placés en culture avec différents agents de dégradation. L'utilisation d'agents de dégradation, lors de la culture cellulaire, est indispensable pour la compréhension de l'ostéoarthrite, car elle permet de contrôler précisément le degré de dégénérescence du cartilage. De cette façon, un lien entre les caractéristiques biochimiques et les propriétés électromécaniques du cartilage peut être établi. En effet, les mesures de potentiel d'écoulement sont directement reliées au contenu de protéoglycanes et à l'intégrité du réseau de collagènes de la matrice extracellulaire du cartilage.

Dans ce chapitre, nous allons d'abord discuter des deux agents de dégradation que nous avons utilisés lors de la culture des cartilages, soit l'interleukin- 1α (IL- 1α) et l'aminophénylmercuric acétate (APMA). Nous présenterons également trois autres agents de dégradation. Dans une deuxième section, nous décrirons les conditions de culture des trois expériences que nous avons réalisées. Nous analyserons ensuite le contenu de protéoglycanes et l'intégrité du réseau de collagènes de cartilages normaux et dégradés. La présentation des résultats sera accompagnée d'une discussion et d'une comparaison avec la littérature.

2.1 Effets biochimiques des agents de dégradation lors de la culture

Les agents de dégradation qui sont utilisés lors de la culture cellulaire peuvent avoir des effets variés sur la structure et la composition biochimique des cartilages. Dans cette section, nous allons d'abord étudier les effets biochimiques de l'IL-1 et de l'APMA.

Nous allons ensuite présenter une brève description de trois autres agents de dégradation : l'acide rétinolique, la chondroïtinase ABC et la trypsin.

2.1.1 L'Interleukin-1

L'IL-1 est un polypeptide qui est un médiateur clé dans les réponses du corps humain aux infections, aux inflammations, aux réactions immunologiques et aux blessures tissulaires. L'IL-1 est synthétisé par une grande variété de cellules dont les chondrocytes (Dinarello C. A., 1988). L'IL-1 fait partie de la famille des cytokines. Les cytokines sont de petites molécules qui peuvent pénétrer dans la matrice extracellulaire et atteindre les cellules cibles (chondrocytes) dans les tissus où il n'y a pas de vaisseaux sanguins comme dans le cartilage (Nietfeld J. J., 1993). En effet, les forces compressives qui sont appliquées de façon intermittente au cartilage permettent de faire voyager les cytokines à travers la matrice extracellulaire (Maroudas A. et al., 1988). L'IL-1 est une cytokine de type catabolique, car elle inhibe la synthèse de protéoglycanes et/ou stimule leur dégradation. Elle a une masse moléculaire de 17 kDa et interagit avec les cellules cibles, par un mécanisme de récepteurs situés sur la membrane plasmique (Nietfeld J. J., 1993).

L'IL-1 existe sous deux formes, α et β , qui ont une homologie de séquence de 26%. Lors de la transcription, les deux formes d'IL-1 sont traduites comme précurseurs polypeptidiques dont la masse moléculaire est de 31 kDa. Elles se retrouvent ensuite dans le compartiment extracellulaire, malgré le fait qu'elles ne contiennent aucune séquence signal de clivage. En effet, lors de la transcription, la séquence signal permet aux protéines d'être synthétisées dans le réticulum endoplasmique où le repliement conformationnel et la glycosylation s'effectuent. Les protéines sont ensuite sécrétées (Voet D. et al., 1995). Dans le cas de l'IL-1, le peptide mature (17 kDa) est créé par les protéases sérines. Il est important de noter que les deux formes d'IL-1 se lient au même récepteur et possèdent des propriétés biologiques semblables (Dinarello C. A., 1988).

L'IL-1 est un agent de dégradation qui a différents effets sur les tissus conjonctifs. L'interaction entre l'IL-1 et les chondrocytes se fait par l'entremise d'un récepteur membranaire. L'IL-1 influence le métabolisme des cellules et diminue la synthèse de protéoglycanes et des collagènes. Il a également pour effet d'augmenter la production de métalloprotéinases (MMP) par les chondrocytes et de favoriser leur activation. De plus, il diminue la production de l'inhibiteur natif des MMP, le TIMP (*Tissue Inhibitors of MetalloProteinases*). Les MMP sont responsables de la dégradation des protéoglycanes et des collagènes de la matrice extracellulaire. La perte progressive et irréversible des protéoglycanes et des collagènes altère les fonctions du tissu et expose l'os à des forces mécaniques plus importantes (Mankin H. J. et al., 1994). La figure 2.1 présente un schéma des enzymes qui sont impliqués dans la dégradation du cartilage articulaire stimulée par l'IL-1. Cette figure est tirée du livre de Mankin H. J. et al..

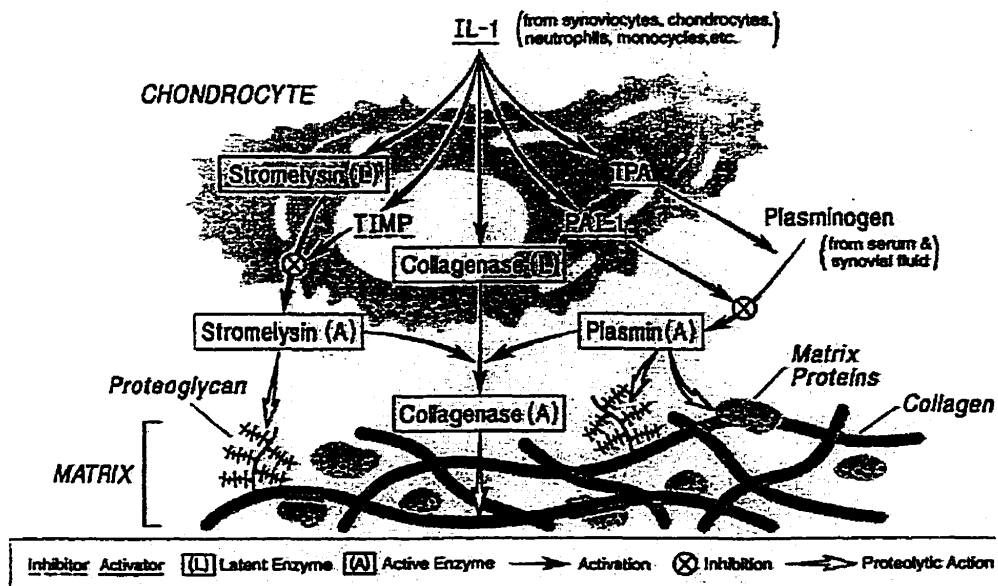


Figure 2.1 : Activateurs et inhibiteurs des enzymes impliqués dans la dégradation du cartilage articulaire stimulée par l'IL-1 (Mankin H. J. et al., 1994)

Il existe 4 types de protéases : sérine, cystéine, aspartique et métallo. Les métalloprotéinases sont principalement responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage. Les métalloprotéinases de la matrice (MMP) peuvent être divisées selon trois classes : collagénases, stromelysines et gélatinases (Matrisian L. M., 1990), (Murphy G. et al, 1991) et (Nagase H. et al., 1992).

Les *collagénases* clivent l'hélice native du collagène. Il y a 3 types de collagénases qui sont connues jusqu'à date, soient les MMP-1, MMP-8 et MMP-13. Ce sont les seuls enzymes capables d'initier le clivage de la triple hélice de collagène à pH neutre. Les collagénases clivent les collagènes de types I, II, et III à un site précis qui est situé approximativement au $\frac{3}{4}$ de la longueur du fragment de collagène. Les fragments de collagène clivés se dénaturent spontanément et peuvent ensuite être dégradés par d'autres métalloprotéinases (MMP-3, MMP-2 et MMP-9) (Billinghurst R. C. et al., 1997).

Les *stromelysines* sont responsables de la dégradation des aggrécanes et du clivage du collagène dans les régions non hélicoïdales de la triple hélice. Il existe 3 types de stromelysines : MMP-3, MMP-10 et MMP-7 (PUMP-1). Une étude a démontré que la stromelysine-1 (MMP-3) clive l'aggrécane humain au niveau du lien Asn³⁴¹ et Phe³⁴² situé dans le domaine interglobulaire entre les protéines G1 et G2 (figure 1.2) (Flannery C. R. et al, 1992). La stromelysine-1 clive également les collagènes de types II et XI dans la région non hélicoïdale du domaine amino-téloptide et le collagène de type IX, à l'intérieur du domaine NC₂ (Wu J-J. et al., 1991).

Les *gélatinases* existent sous deux formes de poids moléculaires différents (MMP-2 et MMP-9). Elles sont impliquées dans la dégradation des collagènes de type IV, V et VII. De plus, elles pourraient agir en synergie avec les collagénases, car elles dégradent efficacement les formes dénaturées du collagène (O'Connell J. P. et al., 1994).

Les MMP sont actives à pH neutre, possèdent un atome de zinc et nécessitent un apport de Ca^{++} pour être activées. De plus, elles sont synthétisées et sécrétées sous forme latente de proenzyme. Elles doivent subir un clivage protéolytique du domaine propeptidique à l'extrémité N-terminale de la molécule pour être activées. Différents agents tels que le plasmin, la trypsin et l'APMA (aminophenylmercuric acétate) peuvent activer les MMP (Vincenti M. P. et al., 1994). Les MMP peuvent être inhibées par un inhibiteur natif, le TIMP qui est produit par les chondrocytes. Le TIMP inhibe l'activité des MMP en se liant à l'extrémité C-terminale de l'enzyme. Une étude effectuée chez des patients avec des blessures au niveau du ménisque ou du ligament antérieur croisé a démontré que la concentration de MMP dans le fluide synovial relativement à celle de TIMP est plus élevée et peut être associée à la dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage (Lohmander L. S. et al., 1993). Le même phénomène a été observé chez des chondrocytes humains traités en culture avec IL-1 β (Shingu M. et al., 1993).

Il est possible que l'IL-1 joue un rôle important dans l'initiation et le développement des maladies arthritiques. En effet, une faible quantité d'IL-1 (entre 150 et 950 pg/ml) se retrouve dans le fluide synovial des patients qui souffrent d'arthrite rhumatoïde (Westacott C. I. et al., 1990). Puisque cette concentration est faible, il est possible que la dégradation du cartilage soit reliée à un mécanisme d'interaction entre l'IL-1 et d'autres facteurs présents dans le fluide (Hollander A. P. et al., 1991). Il a également été démontré que les chondrocytes ostéoarthritiques ont deux fois plus de sites de liaison à l'IL-1, ce qui favorise la production de métalloprotéinases (4069 sites/cellule par rapport à 2315 sites/cellule pour les cartilages normaux) (Martel-Pelletier J. et al., 1992). Une étude récente a permis d'identifier de l'IL-1 dans les cartilages humains ostéoarthritiques à l'aide de techniques d'immunohistochimie et d'analyse par Western Blot. Une augmentation de l'IL-1 α dans les cartilages ayant subi des changements dégénératifs suggère un rôle autocrine/paracrine de cette cytokine dans la pathogenèse de l'ostéoarthrite (Towle C. A. et al., 1997).

2.1.2 L'APMA et les autres agents de dégradation

Comme nous l'avons mentionné dans la section précédente, l'APMA active les MMP qui sont sécrétées sous forme latente de proenzyme. Il a été démontré que l'APMA favorise le changement conformationnel de la prostromelysine (proMMP-3) et de la procollagénase (proMMP-1) natives sous forme d'enzymes actifs qui peuvent dégrader la matrice extracellulaire du cartilage. En effet, l'APMA provoque le retrait du propeptide NH₂-terminal et permet l'activation de la MMP (Nagase H. et al., 1990).

Il existe d'autres agents de dégradation (acide rétinoïque, chondroïtinase ABC et trypsin) qui peuvent être utilisés, lors de la culture des cartilages, pour simuler les conditions d'ostéoarthrite. L'acide rétinoïque provoque une perte et une diminution de la synthèse de protéoglycanes et de collagènes par les chondrocytes du cartilage. Elle agit de façon semblable à l'IL-1 en activant certaines MMP telle que la stromelysine (Sandy J. D. et al., 1991), mais par des récepteurs intracellulaires (Hagiwara H. et al., 1996) ou de manière non spécifique (Buttle D. J. et al., 1992) et (Lapadula G. et al., 1995). La chondroïtinase ABC est une endoglycosidase qui dépolymérise les chaînes de chondroïtine sulfate (Yamagata T. et al., 1968), alors que la trypsin, tout comme l'APMA, active les MMP qui sont sous forme latente dans la matrice. Ces deux agents provoquent une perte très rapide des GAG de la matrice extracellulaire.

2.2 Culture des cartilages

Les conditions d'extraction et de culture des cartilages sont très importantes, car elles peuvent influencer les propriétés biochimiques et électromécaniques de la matrice extracellulaire. De nombreuses précautions doivent être prises afin d'éviter la mort des chondrocytes ou la contamination des milieux de culture.

2.2.1 Extraction et conditions de culture des cartilages

Les disques de cartilage sont extraits de la tête humérale d'un boeuf âgé entre 1 et 2 ans. Une perceuse avec une mèche de biopsie d'environ 4 mm de diamètre permet d'extraire des cylindres de cartilage avec os. Ces cylindres sont ensuite sciés à une épaisseur d'environ 1.5 mm avec une scie dentaire. Le cartilage doit être arrosé avec une solution tampon de HBSS (*Hank's Buffered Saline Solution*) tout au long de l'extraction pour minimiser la mort des cellules. L'épaisseur des disques est mesurée à l'aide d'un micromètre. Lors de l'extraction, les disques sont placés dans une solution de HBSS et ils sont ensuite lavés cinq fois en présence d'antibiotiques (100 µg/ml de gentamycine) avant d'être placés dans un milieu de culture DME/F12 dont le pH est de 7.2. Le milieu de culture contient 50 µg/ml de gentamycine, 0.01% de BSA (*Bovine Serum Albumin*) et 20 µg/ml d'ascorbate. Le BSA est une protéine du sang qui est bien définie et qui peut se lier aux impuretés ou aux sites de liaison du plastique de la plaque de culture. Cette protéine permet d'augmenter l'effet de l'IL-1 α , car sans la présence de BSA, l'IL-1 pourrait se lier aux impuretés ou à la plaque. Le BSA augmente également la croissance et la survie des cellules. L'ascorbate, qui doit préférablement être ajouté frais (sous forme de poudre) chaque jour, agit comme cofacteur dans la synthèse du collagène, des protéoglycanes et dans l'assemblage de la matrice. Le milieu de culture ne contient pas de sérum afin d'éviter le manque de reproductibilité (Freshney R. I., 1994). Les cartilages sont placés dans un incubateur à une température de 37°C et une concentration de CO₂ de 5%. Le changement des milieux de culture est effectué sous la hotte, tous les jours à la même heure, et les anciens milieux sont congelés.

2.2.2 Description des différentes expériences

L'effet de l'IL-1 α sur les propriétés biochimiques et électromécaniques du cartilage a été étudié au cours de deux expériences distinctes. Lors de la première

expérience, la concentration d'IL-1 α et la durée de culture étaient fixes. Pour la deuxième expérience, nous avons analysé l'influence de l'IL-1 α en fonction de la durée de la culture. Au cours d'une troisième expérience, nous avons étudié l'effet d'un second agent de dégradation, l'APMA.

2.2.2.1 Traitement des cartilages avec IL-1 α

Lors de la première expérience qui a été réalisée le 6 février 1997, 4 triplets de cartilage ont été extraits d'une épaule de boeuf. Chaque triplet est composé d'un cartilage de contrôle, d'un cartilage expérimental qui est traité avec un agent de dégradation et d'un cartilage qui a été congelé directement après l'extraction. Les triplets de cartilages proviennent de la même région sur la surface articulaire de la jointure. Les 4 paires de cartilage (contrôle et expérimental) ont été placées en culture pendant 13 jours et les cartilages expérimentaux ont été stimulés avec 5 ng/ml d'IL-1 α .

Afin d'étudier l'effet de l'IL-1 α à différentes étapes de la culture et de vérifier la reproductibilité des résultats de la première expérience, nous avons réalisé une seconde expérience plus complète. L'extraction de 18 triplets de cartilage a été effectuée le 18 juin 1998. Les disques ont été extraits de trois épaules de boeuf différentes. Les mêmes conditions de culture ont été utilisées. Au cours de cette deuxième expérience, nous avons étudié les caractéristiques biochimiques et électromécaniques des cartilages après 1, 4, 7, 11 et 14 jours de culture. Pour chacune de ces durées (sauf pour le jour 14), 4 paires de disques ont été retirées de la culture et placées dans une chambre humidifiée avant d'être testés électromécaniquement. Seulement deux paires ont été testés après 14 jours de culture. Chaque paire de disques (contrôle et expérimental) est associée à un cartilage qui a été congelé directement après l'extraction. Pour le premier jour de la culture, 4 disques frais ont été placés dans une chambre humidifiée directement après l'extraction et testés

la journée suivante. Ceci nous permettra d'étudier l'effet de la congélation sur les propriétés électromécaniques du cartilage.

2.2.2.2 Traitement des cartilages avec APMA

Au cours de la troisième expérience réalisée le 2 avril 1997, nous avons extrait 4 triplets de cartilage. Cette fois-ci, les disques expérimentaux ont été traités avec 1 mM d'APMA pendant 7 jours. Le pH de la solution d'APMA est basique (pH=11.3). Elle doit donc être ajoutée au milieu de culture et placée dans l'incubateur environ 24 heures avant le changement des milieux. Ceci a pour but d'acidifier la solution d'APMA. Les milieux des cartilages de contrôle ont également été placés dans l'incubateur 24 heures à l'avance, pour respecter les conditions de l'expérience.

2.3 Contenu de protéoglycanes

Comme nous l'avons mentionné dans la première section de ce chapitre, l'IL-1 α stimule la production et l'activation des MMP. L'APMA active également les MMP qui sont sécrétées sous forme latente de proenzyme. Les MMP sont notamment responsables de la dégradation des protéoglycanes du cartilage. Dans cette section, nous allons étudier l'effet de l'IL-1 α et de l'APMA sur la perte de protéoglycanes qui est quantifiée à l'aide d'une technique de spectrophotométrie.

2.3.1 Spectrophotométrie avec colorant DMB

La technique de spectrophotométrie avec un colorant bleu de diméthylméthylène (DMB) permet de déterminer le contenu de protéoglycanes d'un échantillon. En effet, la densité optique du colorant augmente en fonction de la concentration de glycosaminoglycanes (GAG) qui sont les chaînes principales des protéoglycanes (figure

1.2). Cette technique a été mise au point par Farndale R. W. et al. qui ont conçu une procédure qui permet d'éviter la précipitation trop rapide des GAG avec les complexes du colorant DMB et d'éliminer l'interférence d'ADN et d'ARN (Farndale R. W. et al., 1982). Afin de quantifier la concentration de protéoglycanes dans le milieu de culture ou dans les cartilages préalablement digérés, une courbe standard est réalisée à partir de concentrations connues de chondroïtine sulfate de requin. Les chaînes de chondroïtine sulfate sont les principales unités de disaccharides qui composent les GAG. Lors des différents tests DMB que nous avons effectués, l'absorbance de la solution était d'environ 0.17 à une longueur d'onde de 525 nm. Afin d'augmenter la précision de l'essai, tous les échantillons ont été dupliqués et mesurés selon deux dilutions différentes. De plus, nous avons vérifié la reproductibilité de la courbe standard des différents tests.

2.3.2 Résultats avec IL-1 α

2.3.2.1 Perte et contenu de GAG après 13 jours de culture

La figure 2.2 présente la perte de GAG dans le milieu en fonction de la durée de la culture.

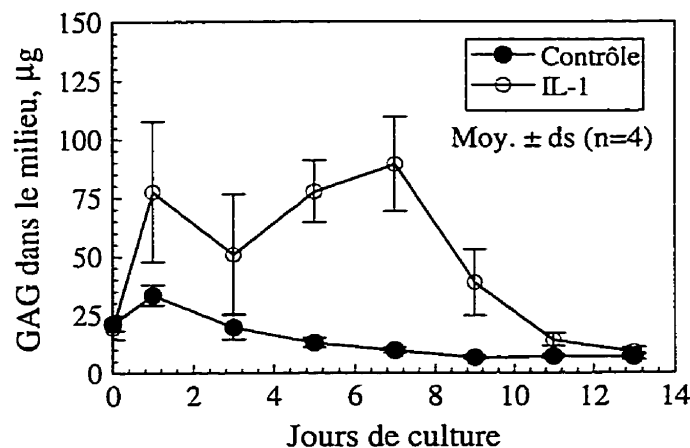


Figure 2.2 : Effet de l'IL-1 α sur les pertes de GAG dans le milieu

La perte de GAG a été mesurée pour 4 paires de cartilage dont le diamètre est de 4 mm. Nous constatons que les disques de contrôle ont une perte plus élevée au jour 1, d'environ 35 μg , qui se stabilise autour de 10 μg après 7 jours de culture. Les cartilages traités avec IL-1 α ont également une perte de GAG élevée au jour 1 qui persiste jusqu'au jour 11. La perte totale moyenne de GAG des cartilages dégradés est environ 3.6 fois plus importante que celle des disques de contrôle après 13 jours de culture.

Nous avons également vérifié si les résultats du test DMB changent lorsque les chaînes de GAG des protéoglycanes sont reliées ou non à la protéine centrale. Nous avons comparé les résultats obtenus sur les milieux de culture avant et après une digestion avec papaïne dans une solution tampon d'acétate. Cette expérience a été répétée deux fois sur les milieux qui ont été dosés au cours de l'expérience précédente (figure 2.2). Les détails de cette expérience sont présentés à l'annexe II. Cette étude nous a permis de conclure que la digestion des milieux avec la papaïne n'affecte pas les résultats obtenus par la méthode DMB.

Le contenu de GAG des cartilages a été quantifié après les tests électromécaniques qui seront présentés dans le chapitre 3. À l'aide d'un vibratome, nous avons effectué des tranches circulaires de 100 μm d'épaisseur à partir de la surface articulaire du cartilage jusqu'à l'os. Lors de la coupe, le disque a été fixé du côté de l'os avec de la colle et submergé d'une solution tampon de HBSS. Les premières tranches qui n'étaient pas circulaires ont été éliminées. Chaque tranche a ensuite été placée dans un tube et digérée avec 0.125 mg/ml de papaïne pendant 12 à 16 heures à 60°C. Le contenu de GAG a été mesuré par spectrophotométrie avec le colorant DMB. La figure 2.3 présente la variation de la concentration de GAG en fonction de la profondeur pour les cartilages de contrôle, dégradés et congelés en considérant que le volume d'une tranche de 100 μm d'épaisseur et de 3 mm de diamètre est de 0.707 μl .

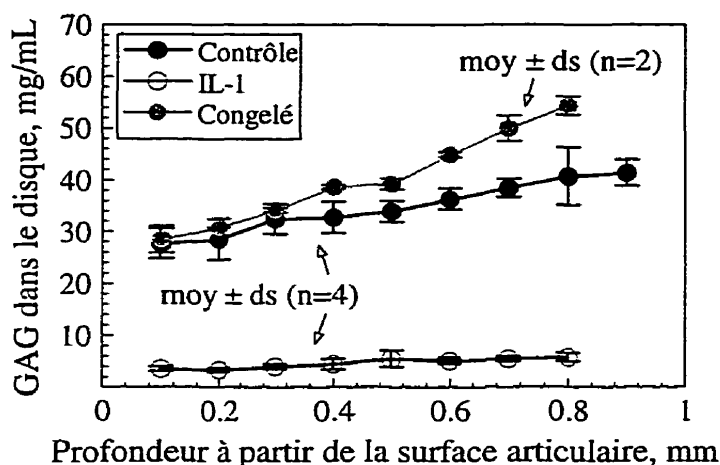


Figure 2.3 : Concentration de GAG dans les cartilages après 13 jours de culture

Nous constatons que les cartilages traités avec IL-1 α ont un contenu total de GAG environ 8 fois moins important que les disques de contrôle. De plus, les cartilages congelés ont un contenu de GAG légèrement plus élevé que les disques de contrôle. Ceci suggère que les cartilages de contrôle ont perdu des GAG lors de la culture et que le taux de synthèse de GAG n'a pas compensé à 100% cette perte. Il est important de noter que seulement 2 cartilages congelés ont été analysés biochimiquement. Pour les disques de contrôle et les cartilages congelés, nous remarquons une augmentation de la concentration de GAG en fonction de la profondeur. Ce phénomène correspond bien à ce qui a été observé dans la littérature (Buschmann M. D. et al. 1998).

2.3.2.2 Perte et contenu de GAG pour différentes durées de culture

Au cours de la deuxième expérience avec IL-1 α , 4 triplets de cartilages ont été testés biochimiquement et électromécaniquement après 1, 4, 7 et 11 jours de culture. De plus, 2 paires ont été testés après 14 jours de culture. La figure 2.4 présente la perte de GAG dans le milieu en fonction de la durée de la culture. Le contenu de GAG des jours 0 et 1 a été moyenné sur 18 échantillons, les jours 2, 3 et 4 sur 14 échantillons, les jours 5 et

7 sur 10 échantillons, les jours 9 et 1 sur 6 échantillons et, finalement, les jours 13 et 14 sur 2 échantillons. Nous constatons que les disques de contrôle ont une perte d'environ 20 μg de GAG pendant les 5 premiers jours de la culture. La perte diminue ensuite jusqu'au jour 10, mais elle semble légèrement plus élevée au cours des 4 derniers jours de la culture. Les cartilages traités avec IL-1 α ont une perte de GAG maximum de 80 μg au cinquième jour de la culture. Cette perte de GAG se stabilise à partir du jour 11 de la culture.

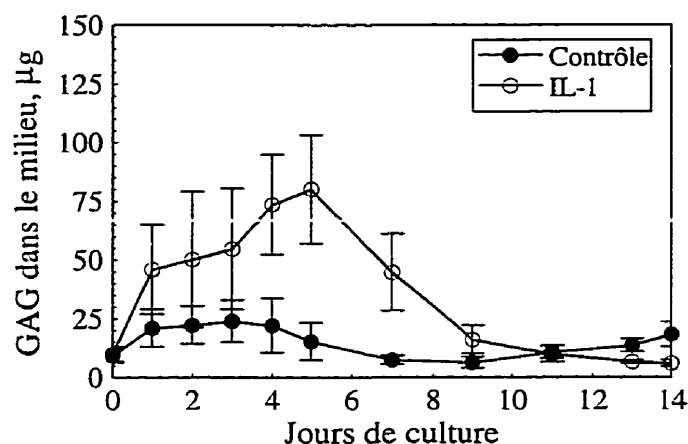


Figure 2.4 : Perte cumulative de GAG dans le milieu selon les jours de culture

Afin de corréler les résultats biochimiques avec les mesures électromécaniques qui seront présentées dans le chapitre 3, il est important de vérifier plus spécifiquement les pertes de GAG des 4 différentes paires de cartilages qui ont été testées après 1, 4, 7 et 11 jours de culture et des 2 paires testées après 14 jours de culture. À l'aide de la figure 2.5, nous observons que les différents groupes de cartilages associés à chacune des durées de culture ont un comportement semblable suite au traitement avec IL-1 α . Malgré le fait que les 4 paires de cartilages correspondant à chacune des durées proviennent de trois épaules de boeuf différentes et d'endroits variés sur la surface articulaire du cartilage, les pertes de GAG sont comparables.

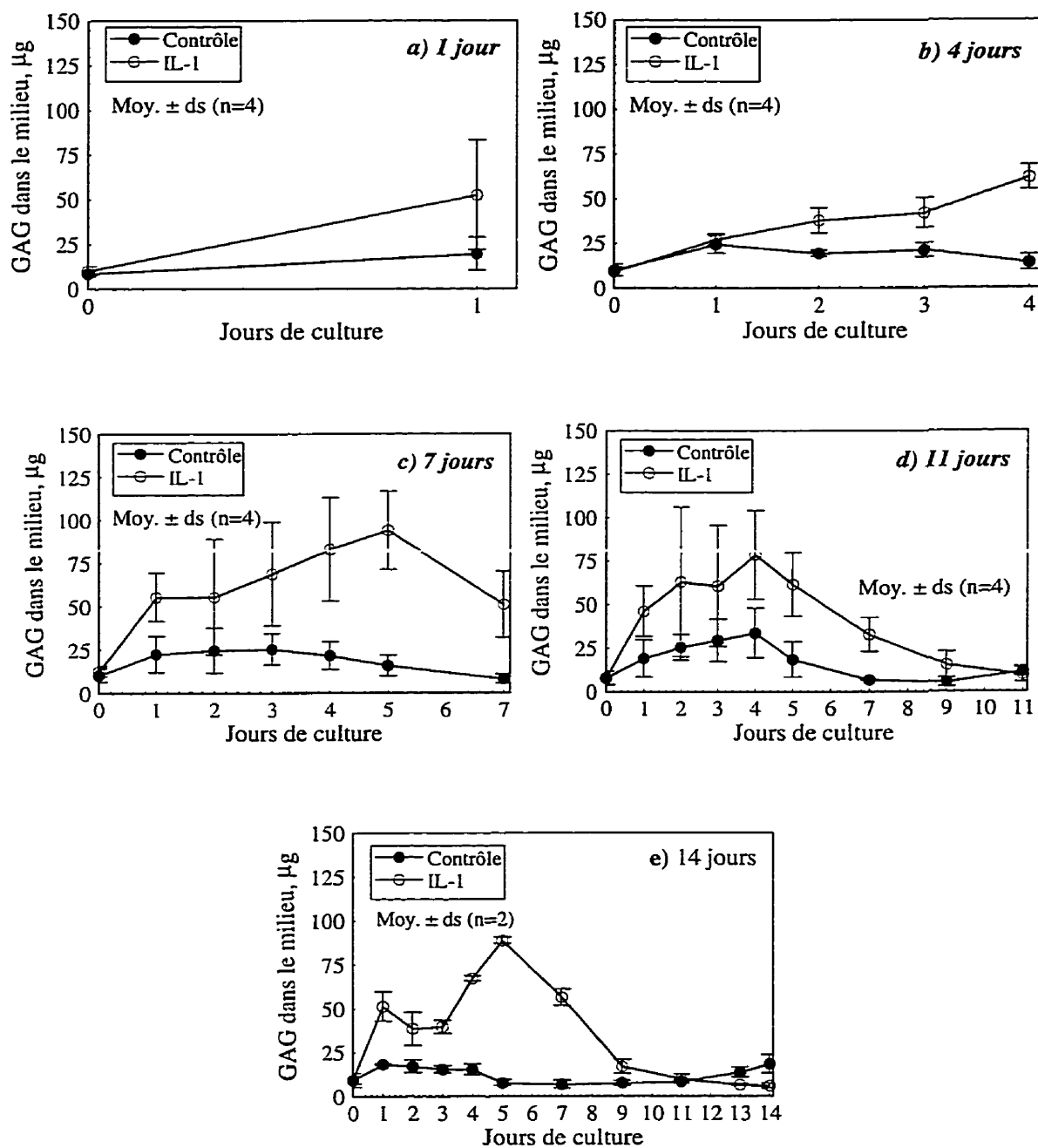


Figure 2.5 : Effet de l'IL-1 α sur les pertes de GAG dans le milieu pour les différents groupes de cartilages après a) 1 jour, b) 4 jours, c) 7 jours, d) 11 jours et e) 14 jours de culture

Les résultats précédents sont résumés à la figure 2.6 qui présente la perte cumulative moyenne de GAG dans le milieu après différentes durées en culture pour les cartilages de contrôle et les disques traités avec IL-1 α . Nous constatons, qu'après 1, 4, 7, 11 et 14 jours de culture avec 5 ng/ml d'IL-1 α , les cartilages expérimentaux ont perdu respectivement 2.2, 2, 3.5, 2.5, et 3.1 fois plus de GAG que les disques de contrôle. Pour les cartilages de contrôle, nous observons une légère augmentation des pertes de GAG en fonction de la durée de la culture, ce qui est normal. Idéalement, les pertes de GAG devraient être compensées à 100% par la synthèse de GAG.

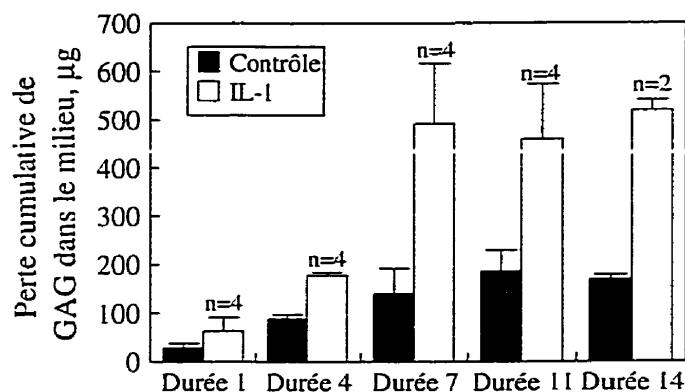


Figure 2.6 : Perte cumulative moyenne de GAG dans le milieu

Le contenu de GAG des cartilages a été quantifié à partir des échantillons obtenus lors de l'évaluation de la dégradation du collagène de type II (section 2.4). Pour évaluer le contenu de collagène, nous devons préalablement digérer le cartilage avec l' α -chymotrypsin. Après avoir retiré le produit de la digestion, le cartilage est ensuite digéré avec la protéinase K. La figure 2.7 présente le contenu total de GAG qui a été mesuré dans les échantillons, après chacune des 2 étapes de digestion. Nous constatons que le contenu de GAG des disques traités avec IL-1 α est inférieur à celui des cartilages de contrôle à partir du jour 7 de la culture. En effet, les cartilages expérimentaux ont un contenu de GAG qui est respectivement 2.7 et 3.7 fois plus faible que celui des disques de

contrôle, après 7 et 11 jours de culture. Nous remarquons également que le contenu de GAG des cartilages de contrôle diminue légèrement au cours de la culture.

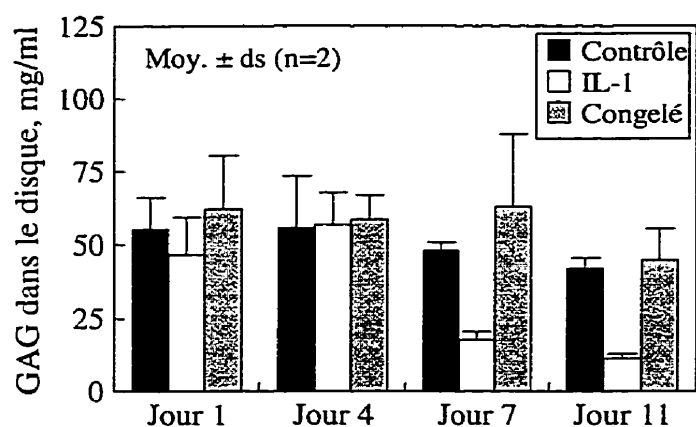


Figure 2.7 : Concentration totale de GAG dans les cartilages en fonction de la durée de la culture

2.3.3 Résultats avec APMA

La figure 2.8 présente les pertes de GAG dans le milieu, en fonction de la durée de culture pour des cartilages de contrôle et des disques traités avec 1 mM d'APMA.

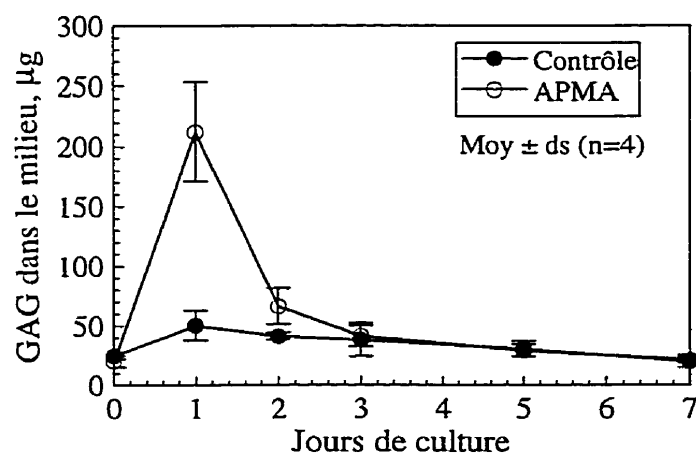


Figure 2.8 : Effet de l'APMA sur les pertes de GAG dans le milieu

Nous constatons que les cartilages traités avec l'APMA ont perdu 1.7 fois plus de GAG que les disques de contrôle après 7 jours de culture. L'effet de l'APMA est très rapide. Après 3 jours de culture, les cartilages traités avec APMA ont perdu la majorité des leurs protéoglycanes. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'APMA ne fait pas seulement qu'activer les MMP, mais provoque également la mort des cellules qui ne peuvent plus synthétiser de nouvelles molécules de protéoglycanes et qui libèrent leur contenu d'enzymes de dégradation.

2.3.4 Discussion sur le contenu de protéoglycanes de cartilages normaux et dégradés

Dans cette section, nous allons d'abord discuter des résultats que nous avons obtenus lors des tests DMB. Nous allons ensuite présenter une revue de la littérature et comparer nos résultats avec les autres équipes de recherche.

2.3.4.1 Discussion des résultats des tests DMB

Le tableau 2.1 présente un résumé des résultats biochimiques que nous avons obtenus lors des cultures avec IL-1 α et APMA. Les disques ont un diamètre de 4 mm lorsqu'ils sont placés en culture. Ils sont poinçonnés à un diamètre de 3 mm avant les mesures électromécaniques. Par conséquent, la perte de GAG dans le milieu de culture (figures 2.2 et 2.5) a été multiplié par un facteur de 9/16 pour être comparé avec le contenu de GAG dans les disques de 3 mm. Au niveau du contenu de GAG dans les disques, les résultats de la première expérience qui sont présentés dans le tableau ont été corrigés à partir du volume des disques de la deuxième expérience, car les volumes ont été évalués à partir de deux méthodes différentes. Le pourcentage de perte de GAG est calculé en divisant la quantité de GAG dans le milieu par la quantité de GAG dans le milieu et dans le disque. Il est à noter que, dans ce tableau, nous ne tenons pas compte de la synthèse de GAG par les chondrocytes. Nous avons donc considéré le pire cas, car en tenant compte de la synthèse, les pourcentages calculés seraient plus faibles. Tous les

résultats présentés dans le tableau 2.1 représentent la moyenne de 4 échantillons, sauf pour les contenus de GAG dans les disques de la deuxième expérience avec IL-1 α .

Tableau 2.1 Perte et contenu de GAG des cartilages lors des expériences avec IL-1 α et APMA

	5ng/ml d'IL-1 α pendant 13 jours		5ng/ml d'IL-1 α pour 1, 4, 7 et 11 jours			1 mM d'APMA pendant 7 jours	
	<u>Contrôle</u>	<u>IL-1</u>	<u>Jour</u>	<u>Contrôle</u>	<u>IL-1</u>	<u>Contrôle</u>	<u>APMA</u>
Relargage de GAG dans le milieu, μ g GAG	109	388	1 4 7 11	16 50 79 104	35 100 277 258	263	449
Contenu de GAG dans le disque, μ g GAG/disque	300	38	1 4 7 11	437 478 465 373 (n=2)	362 466 147 90 (n=2)	---	---
% de perte de GAG, GAG milieu / GAG (milieu + disque)	27	91	1 4 7 11	4 9 14 22	9 18 65 74	---	---

Nous allons d'abord analyser les résultats des deux expériences avec IL-1 α . En comparant les figures 2.2 et 2.4, nous constatons que les courbes de perte de GAG en fonction des jours de culture ont une allure légèrement différente. Premièrement, les disques de contrôle de la deuxième expérience avec IL-1 α sont caractérisés par une perte de GAG plus élevée pendant les 4 premiers jours de la culture. Deuxièmement, l'effet de l'IL-1 α est moins rapide au début de la culture. En effet, au cours de la première expérience, les pertes de GAG des disques traités avec IL-1 α sont beaucoup plus importantes que celles des cartilages de contrôle à partir du jour 1, alors que pour la deuxième expérience, ce n'est qu'au jour 4 que les pertes de GAG deviennent importantes. À l'aide du tableau 2.1, nous constatons que les disques traités avec IL-1 α ont perdu une quantité plus importante de GAG dans le milieu, au cours de la première

expérience, alors que la perte de GAG des cartilages de contrôle est semblable pour les deux expériences.

Comme nous l'avons mentionné plus tôt, le contenu de GAG des disques de la première expérience a été corrigé à partir du volume des cartilages de la seconde expérience. En effet, au cours de la première expérience, nous avons mesuré le contenu de GAG dans des tranches circulaires de cartilage de 100 μm d'épaisseur qui ont été digérées avec papaïne et le volume moyen des disques a été estimé à partir du nombre de tranches à 5.6 μl . Au cours de la deuxième expérience, le contenu de GAG a été évalué après digestion des disques avec α -chymotrypsin et protéinase K et le volume moyen des disques a été estimé à partir des mesures du poids du cartilage avec et sans os à 8.4 μl . La première technique de mesure qui a été utilisée pour estimer le volume des cartilages est beaucoup moins précise que la seconde. En effet, les premières tranches qui ne sont pas circulaires ont été éliminées et la dernière tranche n'est pas directement en contact avec l'os.

Malgré la correction des résultats de la première expérience à partir du volume des cartilages de la seconde expérience, nous constatons que le contenu de GAG de la première expérience est plus faible. Ceci peut être expliqué par une perte de GAG lors de la coupe. En effet, la coupe du réseau des fibres de collagène libère des GAG dans la solution. Il faut également être conscient que les disques de contrôle et les cartilages dégradés de la première expérience ont été congelés directement après la culture, contrairement aux cartilages de la deuxième expérience qui ont été placés dans une chambre humidifiée puis testés électromécaniquement avant d'être congelés. Les disques de la première expérience ont été congelés une fois de plus. Nous considérons donc que la seconde expérience est plus précise. De plus, en supposant que le cartilage a un poids de 10 mg et que les protéoglycanes occupent environ 20% du poids solide, soit 600 μg , les résultats de la deuxième expérience sont plus proches de ceux observés dans la littérature.

Lors de la culture, les chondrocytes continuent à synthétiser des protéoglycanes. En effet, pour des conditions de culture idéales, les cartilages normaux synthétisent la quantité de GAG qui a été perdue dans le milieu. Par conséquent, le contenu de GAG des cartilages de contrôle devrait rester constant tout au long de la culture. Au cours de la deuxième expérience avec IL-1 α , nous avons observé que le contenu de GAG des disques de contrôle est autour de 450 μ g après 1, 4 et 7 jours de culture. Par contre, au jour 11 de la culture, le contenu est plus faible (373 μ g). Pour les disques traités avec IL-1 α , nous observons que le contenu de GAG diminue en fonction de la durée de la culture. En effet, l'IL-1 α favorise à la fois la dégradation de protéoglycanes et la diminution de la synthèse de GAG par les chondrocytes.

Pour les disques traités avec APMA, nous avons seulement mesuré les pertes de GAG dans le milieu. À l'aide du tableau précédent, nous remarquons que les disques de contrôle qui ont été placés en culture pendant 7 jours ont perdu 2 fois plus de GAG que les cartilages de contrôle des deux autres cultures avec IL-1 α . Nous pouvons calculer le pourcentage de perte de GAG en supposant que le contenu total de GAG dans le cartilage est d'environ 500 μ g. Nous obtenons respectivement une perte de GAG de 53 et 90% pour les disques de contrôle et les cartilages traités avec APMA. La perte importante de GAG des disques de contrôle pourrait être reliée au fait que les milieux de culture ont été placés dans l'incubateur 24 heures avant le changement des milieux. En effet, il est possible que certaines composantes du milieu de culture, telle que la glutamine, se soient dégradées pendant les 24 heures. La perte élevée de GAG des disques de contrôle pourrait également être expliquée par une volatilisation de l'APMA lors de la culture. Cette hypothèse est toutefois peu probable.

2.3.4.2 Revue de la littérature

Plusieurs chercheurs ont étudié l'effet biochimique de l'IL-1 α ou β sur le contenu de GAG des cartilages articulaires bovins. Dans un premier temps, Bonassar L. J. et al. ont étudié en détail les effets de différents agents de dégradation, tels que l'IL-1 β , l'APMA, l'acide rétinolique et la stromelysine, sur le contenu de protéoglycanes de cartilages articulaires bovins. Ils ont ensuite corrélé les résultats biochimiques avec les propriétés électromécaniques des cartilages qui ont été évaluées lors d'un test de compression confinée. Il est intéressant de comparer les résultats obtenus par cette équipe de recherche avec nos résultats, car les conditions d'extraction, de culture et de mesure des cartilages sont semblables aux nôtres. En effet, les disques de 3 mm de diamètre proviennent d'un boeuf âgé entre 1 et 2 ans. Ils sont placés dans 1 ml de DMEM avec pénicilline et streptomycine et du BSA (0.1%) est ajouté en présence d'IL-1 β et d'acide rétinolique. Le contenu de GAG dans les disques est évalué suite à une digestion des cartilages avec 0.125 mg/ml de papaïne. Bonassar L. J. et al. ont d'abord démontré qu'un traitement des cartilages avec 100 ng/ml d'IL-1 β pendant 8 jours provoque une perte de 90% des GAG du cartilage. Le processus de dégradation est plutôt lent car il y a seulement 10% de perte après 2 jours de culture. La perte la plus importante se produit entre les jours 2 et 4 de la culture. De plus, la perte de GAG est inhibée à plus de 50% avec 4 mM de TIMP après 8 jours (Bonassar L. J. et al., 1995a, 1995b et 1997). Le TIMP est l'inhibiteur natif des MMP qui est produit par les chondrocytes dans le cartilage.

Le traitement des cartilages avec 1 mM d'APMA pendant 3 jours provoque une perte de GAG qui est significative seulement 12 heures après le début de la culture. De plus, les cartilages ont perdu entre 50 et 85% de leur contenu de GAG après 3 jours. Le contenu de GAG des cartilages de contrôle au début de la culture est d'environ 650 μ g/cartilage. Avec l'addition de 4 μ M de TIMP au milieu de culture en présence

d'APMA, l'inhibition des pertes de GAG est supérieure à 90% (Bonassar L. J. et al., 1995a, 1995b et 1996).

Bonassar L. J. et al. ont également étudié l'effet de deux autres agents de dégradation, la stromelysine-1 ou MMP-3 et l'acide rétinoïque, sur les propriétés biochimiques des cartilages. Lors de l'ajout de 100 µg/ml de stromelysine au milieu de culture pendant 3 jours, une perte du contenu de GAG supérieure à 80% est observée. (Bonassar L. J. et al., 1995a et 1995c). La culture des cartilages avec 1 µM d'acide rétinoïque provoque respectivement une perte de GAG supérieure à 50% et 80% après 2 et 6 jours de culture (Bonassar L. J. et al., 1995a, 1995b et 1997). En 1987, l'effet de la chondroïtinase ABC et de la trypsin sur le contenu de GAG des cartilages a été étudié. Une perte de GAG entre 80 et 85% a été observée après un traitement avec 0.1 U/ml de chondroïtinase ABC pendant 48 heures, alors que la perte se situe entre 88 et 96% après 24 heures avec 1 mg/ml de trypsin (Frank E. H. et al., 1987c).

Plusieurs autres équipes de recherche ont étudié l'effet biochimique de l'IL-1 sur les cartilages articulaires bovins. En 1993, Niedel J. et al. ont remarqué une diminution significative de la synthèse de GAG après 48 heures d'incubation avec 1 ng/ml d'IL-1β. Ils ont également observé que des concentrations plus élevées d'IL-1β sont nécessaires pour augmenter la libération de GAG dans le milieu que pour inhiber la synthèse des GAG. De plus, avec 100 ng/ml d'IL-1β, la synthèse de GAG atteint un plateau après 2 jours, alors que la perte de GAG dans le milieu devient significative après 4 jours. Finalement, ils ont constaté que 100 mM de chloroquine bloque la perte de GAG stimulé avec 200 ng/ml d'IL-1 β, mais augmente la synthèse (Niedel J. et al., 1993). L'effet de l'IL-1β sur le cartilage humain a également été étudié (Mort J. S. et al., 1993). De plus, Kozaci L. D. et al. ont constaté respectivement une perte d'environ 35% et 50% de GAG après 2 et 4 semaines de culture avec 50 ng/ml d'IL-1α. Dans ce cas, les milieux étaient

renouvelés avec et sans IL-1 α après 7, 14 et 21 jours de culture (Kozaci L. D. et al., 1997).

2.3.4.3 Comparaison des résultats avec la littérature

Bonassar L. J. et al. ont obtenu une dégradation du contenu de GAG de 90% avec 100 ng/ml d'IL-1 β après 8 jours de culture, alors que nous avons observé des dégradations de 91 et 74% après 13 et 11 jours de culture avec une concentration de 5 ng/ml d'IL-1 α . Malgré le fait que les deux formes d'IL-1 (α et β) ont des propriétés biologiques semblables et qu'elles se lient au même récepteur sur la membrane des chondrocytes, la concentration nécessaire pour initier une dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage n'est pas la même. Il a été démontré que l'IL-1 α est plus fort que l'IL-1 β pour induire une dégradation des protéoglycanes du cartilage (Smith R. L. et al., 1989). Kozaci L. D. et al. ont observé une perte de GAG très inférieure à ce que nous avons obtenu, ce qui peut être expliqué par des conditions de culture différentes (les changements de milieux sont beaucoup moins fréquents).

Les résultats que nous avons obtenus suite au traitement avec APMA sont comparables avec ceux de la littérature. En effet, nous avons observé une perte de GAG très importante au premier jour de la culture qui se stabilise après 3 jours. Par contre, les cartilages de contrôle ont perdu une quantité très élevée de GAG dans le milieu.

2.4 Contenu de collagène

Après avoir quantifié le contenu de GAG dans les cartilages, nous avons analysé le contenu de collagène de type II. À l'aide de deux essais biochimiques, nous avons étudié l'effet de l'IL-1 α sur la dénaturation et le clivage des fibres de collagène de type II.

2.4.1 Description des essais biochimiques

2.4.1.1 Quantification du collagène dénaturé à l'aide de l'analyse de l'épitope CB11B

L'essai biochimique qui permet de quantifier la dénaturation ainsi que le contenu total de collagène dans le cartilage a été mis au point récemment (Hollander A. P. et al., 1994). Deux étapes de digestion avec α -chymotrypsin et protéinase K sont nécessaires pour déterminer le pourcentage de dénaturation du collagène. L' α -chymotrypsin est une enzyme protéolytique qui coupe spécifiquement le côté carboxyle des acides aminés hydrophobes. L' α -chymotrypsin digère donc les molécules de collagène qui sont déroulées, car elles exposent les acides aminés hydrophobiques à l'intérieur de la triple hélice. Ces acides aminés ne sont pas exposés lorsque le collagène est sous forme de triple hélice. Cet extrait de digestion nous permet de quantifier le collagène dénaturé. La protéinase K est une protéase qui dégrade le contenu du cartilage ainsi que la triple hélice du collagène. L'extrait de cette digestion permet de doser le collagène natif dans le cartilage.

L'essai biochimique que nous allons utiliser est de type ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (Voet D. et Voet J., 1995). La figure 2.9 présente un schéma des différentes étapes de l'essai biochimique. Les échantillons qui contiennent une certaine quantité de collagène dénaturé sont d'abord incubés en présence d'un anticorps primaire. Cet anticorps reconnaît un antigène avec l'épitope CB11B qui est situé dans la région

hydrophobe à l'intérieur de la triple hélice de collagène. Une certaine quantité de cette solution est ensuite transférée dans une plaque dont les parois ont été préalablement recouvertes de collagène dénaturé. Tous les anticorps qui possèdent un site libre se lient à la plaque. Les autres anticorps qui se sont liés à l'antigène lors de l'incubation précédente sont éliminés lors du lavage. L'addition d'un anticorps secondaire qui se conjugue à l'alkaline phosphatase (qui se colore) permet de déterminer la quantité de collagène dénaturé qui est inversement proportionnelle à l'intensité de la couleur.

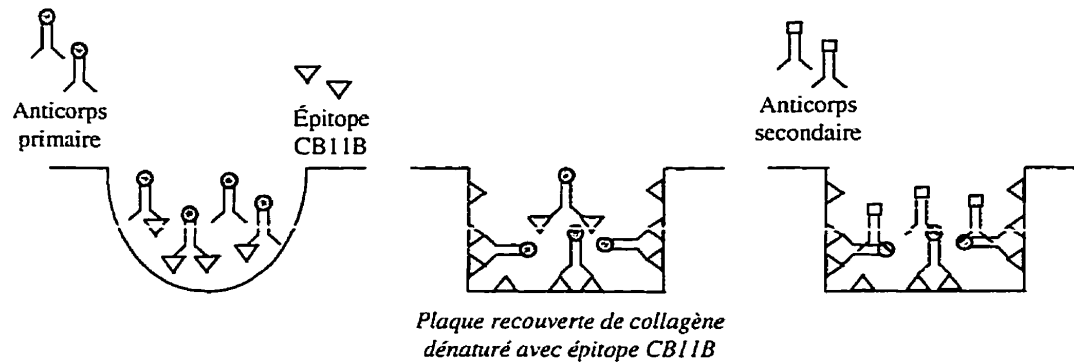


Figure 2. 9 : Description de l'essai biochimique de type ELISA

2.4.1.2 Quantification du collagène clivé à l'aide de l'analyse de l'épitope 3/4c

Un essai biochimique semblable a été mis au point pour déterminer le contenu de collagène clivé dans le cartilage (Billinghurst R. C. et al., 1997). Dans ce cas, l'épitope 3/4c de l'antigène est situé à un site de clivage du collagène qui crée deux fragments de $\frac{3}{4}$ et $\frac{1}{4}$ fois la longueur initiale. Les collagénases (MMP-1, -8 et -13) sont habituellement responsables de ce type de clivage (section 2.1.1). Lors de l'essai, la plaque est recouverte avec un peptide synthétique. Les anticorps primaire et secondaire sont spécifiques à l'antigène et à son épitope 3/4c. Il est à noter que cet essai biochimique a été réalisé sur les deux extraits de la digestion (α -chymotrypsin et protéinase K).

2.4.2 Résultats avec IL-1 α

Les deux essais biochimiques précédents ont été réalisés seulement sur la moitié des échantillons de la deuxième expérience avec IL-1 α pour des durées de culture variables. Les courbes qui sont présentées dans cette section représentent toujours la moyenne de deux échantillons.

2.4.2.1 Contenu de collagène dénaturé

La figure 2.10 présente le contenu de collagène de type II dénaturé dans les disques de contrôle, les cartilages traités avec IL-1 α et les disques congelés après 1, 4, 7 et 11 jours de culture. Nous observons que les cartilages traités avec IL-1 α subissent une dénaturation du collagène environ 3 fois plus importante que les disques de contrôle après 7 jours de culture.

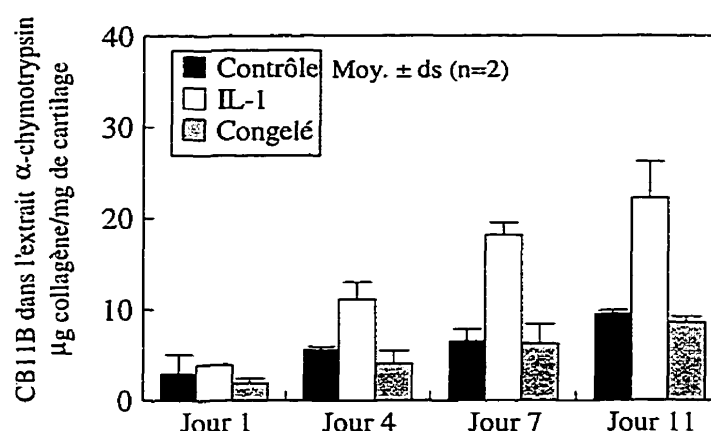


Figure 2.10 : Contenu de collagène de type II dénaturé dans les cartilages

La figure 2.11 présente le contenu total de collagène dans les cartilages qui est calculé par l'addition des résultats obtenus après la digestion avec α -chymotrypsin et protéinase K. Nous constatons que le contenu total de collagène des cartilages de

contrôle, des disques expérimentaux et des cartilages congelés se situe autour de 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de cartilage. Nous remarquons également que le contenu de collagène du triplet qui a été placé un jour en culture est plus faible que les autres.

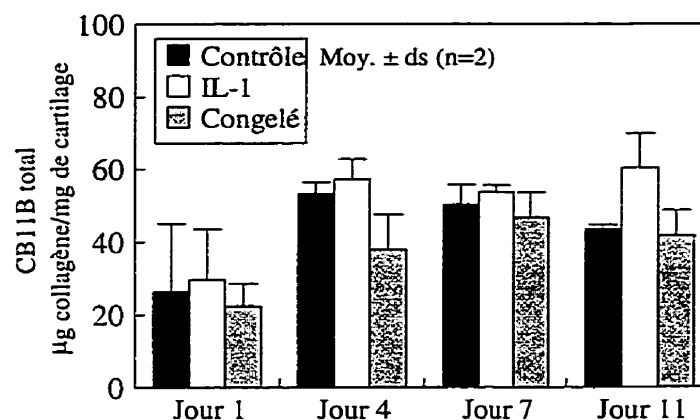


Figure 2.11 : Contenu total de collagène de type II dans les cartilages

2.4.2.2 Contenu de collagène clivé

L'IL-1 α stimule la production de collagénases qui sont responsables du clivage des fibres de collagène.

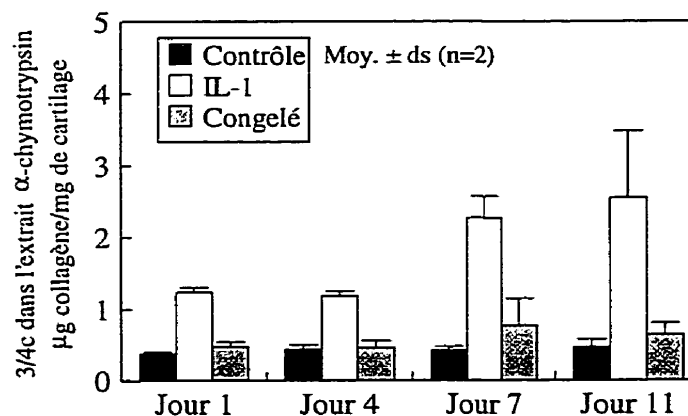


Figure 2.12 : Contenu de collagène de type II clivé dans l'extrait d'α-chymotrypsin

La figure 2.12 présente la concentration de collagène de type II clivé qui a été mesurée dans l'extrait de digestion avec α -chymotrypsin. Nous constatons que la quantité de collagène clivé des disques traités avec IL-1 α est environ 5 fois plus élevée que celle des cartilages de contrôle ou des disques congelés à partir du jour 7 de la culture.

La concentration de collagène clivé dans l'extrait de digestion avec protéinase K est présentée à la figure 2.13. Cette concentration doit être négligeable pour tous les cartilages, car la protéinase K ne clive pas le collagène au même site que les collagénases. Nous observons toutefois que les concentrations de collagène clivé des cartilages congelés des jours 4 et 7 sont très élevées par rapport aux autres. Puisque chaque colonne est la moyenne de deux échantillons, il est fort probable que cet écart soit dû à un des deux échantillons.

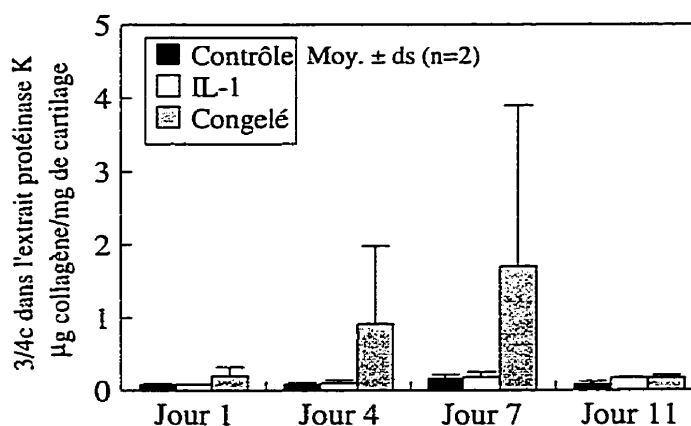


Figure 2.13 : Contenu de collagène de type II clivé dans l'extrait de protéinase K

2.4.3 Discussion sur le contenu de collagène de type II des cartilages traités avec IL-1 α

2.4.3.1 Discussion des résultats

Le tableau 2.2 présente un résumé des résultats qui ont été présentés aux figures 2.10 à 2.13.

Tableau 2.2 : Dénaturation et clivage du collagène de type II pour des cartilages normaux et des disques traités avec IL-1 α

Jours	Contenu total, μg collagène/mg cartilage			Dénaturation, μg collagène/mg cartilage			Clivage, μg collagène/mg cartilage		
	Contrôle	IL-1	Congelé	Contrôle	IL-1	Congelé	Contrôle	IL-1	Congelé
1	29.46	33.63	24.34	2.98	3.92	1.93	0.39	1.24	0.48
4	58.92	68.34	41.92	5.55	11.10	4.04	0.45	1.19	0.47
7	56.86	71.82	52.96	6.57	18.10	6.27	0.43	2.27	0.77
11	53.02	82.62	50.37	9.52	22.20	8.60	0.47	2.55	0.64

Nous constatons d'abord que le contenu total de collagène des disques de contrôle et des cartilages congelés est inférieur à la normale. En effet, pour un cartilage de 3 mm de diamètre dont le poids est d'environ 10 mg, le poids théorique de collagène se situe autour de 1.2 mg (120 μg de collagène/mg de cartilage). La concentration de collagène que nous avons mesurée pour les disques de contrôle est environ 3 fois inférieure à la normale. Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que les disques ont été placés dans une solution de HBSS avec des inhibiteurs 12 heures avant la digestion avec α -chymotrypsin, lors des mesures de l'épaisseur du cartilage qui seront présentées à la section 3.2.3. Des résultats semblables ont été observés au cours d'une autre expérience qui a été réalisée par Marc Thibault. Il est possible que les inhibiteurs diminuent l'effet de la protéinase K. Nous n'expliquons toutefois pas encore le mécanisme biochimique à

l'origine de ce phénomène. Il est également difficile d'expliquer pourquoi le contenu total de collagène des disques traités avec IL-1 α est plus élevé que celui des cartilages de contrôle et que le contenu total de collagène du triplet du jour 1 est plus faible que celui des autres triplets.

À partir de ces résultats, nous pouvons conclure que 5 ng/ml d'IL-1 α provoque une dégradation du collagène de type II à partir du jour 7 de la culture. La quantité de collagène dénaturé est plus importante que celle de collagène clivé. Toutefois, le clivage relatif des fibres de collagène des disques traités avec IL-1 α par rapport aux cartilages de contrôle est plus important que la dénaturation des fibres de collagène. Nous remarquons également, pour les disques de contrôle, une dénaturation du collagène en fonction de la durée de la culture. Cette dégradation est beaucoup moins rapide que pour les disques traités avec IL-1 α . Il est toutefois bizarre que les disques congelés directement après la culture soient également caractérisés par une augmentation de la dénaturation du collagène. Ceci suggère que l'augmentation de la dénaturation du collagène pour les disques de contrôle n'est peut-être pas réelle, mais plutôt associée à un problème lors de l'essai biochimique, comme l'activité de l' α -chymotrypsin et de la protéinase K. La concentration de collagène clivé dans les disques de contrôle et congelés est très semblable, ce qui permet de conclure que les conditions de culture ne favorise pas le clivage du collagène. Nous pouvons donc supposer que les conditions de culture des cartilages n'affectent pas la dégradation du collagène.

Il faut, toutefois, être conscient que les résultats précédents ne sont qu'une indication de l'effet de l'IL-1 α sur la dégradation de collagène, car ils ne représentent que la moyenne de 2 échantillons. Il serait donc important de recommencer une expérience plus détaillée avec d'autres échantillons afin de vérifier la reproductibilité de ces résultats.

2.4.3.2 Comparaison avec la littérature

Il existe peu d'études sur l'effet de l'IL-1 α sur le contenu de collagène de type II dans le cartilage articulaire. En effet, il est beaucoup plus difficile de quantifier le contenu de collagène dans le cartilage que le contenu de GAG.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, Hollander A. P. et al. ont mis au point, en 1994, une méthode qui permet de quantifier le collagène de type II dénaturé dans le cartilage. À l'aide de cette méthode, ils ont étudié la dénaturation du collagène chez 8 patient normaux et 16 patients souffrant d'ostéoarthrite. Le contenu total de collagène est respectivement de 140 et 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de cartilage pour les patients normaux et ostéoarthritiques. alors que le pourcentage de dénaturation est de 1.1% (1.54 $\mu\text{g}/\text{mg}$) pour les cartilages normaux et 6% (6 $\mu\text{g}/\text{mg}$) pour les dégradés. Nous ne pouvons pas comparer directement ces résultats avec ceux que nous avons obtenus, car cette étude a été réalisée sur des cartilages humains. Par conséquent, le degré d'ostéoarthrite n'est pas aussi facile à évaluer qu'avec un agent de dégradation biochimique tel que l'IL-1 α (Hollander A. P. et al., 1994).

En 1997, Kozaci L. D. et al. ont utilisé l'essai biochimique mis au point par Hollander A. P. et al. pour doser le collagène dénaturé qui est libéré dans le milieu lors de la culture d'explants de cartilages articulaires. Ils ont observé qu'une concentration de 50 ng/ml d'IL-1 α pendant 4 semaines n'augmente pas la libération de collagène dénaturé dans le milieu. Il est important de noter que les changements de milieu ne sont effectués qu'aux jours 7, 14 et 21 de la culture. (Kozaci L. D. et al., 1997). Nous ne pouvons pas comparer nos résultats avec cette équipe, car nous n'avons pas dosé le contenu de collagène dénaturé dans le milieu.

Bonassar L. J. et al. ont constaté que le pourcentage de dénaturation du collagène après une culture de 3 jours avec 1 mM d'APMA est de 6.9%, alors que les cartilages de contrôle sont caractérisés par une dénaturation du collagène de 2.5%. Il ont également observé que la stromelysine-1 (100 µg/ml pendant 3 jours) n'affecte pas significativement la dénaturation du collagène. Il serait donc intéressant de recommencer une culture avec APMA et d'étudier la dégradation du collagène de type II (Bonassar L. J. et al., 1995a).

CHAPITRE 3 : Propriétés électromécaniques de cartilages normaux et dégradés

Les propriétés électromécaniques du cartilage sont très sensibles au contenu de protéoglycanes et de collagènes de la matrice extracellulaire. En effet, les rigidités statique et dynamique ainsi que les potentiels d'écoulement mesurés à la surface articulaire du cartilage sont une indication très précise du degré de dégénérescence de la matrice extracellulaire. La culture de cartilage en présence d'agents de dégradation tels que l'IL-1 α ou l'APMA permet d'établir des liens entre les caractéristiques biochimiques et les propriétés électromécaniques du cartilage.

Dans ce chapitre, nous allons d'abord présenter une revue de la littérature sur les potentiels d'écoulement et les modèles théoriques du cartilage. Dans une deuxième section, le protocole de mesure sera décrit. Nous présenterons ensuite les propriétés électromécaniques, c'est-à-dire les rigidités statique et dynamique et les profils de potentiel d'écoulement, mesurés sur des cartilages normaux et dégradés. Nous discuterons des phénomènes que nous avons observés et nous comparerons nos résultats avec la littérature. Finalement, nous parlerons de la précision des différentes propriétés électromécaniques et de leur lien avec les caractéristiques biochimiques des cartilages qui ont été présentées au chapitre 2.

3.1 Revue de la littérature

3.1.1 Les potentiels d'écoulement

Les premières mesures de potentiel d'écoulement ont été effectuées en 1969 par Maroudas A. et al.. Ils ont observé que l'application d'une différence de pression

hydrostatique à travers une tranche de cartilage de 400 μm d'épaisseur provoque un écoulement de fluide et génère un potentiel d'écoulement (Maroudas A. et al., 1969).

En 1987, Frank E. H. et al. ont étudié plus systématiquement les propriétés électromécaniques du cartilage en mesurant les potentiels d'écoulement générés lors de la compression confinée du cartilage. Ils ont observé l'effet du pH et de la force ionique sur les potentiels d'écoulement (Frank E. H. et al., 1987a). Ils ont ensuite comparé les résultats expérimentaux avec un modèle biphasique qui a été développé dans les années 1980 pour la compression confinée du cartilage et qui sera décrit dans la section suivante (Frank E. H. et al., 1987b). Ils ont également effectué des mesures de potentiel d'écoulement sur des cartilages qui ont été placés en culture avec deux agents de dégradation, la chondroïtinase ABC et la trypsin, dont les effets biochimiques ont été présentés à la section 2.1.2 (Frank E. H. et al., 1987c).

Les premières mesures de potentiel d'écoulement en compression non confinée ont été réalisées en 1995 par Kim Y. J. et ses collègues qui ont également développé un modèle poroélastique pour comparer leurs résultats expérimentaux avec les prédictions théoriques. Ils ont étudié la variation de l'amplitude des potentiels d'écoulement et de la rigidité dynamique en fonction de la fréquence. Ils ont également observé l'effet des compressions sinusoïdales sur la synthèse de protéoglycanes dans le cartilage (Kim Y. J. et al., 1995). À partir de 1995, l'effet de différents agents de dégradation, tels que l'IL-1 β , l'APMA, la stromelysine et l'acide rétinoïque, sur les mesures de potentiel d'écoulement a été étudié en détail par Bonassar L. J. et al., dans une géométrie de compression confinée (Bonassar L. J. et al., 1995a, 1995b, 1995c, 1996 et 1997).

Les mesures de potentiels d'écoulement que nous avons réalisées et qui seront présentées dans les sections suivantes ont été effectuées à l'aide d'une série linéaire de 8 électrodes de 50 μm de diamètre, contrairement aux différentes équipes de recherche qui

ont utilisé deux électrodes de taille beaucoup plus importante. De plus, nous avons effectué des mesures de potentiel d'écoulement sur la surface articulaire du cartilage dans une géométrie de compression non confinée.

3.1.2 Les modèles théoriques du cartilage

Le développement de modèles théoriques est une étape primordiale pour la compréhension du fonctionnement du cartilage. En effet, la comparaison des mesures expérimentales avec les modèles théoriques permet d'expliquer les phénomènes observés. Les modèles sont utilisés pour prédire les profils de forces électromécaniques et du flux de fluide induits lors de la compression du cartilage.

L'étude des matériaux poroélastiques a débuté en 1941, lorsque Biot M. A. et ses collègues ont développé un modèle poroélastique basé sur l'étude de la consolidation des sols. Ils ont observé que, sous l'effet d'un poids, le sol se comprime et provoque l'écoulement du fluide. Les résultats de ces études ont été utilisés plus tard pour décrire le fonctionnement du cartilage.

En 1980, un modèle biphasique du cartilage a été développé par Mow V. C. et ses collègues. Ce modèle homogène et isotrope décrit le comportement du cartilage dans une géométrie de compression confinée, c'est-à-dire lorsque le cartilage est comprimé dans la direction axiale entre une électrode de référence et une électrode poreuse qui permet l'écoulement du fluide. Ce modèle biphasique qui tient compte des phases solide et fluide du cartilage est basé sur plusieurs équations. L'équation de continuité relie les deux phases incompressibles du cartilage en tenant compte de la porosité de la matrice extracellulaire. L'équation de l'équilibre des forces pour les phases solide et fluide est basée sur la deuxième loi de Newton en négligeant l'inertie. Les équations constitutives du fluide non visqueux et du solide élastique relient respectivement les contraintes à la vitesse ou la déformation. Et finalement, la loi de Darcy décrit l'interaction visqueuse

entre les deux phases du cartilage. La manipulation mathématique de ces différentes équations permet de décrire les réponses dynamiques électrocinétiques telles que le profil radial de pression et de vitesse du fluide dans le cartilage pour une géométrie de compression confinée (Mow V. C., et al, 1980).

En 1984, Armstrong C. G. et ses collègues ont développé un modèle qui permet de décrire le comportement du cartilage dans une géométrie de compression non confinée. Lors de la compression non confinée, le cartilage prend de l'expansion et le fluide s'écoule dans la direction radiale. En supposant que la surface des électrodes qui compriment le cartilage est sans friction et que le fluide s'écoule dans la direction radiale, il est possible de modifier mathématiquement le modèle biphasique de Mow V. C. et al. pour décrire les propriétés électrocinétiques du cartilage dans une géométrie de compression non confinée (Armstrong C. G. et al., 1984). Toutefois, les résultats de ce modèle ne sont pas toujours en accord avec les données expérimentales. En 1995, ce modèle a été modifié pour inclure des conditions aux frontières adhésives entre les électrodes et le cartilage (Kim Y. J. et al., 1995).

Récemment, un modèle composite non homogène a été développé par Soulhat J. et al.. Ce modèle est basé sur les équations mathématiques du modèle biphasique. Toutefois, dans la géométrie de compression non confinée, le modèle tient compte de la non linéarité des fibres de collagène, c'est-à-dire que la rigidité des fibres de collagène est nulle en compression et constante en tension. Ce modèle permet de déterminer le profil de déformation, de contrainte, de pression et de vitesse relative du fluide dans le cartilage. Il est basé sur quatre paramètres: le module à l'équilibre de la matrice (E_m), la perméabilité hydraulique (k), le coefficient de Poisson de la matrice (ν_m) et la rigidité des fibres de collagène (E_f). Ces paramètres peuvent être déterminés par le *fit* ou l'ajustement des paramètres du modèle sur les courbes expérimentales de relaxation de contrainte de la charge (Soulhat J. et al., 1997 et 1998a).

3.2 Mesure des propriétés électromécaniques

Dans cette section, nous allons décrire les protocoles de mesures électromécaniques qui ont été utilisés lors des trois expériences que nous avons présentées au chapitre 2. Nous allons ensuite montrer des exemples de données typiques qui sont obtenues lors des tests de relaxation de contrainte et de compression sinusoïdale. Finalement, nous discuterons de la technique de mesure de l'épaisseur du cartilage.

3.2.1 Protocole des mesures électromécaniques

3.2.1.1 Cartilages traités avec $IL-1\alpha$ pour une durée de culture fixe

Lors de la première expérience, 4 triplets de cartilages ont été placés en culture pendant 13 jours. Le montage électromécanique que nous avons utilisé a été présenté à la section 1.4. Pendant les mesures électromécaniques, la surface articulaire du cartilage a été alignée sur les électrodes et la tige de compression a été placée en contact avec l'os du cartilage (voir figures 1.4 et 3.1). La chambre de test a été remplie d'une solution de 0.01M NaCl. Un offset de compression de 100 μm , ce qui correspond environ à 10% de l'épaisseur du cartilage, a d'abord été appliqué au cartilage par pas de 20 μm à une vitesse de 2 $\mu\text{m/s}$ avec un temps de relaxation de 200 secondes après chaque pas. Par la suite, nous avons effectué une série de sinusoïdes dynamiques à des fréquences de 2, 0.2 et 0.02 Hz et des amplitudes de 8, 4 et 2 μm . Dans un deuxième temps, la solution de la chambre de test a été changée pour une concentration de 0.15 M NaCl. Après une période de diffusion d'environ 30 minutes, nous avons effectué la même série de compressions sinusoïdales. L'offset de compression a ensuite été augmenté à 200 μm et, encore une fois, la même série de sinusoïdes dynamiques a été réalisée. Les tests électromécaniques ont été effectués sur 4 paires de disques. Seulement 2 disques congelés ont été testés dans une solution de 0.15 M NaCl et à un offset de compression de 100 μm . Il est à noter que

la chambre de test a été rincée à plusieurs reprises entre les changements de solution saline.

Au cours de cette expérience, nous avons étudié l'effet de la concentration de NaCl de la solution de test sur les mesures de potentiel d'écoulement. En effet, nous avons choisi de faire les tests électromécaniques dans des solutions salines de deux concentrations différentes, car les signaux électriques ont une amplitude plus importante dans la solution de 0.01 M NaCl que dans 0.15 M NaCl (concentration de NaCl physiologique). De plus, nous ne savons pas si l'amplitude des signaux électriques mesurés sur des cartilages dégradés serait suffisamment élevée dans la solution de 0.15 M NaCl.

Le pH des solutions salines de test (0.01 ou 0.15 M NaCl) est de 5.5, ce qui correspond au pH de l'eau déionisée. Puisque les glycosaminoglycanes (GAG) sont composées de chaînes de chondroïtine et kératane sulfates avec des groupements carboxyles et sulfates qui ont des pKa respectifs de 4 et 2, tous les groupements sont ionisés à un pH de 5.5 et la charge nette est positive. Pour les fibres de collagène, les groupements carboxyles et les acides aminés basiques des chaînes de collagène sont tous ionisés à un pH de 5.5. La charge nette associée aux fibres de collagène est presque nulle. Par conséquent, à un pH de 5.5, la charge nette fixe du cartilage est positive.

3.2.1.2 Cartilages traités avec IL-1 α pour des durées de culture variables

Lors de la deuxième expérience, 18 triplets de cartilages qui ont été placés en culture pour des durées variables ont été testés électromécaniquement dans une solution tampon de HBSS (*Hank's Buffered Saline Solution*) de concentration de NaCl physiologique avec un pH de 7.2. Un offset de compression de 100 μm a été appliqué au cartilage par pas de 20 μm à une vitesse de 2 $\mu\text{m/s}$ avec un temps de relaxation de 300

secondes après chaque pas. Les compressions sinusoïdales ont été effectuées à des fréquences de 1, 0.1 et 0.01 Hz et à des amplitudes de 8, 4 et 2 μm .

Comme nous l'avons mentionné au chapitre 2, 4 triplets différents de cartilages ont été testés après 1, 4, 7 et 11 jours de culture et 2 triplets ont été mesurés après 14 jours. Pour chacune de ces durées, les cartilages ont été retirées de la culture le matin et placées dans des chambres humidifiées. Pour éviter une perte de protéoglycanes, le cartilage qui est placé dans la chambre humidifiée n'est pas en contact avec la solution de HBSS. En effet, le cartilage est déposé du côté de l'os sur un papier imbibé de la solution. Les tests électromécaniques ont été réalisés selon le protocole précédent au cours des deux journées suivantes. De plus, pour vérifier l'effet de la congélation sur les propriétés électromécaniques, chaque paire de cartilage (contrôle et expérimental) est associée à un cartilage qui a été congelé directement après l'extraction. Il est à noter que les paires de cartilages du jour 1 sont associées à des disques frais qui ont été placés dans des chambres humidifiées tout de suite après l'extraction et testés le lendemain.

3.2.1.3 Cartilages traités avec APMA

Lors de la troisième expérience, 4 triplets de cartilages qui ont été placés en culture avec et sans APMA ont été testés électromécaniquement. Un premier triplet a été testé en juin 1997 et en juin 1998 alors que les trois autres ont été testés seulement pendant l'été 1998. Ceci nous a permis d'étudier l'effet de 15 mois de congélation sur les propriétés électromécaniques du cartilage. Le protocole de mesure qui a été utilisé est le même que pour la première expérience avec une seule concentration de solution saline (0.15 M NaCl) et un offset de compression de 100 μm .

3.2.2 Exemple de résultats bruts

Lors d'un test électromécanique, le cartilage est aligné de façon à ce que les électrodes 2 à 6 couvrent le rayon d'un disque de 3 mm de diamètre (voir figure 3.1). L'électrode 1 est située de l'autre côté du centre du cartilage et les électrodes 7 et 8 servent de référence dans le bain. Pendant la compression du cartilage, nous mesurons la différence de potentiel entre 2 électrodes voisines.

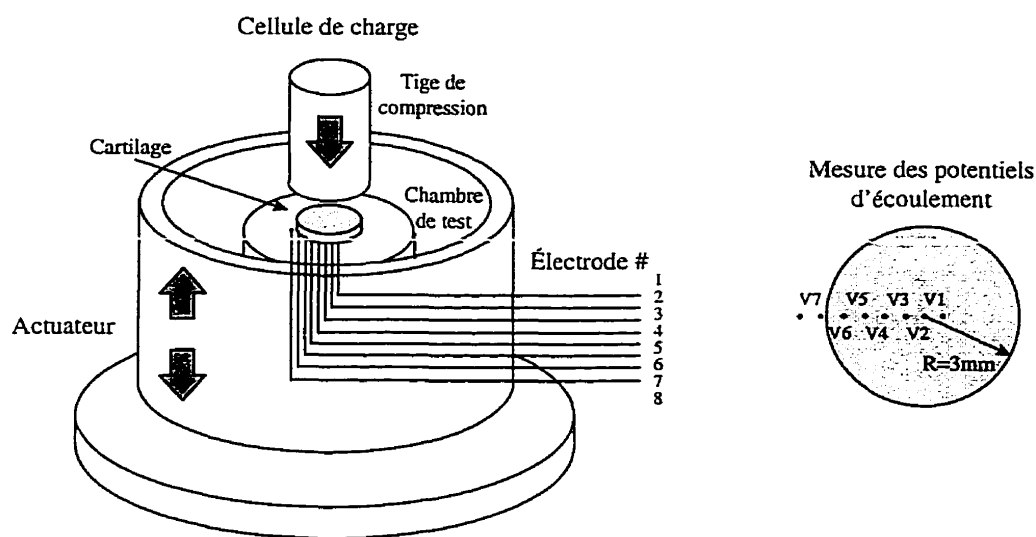


Figure 3.1 : Alignement du cartilage par rapport aux 8 électrodes

La figure 3.2 présente un exemple typique des données d'un test de relaxation de contrainte pour un pas de compression de 180 à 200 μm à une vitesse de 2 $\mu\text{m/s}$ et un temps de relaxation de 300 secondes pour un cartilage de contrôle dans une solution de test de 0.15 M NaCl. Chaque canal représente la différence de potentiel entre 2 électrodes voisines. Nous constatons que l'amplitude des signaux de relaxation augmente du centre (canal 2) vers la périphérie du disque (canal 6). Le canal 7 qui est situé dans le bain a une amplitude presque nulle. Le signal électrique du canal 6 est caractérisé par une distorsion (autour de 20 secondes) qui est due au filtre passe-haut lors de l'acquisition des signaux.

Dans le chapitre 4, nous verrons comment corriger cette distorsion du signal. Il est important de souligner que c'est la première fois que des mesures de potentiel d'écoulement sont réalisées lors d'un test de relaxation de contrainte à l'aide d'une série linéaire de plusieurs électrodes.

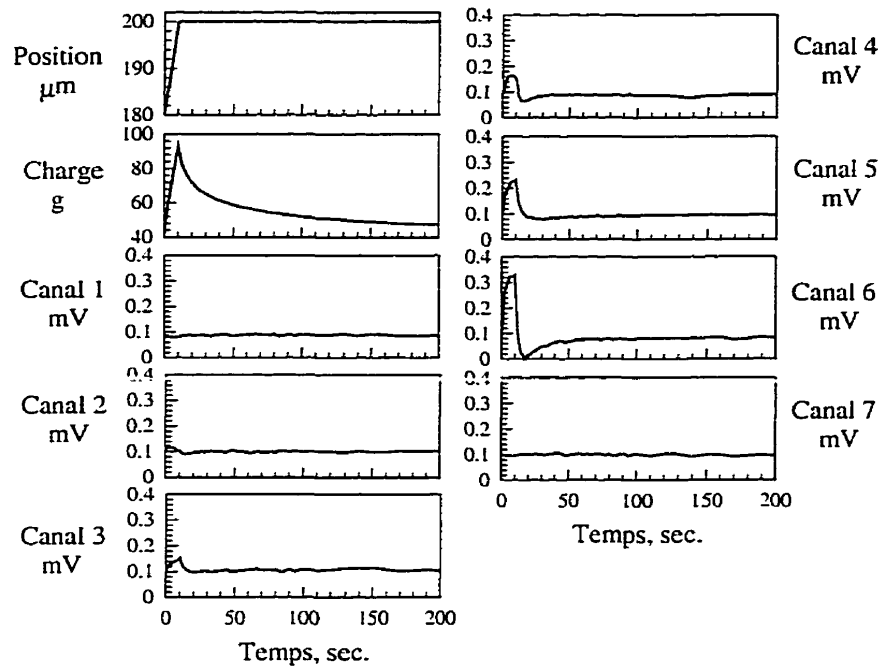


Figure 3.2 : Données brutes d'un test de relaxation de contrainte pour un disque de contrôle dans une solution de 0.15M NaCl

La figure 3.3 présente un exemple typique des données brutes mesurées lors de la compression sinusoïdale d'un cartilage de contrôle pour une amplitude de 4 μm et une fréquence de 0.2 Hz dans une solution 0.01 M NaCl. Le canal 2 est situé environ au centre du disque où le potentiel d'écoulement est presque nul. L'amplitude du potentiel augmente jusqu'au canal 6, car elle est maximale à la périphérie du disque. Nous constatons que l'amplitude du canal 7 n'est pas nulle, c'est-à-dire qu'un faible signal est mesuré dans la solution saline.

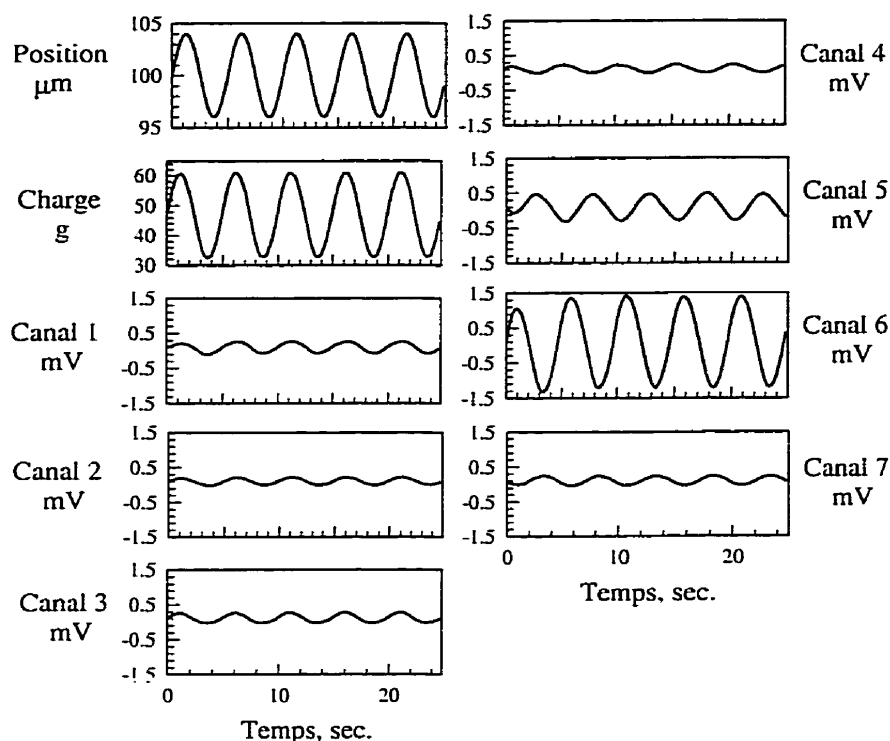


Figure 3.3 : Données brutes d'un test de compressions sinusoïdales à 0.2 Hz et 4 μm pour un disque de contrôle dans une solution de 0.01M NaCl

3.2.3 Mesure de l'épaisseur des cartilages

Afin d'évaluer les propriétés électromécaniques des cartilages normaux et dégradés, il est important de connaître précisément l'épaisseur du cartilage non calcifié. Nous avons utilisé deux techniques différentes pour évaluer l'épaisseur du cartilage non calcifié. Dans les deux cas, l'épaisseur a été mesurée après les tests électromécaniques.

Pour la première culture avec IL-1 α pendant 13 jours, nous avons quantifié le contenu de GAG dans les disques en effectuant des tranches circulaires de 100 μm d'épaisseur à partir de la surface articulaire du cartilage jusqu'au cartilage calcifié (figure 2.3). Puisque nous connaissons l'épaisseur totale du cartilage (avec os) qui a été mesurée

au micromètre, nous pouvons déduire approximativement l'épaisseur du cartilage non calcifié par le nombre de tranches qui ont été effectuées sur chacun des échantillons. Cette technique de mesure de l'épaisseur est approximative. En effet, quelques tranches sont éliminées au début de la coupe car elles ne sont pas circulaires. De plus, la dernière tranche n'est pas toujours située à l'interface entre le cartilage non calcifié et le cartilage calcifié. Nous pouvons donc conclure que cette méthode donne une bonne indication de l'épaisseur du cartilage qui est en réalité plus élevée.

L'épaisseur du cartilage des échantillons de la deuxième culture avec IL-1 α pour des durées variables a été évaluée à l'aide du microscope. Après les tests électromécaniques, les cartilages ont été congelés dans une solution de HBSS. Lors de la mesure de l'épaisseur, les échantillons ont d'abord été placés dans une solution de HBSS avec des inhibiteurs de protéases (Iodoacétamide 1mM, EDTA 1mM et Pepstatine 5 μ g/ml) et placés à 4°C. L'épaisseur de chaque cartilage a ensuite été mesurée pour deux endroits sur le disque. La figure 3.4 démontre que l'épaisseur du cartilage non calcifié peut être très variable selon l'épaule de boeuf ou la localisation sur la surface articulaire du cartilage.

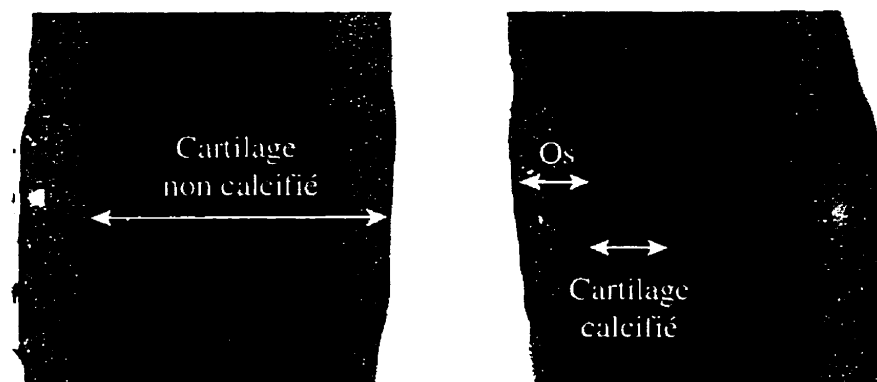


Figure 3.4 Mesure de l'épaisseur du cartilage à l'aide d'une technique de microscopie

Afin de vérifier la précision de cette méthode, nous avons comparé les mesures d'épaisseur avec les mesures du poids que nous avons obtenues sur la moitié des

échantillons lors des tests ELISA pour quantifier le contenu de collagène (section 2.4). Nous avons constaté que le rapport de l'épaisseur de l'os et du cartilage calcifié sur celle du cartilage non calcifié correspond très bien au rapport du poids de l'os et du cartilage calcifié sur celui de cartilage non calcifié. Nous pouvons donc conclure que la méthode utilisée pour mesurer l'épaisseur est valable.

3.3 Rigidité statique et dynamique

Dans cette section, nous allons présenter les mesures de rigidités statique et dynamique que nous avons effectuées sur des cartilages normaux et dégradés. Lors de l'analyse des résultats, nous avons utilisé le test *T de student (ou t-test)* comme première indication statistique. Ce test permet de déterminer dans quelle mesure deux échantillons sont susceptibles de provenir de deux populations sous-jacentes ayant la même moyenne.

3.3.1 Calcul de la rigidité statique et dynamique

Les rigidités statique et dynamique sont calculées à partir de la formule suivante :

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{mgL}{A \cdot \Delta L}$$

Pour la rigidité statique, m représente la charge à l'équilibre qui est moyennée sur 10 points et ΔL est l'amplitude du pas de compression. De plus, L correspond à l'épaisseur du cartilage non calcifié moins l'offset de compression qui est appliqué avant le pas en question, A est l'aire du cartilage non déformé et g représente l'accélération gravitationnelle. La rigidité dynamique est calculée à partir de la transformée de Fourier discrète de la charge et de la position. Dans ce cas, m est l'amplitude de la composante fondamentale de la charge et ΔL celle de la position lors des sinusoïdes dynamiques. La rigidité dynamique augmente en fonction de la fréquence des compressions sinusoïdales.

3.3.2 Résultats avec IL-1 α

3.3.2.1 Durée de culture fixe

La figure 3.5 présente la variation de la rigidité statique en fonction de la distance de compression qui a été mesurée lors de la première expérience avec IL-1 α . Il est à noter que le premier pas de compression de 0 à 20 μm ou de 100 à 120 μm n'est pas montré sur le graphique, car il est effectué dans un autre programme et permet de vérifier le contact entre la tige de compression et le cartilage. À 0.15 M NaCl, la rigidité statique est mesurée lors de l'augmentation de l'offset de compression de 100 à 200 μm . Les courbes sont légèrement décalées, car il y a eu une erreur d'amplitude lors du premier pas de compression. La rigidité statique des disques congelés qui a été mesurée dans la solution de 0.15 M NaCl pour un offset de compression de 100 μm n'est pas montrée sur le graphique. Elle est d'environ 0.275 MPa (moyenne de deux échantillons).

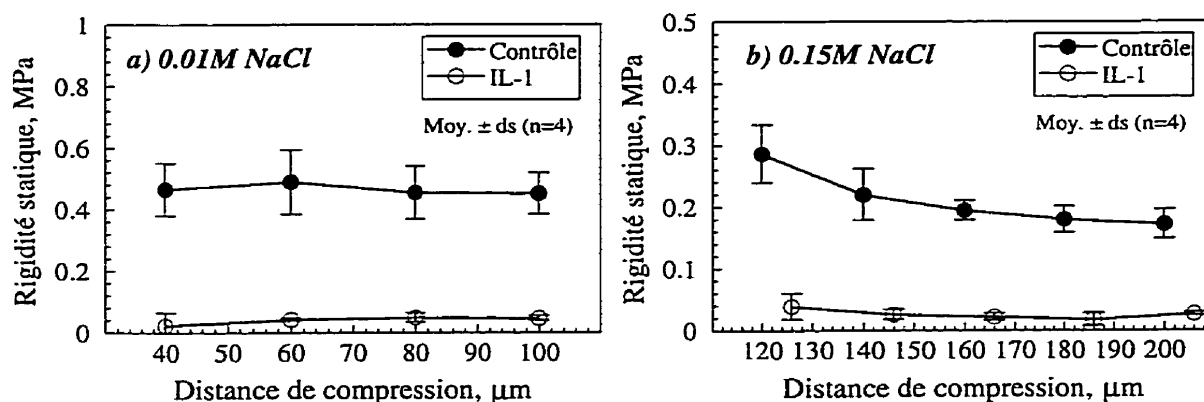


Figure 3.5 : Rigidité statique en fonction de la distance de compression pour des solutions de test de
a) 0.01 M NaCl et b) 0.15 M NaCl

Nous constatons que la rigidité statique des cartilages de contrôle est 10 fois plus élevée que celle des disques dégradés pour les deux concentrations de solution de test.

Après 13 jours de culture avec IL-1 α , la probabilité que les rigidités statiques des disques de contrôle et des cartilages expérimentaux proviennent de la même moyenne est respectivement de 0.005 et 0.003 pour les solutions de 0.01 M et 0.15 M NaCl. De plus, la rigidité statique mesurée dans la solution de 0.15 M NaCl est environ deux fois plus faible que celle mesurée dans 0.01 M NaCl.

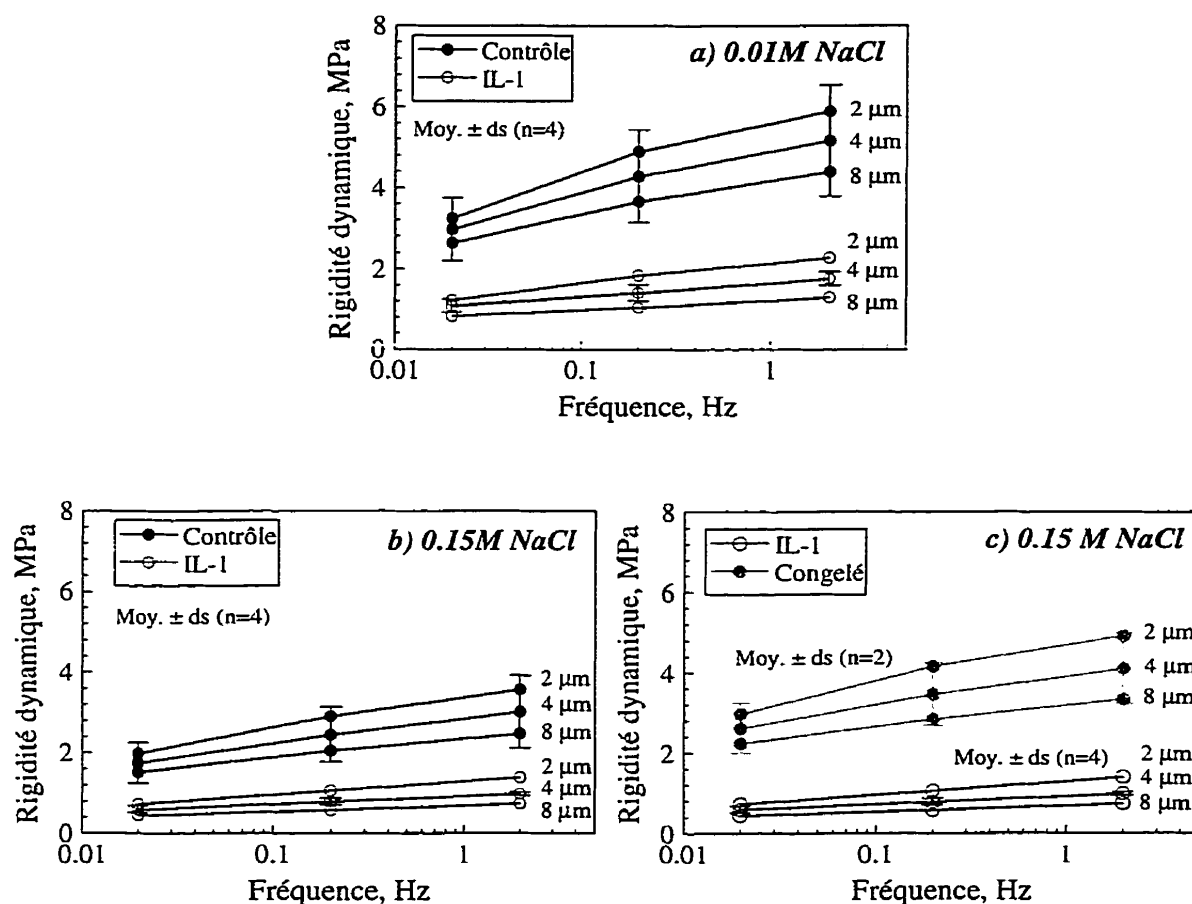


Figure 3.6 : Variation de l'amplitude de la rigidité dynamique en fonction de l'amplitude des compressions sinusoïdales dans des solutions de test de a) 0.01 M NaCl et b) et c) 0.15 M NaCl

La figure 3.6 présente la variation de la rigidité dynamique en fonction de la fréquence qui a été mesurée dans des solutions de 0.01 et 0.15 M NaCl, à un offset de compression de 100 μ m pour différentes amplitudes de compressions sinusoïdales (8, 4 et

2 μm). Pour plus de clarté, seul l'écart type associé à l'amplitude de compression sinusoïdale de 4 μm est présenté sur le graphique. La rigidité dynamique des cartilages de contrôle pour des compressions sinusoïdales à 0.2 Hz et à 4 μm est respectivement de 4.3 et 2.4 MPa pour les solutions salines de 0.01 et 0.15 M NaCl. Elle est environ 3 fois plus faible pour les cartilages traités avec IL-1 α que pour les disques de contrôle dans les deux solutions salines. À l'aide du test statistique, nous avons obtenu une probabilité de 0.01 pour les solutions de 0.01 et 0.15 M NaCl. De plus, nous observons que la rigidité dynamique des cartilages congelés directement après l'extraction est légèrement supérieure à celle des disques de contrôle. Nous remarquons également que la rigidité dynamique augmente lorsque l'amplitude des compressions sinusoïdales diminue et ce, de façon non linéaire. En effet, dans le cas linéaire, les trois courbes de rigidité dynamique correspondant aux différentes amplitudes seraient superposées.

3.3.2.2 Durées de culture variables

Lors de la deuxième expérience avec IL-1 α , nous avons étudié l'évolution des propriétés électromécaniques en fonction de la durée de la culture. Il est à noter que le triplet du jour 1 est différent des autres, car il est composé de 4 paires de cartilages (contrôle et expérimental) ainsi que de 4 disques qui ont été testés directement après l'extraction sans être congelés (disques frais dans la légende).

La figure 3.7 présente la variation de la rigidité statique en fonction de la durée de la culture. Nous constatons que la rigidité statique des disques traités avec IL-1 α est significativement inférieure à celle des cartilages de contrôle à partir du jour 7 de la culture. En effet, la probabilité que les rigidités statiques des disques de contrôle et des cartilages expérimentaux proviennent de la même moyenne est respectivement de 0.006 et 0.12 après 7 et 11 jours de culture. Nous remarquons que la rigidité statique des cartilages de contrôle diminue au cours de la culture d'une valeur de 0.8 MPa au jour 1 à

0.37 MPa au jour 11. Ceci explique pourquoi la différence entre la rigidité statique des cartilages de contrôle et des disques expérimentaux est moins significative après 11 jours de culture. Comme nous l'avons observé à la figure 2.4, la perte de GAG des disques de contrôle augmente à partir du jour 10 de la culture. Il est possible qu'un problème soit survenu à la fin de la culture.

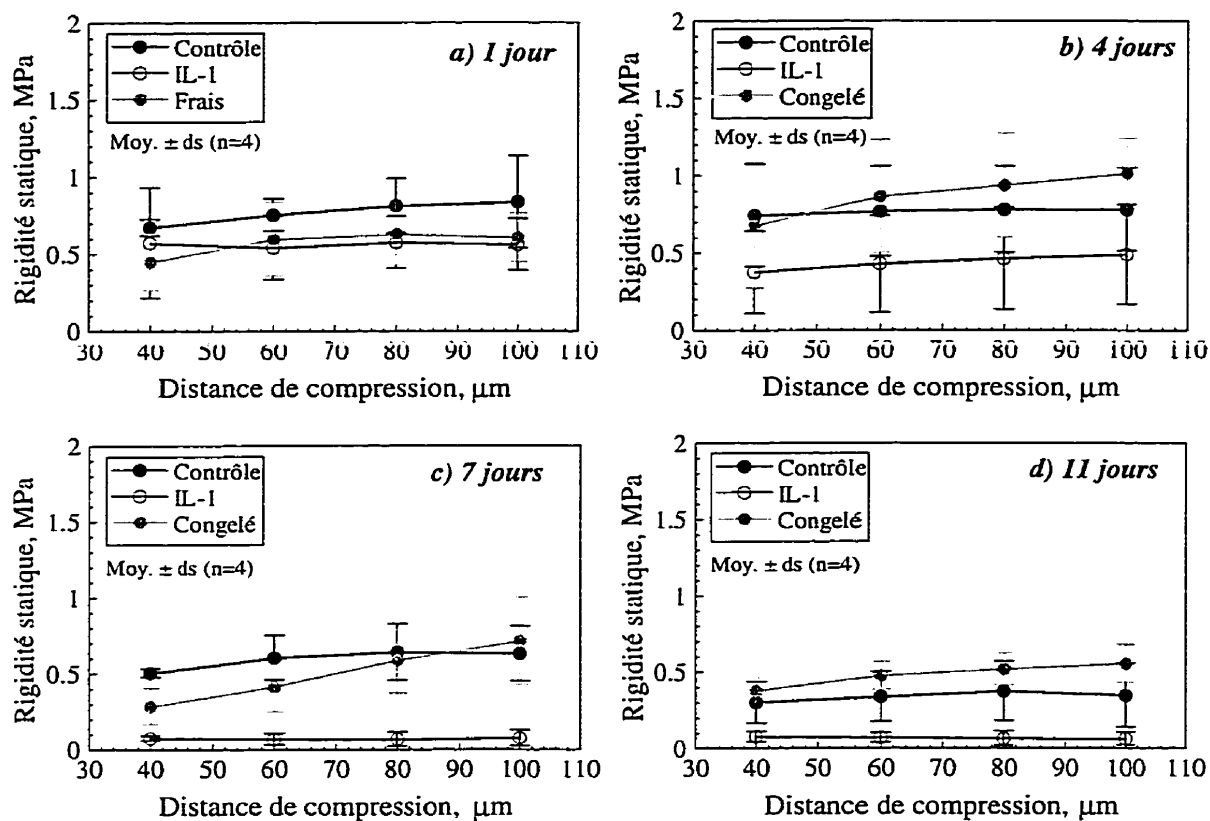


Figure 3.7 : Variation de la rigidité statique en fonction de la distance de compression pour a) 1 jour, b) 4 jours, c) 7 jours et d) 11 jours de culture

Il faut également être conscient que les 4 triplets associés à chaque durée sont différents et que la diminution de la rigidité statique en fonction de la durée de culture pourrait tout simplement être reliée au fait que les cartilages proviennent d'épaules variées ou d'endroits différents sur la surface articulaire. En effet, pour concevoir une

expérience où les jours et les triplets seraient associés, il faudrait créer des groupes de 12 disques (4 triplets). Pour un groupe de cette taille, les propriétés du cartilage sont très variées et nous ne pouvons donc pas supposer que les triplets associés à chacun des jours de culture sont équivalents. Nous constatons que les disques frais qui ont été testés directement après l'extraction ont une rigidité inférieure à celle des disques de contrôle du jour 1, alors que les disques congelés associés aux jours 4, 7 et 11 ont un comportement semblable aux disques de contrôle.

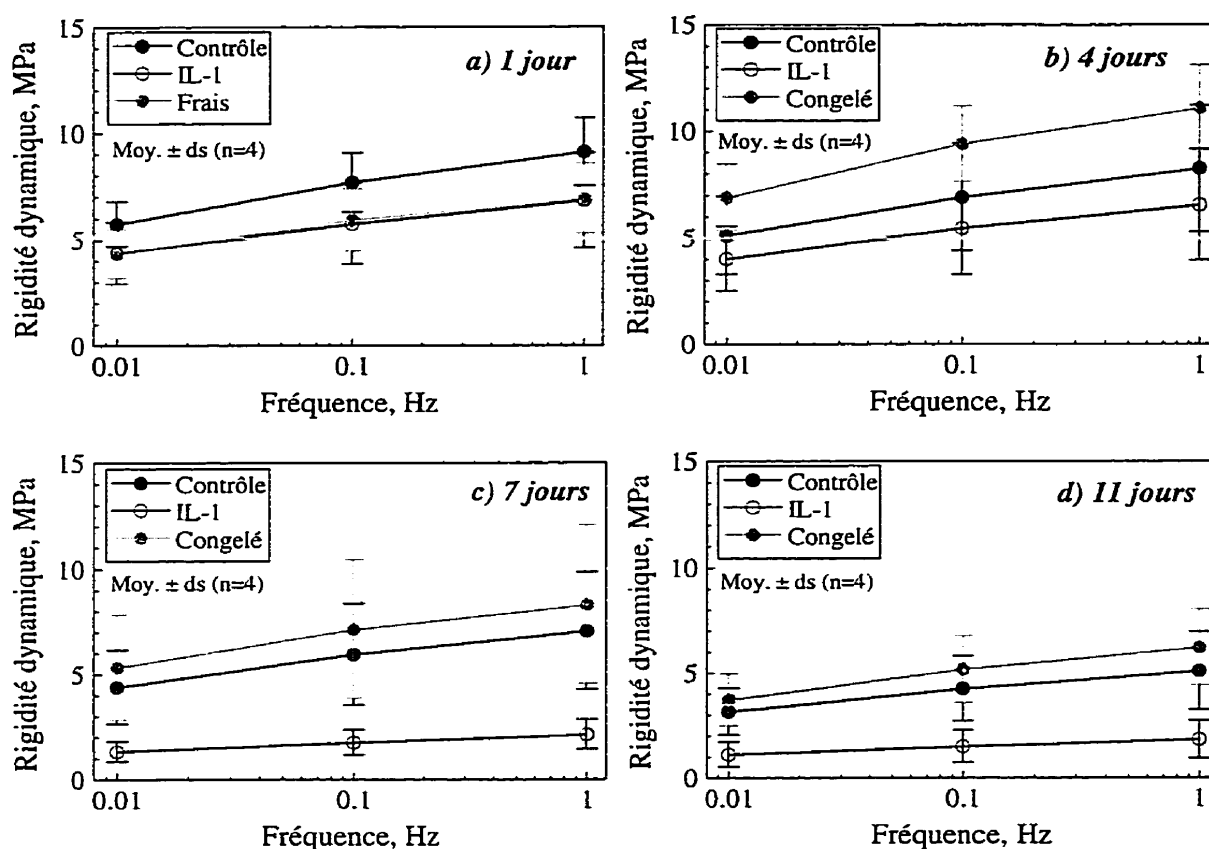


Figure 3.8 : Variation de l'amplitude de la rigidité dynamique en fonction de la fréquence pour a) 1 jour, b) 4 jours, c) 7 jours et d) 11 jours de culture

La figure 3.8 présente la variation de l'amplitude de la rigidité dynamique des cartilages en fonction de la fréquence, pour différentes durées de culture et pour une

amplitude de compressions sinusoïdales de $4\text{ }\mu\text{m}$. Nous constatons que les disques traités avec IL-1 α ont une rigidité dynamique environ 3 fois plus faible que celle des cartilages de contrôle après 7 jours de culture. La probabilité que les rigidités dynamiques des disques de contrôle et des cartilages expérimentaux proviennent de la même moyenne est respectivement de 0.04 et à 0.06 après 7 et 11 jours de culture (à $4\text{ }\mu\text{m}$ et 0.1 Hz). De plus, l'amplitude de la rigidité dynamique des disques congelés est plus élevée que celle des cartilages de contrôle, sauf pour les cartilages frais du jour 1. Tout comme pour la rigidité statique, nous observons que la rigidité dynamique des disques de contrôle diminue légèrement en fonction de la durée de la culture.

La figure 3.9 présente la variation de l'amplitude de la rigidité dynamique, en fonction de l'amplitude des compressions sinusoïdales pour les cartilages qui ont été placés 11 jours en culture. Nous remarquons que la rigidité dynamique diminue de façon non linéaire en fonction de l'amplitude des compressions sinusoïdales. De plus, nous avons observé que les cartilages traités avec IL-1 α sont caractérisés par une non linéarité plus importante.

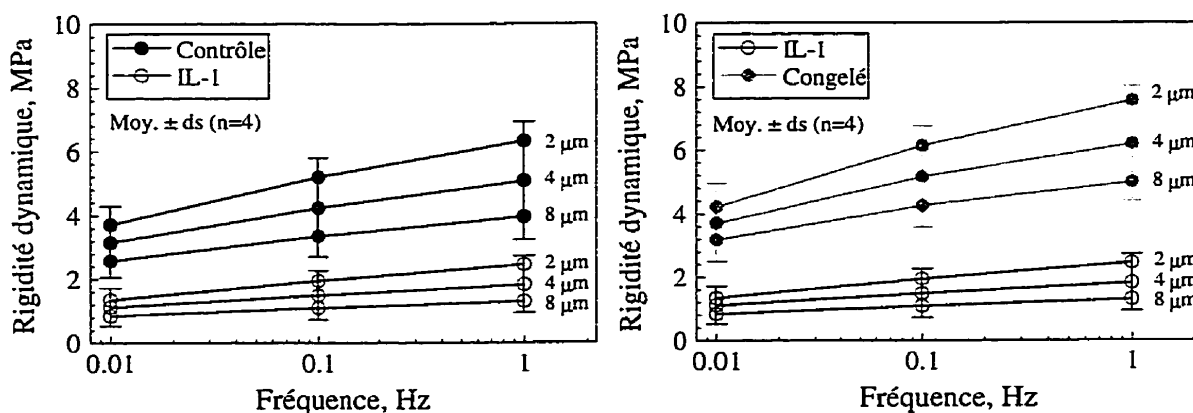


Figure 3.9 : Variation de l'amplitude de la rigidité dynamique en fonction de l'amplitude des compressions sinusoïdales après 11 jours de culture

La figure 3.10 montre la variation de la phase de la rigidité dynamique en fonction de la fréquence lors de compressions sinusoïdales de 4 μm après 11 jours de culture.

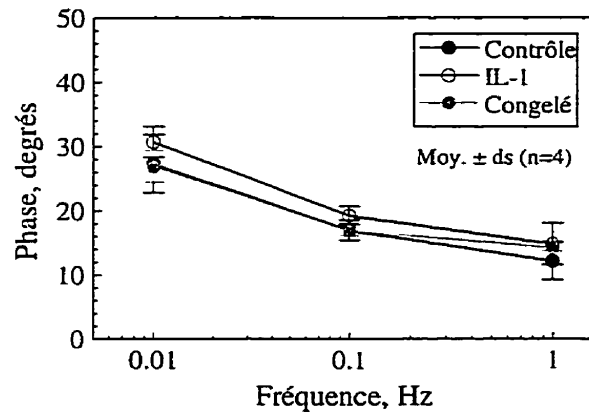


Figure 3.10 : Variation de la phase de la rigidité dynamique en fonction de la fréquence pour une amplitude de compressions sinusoïdales de 4 μm après 11 jours de culture

La phase de la rigidité dynamique représente la différence de phase entre la composante fondamentale de la phase de la charge et celle de la position. Lorsque la phase tend vers zéro, le cartilage a un comportement purement élastique avec aucune dissipation d'énergie, alors que pour une phase de 90 degrés, le cartilage a des propriétés purement viscoélastiques et la dissipation d'énergie est importante. À l'aide de la figure 3.10, nous observons que la phase ne varie pas significativement selon le degré de dégradation du cartilage. De plus, nous avons remarqué qu'elle ne varie pas non plus en fonction de l'amplitude des compressions sinusoïdales. Par contre, la phase diminue lorsque le fréquence augmente.

3.3.3 Résultats avec APMA

Comme nous l'avons mentionné à la section 3.2.1.3, un des quatre triplets de cartilage a été testé en juin 1997 et juin 1998 alors que les autres ont été testés seulement

en juin 1998. Les cartilages sont donc restés congelés à -20°C pendant environ 15 mois. De plus, pour calculer les rigidités statique et dynamique, nous avons estimé que l'épaisseur du cartilage non calcifié est de 1.1 mm.

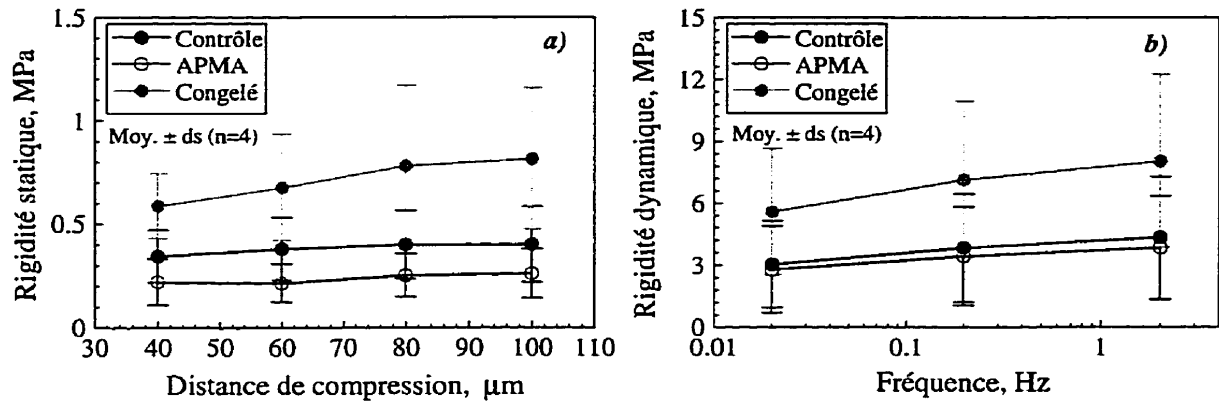


Figure 3.11 : Effet de l'APMA sur a) la rigidité statique et b) l'amplitude de la rigidité dynamique mesurée lors de compressions sinusoïdales de $4\ \mu\text{m}$ à $0.2\ \text{Hz}$

Les résultats qui sont présentés à la figure 3.11 représentent la moyenne des 4 échantillons qui ont été testés en 1998. Nous constatons que l'amplitude de la rigidité statique ou dynamique des cartilages de contrôle est légèrement supérieure à celle des disques expérimentaux après 7 jours en culture avec 1 mM d'APMA, mais il y a un chevauchement des écarts types.

3.4 Profil radial de potentiel d'écoulement

Dans cette section, nous allons présenter les profils de potentiel d'écoulement qui ont été mesurés sur des cartilages normaux et dégradés. Il est intéressant de pouvoir évaluer le degré de dégradation du cartilage à l'aide de différents paramètres mécaniques (rigidités statique et dynamique) ou électriques (potentiel d'écoulement). Ces paramètres peuvent quantifier le degré de dégénérescence de la matrice extracellulaire avec différents

niveaux de sensibilité et de précision.

3.4.1 Construction mathématique du profil radial de potentiel d'écoulement

À l'aide des données du test de compressions sinusoïdales, nous pouvons construire le profil radial d'amplitude et de phase des potentiels d'écoulement qui sont mesurés sur la surface articulaire du cartilage. Le potentiel dans le bain est d'abord fixé arbitrairement à zéro. Le deuxième point du profil situé à 1.2mm du centre correspond à l'addition dans le domaine complexe des canaux 6 et 7. Le troisième point est l'addition des canaux 5, 6 et 7 et ainsi de suite jusqu'au centre du disque. L'équation suivante présente l'amplitude (C) et la phase (θ_3) de l'addition dans le domaine complexe de deux canaux.

$$Ae^{i\theta_1} + Be^{i\theta_2} = Ce^{i\theta_3} = A\cos\theta_1 + B\cos\theta_2 + i(A\sin\theta_1 + B\sin\theta_2) = x + iy$$

$$\text{avec } C = \sqrt{(x + iy) \cdot (x - iy)}$$

$$\text{et } \theta_3 = \text{Arctg}(y/x)$$

3.4.2 Résultats avec IL-1 α

3.4.2.1 Durée de culture fixe

3.4.2.1.1 Variation du profil en fonction de la fréquence

La figure 3.12 présente les profils de potentiel d'écoulement qui ont été mesurés dans les solutions de test de 0.01 et 0.15 M NaCl à une amplitude de compressions sinusoïdales de 4 μm et un offset de compression de 100 μm pour des fréquences de 2, 0.2, 0.02 Hz. Toutes les courbes ont été moyennées sur 4 échantillons, sauf celles des cartilages congelés qui ont été moyennées sur deux échantillons.

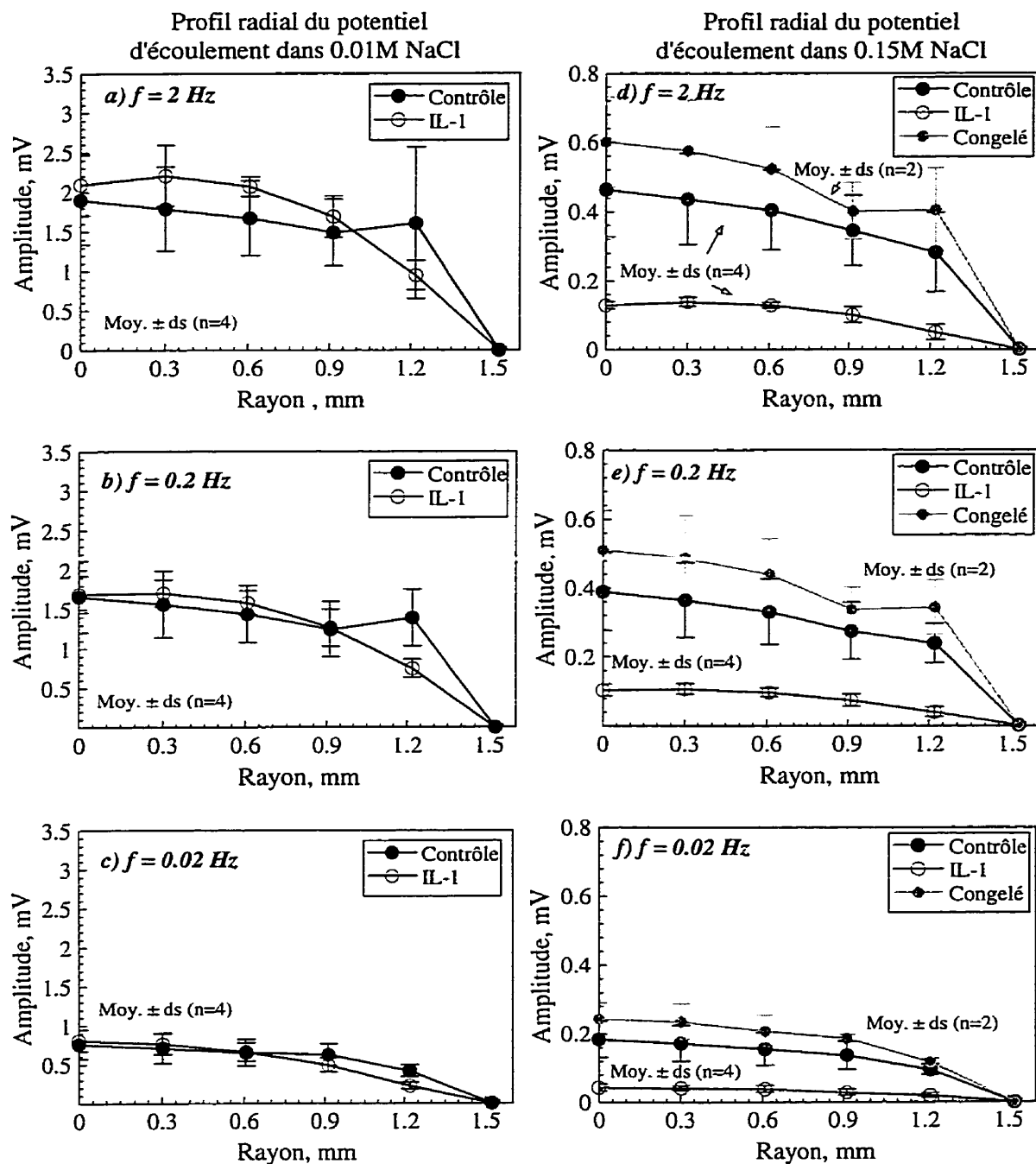


Figure 3.12 : Profils de potentiel d'écoulement dans une solution de test de 0.01 M NaCl à a) 2 Hz, b) 0.2 Hz et c) 0.02 Hz et dans 0.15 M NaCl à d) 2 Hz, e) 0.2 Hz et f) 0.02 Hz pour une amplitude de compressions sinusoïdales de 4 μm

Nous remarquons que la concentration de NaCl de la solution de test influence l'amplitude et la forme des profils de potentiel d'écoulement. À 0.01 M NaCl, l'amplitude du potentiel d'écoulement au centre des disques de contrôle et des cartilages traités avec IL-1 α est semblable, mais la forme du profil est différente. En effet, le gradient de potentiel à la périphérie du cartilage est plus important pour les disques de contrôle. À 0.2 Hz, la probabilité que les gradients de potentiel des disques de contrôle et des cartilages traités avec IL-1 α proviennent de la même moyenne est de 0.05. À 0.15 M NaCl, nous constatons que le gradient de potentiel à la périphérie est plus faible pour les disques traités avec IL-1 α . De plus, l'amplitude du potentiel d'écoulement au centre du disque est réduite d'un facteur 4 pour les disques expérimentaux. La probabilité calculée à partir du test statistique est respectivement de 0.005 et 0.01 pour le gradient à la périphérie et l'amplitude de potentiel au centre du disque. À une fréquence de 0.2 Hz, nous observons que l'amplitude maximale des disques de contrôle est 4 fois plus élevée à 0.01 M NaCl qu'à 0.15 M NaCl, alors que pour les cartilages dégradés, l'amplitude est 16 fois plus élevée. Les disques qui ont été congelés tout de suite après l'extraction n'ont été testés que dans une solution de 0.15 M NaCl. Nous observons que l'amplitude des potentiels d'écoulement des cartilages congelés est supérieure à celle des cartilages de contrôle.

Nous remarquons également que l'amplitude des potentiels d'écoulement augmente en fonction de la fréquence. En effet, à 0.15 M NaCl, les amplitudes de potentiel d'écoulement au centre des disques sont respectivement de 0.46, 0.39 et 0.18 mV à 2, 0.2 et 0.02 Hz, alors qu'elles sont de 2.09, 1.66 et 0.81 mV à une concentration de 0.01 M NaCl. La variation de l'amplitude des potentiels d'écoulement en fonction de la fréquence est semblable pour les deux solutions de concentrations de NaCl différentes.

Nous avons également effectué des mesures de potentiel d'écoulement avec un offset de compression de 200 μ m dans la solution de test de 0.15 M NaCl. Nous avons

observé que la forme du profil de potentiel d'écoulement est semblable à celle qui a été mesurée à 100 μm d'offset, avec une amplitude légèrement plus élevée. Les résultats obtenus pour une amplitude de compressions sinusoïdales de 4 μm à des fréquences de 2, 0.2 et 0.02 Hz sont présentés à l'annexe III. Il est important de souligner qu'un offset de compression de 100 μm se rapproche du chargement physiologique qui se produit dans le corps humain.

3.4.2.1.2 Variation du profil en fonction de l'amplitude sinusoïdale

La figure 3.13 présente la variation du profil de potentiel d'écoulement en fonction de l'amplitude des compressions sinusoïdales à une fréquence de 0.2 Hz. Nous remarquons que la forme des profils de potentiel d'écoulement est variable selon la concentration de NaCl de la solution de test et le taux de dégradation du cartilage. En effet, à 0.01 M NaCl, le gradient de potentiel à la périphérie est très important pour les disques de contrôle. Nous observons d'ailleurs que l'amplitude du potentiel à 1.2 mm est plus élevée que celle à 0.9 mm. À 0.15 M NaCl, le gradient de potentiel à la périphérie est moins important qu'à 0.01 M NaCl. Par contre, de façon générale, nous remarquons que le gradient de potentiel à la périphérie des disques dégradés est plus faible que celui des cartilages de contrôle.

Nous observons également que l'amplitude du potentiel ne varie pas de façon linéaire en fonction de l'amplitude des compressions sinusoïdales. Pour les deux concentrations de solution saline, les amplitudes de potentiel au centre des disques de contrôle à 4 et à 8 μm correspondent respectivement à 1.7 et 2.9 fois celle mesurée à 2 μm . Les cartilages dégradés sont caractérisés par une non linéarité plus importante au niveau de la variation des profils de potentiel en fonction de l'amplitude des compressions sinusoïdales. En effet, pour les disques dégradés, les amplitudes maximales de potentiel à 4 et à 8 μm correspondent respectivement à environ 1.4 et 2.1 fois celle

mesurée à 2 μm .

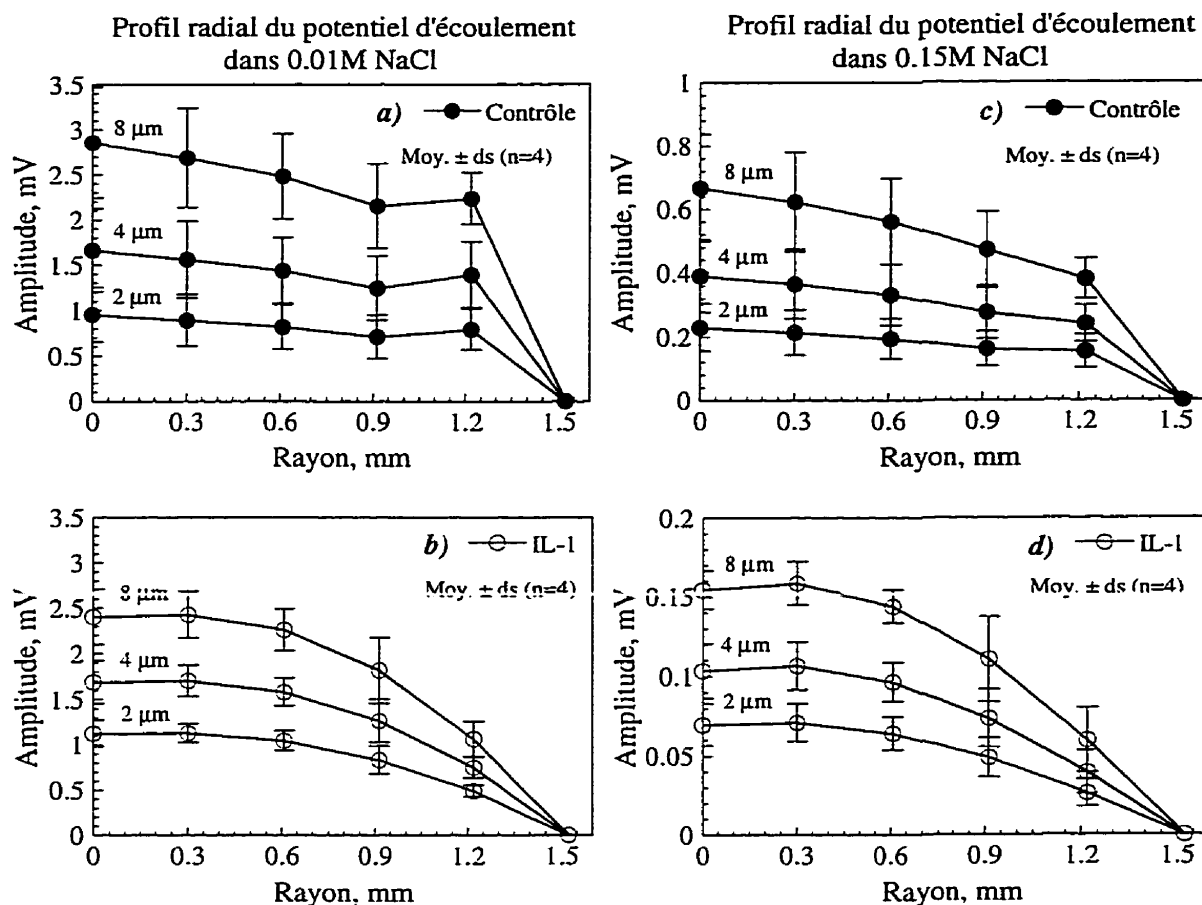


Figure 3.13 : Variation des profils de potentiel d'écoulement selon l'amplitude des compressions sinusoïdales à une fréquence de 0.2 Hz pour une solution de test de 0.01 M NaCl (a) contrôle et b) IL-1 α et 0.15 M NaCl (c) contrôle et d) IL-1 α)

3.4.2.2 Durées de culture variables

Afin d'étudier l'effet de l'IL-1 α sur les propriétés électromécaniques du cartilage tout au long de la culture et de vérifier la reproductibilité des résultats précédents, nous avons recommencé une série de mesures électromécaniques plus complète sur un nombre élevé d'échantillons. Les mesures ont été effectuées dans une solution de test de 0.15 M

NaCl à différentes durées de la culture.

3.4.2.2.1 Variation du profil en fonction de la durée de culture

La figure 3.14 présente les profils de potentiel d'écoulement qui ont été obtenus sur 18 triplets de cartilage après 1, 4, 7, 11 et 14 jours de culture, lors de compressions sinusoïdales de 4 μm d'amplitude à une fréquence de 0.1 Hz. Chaque graphique présente la moyenne de 4 triplets différents, sauf pour le jour 14 où deux paires de cartilages ont été testées. Nous constatons d'abord que les disques de contrôle ont un comportement très semblable tout au long de la culture. L'amplitude maximale de potentiel au centre du cartilage est autour de 0.35 mV. De plus, nous remarquons que le gradient à la périphérie est élevé. En effet, le potentiel mesuré à 1.2 mm du centre est environ de 0.25 mV, ce qui correspond à 70% de l'amplitude maximale de potentiel mesurée au centre du disque.

Les cartilages traités avec IL-1 α sont caractérisés par une amplitude de potentiel au centre du disque qui est significativement plus faible que celle des cartilages de contrôle à partir du jour 7 de la culture. En effet, la probabilité que les amplitudes de potentiel au centre du disque pour les cartilages de contrôle et les disques traités avec IL-1 α proviennent de la même moyenne est respectivement de 0.06 et 0.02 après 7 et 11 jours de culture. Nous remarquons par contre que le gradient de potentiel à la périphérie des disques dégradés est plus faible que celui des cartilages de contrôle à partir du premier jour de la culture. En effet, les probabilités sont respectivement de 0.05, 0.01 et 0.01 après 4, 7 et 11 jours de culture. Après 11 jours de culture, l'amplitude maximale du profil de potentiel des cartilages dégradés est d'environ 0.08 mV, c'est-à-dire 4.4 fois plus faible que celle des disques de contrôle. De plus, l'amplitude du gradient à la périphérie des cartilages dégradés correspond à 50% de l'amplitude maximale au centre du disque par rapport à 70% pour les disques de contrôle.

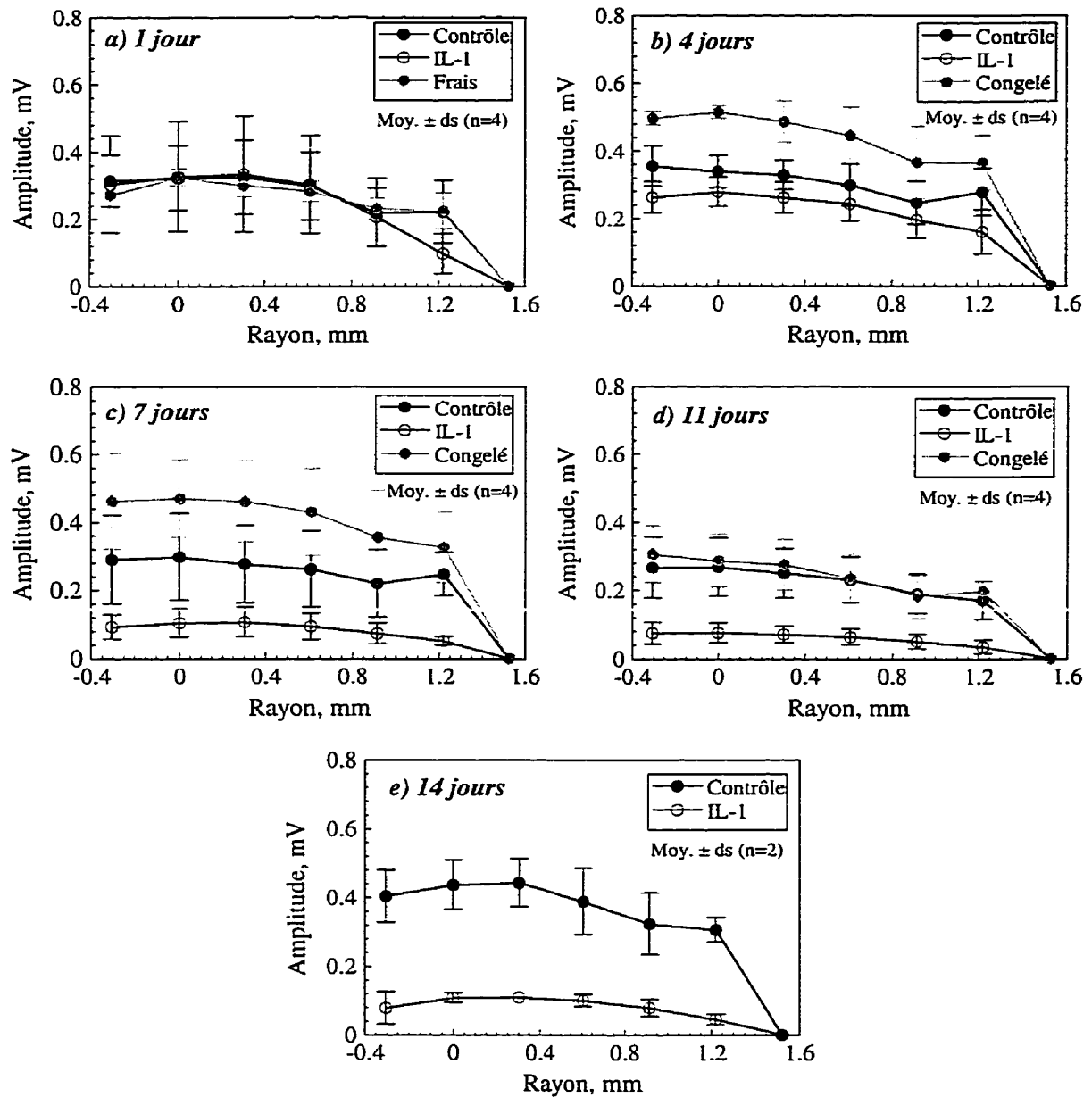


Figure 3.14 : Profils de potentiel d'écoulement pour des compressions sinusoïdales de $4 \mu\text{m}$ à une fréquence de 0.1 Hz après a) 1 jour, b) 4 jours, c) 7 jours, d) 11 jours et e) 14 jours de culture

Les cartilages congelés qui sont associés à chacune des durées de culture ont un comportement variable. Tout comme les disques de contrôle, les cartilages congelés ont un gradient à la périphérie qui correspond à environ 70% de l'amplitude du profil de potentiel au centre du disque. Les cartilages frais qui ont été testés la journée après

l'extraction présente un profil de potentiel qui se superpose presque parfaitement avec celui des cartilages de contrôle. Pour les jours 4 et 7 de la culture, l'amplitude du profil de potentiel des cartilages congelés est plus élevée que celle des disques de contrôle, alors que pour le jour 11, les deux profils sont très semblables.

3.4.2.2.2 Variation du profil en fonction de la fréquence

La figure 3.15 présente la variation de l'amplitude et de la phase du profil de potentiel d'écoulement en fonction de la fréquence pour les cartilages qui ont été placés en culture pendant 11 jours. Nous constatons que l'amplitude du potentiel au centre du cartilage augmente en fonction de la fréquence.

Le profil de phase représente la différence de phase entre la composante fondamentale de la phase de chacun des canaux et celle de la position. Nous remarquons que le profil de phase est relativement constant pour chacune des fréquences. La phase est respectivement d'environ 15, 40 et 105 degrés à 1, 0.1 et 0.01 Hz. En effet, la phase du profil de potentiel augmente lorsque la fréquence diminue. De plus, la phase ne change pas en fonction du taux de dégradation du cartilage.

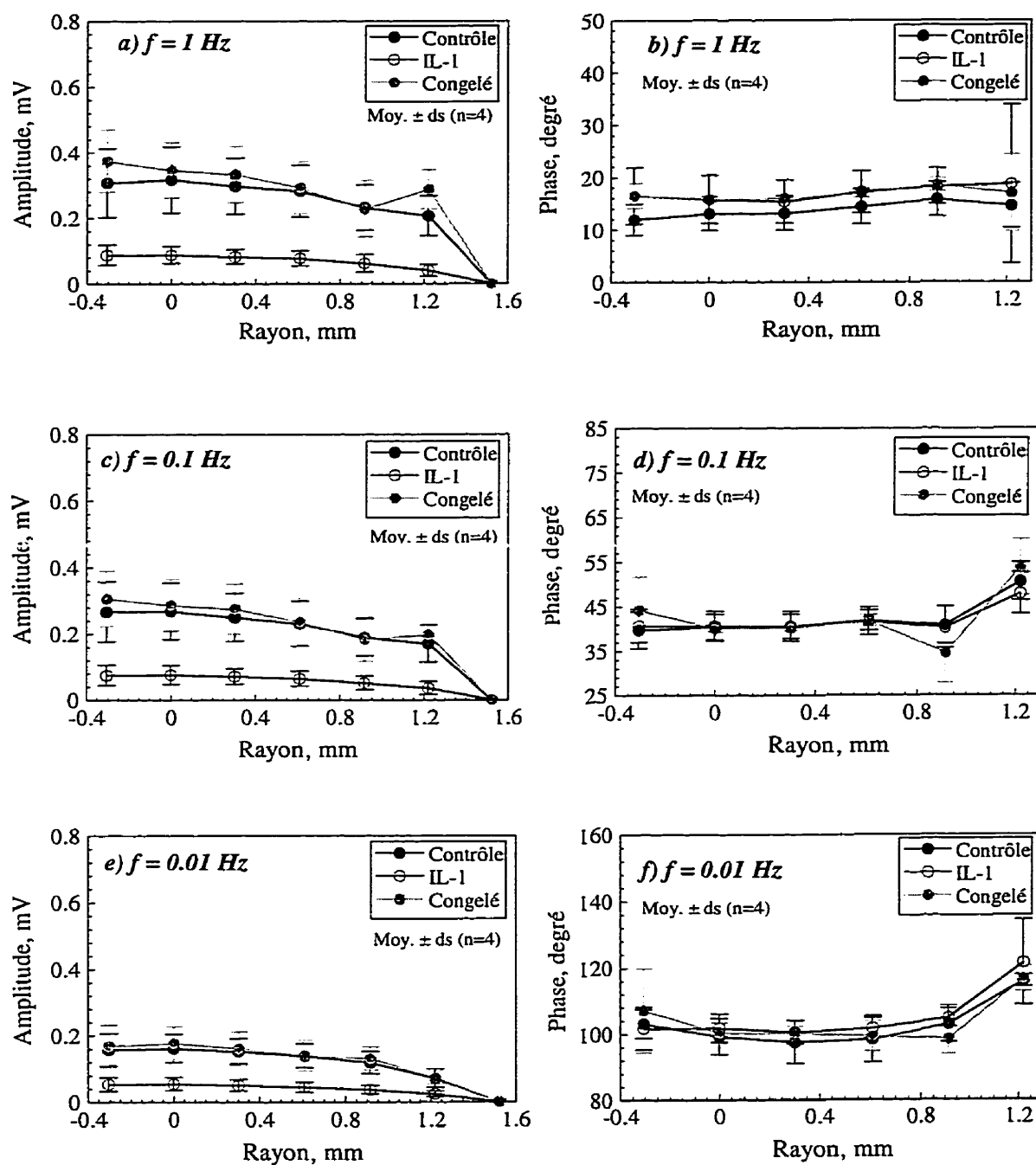


Figure 3.15 : Amplitude et phase du profil de potentiel d'écoulement pour des compressions sinusoïdales de $4 \mu\text{m}$ à a) et b) 1 Hz, c) et d) 0.1 Hz et e) et f) 0.01 Hz après 11 jours de culture

3.4.2.2.3 Variation du profil en fonction de l'amplitude

La figure 3.16 présente la variation du profil de potentiel d'écoulement en fonction de l'amplitude des compressions sinusoïdales à une fréquence de 0.1 Hz pour les cartilages qui ont été placés 11 jours en culture ainsi que les cartilages congelés associés aux disques de contrôle.

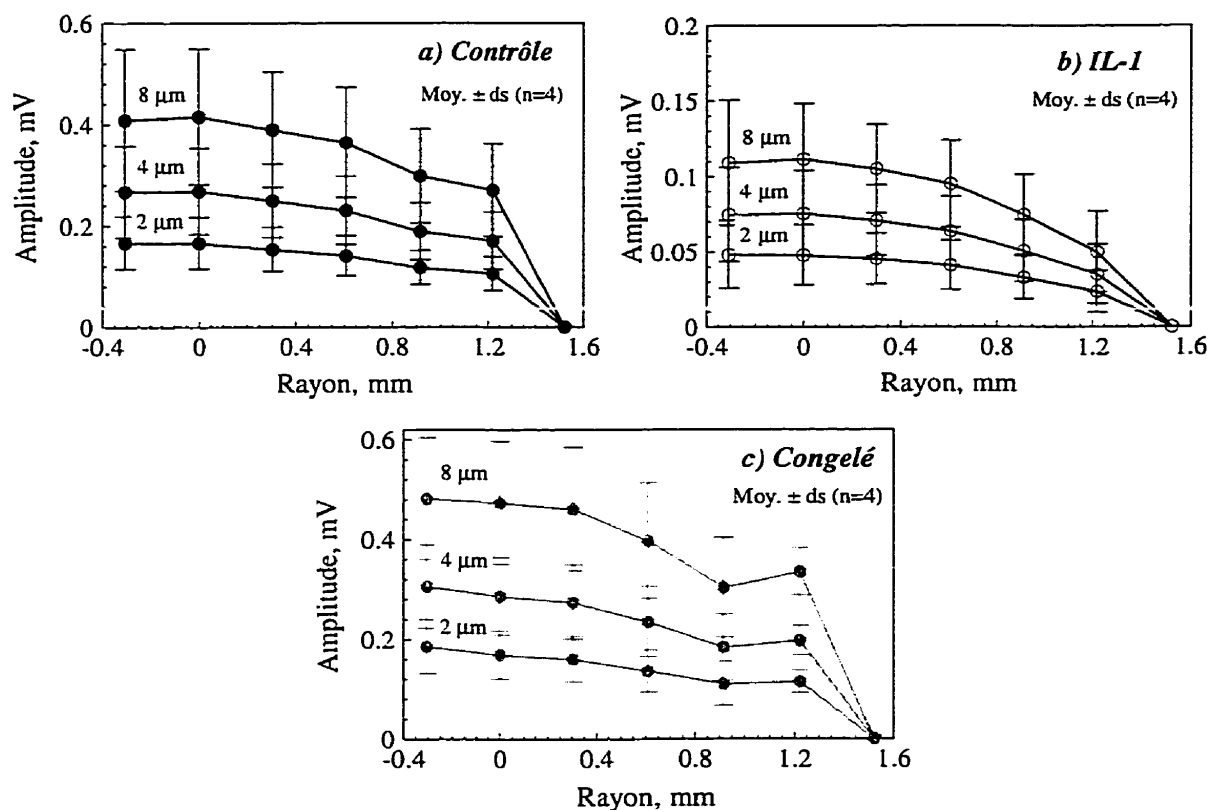


Figure 3.16 : Variation du profil de potentiel en fonction de l'amplitude des compressions sinusoïdales pour les cartilages a) de contrôle, b) IL-1 α et c) congelés après 11 jours de culture

Nous remarquons que l'amplitude du profil de potentiel d'écoulement augmente de façon non linéaire en fonction de l'amplitude des compressions sinusoïdales. Pour les disques de contrôle, l'amplitude maximale du potentiel mesurée à 4 et 8 µm correspond respectivement à 1.6 et 2.5 fois celle obtenue à 2 µm, alors que pour les cartilages

dégradés et congelés, les facteurs respectifs sont de 1.6 et 2.4, et 1.7 et 2.8.

La figure 3.17 présente la variation de la phase du profil de potentiel d'écoulement en fonction de l'amplitude des compressions sinusoïdales pour les cartilages de contrôle à une fréquence de 0.1 Hz. Nous constatons que le profil de phase ne dépend pas de l'amplitude des compressions sinusoïdales. Nous avons également observé, à la figure 3.15, que le profil de phase n'est pas influencé par l'état de dégradation du cartilage.

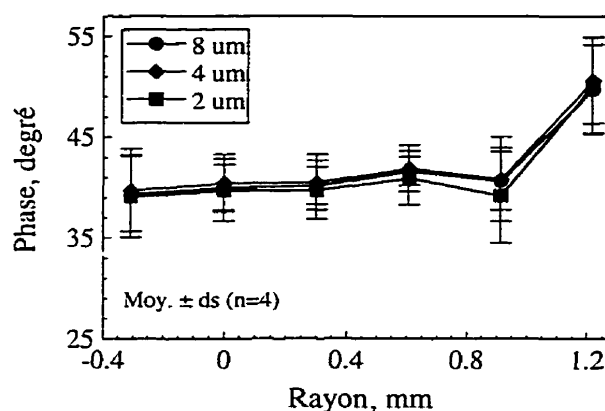


Figure 3.17 :Variation de la phase du profil de potentiel d'écoulement en fonction de l'amplitude des compressions sinusoïdales pour les cartilages de contrôle après 11 jours de culture

3.4.3 Résultats avec APMA

La figure 3.18 présente les profils de potentiel d'écoulement qui ont été mesurés suite à une culture de 7 jours avec et sans APMA pour une amplitude de compressions sinusoïdales de 4 μm . Chaque courbe représente la moyenne de 4 échantillons qui ont été testés en juin 1998. L'amplitude du profil de potentiel des cartilages dégradés est légèrement plus faible que celle des disques de contrôle, mais il y a chevauchement des écart types. Nous constatons également que la forme du profil de potentiel des cartilages de contrôle est différente de celle que nous avons observée lors des expériences précédentes. En effet, le gradient de potentiel à la périphérie est beaucoup plus faible, ce

qui laisse supposer que les cartilages de contrôle ont subi une dégradation. Ceci est également valable pour les cartilages congelés.

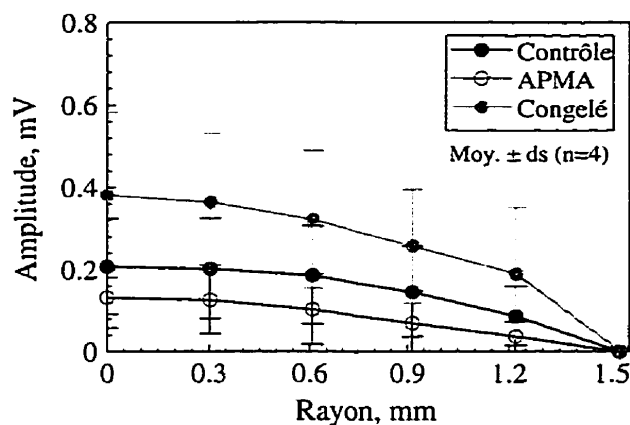


Figure 3.18 : Profils de potentiel d'écoulement pour des compressions sinusoïdales de 4 μ m à 0.1 Hz après 7 jours de culture avec et sans APMA

Comme nous l'avons mentionné au début de ce chapitre, un des 4 triplets de cartilages a été testé en juin 1997 et en juin 1998. La figure 3.19 présente une comparaison des résultats qui ont été mesurés à un an d'intervalle.

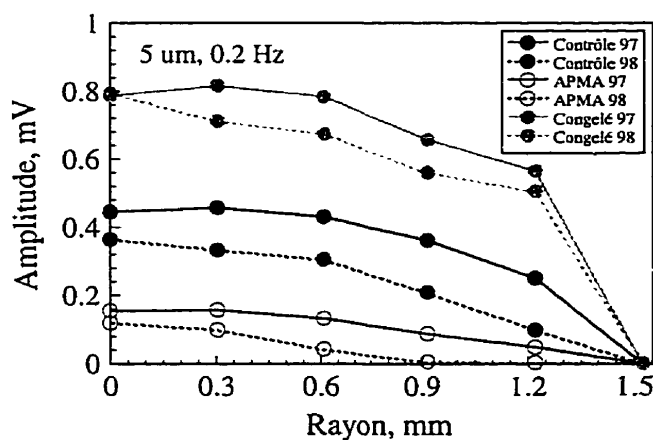


Figure 3.19 : Variation du profil de potentiel d'écoulement après 1 an de congélation

Malgré le fait que les courbes de la figure 3.19 ont été mesurées sur un seul triplet d'échantillons, nous observons que l'amplitude du profil de potentiel est plus faible après un an de congélation. Ces résultats nous laissent supposer que la durée de congélation des échantillons peut affecter les propriétés électromécaniques du cartilage.

Dans cette section, nous avons utilisé un test statistique de type *T de student* pour analyser les résultats. Pour une analyse statistique plus complète et puisque le nombre d'échantillons est faible ($n = 4$), il serait préférable d'utiliser un test de type Anova. Le test Anova permet de tenir compte de plusieurs paramètres, ce qui augmente le nombre de degrés de liberté et la puissance statistique.

3.5 Discussion des résultats

3.5.1 Lien entre les mesures de potentiel d'écoulement et les modèles théoriques

Au début du chapitre 3, nous avons présenté plusieurs modèles théoriques qui décrivent les comportements électromécaniques du cartilage. Ces différents modèles nous permettent d'obtenir la distribution de pression ainsi que le profil de vitesse du fluide interstitiel dans le cartilage. Nous pouvons établir un lien entre la pression et le potentiel d'écoulement en superposant les équations de couplage électrocinétique aux 6 équations du modèle biphasique. Les équations de couplage électromécanique relient la vitesse relative du fluide (U) et la densité de courant (J) avec le gradient de pression du fluide (∇P) et le potentiel électrique (∇V) :

$$\begin{bmatrix} U \\ J \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -k_{11} & k_{12} \\ k_{21} & -k_{22} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \nabla P \\ \nabla V \end{bmatrix}$$

où k_{11} est la perméabilité hydraulique de court-circuit, k_{12} et k_{21} sont les coefficients de couplage électrocinétique et k_{22} est la conductivité électrique (Kim Y. J. et al., 1995) et

(Katchalsky A. et al., 1967). Les mesures de potentiel d'écoulement sont réalisées sous des conditions de circuit ouvert avec une densité de courant nulle ($J = 0$). Les équations de couplage électromécanique deviennent donc :

$$\nabla V = \frac{k_{21}}{k_{22}} \cdot \nabla P = k_e \nabla P$$

et

$$U = -k_{11} \left(1 - \frac{k_{12}k_{21}}{k_{22}k_{11}} \right) \cdot \nabla P = \left(k_{12} - \frac{k_{11}}{k_{21}} \cdot k_{22} \right) \cdot \nabla V$$

où $k_e = k_{21} / k_{22}$ est le coefficient de couplage électrocinétique (Frank E. H. et al., 1987b). Nous constatons que la perméabilité hydraulique de la loi de Darcy ($U = -k_{11} \nabla P$) est réduite par un terme qui tient compte du couplage électrocinétique (De Groot S. R. et al., 1984). En effet, lorsque la concentration de NaCl de la solution de test augmente ou à pH peu élevé, le couplage électrocinétique est faible et la relation entre la vitesse relative du fluide et le gradient de pression tend vers la loi de Darcy. Il est important de souligner que la réciprocité d'Onsager implique que $k_{12} = k_{21}$.

À l'aide des équations de couplage électrocinétique, nous constatons que le profil de potentiel d'écoulement est relié au profil de pression du fluide dans le cartilage, alors que le gradient du profil de potentiel, le champ électrique, est proportionnel à la vitesse du fluide interstitiel. Ces relations sont toujours valides dans une théorie plus complète qui tient compte du couplage avec les contraintes dans le solide, pourvu que les lois constitutives soient homogènes et linéaires (Levenston et al., 1997). Les profils de potentiel d'écoulement que nous avons présentés dans la section 3.4 sont caractérisés par un gradient de potentiel à la périphérie qui est plus important que celui au centre du cartilage. Cette observation confirme les prédictions des modèles biphasiques pour la compression confinée (Mow V. C et al., 1980) et des autres modèles pour la compression non confinée (Kim Y. J. et al., 1995) et (Soulhat J. et al., 1998) qui prédisent que la

vitesse du fluide interstitiel est plus importante à la périphérie du cartilage. Ce phénomène est dû à la symétrie azimutale qui exige que $v(r=0)=0$, alors que $v(r=R) \neq 0$, c'est-à-dire que la vitesse augmente vers la périphérie du disque. De plus, nous avons observé que l'amplitude du profil de potentiel d'écoulement est maximale au centre du disque, ce qui confirme également les prédictions des modèles théoriques. En effet, la pression du fluide est plus importante au centre du cartilage qu'à la périphérie.

Un étudiant de notre laboratoire, Martin Garon, travaille présentement sur le modèle développé par Souihat J. et al. pour déterminer les paramètres théoriques associés aux profils de potentiel d'écoulement qui ont été présentés dans la section 3.4. En effet, la rigidité des fibres de collagène (E_f) et la perméabilité hydraulique (k) sont déterminés par le *fit* de la courbe de relaxation de la charge, alors que le module à l'équilibre ou la rigidité statique (E_m) est mesuré expérimentalement. Le coefficient de couplage électrocinétique (k_e) est calculé en superposant le profil de potentiel d'écoulement et le profil de pression. Les paramètres théoriques du cartilage ont été déterminés à partir des profils de potentiel d'écoulement qui ont été mesurés au cours de la première expérience avec IL-1 α dans la solution de 0.15 M NaCl. La figure 3.20 présente l'amplitude et la phase du profil de pression qui est prédit par le modèle de Souihat J. et al. pour les paramètres calculés : $E_m = 0.17 \text{ MPa}$, $E_f = 7.4 \text{ MPa}$, $k = 5 \cdot 10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$ et $\nu = 0$.

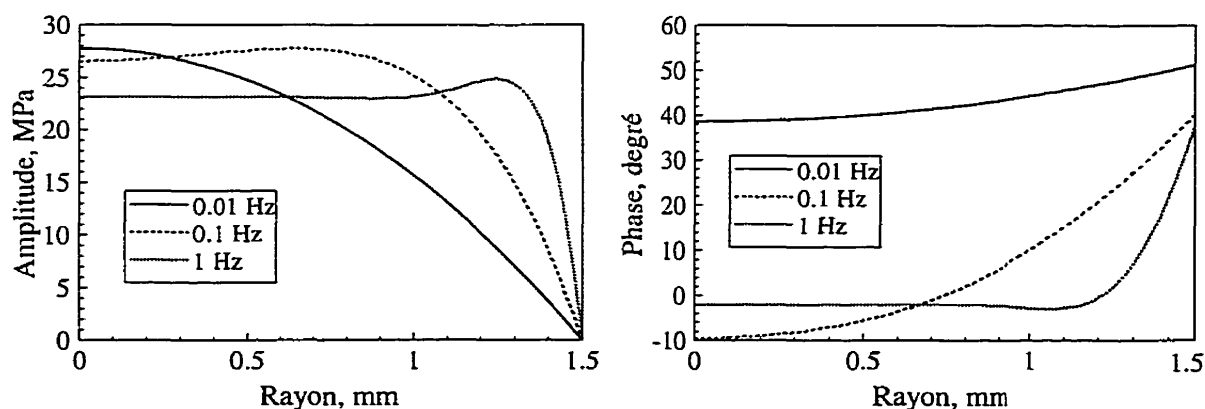


Figure 3.20 : Amplitude et phase du profil de pression prédit par le modèle de Souihat J. et al., 1998

Nous constatons que la forme du profil de pression change en fonction de la fréquence. En effet, plus la fréquence est élevée, plus le gradient de potentiel à la périphérie est important. Nous pouvons comparer les profils de pression avec les profils de potentiels d'écoulement que nous avons mesurés pour les cartilages de contrôle (figures 3.12 et 3.15). Nous remarquons que les profils de potentiel d'écoulement que nous avons mesurés correspondent bien au modèle à basse fréquence (0.01 Hz). Par contre, les profils de potentiel d'écoulement mesurés à des fréquences plus élevées ont une allure différente de ce qui est prédit par le modèle au niveau de l'amplitude et de la phase. Ceci laisse supposer que k ou k_c pourraient avoir une dépendance en fonction de la fréquence. Il est également possible que E_f , qui est relié à l'extension des fibres de collagène, dépende de la fréquence. Nous pouvons aussi supposer qu'il y a des interactions entre les différentes composantes de la matrice extracellulaire. À haute fréquence, nous constatons que le profil de pression prédit par le modèle est caractérisé par un gradient très élevé à la périphérie. Il est important de souligner que nous avons observé ce type de profil à la figure 3.12 pour les disques de contrôle dans une solution de 0.01 M NaCl.

Nous avons observé que les cartilages placés en culture avec IL-1 α sont caractérisés par une diminution très rapide du gradient de potentiel à la périphérie en fonction de la durée de la culture. Nous avons également remarqué une diminution de l'amplitude maximale du profil. Nous pouvons donc supposer que la perte de protéoglycanes et la dégradation du réseau de collagène provoquent une diminution de la vitesse d'écoulement du fluide et de la pression dans le disque. La vitesse du fluide reste toutefois plus élevée à la périphérie et la pression est maximale au centre, mais les valeurs sont beaucoup plus faibles. Les paramètres théoriques, qui peuvent être déterminés par le *fit* des courbes de relaxation de charge et de potentiel d'écoulement, sont différents pour les cartilages dégradés. Le module à l'équilibre ou la rigidité statique (E_m) qui a été mesuré expérimentalement à la figure 3.5 est réduit à 89 %, alors que E_f a diminué de 50% et k est environ 7 fois plus élevée. De plus, k_c est réduit à 50% après un traitement

de 13 jours avec IL-1 α .

À l'aide des figures 3.15 et 3.17, nous avons observé que le profil de phase n'est pas influencé par le taux de dégradation du cartilage ou par l'amplitude des compressions sinusoïdales. Nous avons également remarqué que l'amplitude de la phase augmente lorsque la fréquence diminue. En effet, lors de la compression du disque, il y a un écoulement du fluide dans la direction radiale. Si la fréquence de compression est élevée, le fluide ne se déplace pas beaucoup et le cartilage conserve son volume. Au contraire, lorsque la fréquence de compression est faible, le fluide s'écoule hors du cartilage, il n'y a pas conservation du volume et le déphasage est plus important. Bref, à basse fréquence, le cartilage a un comportement viscoélastique et lorsque la fréquence augmente, le cartilage adopte des propriétés élastiques.

3.5.2 Comparaison des résultats avec la littérature

En 1987, Frank E. H. et ses collègues ont étudié l'effet du pH et de la force ionique de la solution de test sur les potentiels d'écoulement. Les mesures ont été effectuées dans une géométrie de compression confinée entre une électrode d'Ag-AgCl placée au dessus d'un filtre de polyéthylène poreux et une électrode de référence sur des cartilages de 800 μm d'épaisseur. Les électrodes ont un diamètre de 6.35. Des compressions sinusoïdales d'une amplitude correspondant à 1% de l'épaisseur du cartilage ont été superposées à un offset de compression de 15%. Ils ont mesuré des potentiels d'écoulement de 1.5 mV à 0.01 M NaCl et de 0.5 mV à 0.15 M NaCl pour des compressions sinusoïdales de 1% à une fréquence de 0.1 Hz. Malgré le fait que nos conditions de mesures sont très différentes, ces résultats sont comparables à ceux que nous avons obtenus. En effet, nous avons mesuré une amplitude de potentiel d'écoulement au centre du disque dans une solution de test de 0.01 M NaCl environ 4 fois plus importante que celle mesurée dans 0.15 M NaCl (1.66 mV à 0.01 M NaCl et 0.39

mV à 0.15 M NaCl) à une fréquence de compression de 0.2 Hz et une amplitude de 4 μm . Ils ont également observé que l'amplitude du potentiel d'écoulement est minimum à un pH de 2.75 qui correspond au point isoélectrique où la charge fixe nette dans le cartilage est nulle. Pour les valeurs de pH plus faibles et plus élevées que 2.75, l'amplitude du potentiel d'écoulement augmente et le potentiel est constant à partir d'un pH de 4 jusqu'à 7 (Frank E. H. et al., 1987a). Ils ont mesuré une rigidité dynamique qui a une valeur d'environ 6.5 MPa à une fréquence de 0.5 Hz, une concentration de 0.05 M NaCl et un pH de 7. De plus, la rigidité dynamique augmente légèrement lorsque le pH passe de 2 à 7 (Frank E. H. et al., 1987c). Cette valeur de rigidité dynamique est plus élevée que ce que nous avons mesuré. Il faut toutefois être conscient que les mesures ont été effectuées dans une géométrie de compression confinée et que le cartilage ne peut pas prendre d'expansion dans la direction radiale, ce qui rigidifie sa réponse.

Frank E. H. et ses collègues ont également été les premiers à étudier l'effet d'agents de dégradation, tels que la chondroïtinase ABC et la trypsin, sur les propriétés électromécaniques du cartilage. Ils ont observé que les mesures de potentiel d'écoulement sont plus sensibles à la dégradation que la rigidité dynamique. En effet, après 24 heures en présence de chondroïtinase ABC, le potentiel d'écoulement est réduit à 61% de sa valeur initiale alors que la rigidité dynamique correspond à 70% de la valeur du départ. Ils ont également observé que l'effet de la trypsin est très rapide et semblable pour les potentiels d'écoulement et la rigidité dynamique (Frank E. H. et al., 1987c).

Kim Y. J. et ses collègues ont effectué des mesures de potentiel d'écoulement dans une géométrie de compression non confinée sur des cartilages de 3 mm de diamètre et 1 mm d'épaisseur dans une solution saline de 0.01 M à un pH de 7, à l'aide de deux électrodes d'argent de 500 μm de diamètre, placées sur la surface articulaire du cartilage. La première électrode est située au centre du disque alors que l'autre sert de référence dans le bain. Les mesures de potentiels d'écoulement ont été effectuées selon une

géométrie qui se rapproche de celle que nous avons utilisée. Pour une amplitude de compressions sinusoïdales de 10 μm superposée à un offset de 20%, la rigidité dynamique est de 10 MPa et l'amplitude du potentiel d'écoulement est autour de 1.5 mV/% à une fréquence de 0.1 Hz (Kim Y. J. et al., 1995). Lors de notre première expérience, nous avons obtenu des résultats environ 2.5 fois plus élevés. En effet, l'amplitude du potentiel d'écoulement au centre du disque lors de compressions sinusoïdales de 4 μm à 0.2 Hz dans une solution de test de 0.01 M NaCl est de 1.69 mV. Nous avons par contre mesuré une rigidité dynamique plus faible, c'est-à-dire 4.3 MPa. Il est important de noter que les disques que nous avons testés proviennent de boeufs âgés entre 1 et 2 ans, alors que Kim Y. J. et al. testent des tissus beaucoup plus jeunes (environ 2 semaines).

Par la suite, Bonassar L. J. et al. ont étudié l'effet de l'IL-1 β , l'APMA, l'acide rétinolique et la stromelysine sur les propriétés électromécaniques des cartilages. Le même montage électromécanique de compression confinée que Frank E. H. et al. a été utilisé avec une solution de PBS de 0.15 M NaCl à un pH de 7.4. Les disques ont d'abord été comprimés par incréments de 0.5 à 1.5% de déformation jusqu'à une déformation totale de 20%. Des déformations sinusoïdales d'une amplitude inférieure à 1% de l'épaisseur à des fréquences entre 0.01 et 1 Hz ont ensuite été appliquées. Après un traitement avec 100 ng/ml d'IL-1 β pendant 8 jours, les rigidités statique et dynamique ont été réduites à 20% de la valeur obtenue pour les disques de contrôle au début de la culture, c'est-à-dire 1.2 MPa pour la rigidité statique et 9 MPa pour la rigidité dynamique, à 0.1 Hz. Les potentiels d'écoulement mesurés sur les disques dégradés correspondent à 10% de la valeur initiale mesurée pour les disques de contrôle (65.1 $\mu\text{V}/\%$ à 0.01 Hz et 392 $\mu\text{V}/\%$ à 1 Hz) (Bonassar L. J. et al., 1995a et 1997). En comparant ces résultats avec ceux que nous avons obtenus, nous observons que la rigidité dynamique que nous avons mesurée est 2 fois plus faible. Ceci peut être expliqué par le fait que nous utilisons une géométrie de compression non confinée. En effet, en compression confinée, le disque ne peut pas

prendre d'expansion dans la direction radiale, ce qui augmente la valeur de rigidité mesurée. Il peut aussi y avoir certains problèmes à l'interface entre la plaque poreuse (superposée à l'électrode) et la surface articulaire du cartilage (Buschmann M. D. et al., 1995b). Il faut également être conscient que l'âge et la provenance des boeufs peuvent influencer significativement les valeurs de rigidités. De plus, nous avons mesuré des potentiels d'écoulement environ 5 fois plus élevés que Bonassar L. J. et al., mais du même ordre de grandeur que Frank E. H. et Kim Y. J.. Il est possible que le système d'acquisition électrique utilisé par Bonassar L. J. et al. soit différent du nôtre qui a été conçu par Robert Guardo. Nous avons par contre observé des pourcentages de dégradation semblables. D'ailleurs un résumé des pourcentages de dégradation que nous avons mesurés sera présenté au tableau 3.2 de la section 3.6.1.

Bonassar L. J. et al. ont également démontré qu'un traitement des cartilages avec 1 mM d'APMA pendant 3 jours diminue la rigidité statique à 5% de la valeur mesurée sur les disques de contrôle (1.47 MPa). De plus, la rigidité dynamique des disques dégradés correspond à 20% de celle des cartilages de contrôle (3.88 MPa à 0.01 Hz et 10.13 MPa à 1 Hz). Les potentiels d'écoulement ont subi une diminution très importante seulement 1 jour après le début de la culture avec 1 mM d'APMA. En effet, après 24 heures, l'amplitude du potentiel d'écoulement correspond à 25% de la valeur initiale mesurée sur les cartilages de contrôle (33.5 $\mu\text{V}/\%$ à 0.01 Hz et 133.8 $\mu\text{V}/\%$ à 1 Hz) (Bonassar L. J. et al., 1996). Nous avons obtenu des résultats très différents lors de la culture avec APMA. En effet, nous avons observé une dégradation des propriétés électromécaniques moins importante que ce qui a été observé par Bonassar L. J. et al.. L'effet de deux autres agents de dégradation, c'est-à-dire la stromelysine et l'acide rétinoïque, sur les propriétés électromécaniques du cartilage a également été étudié par cette équipe de recherche. Des résultats semblables à ceux qui ont été obtenus pour l'APMA ont été observés (Bonassar L. J. et al., 1995a et 1995c).

3.5.3 Effet de la concentration de NaCl sur les propriétés électromécaniques

3.5.3.1 Effet de la concentration de NaCl sur les rigidités statique et dynamique

À l'aide de la première expérience avec IL-1 α , nous avons vérifié l'effet de la concentration de NaCl de la solution de test sur les propriétés électromécaniques des cartilages. Nous avons constaté que les rigidités statique et dynamique des cartilages normaux et dégradés sont deux fois plus faibles dans la solution saline de concentration physiologique (figures 3.5 et 3.6). Ces résultats correspondent bien à ce qui a été observé par Eisenberg S. R. et al. qui ont étudié la variation de la rigidité statique en fonction de la concentration de NaCl de la solution de test. Malgré le fait qu'ils ont effectué des mesures dans une géométrie de compression confinée sur des cartilages de 600 μ m d'épaisseur et de 6.4 mm de diamètre, un facteur 2 entre les rigidités statiques mesurées à 0.01 M NaCl et 0.15 M NaCl a été observé (1.1 MPa à 0.005 M NaCl et 0.5 MPa à 0.15 M NaCl) (Eisenberg S. R. et al., 1985).

Il est possible de calculer théoriquement la valeur de la rigidité statique (ou du module à l'équilibre) à l'aide d'un modèle moléculaire des forces électrostatiques associées aux protéoglycanes (Buschmann M. D. et al., 1995a). Ce modèle, qui sera présenté plus en détail dans la prochaine section, est basé sur l'hypothèse que les chaînes de GAG ont une forme cylindrique et sont parallèles dans la matrice extracellulaire. À l'aide de l'équation de Poisson et de la distribution de Boltzmann, il est possible de déterminer la distribution de potentiel entre les chaînes de GAG ainsi que la pression osmotique de gonflement. Ceci nous permet de déduire le module à l'équilibre ou la rigidité statique du cartilage. Le modèle théorique correspond très bien aux données expérimentales de rigidité statique qui ont été obtenues par Eisenberg S. R. et al., en 1985, pour différentes concentrations de NaCl. À l'aide du modèle, nous observons que les forces électrostatiques ont plus d'influence sur la rigidité statique mesurée à 0.01 M

NaCl qu'à 0.15 M NaCl. En effet, lorsque la concentration de NaCl diminue, la force de répulsion entre les molécules GAG joue un rôle de plus en plus important dans la valeur de la rigidité statique, car l'effet d'écran des ions mobiles est réduit. Ceci explique pourquoi la rigidité statique est deux fois plus élevée à 0.01 M NaCl.

La rigidité statique dépend à la fois de la concentration de GAG et de la rigidité des fibres de collagène de la matrice extracellulaire, alors que la rigidité dynamique dépend en plus de la perméabilité hydraulique du cartilage. En effet, la rigidité dynamique est calculée lors de la compression sinusoïdale du cartilage. La perméabilité hydraulique, qui est directement reliée à la taille des pores de la matrice extracellulaire et à l'écoulement du fluide interstitiel à travers ces pores, influence la rigidité dynamique. Dans le chapitre 2, nous avons observé que les cartilages traités avec IL-1 α perdent la majeure partie de leur contenu de GAG. Par conséquent, la distance entre les GAG augmente et l'influence des forces électrostatiques devient plus faible ou négligeable. Nous avons également montré que le collagène subit une dégradation au cours de la culture avec IL-1 α . Les deux paramètres précédents peuvent expliquer pourquoi les rigidités statique et dynamique diminuent respectivement d'un facteur 10 et 3 après 2 semaines de culture avec IL-1 α . Nous présenterons de façon plus détaillée les liens entre les caractéristiques biochimiques et les propriétés électromécaniques des cartilages normaux et dégradés à la section 3.6.2.

3.5.3.2 Effet de la concentration de NaCl sur les potentiels d'écoulement

Nous avons observé que la dégradation des cartilages avec IL-1 α affecte significativement l'amplitude et l'allure des profils de potentiel d'écoulement. De plus, lors de la première expérience avec IL-1 α , nous avons constaté que la concentration de NaCl de la solution de test influence la forme des profils de potentiel d'écoulement. En effet, à 0.01 M NaCl, les profils de potentiels des cartilages dégradés sont caractérisés par

un faible gradient de potentiel à la périphérie, mais une amplitude de potentiel maximale semblable à celle des disques de contrôle (figure 3.12). À 0.15 M NaCl, les profils de potentiel d'écoulement pour les disques dégradés présentent à la fois un gradient de potentiel réduit à la périphérie et une amplitude au centre du disque 4 fois plus faible que celle des cartilages de contrôle. Afin de comprendre l'effet de la concentration de NaCl sur la forme des profils de potentiels d'écoulement pour les cartilages normaux et dégradés, nous allons utiliser le modèle des forces électrostatiques associées aux protéoglycannes. Tous les calculs qui seront présentés dans cette section proviennent de l'article de Buschmann M. D. et al. et du polycopié de Grodzinsky A. J. (Buschmann M. D. et al., 1995) et (Grodzinsky A. J., 1997).

Le cartilage est composé de chaînes de GAG qui sont encastrées dans un réseau de fibres de collagène. Puisque les GAG sont chargées négativement, il y a un excès de charges positives mobiles dans le fluide et il y a une différence de potentiel entre la chaîne de GAG et le milieu électrolyte ou le fluide interstitiel. Nous pouvons supposer que les chaînes de GAG sont cylindriques et qu'elles sont approximativement parallèles les unes par rapport aux autres. La distribution de potentiel dans la région chargée peut être exprimée à l'aide de l'équation de Poisson :

$$\nabla^2 \Phi = \frac{-\rho_u}{\epsilon}.$$

De plus, la distribution de la concentration des ions dans le fluide peut être décrite par la statistique de Boltzmann :

$$c(x) = c_0 \exp \left[\frac{-zF\Phi(x)}{RT} \right].$$

En combinant les deux équations précédentes et en faisant l'approximation que le potentiel est beaucoup plus petit que le potentiel thermique ($RT/zF=25.7 \text{ mV}$), nous obtenons une équation différentielle du deuxième ordre qui se nomme l'équation de

Poisson-Boltzmann :

$$\nabla^2 \Phi = k^2 \sinh\left(\frac{\Phi(x) \cdot zF}{RT}\right)$$

où $\frac{1}{k} = \sqrt{\frac{\epsilon RT}{2z^2 F^2 c_0}}$ est la longueur de Debye.

La longueur de Debye représente la distance sur laquelle le potentiel va diminuer à 1/e de sa valeur initiale. Les longueurs de Debye sont de 0.8 et 3 nm respectivement pour des solutions de 0.15 et 0.01 M NaCl, en supposant que la permittivité est environ celle de l'eau ($\epsilon = 80\epsilon_0$). De plus, à partir de la concentration de protéoglycanes dans le cartilage, nous pouvons déterminer la distance entre 2 chaînes de GAG voisines cylindriques

$$d = 2R = \frac{2}{\sqrt{\frac{\pi 2bNC_{PG}}{M_{CS}}}}$$

où N est le nombre d'Avogadro, C_{PG} est la concentration de protéoglycanes en (g / m^3), M_{CS} est le poids moléculaire des dissacharides de chondroïtine sulfate dissociés qui est environ 458 g/mole et b est la distance d'interchange qui a été estimée à 0.64 nm. Pour une concentration de protéoglycanes dans le cartilage autour de 30 mg/ml (voir figure 2.3), $d=5$ nm et correspond à 6.25 fois la longueur de Debye à 0.15 M NaCl et 1.7 fois celle à 0.01 M NaCl. Les cartilages traités avec IL-1 α ont un contenu de GAG environ 7 fois plus faible que les cartilages de contrôle. Par conséquent, la distance entre deux chaînes de GAG voisines est d'environ $d_{IL-1} = \sqrt{7}d_{contrôle} = 13nm$. Puisque les distances entre les chaînes de GAG sont de l'ordre de la longueur de Debye, les interactions d'origine électrostatique entre les GAG ne sont pas négligeables.

L'équation de Poisson-Boltzmann en coordonnées cylindriques avec les conditions aux frontières existantes n'a pas de solution analytique générale. Une solution

numérique stable a été formulée en résolvant l'équation par intervalles où le potentiel est beaucoup plus petit que 1 à l'aide d'une linéarisation. La solution est composée de fonctions de Bessel et elle peut ensuite être généralisée pour l'intervalle d'intérêt. Afin d'observer plus simplement la distribution de potentiel entre deux chaînes de GAG voisines, nous pouvons résoudre l'équation de Poisson-Boltzmann en coordonnées rectangulaires en supposant que les GAG sont des plans plutôt que des cylindres. Dans ce cas, la distribution de potentiel entre deux plans parallèles chargés est :

$$\Phi(x) = \frac{\Phi_0 \cosh\left[k \cdot \left(\frac{d}{2} - x\right)\right]}{\cosh\left[\frac{kd}{2}\right]}.$$

La figure 3.21 présente les distributions de potentiel normalisées par rapport à Φ_0 pour les disques normaux et dégradés dans les deux solutions salines de test.

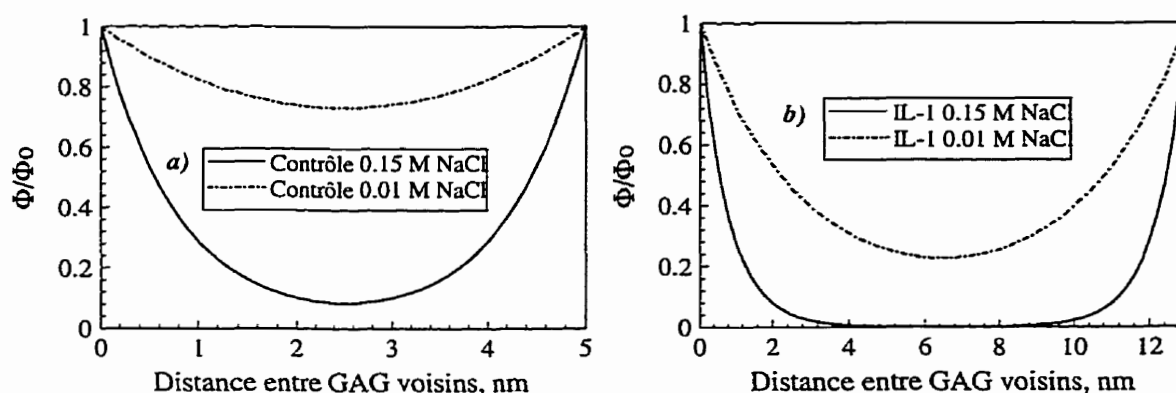


Figure 3.21 : Distributions de potentiel normalisées par rapport à Φ_0 pour les cartilages a) de contrôle et b) dégradés dans des solutions de test de 0.01 M NaCl et 0.15 M NaCl

Ces profils ont été tracés pour les longueurs caractéristiques que nous avons présentées précédemment. Nous pouvons constater que seul le disque traité avec IL-1 α et placé dans une solution saline physiologique (0.15 M NaCl) a une longueur de Debye

beaucoup plus petite que la distance intermoléculaire entre deux GAG voisins. Par conséquent, la charge nette dans le fluide est confinée proche des molécules de GAG et elle est nulle sur la majorité de la distance entre les GAG.

Lors des mesures expérimentales, nous avons observé, pour une concentration de NaCl physiologique, que les profils de potentiel des disques dégradés ont une amplitude maximale au centre du disque environ 4 fois plus faible que celle des cartilages de contrôle. Ce phénomène est probablement dû au fait que les cartilages dégradés ont une charge nette nulle sur la majeure partie de la distance entre deux GAG voisins, contrairement aux disques de contrôle, qui ont une charge nette non nulle. Dans la solution 0.01 M NaCl, les disques dégradés ont une charge nette plus faible que les disques de contrôle, mais elle n'est jamais nulle. Ceci explique pourquoi les profils de potentiel d'écoulement des cartilages dégradés ont une amplitude maximale semblable à celle des disques de contrôle.

3.5.4 Non linéarité des propriétés électromécaniques

Nous avons observé que la rigidité dynamique diminue de façon non linéaire en fonction de l'amplitude des compressions sinusoïdales (figures 3.6 et 3.9). Ce phénomène a déjà été observé par Fortin M. et al. dans une géométrie de compression non confinée. Ce comportement non linéaire diminutif n'est pas encore très bien expliqué, mais il pourrait être relié à une rigidification des fibres de collagène en compression (Fortin M. et al., 1997). Nous avons également démontré que la concentration de NaCl de la solution de test n'influence pas significativement le degré de non linéarité de la rigidité dynamique. À la figure 3.10, nous avons présenté la variation de la phase de la rigidité dynamique en fonction de la fréquence. Des résultats très semblables ont été mesurés pour des cartilages normaux (Fortin M. et al., 1998).

Nous avons également observé que l'amplitude maximale des profils de potentiel

d'écoulement varie de façon non linéaire en fonction de l'amplitude des compressions sinusoïdales et ce, dans les deux concentrations de solution saline. Le tableau 3.1 présente un résumé des résultats qui ont été obtenus dans 0.15 M NaCl pour l'amplitude de la charge dynamique (qui est directement reliée à la rigidité dynamique) et celle des potentiels d'écoulement. Le nombre entre parenthèses représente la normalisation par rapport à l'amplitude de compression de 2 μm . Dans le cas linéaire, les nombres entre parenthèse seraient 2 à 4 μm et 4 à 8 μm .

Tableau 3.1 : Non linéarité de la rigidité dynamique et de l'amplitude maximale des profils de potentiel d'écoulement

	5 ng/ml d'IL-1 α pendant 13 jours (1 ^{ère} expérience)				5 ng/ml d'IL-1 α pendant 11 jours (2 ^{ème} expérience)		
Charge dynamique (g)		<i>Contrôle</i>	<i>IL-1</i>	<i>Congelé</i>	<i>Contrôle</i>	<i>IL-1</i>	<i>Congelé</i>
	2 μm	5.31 (1)	2.19 (1)	8.11 (1)	7.19 (1)	2.60 (1)	8.93 (1)
	4 μm	8.93 (1.7)	3.21 (1.5)	13.49 (1.7)	11.75 (1.6)	3.97 (1.5)	14.99 (1.7)
	8 μm	15.07 (2.8)	4.75 (2.2)	22.07 (2.7)	18.57 (2.6)	5.85 (2.3)	24.75 (2.8)
Amplitude maximale du profil (mV)	2 μm	0.23 (1)	0.07 (1)	---	0.17 (1)	0.05 (1)	0.17 (1)
	4 μm	0.39 (1.7)	0.10 (1.4)	---	0.27 (1.6)	0.08 (1.6)	0.29 (1.7)
	8 μm	0.66 (2.9)	0.15 (2.1)	---	0.42 (2.5)	0.12 (2.4)	0.47 (2.8)

Nous constatons d'abord que les résultats pour la charge dynamique et l'amplitude maximale du profil sont très semblables. De plus, les cartilages congelés ont un comportement qui se rapproche de celui des disques de contrôle. Nous remarquons toutefois que les cartilages traités avec IL-1 α sont caractérisés par une non linéarité plus importante que celle des disques de contrôle. Nous avons également observé que la phase ne change pas en fonction du taux de dégradation du cartilage ou de l'amplitude des compressions sinusoïdales. Il est difficile d'expliquer pourquoi la non linéarité de propriétés électromécaniques augmente en fonction de la dégradation du cartilage. Nous avons mentionné plus tôt que Fortin M. et al. ont relié la non linéarité de la rigidité

dynamique des cartilages normaux à l'hypothèse de la rigidification des fibres de collagène en compression. Cette hypothèse est contredite par les résultats que nous avons observés. En effet, la dégradation du cartilage diminue la rigidité de fibres de collagène et par conséquent, devrait diminuer également la non linéarité de la rigidité dynamique.

Il est possible que l'augmentation de la non linéarité des propriétés électromécaniques en fonction de la dégradation soit reliée à une instabilité de la structure du cartilage. En effet, nous pouvons supposer que la perte de GAG et la dégradation des fibres de collagène de la matrice extracellulaire diminuent la stabilité de la structure du cartilage. Toutefois, pour trouver l'explication rigoureuse de ce phénomène, il faudrait élargir le modèle composite non homogène développé par Soulhat J. et al. et vérifier l'effet de la variation des différents paramètres sur la non linéarité des propriétés électromécaniques.

3.5.5 Effet de la congélation

Lorsque les cartilages sont congelés après la culture, il y a mort des cellules et libération de différentes sortes de protéases. Avant les tests électromécaniques ou biochimiques, les cartilages sont décongelés pendant environ 15 minutes dans une solution de HBSS, puis testés. Si les tests électromécaniques sont de longue durée, les protéases peuvent détruire la matrice extracellulaire du cartilage et fausser les résultats.

Au cours de la première expérience avec IL-1 α et de celle avec APMA, les cartilages ont été placés en culture pour une durée donnée et ils ont ensuite été congelés avant d'être testés électromécaniquement. Au contraire, au cours de la deuxième expérience avec IL-1 α , les cartilages de contrôle et dégradés ainsi que les 4 disques associés au jour 1 de la culture ont été testés à la sortie de la culture sans être congelés. Ceci nous a permis de vérifier l'effet de la congélation sur les mesures

électromécaniques. En effet, nous avons observé, dans la section précédente, que les rigidités statique et dynamique des disques de la deuxième expérience sont plus élevées que celles des deux autres expériences. Par contre, nous avons remarqué que l'amplitude maximale du profil de potentiel d'écoulement des disques de contrôle est moins élevée. Ceci peut être expliqué par le fait que les compressions sinusoïdales ont été effectuées à des fréquences plus faibles (1, 0.1 et 0.01 Hz). Bref, il est possible que la congélation affecte les propriétés électromécaniques des cartilages, mais les observations précédentes pourraient aussi être tout simplement reliées au fait que les cartilages proviennent de différents boeufs qui n'ont peut-être pas le même âge.

Il est intéressant de remarquer que les cartilages frais qui sont associés au jour 1 de la culture ont des rigidités statique et dynamique semblables à celles des disques de contrôle, alors que les disques congelés associés à chacune des durées ont des rigidités plus élevées que les cartilages de contrôle. Nous avons également observé que le profil de potentiel des disques frais se superpose avec celui des cartilages de contrôle, alors que les profils des disques congelés associés aux jours 4 et 7 sont plus élevés et que le profil du jour 11 est très semblable à celui des disques de contrôle. Ces résultats nous permettent de supposer qu'une congélation de courte durée n'a aucun effet significatif sur les cartilages pour les mesures électromécaniques.

Nous avons toutefois remarqué qu'une congélation de longue durée affecte les mesures de potentiels d'écoulement. En effet, lors de l'expérience avec APMA, un triplet de cartilage a été testé en 1997 et 1998 et nous avons observé que l'amplitude des profils de potentiel d'écoulement a diminué. Ce résultat n'est que préliminaire. Il serait important d'étudier plus systématiquement l'effet de la congélation sur un nombre élevé d'échantillons pour différents temps de congélation. Il pourrait également être intéressant d'étudier l'effet de plusieurs étapes de congélation sur les propriétés électromécaniques des cartilages. Nous pouvons donc supposer qu'une première étape de congélation des cartilages, de courte durée (moins de 6 mois), n'affecte pas les mesures

électromécaniques. Nous avons par contre observé une dégradation du cartilage après 12 mois de congélation.

3.5.6 Problèmes rencontrés lors des mesures électromécaniques

Il est important de spécifier les problèmes que nous avons rencontrés lors des mesures électromécaniques. Le premier problème est survenu lorsque nous avons poinçonné les disques à 3 mm de diamètre. En effet, certains disques étaient très difficiles à poinçonner et à sortir du poinçon. Il est probable que ces cartilages aient subi une dégradation supplémentaire causée par la force que nous avons appliquée pour les poinçonner.

Le problème le plus important que nous avons rencontré est relié à l'alignement du cartilage par rapport aux électrodes. Puisque le diamètre des électrodes est de 50 μm et qu'elles sont distancées d'environ 300 μm , il est difficile de s'assurer que seulement deux électrodes se retrouvent dans le bain. Par conséquent, pour certains cartilages, nous avons dû recommencer les mesures électromécaniques jusqu'à trois fois avant d'obtenir un profil de potentiel d'écoulement raisonnable. De plus, il nous est arrivé d'obtenir des profils bizarres alors que l'alignement du cartilage semblait correct. Ceci pourrait être relié à la présence d'un artefact à la surface du cartilage articulaire. Il est à noter que les cartilages dégradés étaient plus faciles à aligner que les autres disques. En effet, nous avons presque toujours obtenu des profils de potentiel raisonnables lors du premier alignement pour les cartilages dégradés.

Afin de faciliter les mesures et de sauver du temps, nous avons tenté de trouver une méthode pour vérifier rapidement si le cartilage est correctement aligné sur les électrodes. Après avoir établi le contact entre la tige de compression et le cartilage, nous avons effectué une première série de 4 pas de compression de 20 μm d'amplitude avec un

temps de relaxation très court (60 secondes). Nous avons vérifié si l'allure du profil était raisonnable, nous avons redescendu l'actuateur et laissé regonfler le cartilage sans le déplacer. Nous avons par la suite retiré la solution de test et établi de nouveau le contact entre le tige de compression et le cartilage, avant d'effectuer la série de mesures avec un temps de relaxation plus élevé. Nous avons toutefois observé un nouveau problème lors de ce test pour vérifier l'alignement. En effet, malgré le temps pendant lequel nous laissons le cartilage se regonfler, nous avons observé qu'il y avait parfois une sorte de succion entre la surface du cartilage et celle des électrodes. Par conséquent le cartilage restait dans un état comprimé, ce qui augmentait la valeur de la charge mesurée.

3.6 Conclusion

3.6.1 Précision et sensibilité des différentes propriétés électromécaniques

Le tableau 3.2 présente un résumé général des propriétés électromécaniques qui ont été mesurées au cours des trois expériences. Les pourcentages indiquent le taux de dégradation des disques traités avec IL-1 α ou APMA, alors que les valeurs entre parenthèses sont l'amplitude de la rigidité ou du potentiel mesurée sur le cartilage de contrôle. Par exemple, la rigidité statique des disques dégradés lors de la première expérience correspond à 11% de celle des cartilages de contrôle qui ont une rigidité statique de 0.19 MPa. Tous les résultats présentés dans le tableau ont été mesurés dans une solution de 0.15 M NaCl. De plus, pour la première expérience avec IL-1 α et celle avec APMA, la rigidité dynamique et le profil de potentiel d'écoulement ont été mesurés lors de compressions sinusoïdales de 4 μ m d'amplitude à une fréquence de 0.2 Hz, alors que pour la deuxième expérience avec IL-1 α , la fréquence était de 0.1 Hz.

En comparant les résultats des deux expériences avec IL-1 α , nous constatons d'abord que le taux de dégradation des propriétés électromécaniques est plus important

lors de la première expérience avec IL-1 α (13 jours de culture) que de la deuxième (11 jours de culture). Dans les deux cas, à la fin de la culture, nous remarquons que la rigidité statique est plus sensible à la dégradation du cartilage que les autres paramètres. Par ordre décroissant de sensibilité à la dégradation à la fin de la culture, nous avons la rigidité statique, le gradient de potentiel à la périphérie du profil, l'amplitude maximale du profil de potentiel d'écoulement et la rigidité dynamique.

Tableau 3.2 : Propriétés électromécaniques des cartilages normaux et dégradés lors des 3 expériences

	5 ng/ml d'IL-1 α pendant 13 jours	5 ng/ml d'IL-1 α pour des durées variables		APMA 1 mM pendant 7 jours
Rigidité statique (MPa)	11% (0.19)	<i>1 jour</i>	70% (0.81)	60% (0.4)
		<i>4 jours</i>	59% (0.78)	
		<i>7 jours</i>	10% (0.64)	
		<i>11 jours</i>	17% (0.37)	
Rigidité dynamique (MPa)	32% (2.43)	<i>1 jour</i>	75% (7.67)	90% (3.82)
		<i>4 jours</i>	79% (6.90)	
		<i>7 jours</i>	30% (5.94)	
		<i>11 jours</i>	35% (4.24)	
Amplitude maximale du profil de potentiel d'écoulement (mV)	26% (0.39)	<i>1 jour</i>	103% (0.32)	63% (0.21)
		<i>4 jours</i>	82% (0.34)	
		<i>7 jours</i>	33% (0.30)	
		<i>11 jours</i>	30% (0.27)	
Gradient de potentiel à la périphérie du profil (mV)	16% (0.24)	<i>1 jour</i>	44% (0.22)	42% (0.09)
		<i>4 jours</i>	57% (0.28)	
		<i>7 jours</i>	20% (0.25)	
		<i>11 jours</i>	24% (0.17)	

À l'aide des résultats de la deuxième expérience avec IL-1 α , nous pouvons étudier l'évolution de chaque paramètre en fonction de la durée de la culture. La figure 3.22 présente l'évolution des propriétés électromécaniques de cartilages qui ont été traités avec IL-1 α en fonction de la durée de la culture. Ce graphique résume les résultats qui ont été

présentés dans la deuxième colonne du tableau 3.2.

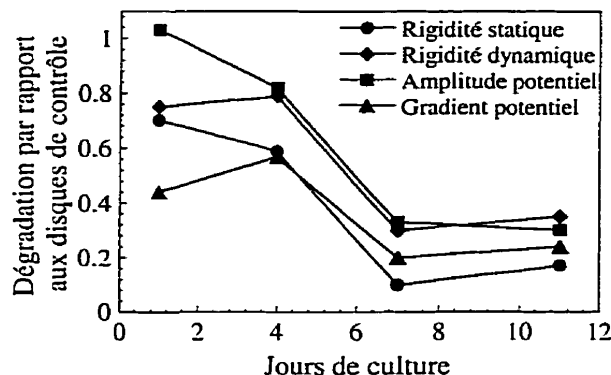


Figure 3.22 : Évolution des propriétés électromécaniques de disques traités avec 5 ng/ml d'IL-1α en fonction de la durée de la culture

Nous constatons que le gradient de potentiel à la périphérie du profil est très sensible à la dégradation du cartilage. En effet, 24 heures après le début de la culture, le gradient de potentiel des disques dégradés est réduit à 44% de la valeur mesurée pour les cartilages de contrôle. La dégradation de la rigidité statique évolue un peu moins rapidement que le gradient de potentiel à la périphérie en fonction de la durée de la culture, mais elle est plus importante à la fin de la culture. De plus, malgré le fait que l'amplitude maximale du profil de potentiel d'écoulement soit légèrement plus sensible à la dégradation que la rigidité dynamique à la fin de la culture, la diminution de la rigidité dynamique est plus rapide au début de la culture. L'amplitude maximale du profil de potentiel d'écoulement pour les cartilages dégradés diminue lentement au début de la culture pour atteindre 33% de celle des disques de contrôle après 7 jours de culture. Suite à ces résultats, nous pouvons conclure que les mesures de potentiel d'écoulement sont sensibles au niveau de dégradation de la matrice extracellulaire. De plus, le gradient à la périphérie du profil indique plus sensiblement le degré de dégradation du cartilage que l'amplitude maximale du profil de potentiel d'écoulement. Toutefois, la rigidité statique reste le paramètre qui est le plus sensible à la dégradation du cartilage.

À l'aide du tableau 3.2, nous remarquons également que les propriétés électromécaniques des cartilages de contrôle diminuent en fonction de la durée de la culture. Ces résultats ne correspondent pas à ceux qui ont été obtenus par Dumont J. et al.. En effet, ils ont observé que les rigidités statique et dynamique des disques de contrôle sont constantes pendant environ 1 mois de culture (Dumont J. et al., 1998). Puisque les 4 disques de contrôle que nous avons testés pour chacune des durées de culture sont différents, c'est-à-dire que nous n'avons pas étudié l'évolution des 4 mêmes disques tout au long de culture, nous ne pouvons pas conclure avec certitude que les propriétés électromécaniques des disques de contrôle changent au cours de la culture. De plus, à la figure 2.4, nous avons observé que la perte de GAG des disques de contrôle augmente à partir du jour 10 de la culture. En effet, il est possible qu'un problème soit survenu à la fin de la culture. Ceci pourrait expliquer pourquoi les rigidités et les potentiels d'écoulement des cartilages qui ont été placés 11 jours en culture sont plus faibles.

Les résultats obtenus lors de la culture avec APMA sont très différents de ceux qui ont été mesurés lors des expériences avec IL-1 α . Le taux de dégradation des propriétés mécaniques des cartilages traités avec APMA est beaucoup plus faible que celui des disques dégradés avec IL-1 α . Nous tenterons d'expliquer ces résultats dans la section suivante.

3.6.2 Corrélation entre les caractéristiques biochimiques et les propriétés électromécaniques

Le tableau 3.3 rappelle les caractéristiques biochimiques des disques de contrôle et dégradés qui ont été présentées dans le chapitre 2. Les pourcentages de perte de GAG ont été calculés à partir du contenu total de GAG, alors que les pourcentages de collagène dénaturé ou clivé ont été estimés par rapport à un contenu de collagène total fixe de 150

µg. Il est à noter que pour l'expérience avec APMA, les pourcentages de perte de GAG ont également été estimés en considérant un contenu total de GAG de 500 µg.

Tableau 3.3 : Caractéristiques biochimiques des cartilages normaux et dégradés lors des 3 expériences

	5 ng/ml d'IL-1α pendant 13 jours		5 ng/ml d'IL-1α pour durées variables			APMA 1 mM pendant 7 jours	
% de perte de GAG <i>GAG milieu/ GAG(milieu+disque)</i>	<u>Contrôle</u> 27%	<u>IL-1</u> 91%		<u>Contrôle</u>	<u>IL-1</u>	<u>Contrôle</u> 53%	<u>APMA</u> 90%
			<i>1 jour</i>	3.5%	8.8%		
			<i>4 jours</i>	9.4%	17.6%		
			<i>7 jours</i>	14.4%	65.3%		
			<i>11 jours</i>	21.8%	74.1%		
% de dénaturation du collagène de type II	---	---	<i>1 jour</i>	2.0%	2.6%	---	---
			<i>4 jours</i>	3.7%	7.4%		
			<i>7 jours</i>	4.4%	12.1%		
			<i>11 jours</i>	6.3%	14.8%		
% de clivage du collagène de type II	---	---	<i>1 jour</i>	0.3%	0.8%	---	---
			<i>4 jours</i>	0.3%	0.8%		
			<i>7 jours</i>	0.3%	1.5%		
			<i>11 jours</i>	0.3%	1.7%		

Nous constatons d'abord que le pourcentage de perte de GAG est plus important que le pourcentage de dénaturation ou de clivage des fibres de collagène de type II. Nous observons également que les disques de contrôle ont subi une certaine perte de GAG et une dénaturation du collagène au cours de la culture. Les cartilages traités avec IL-1α ont perdu la majorité de leur contenu de GAG après deux semaines de culture. Pour l'expérience avec APMA, nous observons que les disques de contrôle ont perdu plus de la moitié de leur contenu de GAG après seulement 7 jours de culture. Nous avons également constaté que la perte de GAG est beaucoup plus rapide. La figure 3.23 résume les résultats qui sont présentés dans le tableau pour la deuxième expérience avec IL-1α.

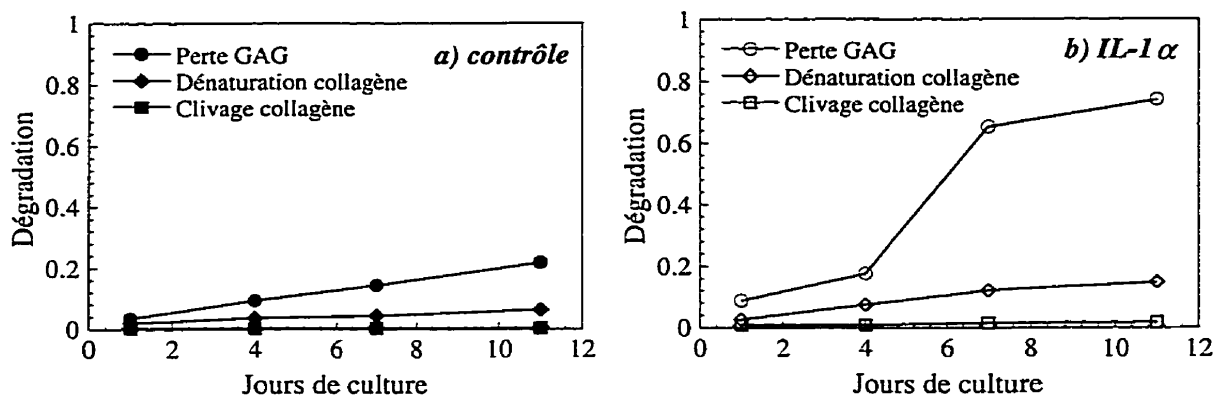


Figure 3.23 : Évolution des caractéristiques biochimiques a) des cartilages de contrôle et b) des disques traités avec IL-1α en fonction de la durée de culture

Lors des deux expériences avec IL-1α, nous observons que la diminution de la rigidité statique suite à un traitement avec IL-1α est supérieure à la perte de GAG. En effet, les disques dégradés ont perdu entre 50 et 65% plus de GAG que les cartilages de contrôle, alors que la rigidité statique a été réduite entre 10 et 20% de la valeur mesurée pour les disques de contrôle. Nous pouvons donc supposer que la rigidité statique est très sensible au contenu de protéoglycanes, mais aussi à la dégradation des fibres de collagène. La rigidité dynamique qui est le paramètre le moins sensible à la dégradation à la fin de la culture est probablement moins influencée par la dénaturation et le clivage du collagène. L'amplitude maximale du profil de potentiel d'écoulement n'est pas aussi rapidement affectée que le gradient à la périphérie par la dégradation du cartilage. En effet, la plus importante partie de la perte de GAG se produit entre les jours 4 et 7 de la culture, ce qui est également observé au niveau de l'amplitude maximale du profil. Au contraire, le gradient à la périphérie est un paramètre très sensible à la dégradation dès le début de la culture. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la perte de GAG au début de la culture est plus importante à la périphérie du cartilage, ce qui est directement reflété par le gradient de potentiel. Il est difficile d'estimer quel est l'effet direct de la perte de GAG ou de la dégradation du collagène sur les propriétés électromécaniques du cartilage.

Le deux phénomènes sont directement reliés à la diminution des propriétés mécaniques et électriques du cartilage.

Au cours de l'expérience avec APMA, nous avons observé que les cartilages de contrôle ont perdu une quantité importante de leur contenu de GAG pendant les 7 jours de culture. Par conséquent, la différence entre les propriétés électromécaniques des disques de contrôle et dégradés est beaucoup moins marquée qu'au cours des expériences avec IL-1 α . Le profil de potentiel d'écoulement qui a été obtenu pour les disques de contrôle est caractérisé par un gradient à la périphérie qui est faible (0.09 mV). D'ailleurs, au cours de la deuxième expérience avec IL-1 α , nous avons remarqué que le gradient de potentiel à la périphérie est le paramètre électromécanique le plus sensible à la dégradation au début de la culture. Ceci nous indique clairement qu'un problème est survenu lors de la culture des cartilages avec et sans APMA. Nous avons déjà supposé, dans le chapitre 2, que la dégradation des disques de contrôle pourrait être reliée au fait que les milieux de culture des disques de contrôle ont été placés dans l'incubateur 24 heures avant le changement des milieux. En effet, il est possible que certains constituants du milieu, telle que la glutamine, soient dégradés pendant les 24 heures avant le changement des milieux. Puisque l'APMA est une très petite molécule, une autre hypothèse d'explication pourrait être la volatilisation de la molécule pendant la culture. Il faut également tenir compte du fait que les triplets de cartilage sont restés congelés pendant environ 15 mois avant d'être testés et que les propriétés électromécaniques ont certainement été affectées. Afin de vérifier plus systématiquement les différentes hypothèses, il serait important de recommencer une expérience plus complète pour tester l'effet de l'APMA.

CHAPITRE 4: Modélisation du filtrage et construction des profils de potentiel d'écoulement à partir des courbes de relaxation

Dans le chapitre précédent, nous avons présenté les profils de potentiel d'écoulement qui sont obtenus lors de la compression sinusoïdale du cartilage. Les profils de potentiel d'écoulement peuvent également être construits à l'aide des signaux électriques mesurés lors du test de relaxation. D'ailleurs, dans une perspective d'avenir, il est plus facile cliniquement de mesurer les potentiels d'écoulement générés lors d'un test de relaxation sur des cartilages *in vivo* avec une sonde arthroscopique que lors de compressions sinusoïdales. Il est donc important de minimiser l'influence du système d'acquisition sur les mesures de potentiels d'écoulement lors du test de relaxation.

Dans ce chapitre, nous allons d'abord discuter de l'effet du filtrage lors de l'acquisition des potentiels d'écoulement. Nous allons vérifier l'efficacité de plusieurs méthodes de correction des signaux à l'aide de différentes fonctions de transfert. Nous allons ensuite présenter la technique de correction que nous allons utiliser ainsi que les profils de potentiel d'écoulement construits à partir de courbes de relaxation mesurées lors des deux expériences avec IL-1 α . Nous allons comparer ces profils avec ceux qui ont été obtenus lors de la compression sinusoïdale du cartilage. Nous discuterons finalement des travaux futurs qui seront effectués pour développer un système de mesure fiable et reproductible dans le but de concevoir une sonde arthroscopique pour mesurer les potentiels d'écoulement directement sur la surface articulaire du cartilage de patients souffrant d'ostéoarthrite.

4.1 Modélisation du filtrage des signaux électriques lors du test de relaxation

Lors du test de relaxation, un offset de compression de 100 μm est appliqué au cartilage par pas de 20 μm à une vitesse de 2 $\mu\text{m/s}$ et un temps de relaxation de 200 ou

300 secondes après chaque pas. Nous avons remarqué que les potentiels d'écoulement mesurés lors du test de relaxation ont une allure différente de la courbe de relaxation de la charge. En effet, les signaux électriques mesurés sont caractérisés par un pic dans les valeurs négatives (voir le canal 6 de la figure 3.2). Ce phénomène peut être expliqué par le prétraitement des signaux électriques. En effet, les potentiels d'écoulement générés lors de la compression du cartilage sont mesurés à l'aide de 8 électrodes. Chaque canal représente la différence de potentiel d'écoulement entre 2 électrodes voisines. Les signaux analogiques provenant des 7 canaux doivent d'abord être amplifiés et filtrés avant d'arriver à un convertisseur analogue/digital et d'être transférés à l'ordinateur. C'est le filtre passe-haut qui est responsable de la distorsion des potentiels d'écoulement mesurés lors de la relaxation (voir figure 1.13).

4.1.1 Effet théorique du filtrage sur les potentiels d'écoulement mesurés lors de la relaxation

Les filtres passe-haut et passe-bas ont respectivement des fréquences de coupure de $f_h = 0.05Hz$ et $f_b = 200Hz$. Le système est caractérisé par une fonction de transfert qui correspond au produit des fonctions de transfert de chacun des filtres, c'est-à-dire

$$T = \frac{g \cdot i\omega \cdot w_b}{(i\omega + w_h)(i\omega + w_b)} \quad \text{où} \quad \begin{aligned} w_h &= 2 \cdot \pi \cdot f_h \\ w_b &= 2 \cdot \pi \cdot f_b \end{aligned}$$

où g est le gain, w_b est la fréquence de coupure du filtre passe-bas et w_h est celle du filtre passe-haut. Nous avons étudié l'effet théorique du filtrage en créant une courbe de relaxation ou un signal d'entrée dans le domaine temporel avec une amplitude, une vitesse, une constante et un temps de relaxation donnés. Dans le domaine de Laplace, nous avons calculé le signal de sortie du système (produit de la transformée de Laplace du signal d'entrée avec la fonction de transfert) et nous l'avons comparé avec le signal

d'entrée dans le domaine temporel. Les détails de ce calcul sont présentés à l'annexe IV. Nous avons fixé les paramètres de relaxation qui ont été obtenus lors des mesures expérimentales, c'est-à-dire une amplitude de 2 mV, un temps de montée de 10 secondes, une constante de relaxation d'environ 0.1 s^{-1} et un temps de relaxation de 200 secondes. La figure 4.1 présente les signaux d'entrée et de sortie après filtrage. Nous constatons que l'amplitude du signal de sortie est atténuée, que la pente ascendante n'est plus linéaire et que la constante de relaxation est plus élevée. Nous observons également un pic dans les valeurs négatives à la fin de la descente (autour de 20 secondes).

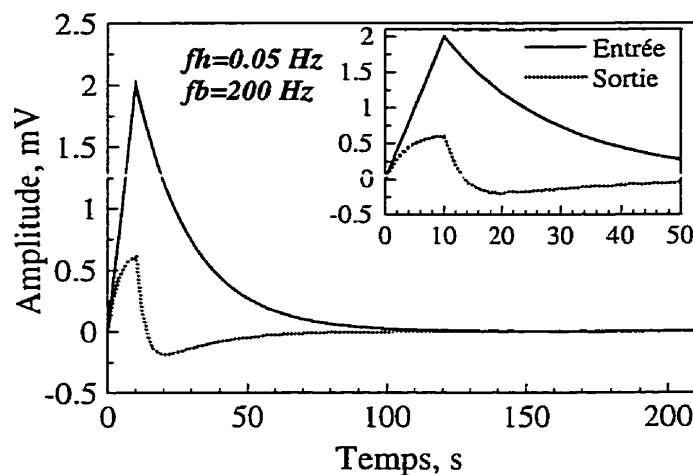


Figure 4.1 : Effet théorique des filtres passe-haut et passe-bas sur les courbes de relaxation

En variant les fréquences de coupure des filtres passe-haut et passe-bas, nous avons observé que la distorsion du signal est principalement liée à la fréquence de coupure du filtre passe-haut. Nous avons constaté que pour une fréquence de coupure de 0.0001 Hz, l'effet du filtre devient presque négligeable. Il est toutefois pratiquement impossible de créer un filtre passe-haut avec une fréquence de coupure aussi faible.

4.1.2 Fonction de transfert expérimentale construite à partir d'une courbe de relaxation

Afin d'étudier plus précisément la réponse électrique de chaque canal, un programme d'acquisition de données a été écrit sur *Labview* (annexe V). Ce programme envoie une courbe de relaxation à l'entrée de la carte d'acquisition et enregistre la réponse électrique générée après le filtrage et l'amplification du signal. Le taux d'échantillonnage du signal doit être fixé de façon à respecter le théorème d'échantillonnage de Shannon-Nyquist. La figure 4.2 présente le signal de sortie du système d'acquisition lorsque le signal d'entrée a une amplitude de 2 mV, un temps de montée de 10 secondes, une constante de relaxation de 0.1 s^{-1} et un temps de relaxation de 200 secondes.

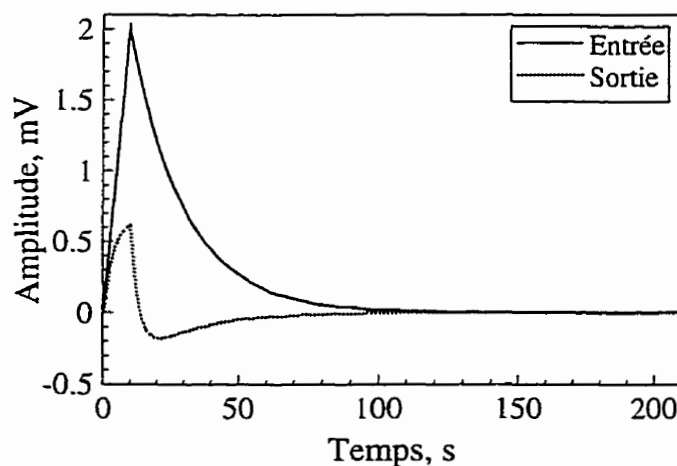


Figure 4.2 : Signal expérimental de sortie du système d'acquisition électrique pour un signal d'entrée typique

Le signal de sortie a été moyenné sur les 7 canaux. Il est à noter que les différents canaux ont un comportement électrique très semblable. De plus, nous constatons que les signaux électriques mesurés expérimentalement à la sortie du système d'acquisition (figure 4.2) sont très semblables aux prédictions du modèle théorique (figure 4.1).

Puisque le signal d'entrée est connu et que le signal de sortie est mesuré, nous pouvons déduire la fonction de transfert expérimentale du système par la méthode de division spectrale. Par contre, puisque les courbes de relaxation ne sont pas périodiques et que les données sont discrètes, la programmation de la transformée de Laplace directe et inverse discrète est un problème laborieux. Nous allons donc utiliser la transformée de Fourier qui a été développée dans *Labview*. Nous avons construit un fichier de calibration en calculant la fonction de transfert expérimentale du système. Pour tester l'efficacité de la méthode, nous avons utilisé le signal de sortie mesuré précédemment et nous l'avons divisé dans le domaine de Fourier par le fichier de calibration expérimental calculé à partir de ce même signal. Nous avons constaté que le signal estimé (dont le graphique n'est pas montré) correspondait parfaitement au signal d'entrée du départ.

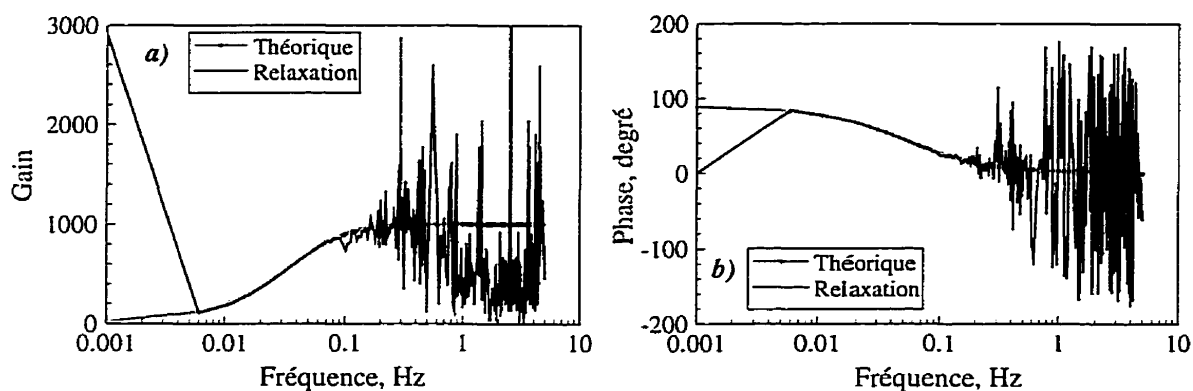


Figure 4.3 : Comparaison entre a) l'amplitude et b) la phase du modèle théorique et de la fonction de transfert expérimentale construite à partir des courbes de relaxation

La figure 4.3 présente la variation du gain et de la phase de la fonction de transfert expérimentale du système dans le domaine fréquentiel. Nous constatons que, pour des fréquences supérieures à 0.1 Hz, le bruit est très important (jusqu'à 10 fois l'amplitude du signal). Nous remarquons également que la fonction de transfert expérimentale (sans le premier point) correspond très bien au modèle théorique pour des fréquences inférieures à 0.1 Hz. Le premier point de la fonction de transfert expérimentale qui est très élevé par

rapport au modèle théorique est relié à l'offset des signaux d'entrée et de sortie. Il peut être éliminé en moyennant les signaux d'entrée et de sortie à zéro. Par contre, contrairement aux sinus, les signaux de relaxation ne peuvent pas être moyennés à zéro.

La présence de bruit dans la fonction de transfert expérimentale peut être expliquée par le fait que les signaux d'entrée et de sortie ont un contenu fréquentiel peu important à partir de 0.1 Hz et que le signal de sortie est caractérisé par du bruit. Par conséquent, lors du calcul de la fonction de transfert expérimentale, une composante élevée du bruit de la sortie peut être divisée par une composante faible de l'entrée, ce qui donne un pic important dans la fonction de transfert. Pour bien caractériser le système, il est important de choisir un signal d'entrée qui a un contenu fréquentiel le plus large possible et qui peut être moyenné à zéro. Il serait donc préférable d'utiliser un bruit blanc gaussien de variance 0.1 comme signal d'entrée. La fonction de transfert obtenue à partir d'un bruit blanc est présentée à la figure VI.1 de l'annexe VI. Nous constatons que la fonction de transfert correspond relativement bien au modèle théorique et que le bruit est beaucoup moins important. Il est à noter que le bruit blanc présenté sur ces graphiques n'a pas été moyenné à zéro, ce qui explique pourquoi le premier point de la fonction de transfert est très élevé.

4.1.3 Fonction de transfert expérimentale construite à partir de sinusoïdes

Le filtrage des signaux électriques influence également les potentiels d'écoulement mesurés lors des compressions sinusoïdales du cartilage. Par contre, puisque les signaux d'entrée et de sortie sont sinusoïdaux et périodiques, il est beaucoup plus facile de corriger l'effet du filtrage. En effet, puisque nous connaissons l'amplitude et le déphasage des signaux d'entrée et de sortie, nous pouvons déduire le gain (rapport des amplitudes) et le déphasage (soustraction des phases) de chaque canal. Lors de la correction, l'amplitude de chaque sinus est divisée par le gain et le déphasage est soustrait

à la phase. Il est important de noter que la phase est associée à la composante fondamentale de la transformée de Fourier.

La figure 4.4 présente une comparaison entre le gain et la phase du modèle théorique et de la fonction de transfert expérimentale calculée à partir de la calibration sinusoïdale de chaque canal pour 21 fréquences entre 0.01 et 500 Hz sur une échelle logarithmique. Nous constatons que la phase de la fonction de transfert expérimentale correspond très bien au modèle théorique alors que le gain est surestimé à basse fréquence.

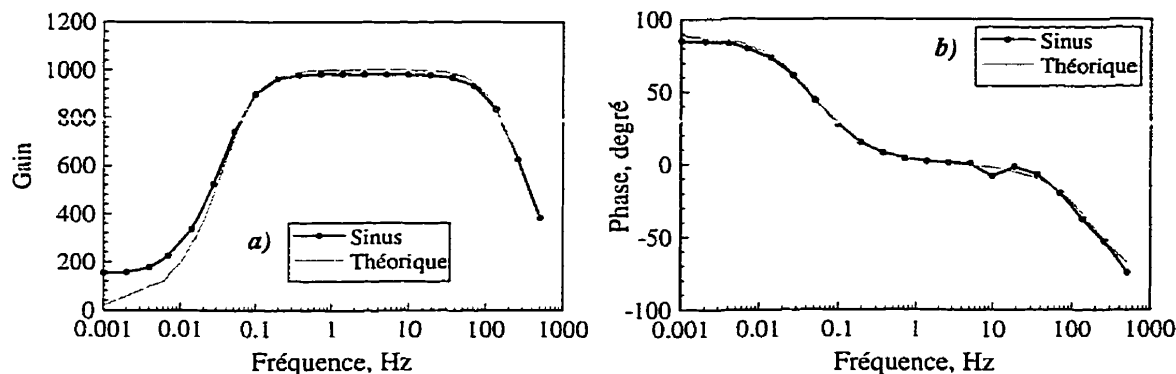


Figure 4.4 : Comparaison entre a) l'amplitude et b) la phase du modèle théorique et de la fonction de transfert calculée à partir de la calibration sinusoïdale

4.1.4 Efficacité des différentes fonctions de transfert pour la correction des potentiels d'écoulement mesurés lors du test de relaxation

Dans les sections précédentes, nous avons étudié trois fonctions de transfert qui ont été obtenues par la méthode de division spectrale. En effet, nous avons présenté les fonctions de transfert calculées à partir du modèle théorique, des courbes de relaxation expérimentales et de la calibration sinusoïdale. Afin de tester l'efficacité de ces différentes fonctions de transfert, nous avons utilisé le signal de sortie qui a été présenté à

la figure 4.2 et nous avons comparé l'entrée estimée avec l'entrée connue qui a été envoyée dans le système d'acquisition.

Comme nous allons le présenter à la figure 4.5 de la section 4.2.1, la correction du signal à partir du modèle théorique avec des fréquences de coupure pour les filtres passe-haut et passe-bas de 0.05 et 200 Hz permet d'estimer un signal d'entrée qui a une amplitude plus faible et qui est surestimé à la fin de la relaxation (entre 50 et 300 secondes). En augmentant la fréquence de coupure du filtre passe-haut autour de 0.1 Hz, il est possible de retrouver l'amplitude du signal d'entrée, mais le signal est toujours surestimé à la fin de la courbe de relaxation (figure 4.5).

La fonction de transfert calculée à partir des courbes de relaxation nous permet d'estimer parfaitement le signal d'entrée du système. Elle induit par contre beaucoup de bruit à haute fréquence dans les potentiels d'écoulement mesurés lors de la compression du cartilage. La correction des signaux à partir de la fonction de transfert calculée lors de la calibration sinusoïdale ressemble aux résultats qui ont été obtenus à l'aide du modèle théorique pour une fréquence de 0.05 Hz. Le signal estimé est caractérisé par une amplitude moins élevée et une surestimation à la fin de la relaxation. Puisque la fonction de transfert obtenue à partir des courbes de relaxation de contrainte décrit très bien le comportement à basse fréquence alors que celle calculée à partir de la calibration sinusoïdale correspond très bien au modèle théorique à haute fréquence, nous avons construit une nouvelle fonction de transfert en combinant les fichiers de calibration obtenus à partir des deux méthodes. Nous avons utilisé le fichier de calibration calculé à partir d'une courbe de relaxation pour les fréquences inférieures à 0.1 Hz et la calibration sinusoïdale pour les fréquences supérieures à 0.1 Hz. Nous avons toutefois observé que cette méthode de correction réduit l'amplitude du signal estimé.

Comme nous l'avons mentionné dans la section 4.1.2, l'utilisation d'un bruit blanc gaussien pour calculer la fonction de transfert du système d'acquisition permet

d'éliminer le bruit à haute fréquence. Le signal d'entrée estimé à l'aide de cette fonction de transfert est présenté à la figure VI.2 de l'annexe VI. Nous constatons que le signal estimé a la même amplitude que le signal d'entrée. La fonction de transfert induit par contre du bruit sinusoïdal à basse fréquence dans les signaux estimés.

4.1.5 Mesure des potentiels d'écoulement en DC

Le système acquisition que nous utilisons pour mesurer les potentiels d'écoulement nous permet de sélectionner des fréquences de coupure de 200 ou 2000 Hz pour le filtre passe-bas et de 0.05 Hz ou DC pour le filtre passe-haut. Lorsque nous avons effectué les mesures électriques, le système était programmé pour des fréquences de coupure de 200 et 0.05 Hz avec un gain de 1000 (voir figure 1.13). À l'aide du signal d'entrée que nous avons présenté à la figure 4.2, nous avons constaté que le signal de sortie du système placé en DC avec un gain de 100 ne subit aucune distorsion ou atténuation contrairement à ce que nous avons observé pour la fréquence de coupure de 0.05 Hz. Par contre, lorsque le système est placé en DC, le gain des amplificateurs doit être plus faible pour éviter une saturation liée à l'offset des signaux. En effet, selon le circuit électrique et les électrodes utilisées pour mesurer les potentiels d'écoulement, l'offset des signaux peut être plus ou moins élevé. Le gain des amplificateurs doit donc être ajusté selon le type d'application, l'amplitude des signaux et le choix des électrodes. Par exemple, les signaux électriques mesurés sur le tissu cardiaque avec des électrodes sont caractérisés par des offsets de l'ordre de 100 mV. Pour un gain de 100, un amplificateur avec une plage de ± 10 V est saturé. Par conséquent, dans certains cas, il est important de programmer le filtre passe-haut pour une certaine fréquence de coupure plutôt qu'en DC, de façon à éliminer l'offset associé aux signaux électriques des différents canaux.

Lorsque les mesures électriques ne peuvent pas être effectuées en DC et qu'il est pratiquement impossible de réduire la fréquence de coupure du filtre passe-haut à moins de 0.01 Hz, il est important de trouver une méthode approximative efficace pour corriger

l'effet du filtrage sur les potentiels d'écoulement mesurés lors du test de relaxation. Les techniques que nous avons suggérées dans cette section sont basées sur la division spectrale dans le domaine fréquentiel. Il existe d'autres méthodes plus précises qui peuvent être développées dans le domaine temporel pour caractériser le système d'acquisition. Le filtrage de Wiener par exemple est une méthode qui permet de tenir compte du bruit dans les signaux en ajoutant une information a priori sur le bruit.

4.2 Profils de potentiel d'écoulement construits à partir des courbes de relaxation

4.2.1 Choix de la méthode de correction des potentiels d'écoulement

Les deux facteurs les plus critiques lors de la construction du profil de potentiel d'écoulement à partir des courbes de relaxation sont l'amplitude maximale et la constante de relaxation. Nous devons donc utiliser une méthode de correction qui nous permet de retrouver ces deux paramètres. Suite aux résultats qui ont été présentés dans la section précédente, nous avons choisi d'utiliser le modèle théorique pour corriger les potentiels d'écoulement mesurés lors du test de relaxation de contrainte.

La figure 4.5 présente le signal de la figure 4.2 avant et après correction à l'aide du modèle théorique pour des fréquences de coupure du filtre passe-haut de 0.05 et 0.1 Hz. Les deux courbes corrigées ont été moyennées sur les 7 canaux d'acquisition. L'écart type associé à la moyenne des 7 canaux n'est pas présenté sur cette figure, car il est très faible pour tous les temps. Nous pouvons constater que la correction du signal avec le modèle théorique pour une fréquence de 0.1 Hz permet de retrouver l'amplitude maximale ainsi que la constante de relaxation du signal d'entrée. Malgré le fait que le signal est surestimé à la fin de la relaxation, nous pouvons affirmer que les 50 premières secondes sont très bien estimées par le modèle théorique avec une fréquence de coupure du filtre passe-haut de 0.1 Hz.

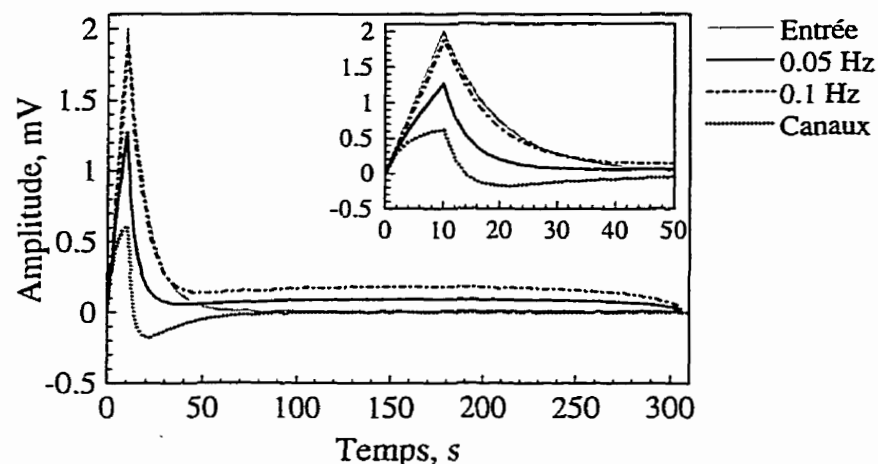


Figure 4. 5 : Correction du signal expérimental de la figure 4.2 à l'aide du modèle théorique pour des fréquences de coupure du filtre passe-haut de 0.05 et 0.1 Hz

Il est important de s'assurer que la fréquence de coupure optimale du modèle théorique reste la même quelle que soit l'amplitude du signal initial qui est envoyé dans le système. La figure 4.6 présente la variation de l'amplitude du signal de sortie par rapport à celle du signal d'entrée. Chaque point représente la moyenne des 7 canaux d'acquisition. La relation entre les amplitudes des signaux de sortie et d'entrée est linéaire, ce qui nous indique que notre méthode de correction est valable pour n'importe quelle amplitude du signal électrique expérimental.

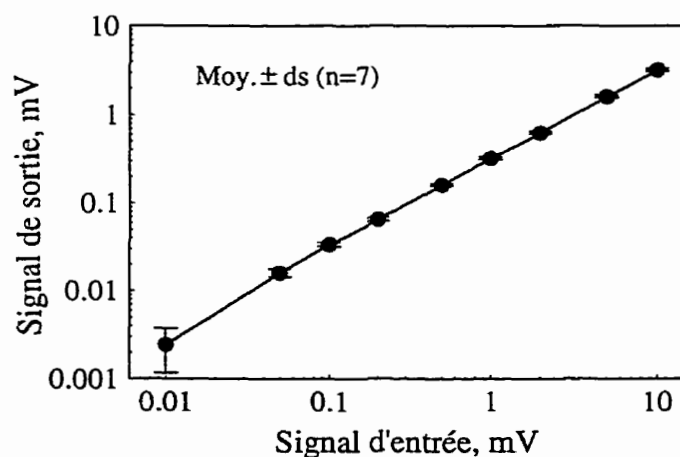


Figure 4.6 : Variation de l'amplitude du signal de sortie en fonction de celle du signal d'entrée

4.2.2 Construction et correction du profil de potentiel d'écoulement à partir des courbes de relaxation

La figure 4.7 présente un exemple des profils de potentiel d'écoulement construits à partir des courbes de relaxation avant et après correction des signaux avec le modèle théorique pour des fréquences de coupure de 0.05 et 0.1 Hz. Les profils de potentiel sont construits de la même façon que ceux qui ont été présentés dans le chapitre 3. En effet, le canal 7 est fixé à 0 et chaque point du profil représente l'addition des amplitudes des différents canaux pour un pas de compression et un temps donnés. Les profils présentés à la figure 4.7 ont été obtenus pour un cartilage frais du jour 0 de la deuxième culture avec IL-1 α . Il est à noter que le temps de montée est de 10 secondes. De plus, les programmes de correction des signaux à l'aide du modèle théorique et de construction des profils de potentiel d'écoulement à partir des courbes de relaxation sont présentés à l'annexe V.

Lorsque les courbes de relaxation ne sont pas corrigées (figure 4.7 a)), nous constatons que l'amplitude du profil de potentiel d'écoulement au centre du cartilage est maximale à 5 secondes, elle commence ensuite à diminuer jusqu'à 10 secondes et elle est nulle ou négative à 15 secondes. La correction des signaux avec le modèle théorique pour une fréquence de coupure du filtre passe-haut de 0.05 Hz permet de construire des profils de potentiel d'écoulement avec une amplitude maximale à 10 secondes qui est autour de 0.5 mV (figure 4.7 b)). Pour une fréquence de coupure du filtre passe-haut de 0.1 Hz, l'amplitude maximale du profil de potentiel d'écoulement est de 0.8 mV. Nous avons également observé que la constante de relaxation des courbes est plus faible. En effet, sur la figure 4.7 c), nous pouvons observer que le profil de potentiel à 15 secondes a une amplitude supérieure au profil à 5 secondes alors que nous avons observé l'inverse pour le modèle théorique avec une fréquence de coupure de 0.05 Hz. Suite à ces observations, nous pouvons conclure que la correction des courbes de relaxation à l'aide du modèle théorique pour une fréquence de coupure du filtre passe-haut de 0.1 Hz permet de retrouver l'information nécessaire à la construction du profil de potentiel d'écoulement.

En effet, ce ne sont que les 50 premières secondes des courbes de relaxation qui nous intéressent pour la construction du profil de potentiel d'écoulement.

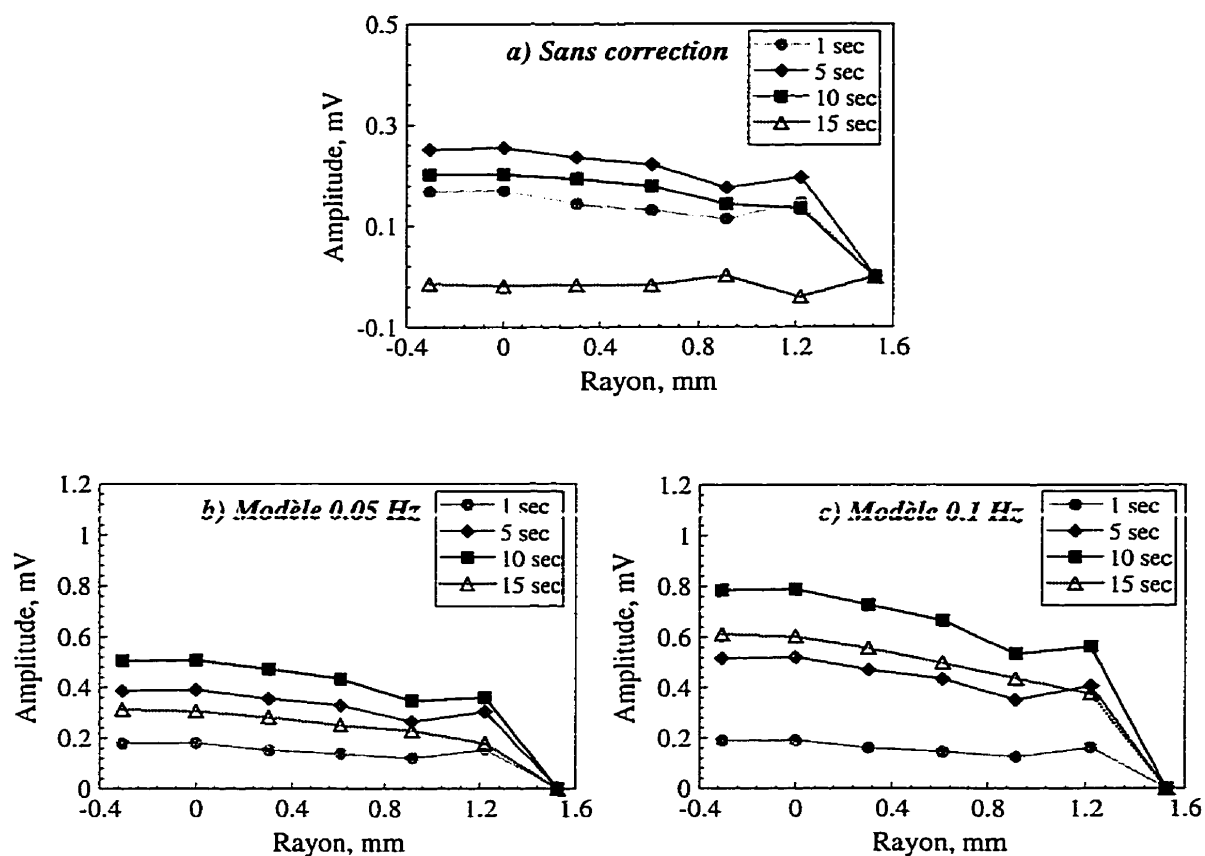


Figure 4. 7 : Profils de potentiel d'écoulement calculés à partir des courbes de relaxation a) sans correction et après correction à l'aide du modèle pour une fréquence de coupure du filtre passe-haut de b) 0.05 Hz et c) 0.1 Hz

4.2.3 Profils de potentiel d'écoulement construits à partir des courbes de relaxation pour les deux expériences avec IL-1 α

Dans cette section, nous présentons les profils de potentiel d'écoulement que nous avons mesurés lors des tests de relaxation au cours des deux expériences avec IL-1 α .

4.2.3.1 Résultats non corrigés de la première expérience avec IL-1 α

La figure 4.8 présente les profils de potentiel d'écoulement qui ont été construits à partir des courbes de relaxation non corrigées de chaque canal, à 1, 5 et 9 secondes.

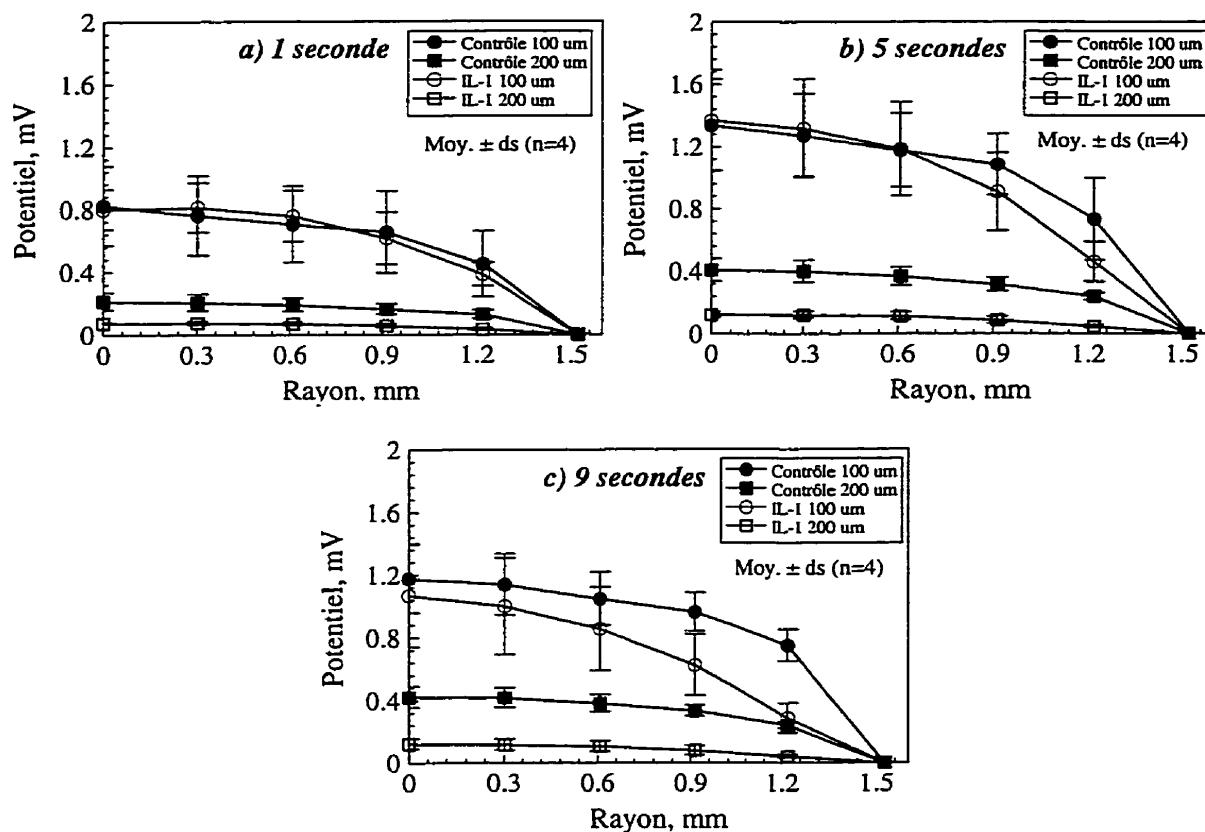


Figure 4.8 : Profils de potentiel d'écoulement non corrigés construits à partir des courbes de relaxation à a) 1, b) 5 et c) 9 secondes pour un offset de compression de 100 μ m dans une solution de 0.01 M NaCl et de 200 μ m dans une solution de 0.15 M NaCl

Les mesures de potentiels d'écoulement ont été effectuées dans une solution de 0.01 M NaCl pour le pas de compression de 80 à 100 μ m et dans une solution de 0.15 M NaCl pour le pas de compression de 180 à 200 μ m. Chaque courbe représente la moyenne de 4 échantillons. Il est important de noter que le temps de montée est de 10 secondes. Pour l'offset de compression de 200 μ m et la solution de test de 0.15 M NaCl, nous

constatons qu'il y a une différence significative au niveau de l'amplitude du profil de potentiel des disques de contrôle et des cartilages traités avec IL-1 α . En effet, à 9 secondes, l'amplitude maximale du profil de potentiel est réduite d'un facteur 4 pour les disques dégradés. Au contraire, pour l'offset de compression de 100 μm et la solution de test de 0.01 M NaCl, les profils de potentiel des disques de contrôle et dégradés sont très semblables. Seul le gradient à la périphérie du profil de potentiel mesuré à 9 secondes est plus faible pour les disques dégradés. Ces résultats correspondent bien à ce qui a été observé pour les profils de potentiel d'écoulement mesurés lors des compressions sinusoïdales. Nous avons d'ailleurs présenté l'explication détaillée de l'effet de la concentration de NaCl de la solution de test sur la forme et l'amplitude des profils de potentiels d'écoulement dans la section 3.5.3.2.

4.2.3.2 Résultats corrigés de la deuxième expérience avec IL-1 α

Dans cette section, nous allons présenter les profils de potentiel d'écoulement construits à partir des courbes de relaxation pour les triplets de cartilages de la deuxième expérience avec IL-1 α pour différentes durées de culture. La figure 4.9 présente les profils de relaxation qui ont été mesurés à la fin de la montée (à 10 secondes) pour les cartilages de contrôle et dégradés qui sont restés 1 et 4 jours en culture ainsi que les disques congelés associés à ces paires. Les profils ont été construits pour le quatrième pas de compression de 80 à 100 μm dans une solution de test de 0.15 M NaCl. Après 1 jour de culture, nous constatons que les profils de potentiel des disques de contrôle, congelés et traités avec IL-1 α sont très semblables. Les disques dégradés sont par contre caractérisés par un profil qui a un gradient de potentiel à la périphérie plus faible que les cartilages de contrôle et congelés. Nous observons des résultats semblables pour les cartilages qui sont restés 4 jours en culture. Toutefois, l'amplitude du potentiel au centre pour les cartilages congelés est plus élevée que celle des disques de contrôle.

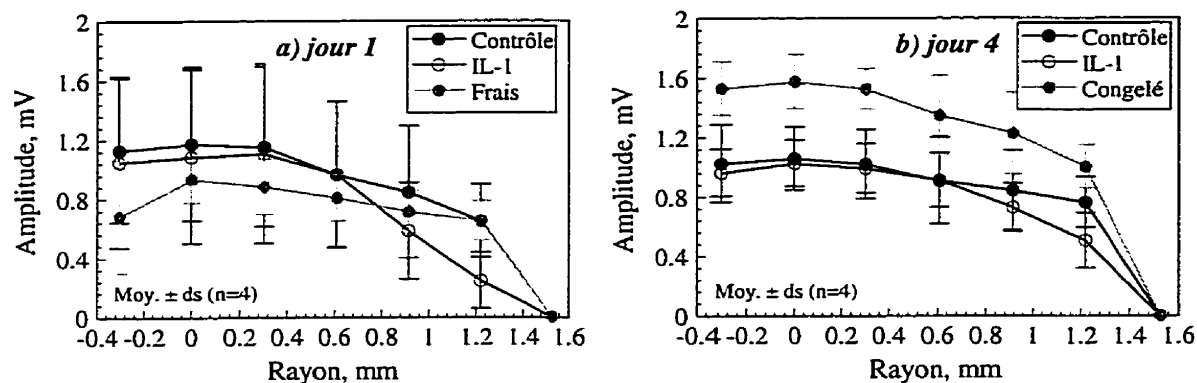


Figure 4. 9 : Profils de potentiel d'écoulement corrigés construits à partir des courbes de relaxation à 10 secondes après a) 1 jour et b) 4 jours de culture

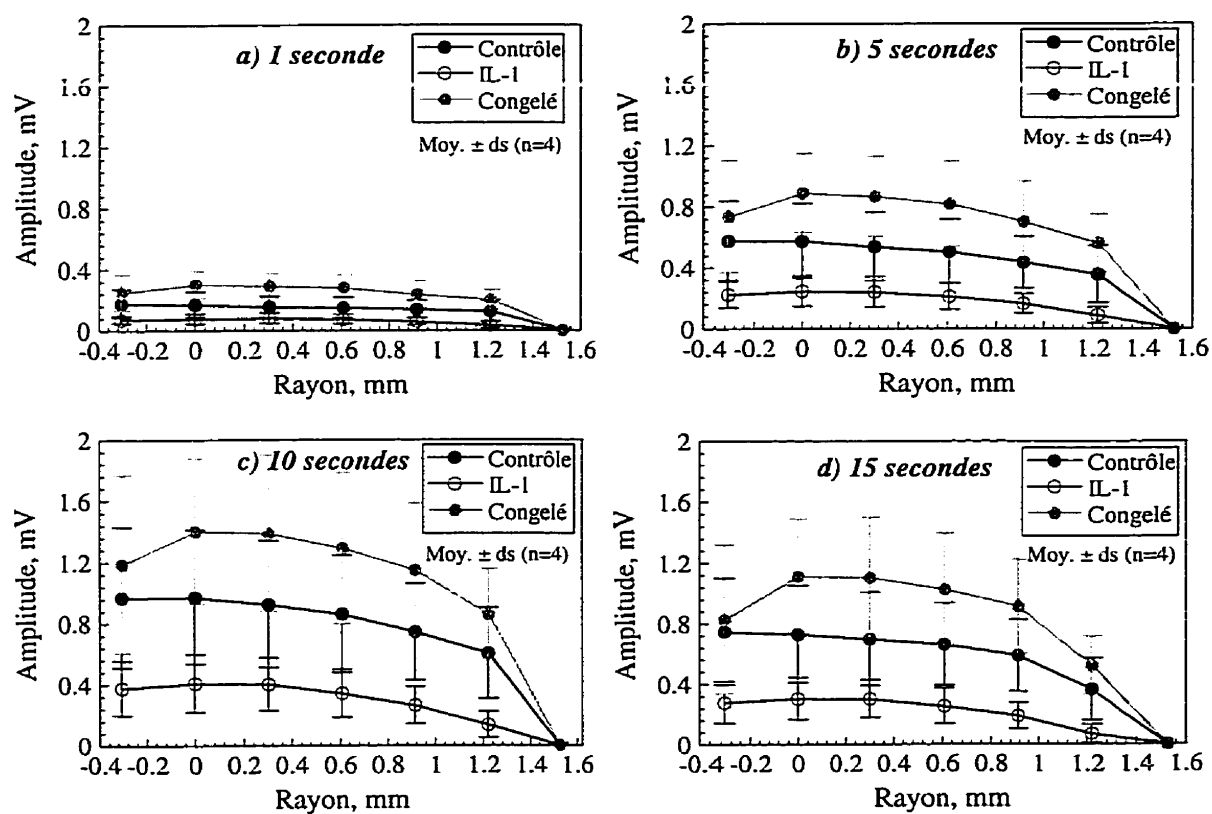


Figure 4. 10 : Profils de potentiel d'écoulement corrigés construits à partir des courbes de relaxation après 7 jours de culture à a) 1, b) 5, c) 10 et d) 15 secondes

La figure 4.10 présente les profils de relaxation qui ont été obtenus à 1, 5, 10 et 15 secondes pour les cartilages qui ont été placés 7 jours en culture. Nous remarquons une différence entre les profils de potentiel des disques de contrôle et des cartilages traités avec IL-1 α . En effet, l'amplitude du potentiel au centre des disques de contrôle est environ 2.3 fois plus élevée que celle des cartilages dégradés pour tous les temps. De plus, nous observons que l'amplitude du profil de relaxation des disques congelés est plus élevée que celle des cartilages de contrôle. La figure 4.11 présente les résultats qui ont été obtenus pour des cartilages qui sont restés 11 jours en culture. Nous remarquons qu'à 1, 5, 10 et 15 secondes, l'amplitude du profil de potentiel des cartilages de contrôle est environ 3.2 fois plus élevée que celle des disques dégradés.

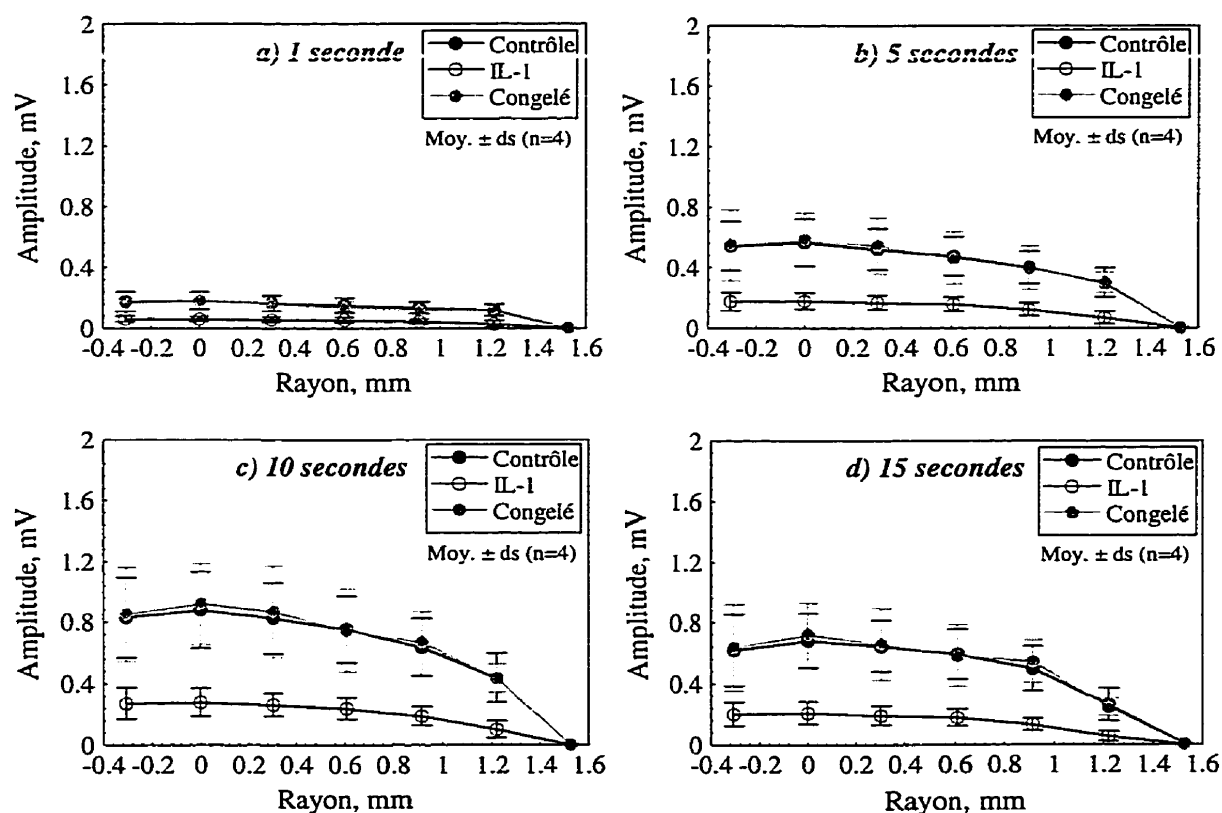


Figure 4.11 : Profils de potentiel d'écoulement corrigés construits à partir des courbes de relaxation après 11 jours de culture à a) 1, b) 5, c) 10 et d) 15 secondes

4.3 Discussion des résultats

Dans la section précédente, nous avons présenté les résultats des deux expériences avec IL-1 α . Pour une solution de test de 0.15 M NaCl, nous avons constaté que les résultats des deux expériences sont semblables. En effet, après 13 jours de culture avec IL-1 α , nous avons observé un facteur 4 entre l'amplitude maximale des profils de potentiel d'écoulement des disques de contrôle et des cartilages traités avec IL-1 α (1^{ère} expérience) alors qu'après 11 jours, nous avons mesuré un facteur de 3.2 (2^{ème} expérience).

Le tableau suivant présente une comparaison des profils de potentiel d'écoulement qui ont été mesurés lors de la compression sinusoïdale du cartilage et du test de relaxation pour la deuxième expérience avec IL-1 α .

Tableau 4.1 : Amplitude maximale et gradient à la périphérie du profil de potentiel d'écoulement de cartilages normaux et dégradés lors des compressions sinusoïdales et du test de relaxation de contrainte

	Durée de la culture	Compressions sinusoïdales	Relaxation de contrainte
Amplitude maximale du profil de potentiel d'écoulement (mV)	<i>1 jour</i>	103% (0.32)	92% (1.17)
	<i>4 jours</i>	82% (0.34)	97% (1.06)
	<i>7 jours</i>	33% (0.30)	42% (0.97)
	<i>11 jours</i>	30% (0.27)	32% (0.88)
Gradient de potentiel à la périphérie du profil (mV)	<i>1 jour</i>	44% (0.22)	38% (0.65)
	<i>4 jours</i>	57% (0.28)	66% (0.76)
	<i>7 jours</i>	20% (0.25)	22% (0.60)
	<i>11 jours</i>	24% (0.17)	23% (0.44)

La valeur entre parenthèse représente la mesure obtenue pour les cartilages de contrôle, alors que le pourcentage indique le taux de dégradation des disques traités avec IL-1 α . Les compressions sinusoïdales ont été effectuées à une fréquence de 0.1 Hz et une amplitude de 4 μm . Les profils de relaxation ont été calculés lors de la compression du cartilage de 80 à 100 μm à la fin de la montée (à 10 secondes). Nous observons d'abord que l'amplitude des profils de potentiel construits à partir des courbes de relaxation est environ 3.3 fois plus élevée que celle des profils mesurés lors des compressions sinusoïdales, alors que le gradient de potentiel à la périphérie du disque est 2.7 fois plus élevé. Ceci s'explique par le fait que l'amplitude des compressions sinusoïdales est de 4 μm , alors que pendant le test de relaxation le cartilage est comprimé de 20 μm . La figure 4.12 présente un résumé des résultats qui ont été présentés dans le tableau 4.1.

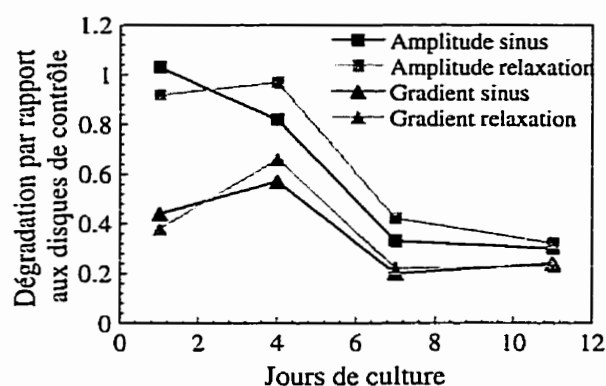


Figure 4.12 : Évolution de l'amplitude et du gradient des profils de potentiel d'écoulement construits à partir de deux méthodes pour les cartilages traités avec 5 ng/ml d'IL-1 α

De façon générale, nous observons que les profils de potentiel d'écoulement mesurés lors des deux tests ont un comportement semblable. Le gradient de potentiel à la périphérie est plus sensible à la dégradation que l'amplitude maximale du profil. En effet, dans les deux cas, le gradient de potentiel des disques traités avec IL-1 α correspond à

moins de 50% de celui des disques de contrôle seulement un jour après le début de la culture.

Il est important de souligner que c'est la première fois que des mesures de potentiel d'écoulement sont réalisées lors du test de relaxation de contrainte. Nous ne pouvons donc pas comparer nos résultats avec la littérature. Au niveau pratique, il est plus facile cliniquement de mesurer les profils de potentiel d'écoulement lors du test de relaxation de contrainte que pendant les compressions sinusoïdales. En effet, les microélectrodes seront éventuellement intégrées à une sonde arthroscopique pour mesurer *in vivo* les potentiels d'écoulement sur la surface articulaire de patients ostéoarthritiques. Dans cette perspective, il sera beaucoup plus facile pour un chirurgien d'effectuer des pas de compression d'une amplitude donnée plutôt que des compressions sinusoïdales à une fréquence fixe et une petite amplitude.

4.4 Travaux futurs

Des travaux sont présentement en cours pour déterminer les propriétés intrinsèques des cartilages. En effet, comme nous l'avons mentionné à la section 3.5.1, un étudiant travaille en ce moment sur le modèle théorique du cartilage qui a été développé par Soulhat J. et al. pour déterminer les paramètres théoriques qui sont associés aux profils de potentiel d'écoulement des cartilages normaux et dégradés. Les propriétés intrinsèques du tissu représentent la composition moléculaire et l'intégrité du cartilage. Elles permettent d'étudier de façon non destructive l'effet d'une dégradation de la matrice extracellulaire sur la diminution de la rigidité des fibres de collagène, l'altération du contenu de protéoglycanes et l'augmentation de la perméabilité hydraulique.

Dans ce mémoire, nous avons démontré la sensibilité des mesures de potentiel d'écoulement à la dégénérescence de la matrice extracellulaire de cartilages de boeufs. Il serait maintenant primordial de faire des mesures semblables sur des cartilages humains

de patients normaux et ostéoarthritiques. En effet, la structure et le métabolisme des cartilages de boeufs et d'humains sont différents. Il serait également intéressant d'étudier en temps réel l'effet de la dégradation sur les mesures de potentiel d'écoulement. Puisque l'effet de l'APMA est très rapide, des mesures de potentiel d'écoulement pourraient être réalisées à une fréquence régulière pendant environ trois jours sur un cartilage placé en permanence dans la chambre de test remplie de milieu de culture.

Un projet vient de débuter pour la construction d'une sonde arthroscopique. La figure 4.13 présente un schéma simplifié de la sonde arthroscopique.

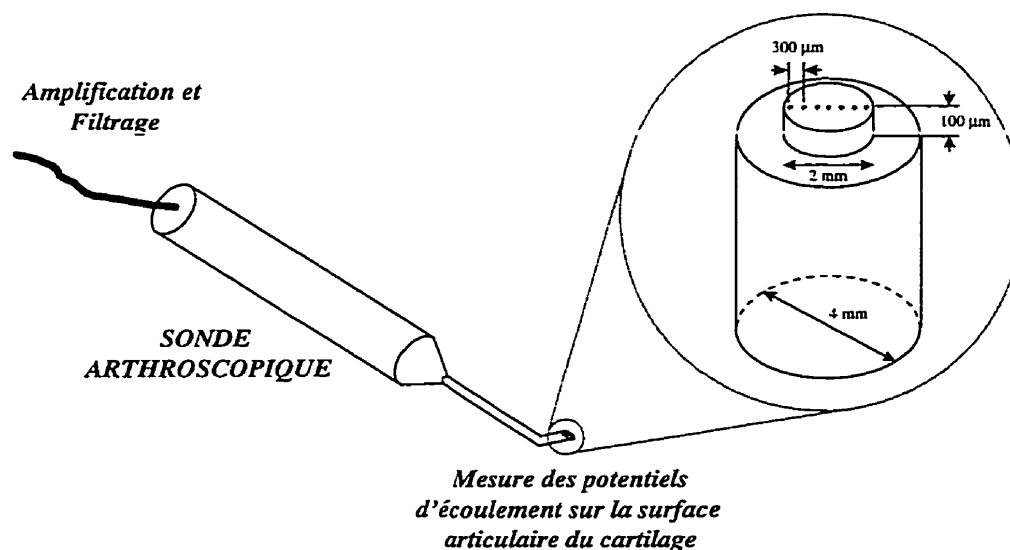


Figure 4.13 : Schéma simplifié de la sonde arthroscopique de mesure des potentiels d'écoulement sur la surface articulaire du cartilage de patients ostéoarthritiques

À l'aide de cette sonde, les potentiels d'écoulement seront mesurés directement sur la surface articulaire de patients ostéoarthritiques lors d'un test d'indentation. Les signaux électriques mesurés seront amplifiés et filtrés avant d'être acheminés vers un ordinateur. L'extrémité de la sonde aura un diamètre d'environ 4 mm. Plusieurs électrodes de 50 µm de diamètre distancées de 300 µm seront situées sur la surface du

cylindre central. Pendant les mesures de potentiel d'écoulement, la sonde sera placée directement en contact avec la surface articulaire du patient et la compression du cartilage sera appliquée manuellement par le chirurgien. Cette sonde arthroscopique permettra d'évaluer, de façon non destructive, l'état de dégradation du cartilage. Elle sera également utilisée pour tester les différentes méthodes de régénération de la matrice extracellulaire. En effet, plusieurs chercheurs travaillent en ce moment sur la création de gels de remplacement du cartilage dans lequel sont encastrées des chondrocytes qui synthétisent une matrice extracellulaire.

Conclusion

Dans ce mémoire de maîtrise, nous avons démontré que les mesures de potentiels d'écoulement sont un indicateur sensible de l'état de dégradation du cartilage. En effet, nous avons développé une microélectrode pour mesurer les potentiels d'écoulement qui sont générés sur la surface articulaire lors de la compression non confinée du cartilage. Afin d'établir des liens entre l'état de dégradation de la matrice extracellulaire et les propriétés électromécaniques du cartilage, nous avons extrait des cartilages de boeufs qui ont été placés en culture et stimulés par des agents de dégradation, tels que l'interleukin-1 α (IL-1 α) et l'aminophénylmercuric acétate (APMA). L'IL-1 α est une cytokine qui inhibe la synthèse de protéoglycanes et de collagènes et augmente la production de métalloprotéinases (MMP) qui sont responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire. L'APMA active également les MMP. Nous avons démontré que la culture des cartilages pendant deux semaines avec IL-1 α stimule la perte de glycosaminoglycanes (GAG) dans le milieu et affecte la synthèse de protéoglycanes par les chondrocytes. Nous avons également observé que l'IL-1 α favorise la dénaturation et le clivage des fibres de collagène de type II. L'APMA entraîne une dégradation très rapide des protéoglycanes de la matrice extracellulaire. En effet, l'APMA provoque la mort des cellules qui ne peuvent plus synthétiser de protéoglycanes et qui libèrent leur contenu d'enzymes de dégradation.

Les résultats que nous avons présentés dans ce mémoire nous permettent de conclure que les propriétés électromécaniques du cartilage sont des indicateurs précis du degré de dégénérescence de la matrice extracellulaire. En effet, le gradient de potentiel à la périphérie du cartilage est sensible à la perte de GAG dès les premiers jours de la culture avec IL-1 α . Ceci peut être expliqué par le fait que la perte de GAG est plus importante à la périphérie au début de la culture. L'amplitude maximale du profil de potentiel n'est pas aussi rapidement affectée que le gradient à la périphérie par la dégradation du cartilage. En effet, la diminution de l'amplitude du profil de potentiel

concorde avec la perte graduelle de GAG. À la fin de la culture, la rigidité statique est le paramètre le plus sensible à la dégradation du cartilage. Nous pouvons donc supposer que la rigidité statique est très sensible au contenu de GAG, mais aussi à l'intégrité du réseau de collagène. La rigidité dynamique qui a un comportement semblable à celui de l'amplitude du profil de potentiel est probablement moins affectée par la dénaturation et le clivage des fibres de collagène.

Nous avons démontré que le profil radial de potentiel dans le cartilage, lors de la compression non confinée, est caractérisé par une amplitude élevée au centre du disque et un gradient important à la périphérie. Ceci confirme les prédictions des modèles théoriques. En effet, le profil de potentiel est relié au profil de pression dans le cartilage, alors que le gradient du profil de potentiel (le champ électrique) est proportionnel à la vitesse du fluide interstitiel. Par conséquent, lors de la compression, la pression est plus élevée au centre du disque, alors que la vitesse du fluide est plus importante à la périphérie. Les cartilages dégradés sont caractérisés par un gradient de potentiel à la périphérie ou une vitesse du fluide qui est réduit dès les premiers jours de la culture. L'amplitude du profil de potentiel qui est proportionnelle au profil de pression diminue également suite à un traitement avec IL-1 α .

Nous avons aussi remarqué que la concentration de NaCl de la solution de test influence les propriétés électromécaniques du cartilage. En effet, nous avons observé qu'une diminution de la concentration de NaCl provoque une augmentation de la force de répulsion entre les molécules de GAG et augmente la valeur de la rigidité. De plus, pour les deux concentrations de NaCl, nous avons constaté que les profils de potentiel des disques dégradés sont caractérisés par un faible gradient de potentiel à la périphérie. Toutefois, à 0.01 M NaCl, l'amplitude maximale du profil de potentiel des cartilages dégradés est semblable à celle des disques de contrôle, alors qu'à 0.15 M NaCl, elle est environ 4 fois plus faible. À l'aide du modèle des forces électrostatiques, nous avons observé que les cartilages dégradés dans 0.15 M NaCl ont une charge nette nulle sur la

majorité de la distance entre deux GAG, contrairement aux disques de contrôle dans 0.15 et 0.01 M NaCl et aux cartilages dégradés dans 0.01 M NaCl. Ceci explique pourquoi les profils de potentiel des cartilages de contrôle et des disques dégradés ont une amplitude semblable dans 0.01 M NaCl et différente dans 0.15 M NaCl.

Nous avons également observé que la charge dynamique et l'amplitude du profil de potentiel d'écoulement au centre disque augmentent de façon non linéaire en fonction de l'amplitude des compressions sinusoïdales. Nous avons constaté que la non linéarité est plus importante pour les disques qui sont dégradés. En effet, il est possible que la perte de GAG et la dénaturation et le clivage des fibres de collagène de la matrice extracellulaire provoquent une instabilité de la structure qui se reflète par une augmentation de la non linéarité des propriétés électromécaniques du cartilage.

Nous avons aussi démontré que les profils de potentiel d'écoulement qui sont mesurés lors de la compression sinusoïdale du cartilage sont équivalents à ceux qui sont construits à partir des courbes de relaxation. En effet, dans les deux cas, le gradient de potentiel et l'amplitude du profil sont affectés de façon semblable par la dégradation du cartilage. Il faut toutefois corriger l'effet du filtrage sur les courbes de relaxation. Le modèle théorique avec une fréquence de coupure du filtre passe-haut optimale permet de retrouver l'amplitude et la constante de relaxation de la courbe. Il est important de rappeler que c'est la première fois que des mesures de potentiel d'écoulement sont réalisées lors d'un test de relaxation de contrainte. Au niveau pratique, il est beaucoup plus avantageux de mesurer les potentiels d'écoulement lors du test de relaxation de contrainte. D'ailleurs, un projet vient de débiter pour la construction d'une sonde arthroscopique qui permettrait de mesurer les potentiels d'écoulement générés sur la surface articulaire du cartilage d'un patient ostéoarthritique lors de la compression. Cette sonde arthroscopique permettrait de détecter de manière non destructive la dégradation de la matrice extracellulaire et de tester les méthodes de régénération du cartilage.

Références

ARMSTRONG, C.G, LAI, W.M. et MOW, V.C. (1984). An Analysis of the Unconfined Compression of Articular Cartilage. Journal of Biomechanical Engineering, 106, 165-173.

BILLINGHURST, R.C., DAHLBERG, L., IONESCU, M., REINER, A., BOURNE, R., RORABECK, C., MITCHELL, P., HAMBOR, J., DIEKMANN, H., CHEN, J., VAN WART, H. et POOLE, A.R. (1997). Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. Journal of Clinical Investigations, 99, 7, 1534-1545.

BONASSAR, L.J., SANDY, J.D., LARK, M.W., PLAAS, A.H.K., FRANK, E.H. et GRODZINSKY, A.J. (1997). Inhibition of Cartilage Degradation and Changes in Physical Properties Induced by IL-1 β and Retinoic Acid Using Metalloproteinase Inhibitors. Archives of Biochemistry and Biophysics, 344, 2, 404-412.

BONASSAR, L.J., STINN, J.L., PAGUIO, C.G., FRANK, E.H., MOORE, V.L., LARK, M.W., SANDY, J.D., HOLLANDER, A.P., POOLE, A.R. et GRODZINSKY, A.J. (1996). Activation and Inhibition of Endogenous Matrix Metalloproteinases in Articular Cartilage : Effects on Composition and Biophysical Properties. Archives of Biochemistry and Biophysics, 333, 2, 359-367.

BONASSAR, L.J., JEFFRIES, K.A., PAGUIO, C.G. et GRODZINSKY, A.J. (1995a). Cartilage Degradation and Associated Changes in Biomechanical and Electromechanical Properties. Acta Orthopaedica Scandinavica, 266, 66, 38-44.

BONASSAR, L.J., STINN, J.L., FRANK, E.H., MOORE, V.L., LARK, M.W. et GRODZINSKY, A.J. (1995b). Degradation of Cartilage and Changes in Physical Properties Induced by IL-1 β , Retinoic Acid, and APMA are Inhibited by TIMP. Transactions of the 41st Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, 20, 1, 126.

BONASSAR, L.J., FRANK, E.H., MURRAY, J.C., PAGUIO, C.G., MOORE, V.L., LARK, M.W., SANDY, J.D., WU, J-J., EYRE, D.R. et GRODZINSKY, A.J. (1995c). Changes in Cartilage Composition and Physical Properties Due to Stromelysin degradation. Arthritis & Rheumatism, 38, 2, 173-183.

BUSCHMANN, M.D., MAURER, A-M., BERGER, E. et HUNZIKER, E.B. (1998). Proteoglycan Density Mapping in Cartilage using Ruthenium Hexaammine Trichloride Induced Chemography. Soumis au Journal of microscopy.

BUSCHMANN, M.D. et GRODZINSKY, A.J. (1995a). A molecular Model of Proteoglycan Associated Electrostatic Forces in Cartilage Mechanics. Journal of Biomechanical Engineering, 117, 179-192.

BUSCHMANN, M.D., JURVELIN, J.S. et HUNZIKER, E.B. (1995b). Confined Compression of Articular Cartilage : Small-Amplitude Linear and Nonlinear Stress Responses and the Effect of the Porous Compressing Platen. ASME BED, 31, 307-308.

BUCKWALTER, J.A. et MANKIN, H.J. (1997a). Articular Cartilage, part I. The journal of bone and joint surgery, 79, 4, 600-611.

BUCKWALTER, J.A. et MANKIN, H.J. (1997b). Articular Cartilage, part II. The journal of bone and joint surgery, 79, 4, 612-632.

BUTTLE, D.J., SAKLATVALA, J., TAMAI, M. et BARRETT, A.J. (1992). Inhibition of Interleukin 1-stimulated cartilage proteoglycan degradation by a lipophilic inactivator of cysteine endopeptidases. Journal of Biochemistry, 281, 175-177.

CHIDSEY, C.E., FELDMAN, B.J., LUNDGREN, C. et MURRAY, R.W. (1986). Micrometer-Spaced Platinum Interdigitated Array Electrode : Fabrication, Theory, and Initial Use. Analytical Chemistry, 58, 3, 601-607.

COMPER, W.D. et LAURENT, T.C. (1978). Physiological Function of Connective Tissue Polysaccharides. Physiological Reviews, 58, 1, 255-315.

COTE, K.R. et GILL, R.C. (1987). Development of a platinized platinum/iridium electrode for use in vitro. Annals of Biomedical Engineering, 15, 419-426.

DE BOER, R.W. et VAN OOSTEROM, A. (1978). Electrical properties of platinum electrodes : impedance measurements and time-domain analysis. Medical & Biological Engineering & Computing, 16, 1-10.

DE GROOT, S.R. et MAZUR, P. (1984). Non-Equilibrium Thermodynamics, New York, Dover.

DINARELLO, C.A. (1988). Biology of Interleukin 1. FASEB Journal, 2, 2, 108-115.

DRAKE, K.L., WISE, K.D., FARRAYE, J., ANDERSON, D.J. et BEMENT, S.L. (1988). Performance of Planar Multisite Microprobes in Recording Extracellular Single-Unit Intracortical Activity. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 35, 9, 719-732.

DUMONT, J., IONESCU, M., REINER, A., POOLE, A.R., TRAN-KHANH, N., HOEMANN, C.D., MCKEE, M. et BUSCHMANN, M.D. (1998). Mature Full-Thickness Articular Cartilage Explants Attached to Bone are Physiologically Stable over Long Term Culture in Serum-free Media. Soumis à Connective Tissue Research.

EISENBERG, S.R. et GRODZINSKY, A.J. (1985). Swelling of Articular Cartilage and Other Connective Tissues : Electromechanochemical Forces. Journal of Orthopaedic Research, 3, 148-159.

FARNDAL, R.W., SAYERS, C.A. et BARRETT, A.J. (1982). A direct Spectrophotometric Microassay for Sulfated Glycosaminoglycans in Cartilage Cultures. Connective Tissue Research, 9, 247-248.

FELTHAM, A.M. et SPIRO, M. (1971). Platinized Platinum Electrodes. Chemical Review, 71, 2, 177-193.

FLANNERY, C.R., LARK, M.W. et SANDY, J.D. (1992). Identification of a Stromelysin Cleavage Site within the Interglobular Domain of Human Aggrecan. The Journal of Biological Chemistry, 267, 2, 1008-1014.

FORTIN, M., SOULHAT, J., SHIRAZI-ADL, A., HUNZIKER, E.B. et BUSCHMANN, M.D. (1998). Unconfined Compression of Articular Cartilage : Nonlinear Behavior and Comparison with a Fibril-Reinforced Biphasic Model. Soumis à ASME Journal of Biomechanical Engineering.

FORTIN, M., SOULHAT, J., SHIRAZI-ADL, A., HUNZIKER, E.B. et BUSCHMANN, M.D. (1997). Dynamic and Transient Nonlinear Behavior of Articular Cartilage in Unconfined Compression. Advances in Bioengineering ASME BED, 36, 199-200.

FRANK, E.H. et GRODZINSKY, A.J. (1987a). Cartilage Electromechanics I: Electrokinetics Transduction and the Effect of Electrolyte pH and Ionic Strength. Journal of Biomechanics, 20, 6, 615-627.

FRANK, E.H. et GRODZINSKY, A.J. (1987b). Cartilage electromechanics II: A Continuum Model of Cartilage Electrokinetics and Correlation with Experiments. Journal of Biomechanics, 20, 6, 629-639.

FRANK, E.H., GRODZINSKY, A.J., KOOB, T.J. et EYRE, D.R. (1987c). Streaming potentials : a sensitive index of enzymatic degradation in articular cartilage. Journal of Orthopaedic Research, 5, 497-508.

FRESHNEY, R.I. (1994). Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, Third Edition, Wiley-Liss, New York.

GARON, M., GUARDO, R., SAVARD, P. et BUSCHMANN, M.D. (1997). Spatially Resolved Detection of Streaming Potentials in Articular Cartilage. Transactions of the 43rd Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, 22, 1, 80.

GIELEN, F.L.H. et BERGVELD, P. (1982). Comparison of electrode impedances of Pt, PtIr (10% Ir) and Ir-AIROF electrodes used in electrophysiological experiments. Medical & Biological Engineering & Computing, 20, 77-83.

GRODZINSKY, A.J. (1997). Fields, Forces and Flows in Biological Tissues and Membranes, Massachusetts Institute of Technology, Departments of Electrical Engineering and Computer Science, Mechanical Engineering and Harvard-MIT Division of Health Sciences and Technology.

HAGIWARA, H., INOUE, A., NAKAJO, S., NAKAYA, K., KOJIMA, S. et HIROSE, S. (1996). Inhibition of Proliferation of Chondrocytes by Specific Receptors in Response to Retinoids. Biochemical and Biophysical Research Communications, 222, 2, 220-224.

HAY, E.D. (1991). Cell Biology of Extracellular Matrix, Second Edition, Plenum Press, New York.

HEINEGARD, D. et OLDBERG, A. (1989). Structure and Biology of Cartilage and Bone Matrix Noncollagenous Macromolecules. The FASEB Journal, 3, 2042-2051.

HOLLANDER, A.P., HEATHFIELD, T.F., WEBBER, C., IWATA, Y., BOURNE, R., RORABECK, C. et POOLE, A.R. (1994). Increased Damage to Type II Collagen in Osteoarthritic Articular Cartilage Detected by a New Immunoassay. Journal of Clinical Investigations, 93, 1722-1732.

HOLLANDER, A.P., ATKINS, R.M., EASTWOOD, D.M., DIEPPE, P.A. et ELSON, C.J. (1991). Human cartilage is degraded by rheumatoid arthritis synovial fluid but not by recombinant cytokines in vitro. Clinical and Experimental Immunology, 83, 52-57.

JACKSON, W.F. et DULING, B.R. (1983). Toxic Effects of Silver-Silver Chloride Electrodes on Vascular Smooth Muscle. Circulation Research, 53, 1, 105-108.

KATCHALSKY, A. et CURRAN, P.F. (1967). Non equilibrium Thermodynamics in Biophysics, Harvard University Press, Cambridge, MA.

KIM, Y.J., BONASSAR, L.J. et GRODZINSKY, A.J. (1995). The Role of Cartilage Streaming Potential, Fluid Flow and Pressure in the Stimulation of Chondrocyte Biosynthesis during Dynamic Compression. Journal of Biomechanics, 28, 9, 1055-1066.

KOZACI, L.D., BUTTLE, D.J. et HOLLANDER, A.P. (1997). Degradation of Type II Collagen, but not Proteoglycan, correlates with Matrix Metalloproteinase Activity in Cartilage Explant Cultures. Arthritis & Rheumatism, 40, 1, 164-174.

LAPADULA, G., NICO, B., CANTATORE, F.P., LA CANNA, R., RONCALI, L. et PIPITONE, V. (1995). Early Ultrastructural Changes of Articular Cartilage and Synovial Membrane in Experimental Vitamin A-Induced Osteoarthritis. The Journal of Rheumatology, 22, 10, 1913-1921.

LEGARE, A., GARON, M., GUARDO, M., LE GUYADER, P., SAVARD, P. et BUSCHMANN, M.D. (1998). Detection of Cartilage Degeneration by Spatially Resolved Streaming Potentials. Transactions of the 44th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, 23, 1, 154.

LE GUYADER, P. (1992). Cartographie des propriétés électriques passives du tissu cardiaque. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Département de génie biomédical, Canada.

LEVENSTON, M.E., FRANK, E.H. et GRODZINSKY, A.J., Nonuniform Spatial Profiles of Compression-Induced Electromechanical Fields : Relevance to Chondrocyte Biosynthesis. Transactions of the 43rd Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, 22, 1, 204.

LOHMANDER, L.S., HOERRNER, L.A. et LARK, M.W. (1993). Metalloproteinases, Tissue Inhibitor, and Proteoglycan Fragments in Knee Synovial Fluid in Human Osteoarthritis. Arthritis & Rheumatism, 36, 2, 181-189.

MANKIN, H.J., BUCKWALTER, J.A., IANOTTI, J.P. et RATCLIFFE, A. (1994). Form and Function of Articular Cartilage. Orthopaedic Basic Science, New York, pp 1-45.

MAROUDAS, A., WEINBERG, P.D., PARKER, K.H. et WINLOVE, C.P. (1988). The distributions and diffusivities of small ions in chondroitin sulphate, hyaluronate and some proteoglycan solutions. Biophysical Chemistry, 32, 257-270.

MAROUDAS, A., MUIR, H. et WINGHAM, J. (1969). The correlation of fixed charge with glycosaminoglycan content of human articular cartilage. Biochimica et Biophysica Acta, 177, 492-500.

MARRESE, C.A. (1987). Preparation of Strongly Adherent Platinum Black Coatings. Analytical Chemistry, 59, 1, 217-218.

MARTEL-PELLETIER, J., MCCOLLUM, R., DIBATTISTA, J., FAURE, M-P., CHIN, J.A., FOURNIER, S., SARFATI, M. et PELLETIER, J-P. (1992). The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Arthritis & Rheumatism, 35, 5, 530-540.

MATRISIAN, L.M. (1990). Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. Trends in Genetics, 6, 4, 121-125.

MOORE, K.B., KIMBALL, T. et STEADMAN, B. (1990). Silver-Silver Chloride Plunge Electrode Needles and Chloriding Monitor. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 37, 5, 532-535.

MORT, J.S., DODGE, G.R., ROUGHLEY, P.J., LIU, J., FINCH, S.J., DIPASQUALE, G. et POOLE, A.R. (1993). Direct Evidence for Active Metalloproteinases Mediating Matrix Degradation in Interleukin 1-Stimulated Human Articular Cartilage. Journal of Clinical Investigations, 13, 2, 95-102.

MOW, V.C., RATCLIFFE, A. et POOLE, A.R. (1992). Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. Biomaterials, 13, 2, 67-97.

MOW, V.C., KUEI, S.C., LAI, W.M. et ARMSTRONG, C.G. (1980). Biphasic Creep and Stress Relaxation of Articular Cartilage in Compression: Theory and Experiments. Journal of Biomechanical Engineering, 102, 73-84.

MURPHY, G., DOCHERTY, A.J.P., HEMBRY, R.M. et REYNOLDS, J.J. (1991). Metalloproteinases and Tissue Damage. British Journal of Rheumatology, 30, 1, 25-31.

NAGASE, H., BARRETT, A.J. et WOESSNER, J.F. (1992). Nomenclature and Glossary of the Matrix Metalloproteinases. Matrix Supplement, 1, 421-424.

NAGASE, H., ENGHILD, J.J., SUZUKI, K. et SALVESEN G. (1990). Stepwise Activation Mechanisms of the Precursor of Matrix Metalloproteinase 3 (Stromelysin) by Proteinase and (4-Aminophenyl)mercuric Acetate. Biochemistry, 29, 5783-5789.

NEIDEL, J. et ZEIDLER, U. (1993). Independent effects of interleukin 1 on proteoglycan synthesis and proteoglycan breakdown of bovine articular cartilage in vitro. Agents Actions, 39, 82-90.

NIETFELD, J.J. (1993). Cytokines and proteoglycans. Experientia, 49, 5, 456-469.

O'CONNELL, J.P., WILLENBROCK, F., DOCHERTY, A.J.P., EATON, D. et MURPHY, G. (1994). Analysis of the Role of the COOH-terminal Domain in the Activation, Proteolytic Activity, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase Interactions of Gelatinase B. The Journal of Biological Chemistry, 269, 21, 14967-14973.

POULIOT, L. (1994). Fabrication d'une matrice plane de microélectrodes destinées à la mesure de l'impédance du tissu cardiaque. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Département de génie physique, Canada.

RAGHEB, T. et GEDDES, L.A. (1990). Electrical Properties of Metallic Electrodes. Medical & Biological Engineering & Computing, 28, 182-186.

SANDY, J.D., BOYNTON, R.E. et FLANNERY, C.R. (1991). Analysis of the Catabolism of Aggrecan in Cartilage Explants by Quantitation of Peptides from the three Globular Domains. The journal of Biological Chemistry, 266, 13, 8198-8205.

SHINGU, M., NAGAI, Y., ISAYAMA, T., NAONO, T., NOBUNAGA, M. et NAGAI, Y. (1993). The effects of Cytokines on Metalloproteinase Inhibitors (TIMP) and Collagenase Production by Human Chondrocytes and TIMP Production by Synovial Cells and Endothelial Cells. Clinical and Experimental Immunology, 94, 145-149.

SMITH, R.L., ALLISON, A.C. et SCHURMAN, D.J. (1989). Induction of Articular Cartilage Degradation by Recombinant Interleukin 1 α and 1 β . Connective Tissue Research, 18, 307-316.

SOULHAT, J., BUSCHMANN, M.D. et SHIRAZI-ADL, A. (1998). A Fibril-Network Reinforced Biphasic Model of Cartilage in Unconfined Compression. Accepté au Journal of Biomechanical Engineering.

SOULHAT, J., BUSCHMANN, M.D. et SHIRAZI-ADL, A. (1997). A Nonhomogeneous Composite Model of Articular Cartilage : Development and Validation in Unconfined Compression. Transactions of the 43rd Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, 22, 2, 822.

TOWLE, C.A., HUNG, H.H., BONASSAR, L.J., TREADWELL, B.V. et MANGHAM, D.C. (1997). Detection of interleukin-1 in the cartilage of patients with osteoarthritis : a possible autocrine/paracrine role in pathogenesis. Osteoarthritis and Cartilage, 5, 293-300.

VINCENTI, M.P., CLARK, I.M. et BRINCKERHOFF, C.E. (1994). Using inhibitors of metalloproteinases to treat arthritis. Arthritis & Rheumatism, 37, 8, 1115-1126.

VOET, D. et VOET, J. (1995). Biochemistry. second edition, John Wiley & Sons, New York.

WESTACOTT, C.I., WHICHER, J.T., BARNES, I.C., THOMPSON, D., SWAN, A.J. et DIEPPE, P.A. (1990). Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. Annals of Rheumatic Diseases, 49, 676-681.

WITKOWSKI, F.X. KAVANAGH, K.M., PENKOSKE, P.A. et PLONSEY, R. (1993). In vivo Estimation of Cardiac Transmembrane Current. Circulation Research, 72, 2, 424-439.

WOESSNER, J.F. et HOWELL, D.S. (1993). Joint Cartilage Degradation, Basic and Clinical Aspects, New York.

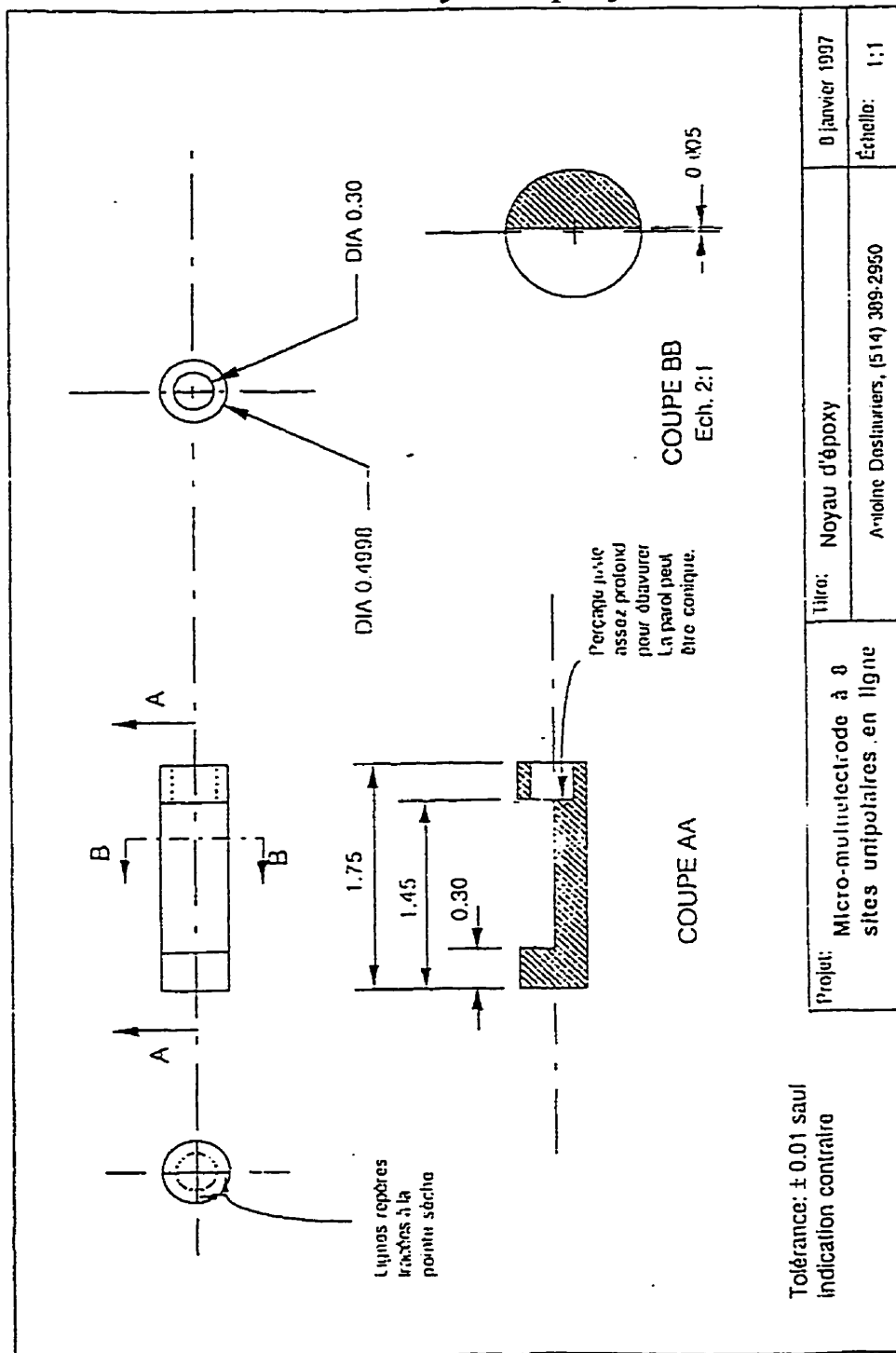
WU, J-J., LARK, M.W., CHUN, L.E. et EYRE, D.R. (1991). Sites of Stromelysin Cleavage in Collagen Types II, IX, X and XI of Cartilage. The journal of Biological Chemistry, 266, 9, 5625-5628.

YAMAGATA, T., SAITO, H., HABUCHI O. et SUZUKI, S. (1968). Purification and Properties of Bacterial Chondroitinases and Chondrosulfatases. The Journal of Biological Chemistry, 243, 7, 1523-1535.

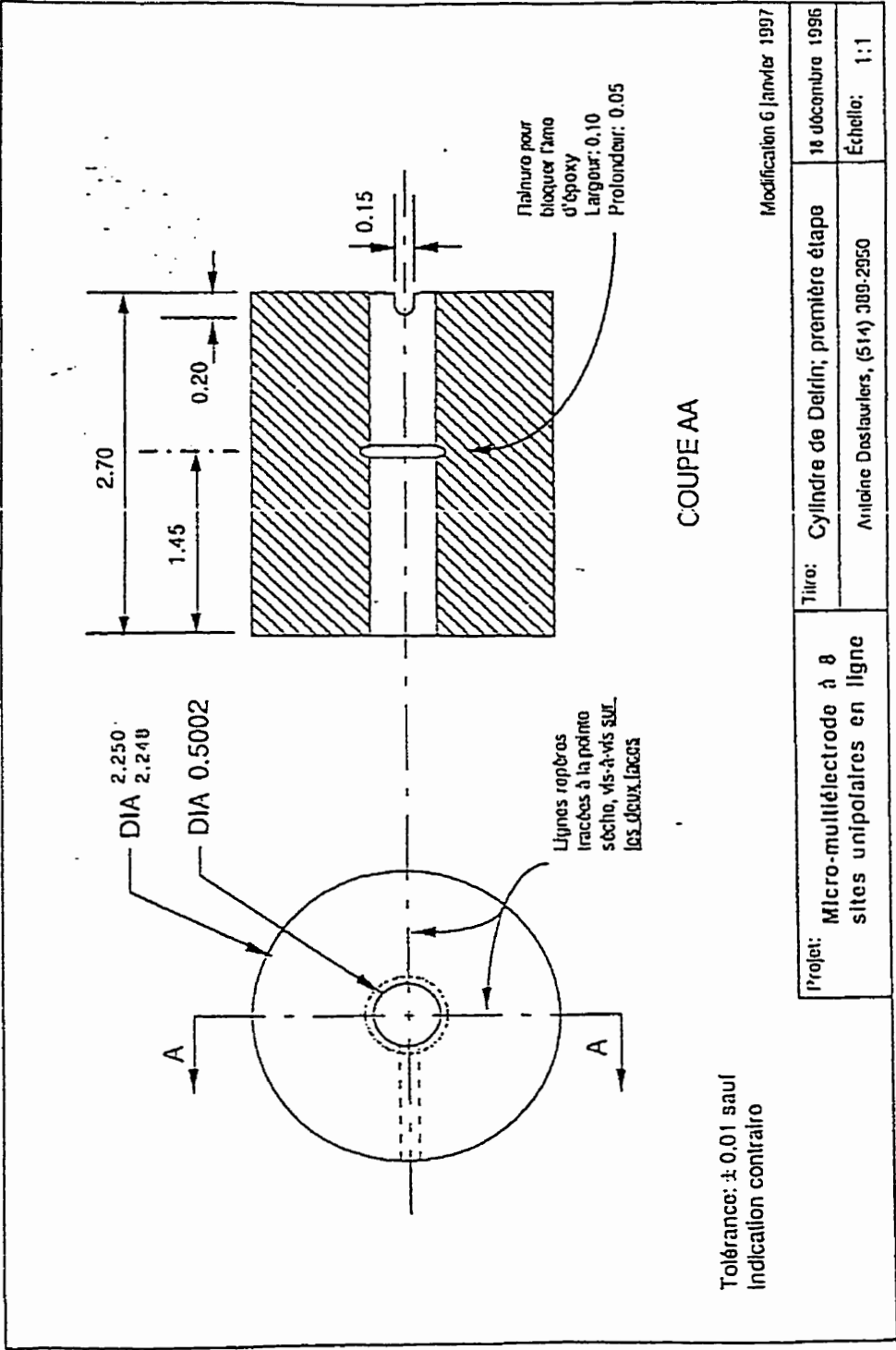
ZEUTHEN, T. (1978). Potentials and small-signal impedances of platinum microelectrodes in vivo and in vitro. Medical & Biological Engineering & Computing, **16**, 489-499.

Annexe I : Plans de fabrication de la microélectrode

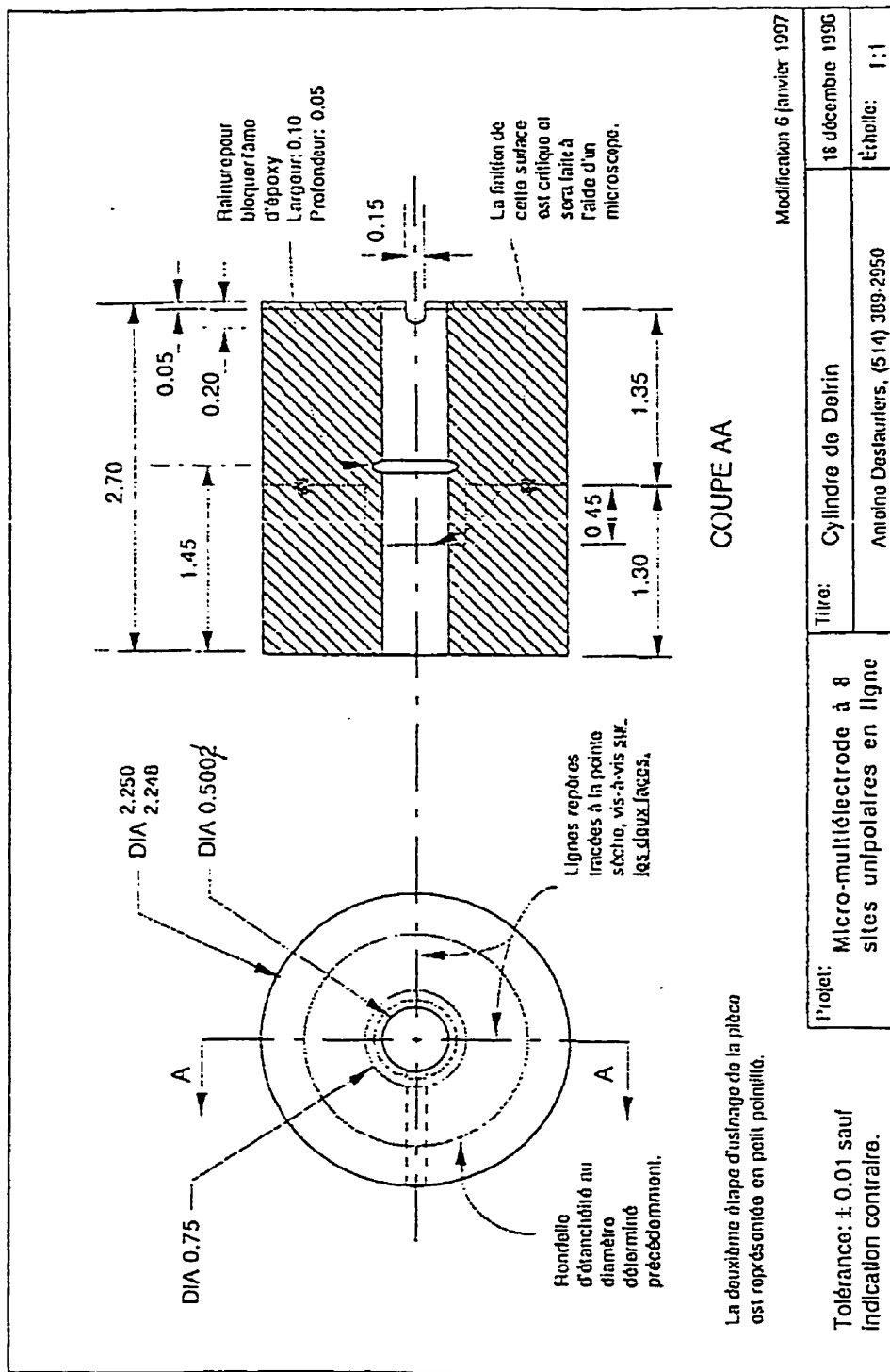
Plan du noyau d'époxy



Plan du cylindre de delrin : 1^{ère} étape



Plan du cylindre de delrin : 2^{ème} étape



Annexe II : Digestion des milieux à la papaïne

Protocole de digestion

Pour un aliquot de 250 μ l, nous devons ajouter 25 μ l du tampon qui est composé de 50 mM EDTA, 50 mM Cystéine, 2M NaAcétate, 1 μ g/25 μ l de papaïne et ajuster le pH entre 5 et 6

Procédure détaillée

1. Préparation de la solution d'EDTA 200mM

(Il est préférable de dissoudre préalablement l'EDTA, car il ne se dissout pas directement dans la solution tampon)

- a) Pour un volume final de 10 ml, dissoudre 0.76g de tetraEDTA (380.2g/mol) dans 7 ml d'eau déionisée.
- b) Vortexer et filtrer la solution sous la hotte.
- c) Compléter le volume à 10 ml et aliquoter dans des épendorfs autoclavés.

2. Préparation de la solution tampon

- a) Pour un volume final de 5 ml, mesurer 572 μ l d'acide acétique (17.47 M) et ajouter 1 à 2 ml d'eau déionisée (tampon d'acétate 2M).
- b) Ajouter 1.25 ml de la solution d'EDTA 200 mM et vortexer.
- c) Ajuster à un pH=5 avec un agitateur magnétique à l'aide de NaOH 5N.
- d) Ajouter 40.2 mg de cystéine (157.6 g/mol) et vortexer.
- e) Compléter le volume à 5 ml avec de l'eau déionisée et filtrer sous la hotte
- f) Ajouter 0.125 mg/ml de papaïne préalablement chauffée à 37 °C (stock de papaïne: 25mg/ml).

3. Incubation à 37 °C pendant 24 heures

Expérimentation

La digestion à la papaïne a été effectuée sur les milieux de culture du jour 6 des disques de la première expérience avec IL-1 α qui ont été isolés le 6 février 1997. Nous voulons vérifier quel est l'effet de la digestion à la papaïne sur les résultats du test DMB qui permet de quantifier le contenu de chondroïtine sulfate libéré dans le milieu. Nous avons d'abord poolé respectivement 1.65 ml de milieu de contrôle et expérimental. Nous avons ensuite placé 250 μ l de chaque milieu poolé dans 6 épendorfs. Les deux premiers tubes ont été congelés pendant 24 heures et un volume de 25 μ l du tampon a été ajouté avant de faire le test DMB. Dans les tubes 3 et 4, nous avons ajouté 25 μ l du tampon sans la papaïne. Les tubes ont été placés dans l'incubateur pendant 24 heures à 37°C. Pour les tubes 5 et 6, nous avons ajouté 25 μ l de tampon avec papaïne. Les tubes ont également été placés dans l'incubateur pendant 24 heures à 37 °C.

Nous avons ensuite testé l'effet du tampon avec papaïne sur le pH de la solution de DMB. Lors des tests de DMB, 10 μ l de milieu digéré (pH=5) sont mélangés avec 250 μ l de DMB (pH=3). Puisque la quantité de milieu digéré est beaucoup plus faible que celle de DMB, le pH reste autour de 3. Nous avons également vérifié si l'absorbance du DMB est modifiée par la papaïne. Nous avons mélangé du milieu frais (pH=7) avec le tampon et la papaïne et nous avons constaté que l'absorbance est nulle. La papaïne n'influence pas les résultats du DMB.

Résultats

Lors du test DMB, nous avons obtenu une courbe standard ($y=-0.0213+0.5359x$) dont l'erreur quadratique est de 0.9947. Chaque mesure est calculée à partir de la moyenne des duplicatas d'une seule dilution. Pour respecter les conditions de l'expérience de digestion, nous avons réalisé les dilutions à partir de milieu frais mélangé avec 10% de

tampon (pH=5). De plus, afin de vérifier la reproductibilité des résultats, nous avons recommencé le test. Nous avons obtenu une courbe standard ($y=0.0138+0.5659x$) dont l'erreur quadratique est de 0.9981. Il est à noter que les duplicatas avec un coefficient de variation supérieur à 10% ont été éliminés. Les résultats sont présentés à la figure suivante.

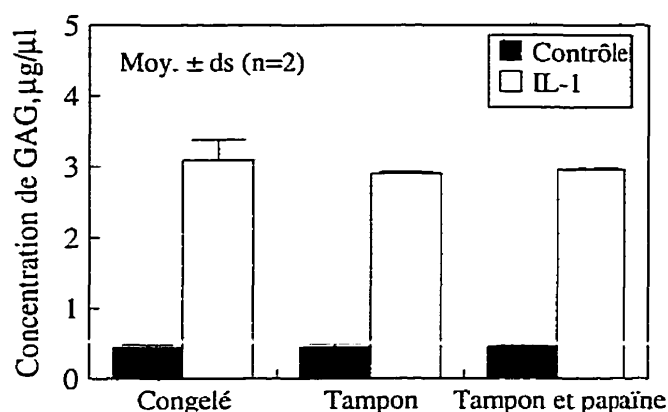


Figure II.1 : Effet de la digestion des milieux de culture avec papaïne sur le test DMB

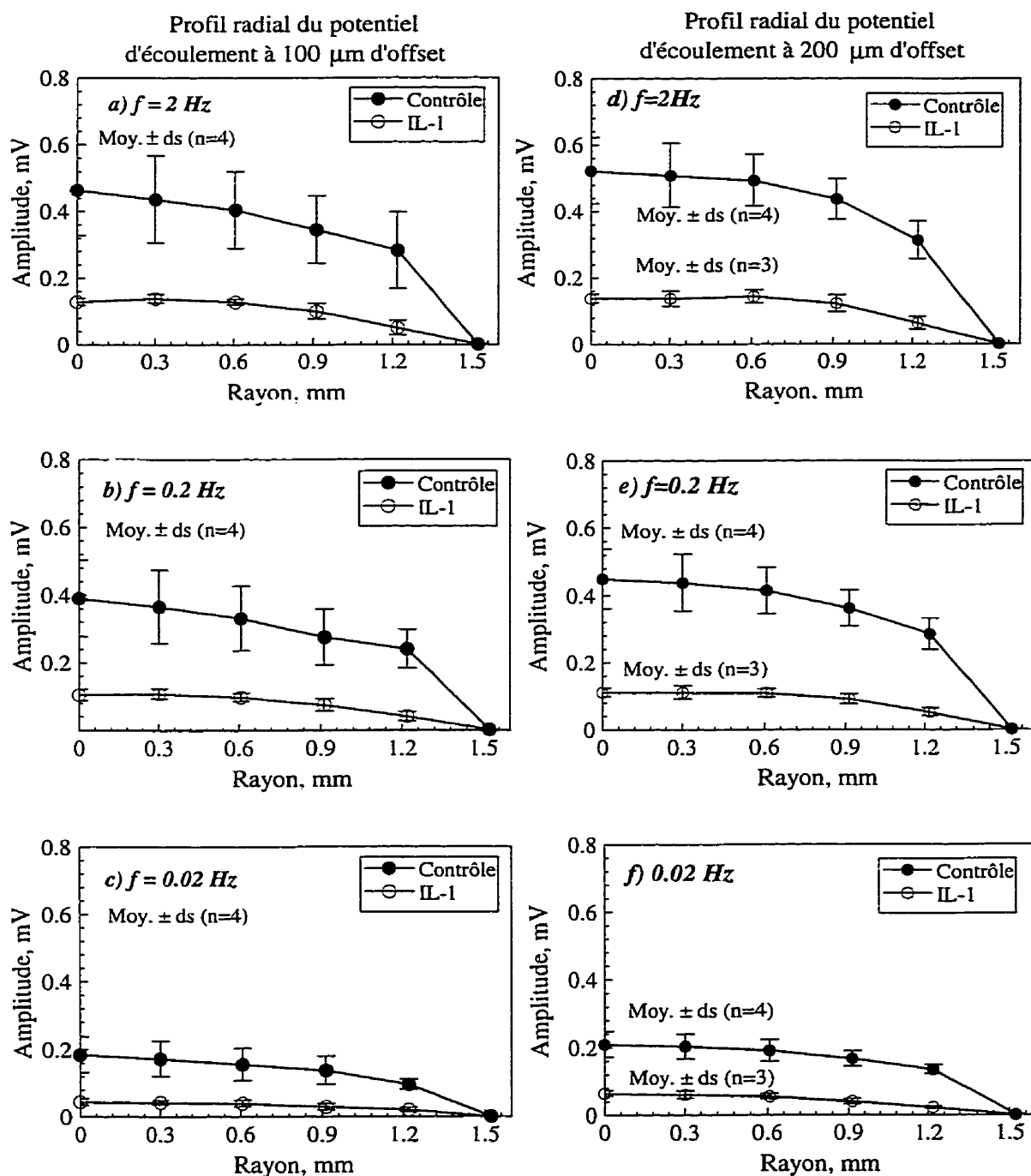
Discussion

À l'aide des résultats précédents, nous constatons que la digestion des milieux à la papaïne n'influence pas significativement la quantité de chondroïtine sulfate mesurée par le test DMB. En effet, les variations entre les quantités mesurées sont probablement dues aux différentes incertitudes du test DMB plutôt qu'à la digestion.

Il serait toutefois important d'effectuer un contrôle positif afin de vérifier si la papaïne était active lors de la digestion. L'efficacité de la digestion pourrait être vérifiée à l'aide d'un test Western Blot sur les milieux congelés et ceux digérés pendant 24 heures. En effet, les milieux digérés sont caractérisés par des molécules de poids moléculaire plus faible que les milieux congelés.

Annexe III : Profils de potentiel d'écoulement à 100 et 200 μm d'offset de compression

(Mesures dans 0.15 M NaCl pour une amplitude de compressions sinusoïdales de 4 μm)



Annexe IV : Programme sur *mathematica* pour observer l'effet théorique des filtres passe-haut et passe-bas

```

Unprotected[Times];
Clear["Global`*"];
<< Calculus`LaplaceTransform`;
<< Calculus`FourierTransform`;
<< Graphics`Graphics`;

w0 = 2 * Pi * f0;
w1 = 2 * Pi * f1;
f1 = 0.05;
f0 = 200;
x0 = 2;
t0 = 10;
a = 0.1;

x1 = x0 * (t / t0) * (UnitStep[t] - UnitStep[t - t0]);
x2 = Exp[-a (t - t0)] * UnitStep[t - t0] * x0;
f = x1 + x2
debut = LaplaceTransform[f, t, s]
Print[debut];
graph1 = Plot[f, {t, 0, 200}, PlotRange -> All];

passebas = w0 / (s + w0);
passehaut = s / (s + w1);
hautbas = passebas * passehaut
sortie = debut * hautbas
signalout = InverseLaplaceTransform[sortie, s, t]
graph = Plot[signalout, {t, 0, 300}, PlotRange -> All];
Show[graph1, graph, PlotRange -> All];

```

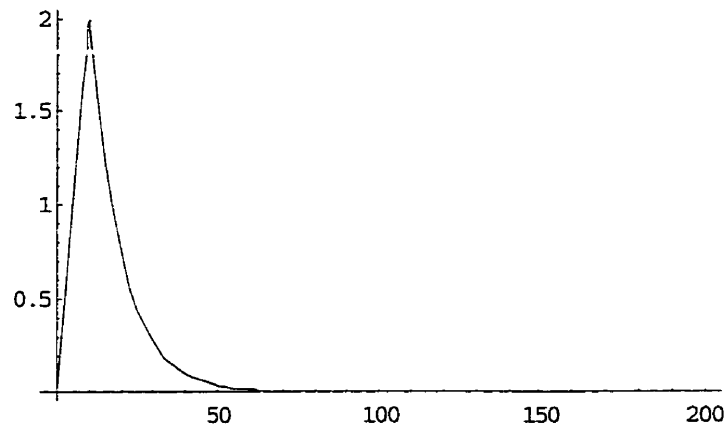
Signal d'entrée dans le domaine temporel :

$$2 E^{-0.1 (-10+t)} \text{UnitStep}[-10+t] + \frac{1}{5} t (-\text{UnitStep}[-10+t] + \text{UnitStep}[t])$$

Signal d'entrée dans le domaine de Laplace :

$$\frac{2 \cdot E^{-10 s}}{0.1 + 1 \cdot s} + \frac{1}{5} \left(\frac{1}{s^2} - \frac{E^{-10 s} (1 + 10 s)}{s^2} \right)$$

Signal d'entrée dans le domaine temporel



Fonction de transfert théorique dans le domaine de Laplace :

$$\frac{400 \pi s}{(0.314159 + s) (400 \pi + s)}$$

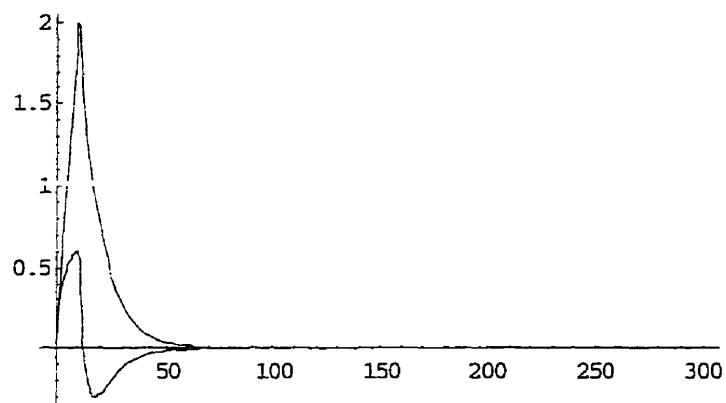
Produit du signal d'entrée et de la fonction de transfert dans le domaine de Laplace :

$$\frac{400 \pi s \left(\frac{2 \cdot E^{-10 s}}{0.1 + 1 \cdot s} + \frac{1}{5} \left(\frac{1}{s^2} - \frac{E^{-10 s} (1 + 10 s)}{s^2} \right) \right)}{(0.314159 + s) (400 \pi + s)}$$

Signal de sortie dans le domaine temporel :

$$\begin{aligned}
 & 400 \pi \left(0.000506606 - 0.000506733 E^{-0.314159 t} + \right. \\
 & 1.26683 \times 10^{-7} E^{-400 \pi t} + \left(2. (0.00116765 E^{-0.314159 (-10+t)} - 0.00037161 E^{-0.1 (-10+t)} - 0.000796037 E^{-400 \pi (-10+t)}) - \right. \\
 & 2 (0.000795974 E^{-0.314159 (-10-t)} - 0.000795974 E^{-400 \pi (-10-t)}) + \\
 & \left. \frac{1}{5} (-0.00253303 + 0.00253366 E^{-0.314159 (-10-t)} - 6.33416 \times 10^{-7} E^{-400 \pi (-10-t)}) \right) \\
 & \text{UnitStep}[-10 - t] \}
 \end{aligned}$$

Signal d'entrée et signal de sortie dans le domaine temporel



Annexe V : Programmes de modélisation du filtrage sur Labview

Diagramme du programme de calibration expérimentale du filtrage

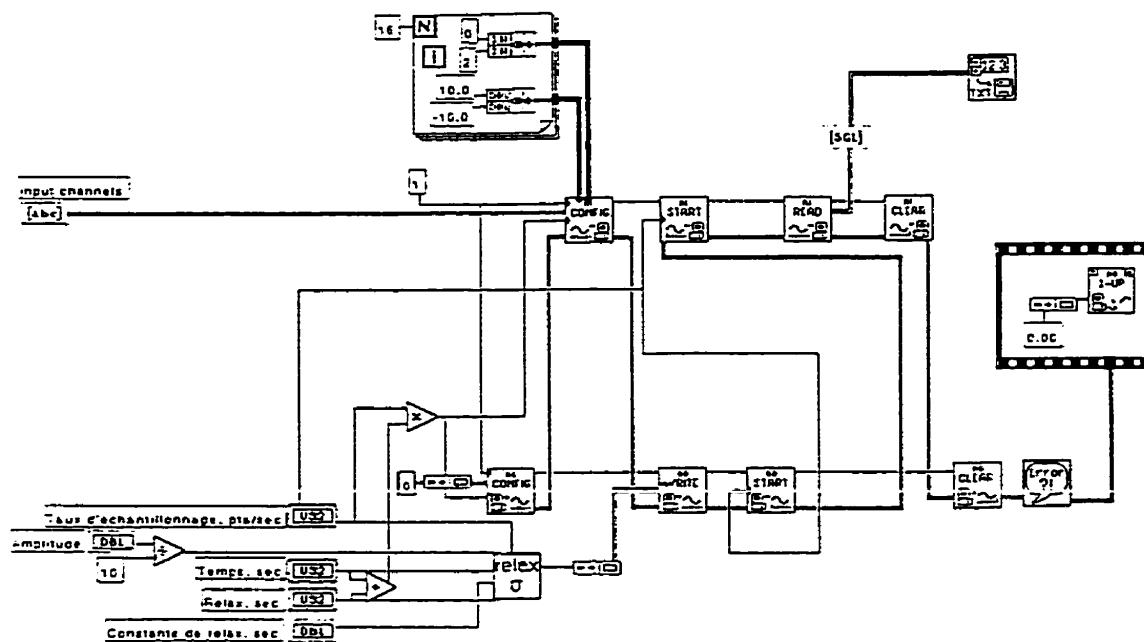


Diagramme du programme qui crée la courbe de relaxation

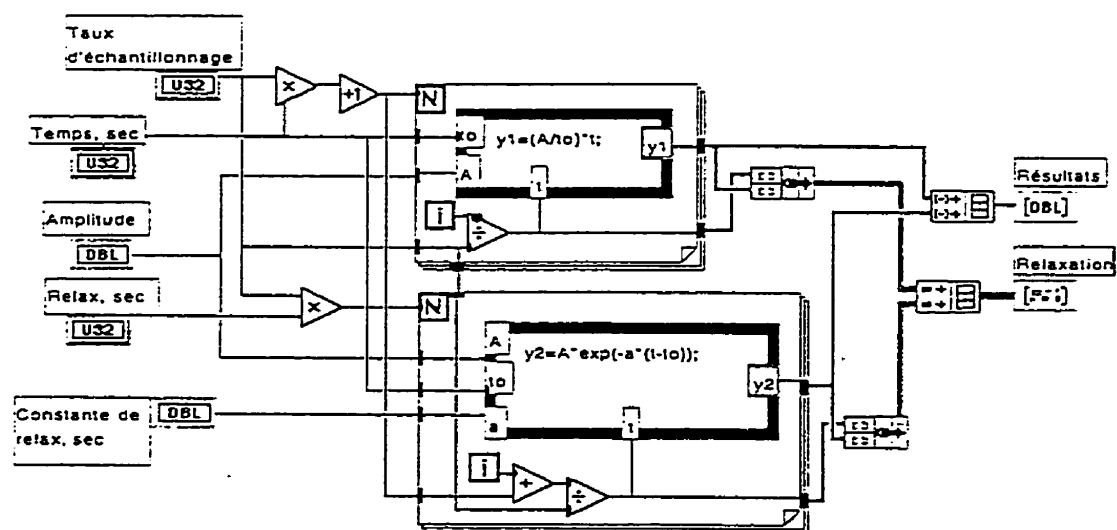


*Diagramme du programme qui corrige les courbes de relaxation à partir
du modèle théorique*

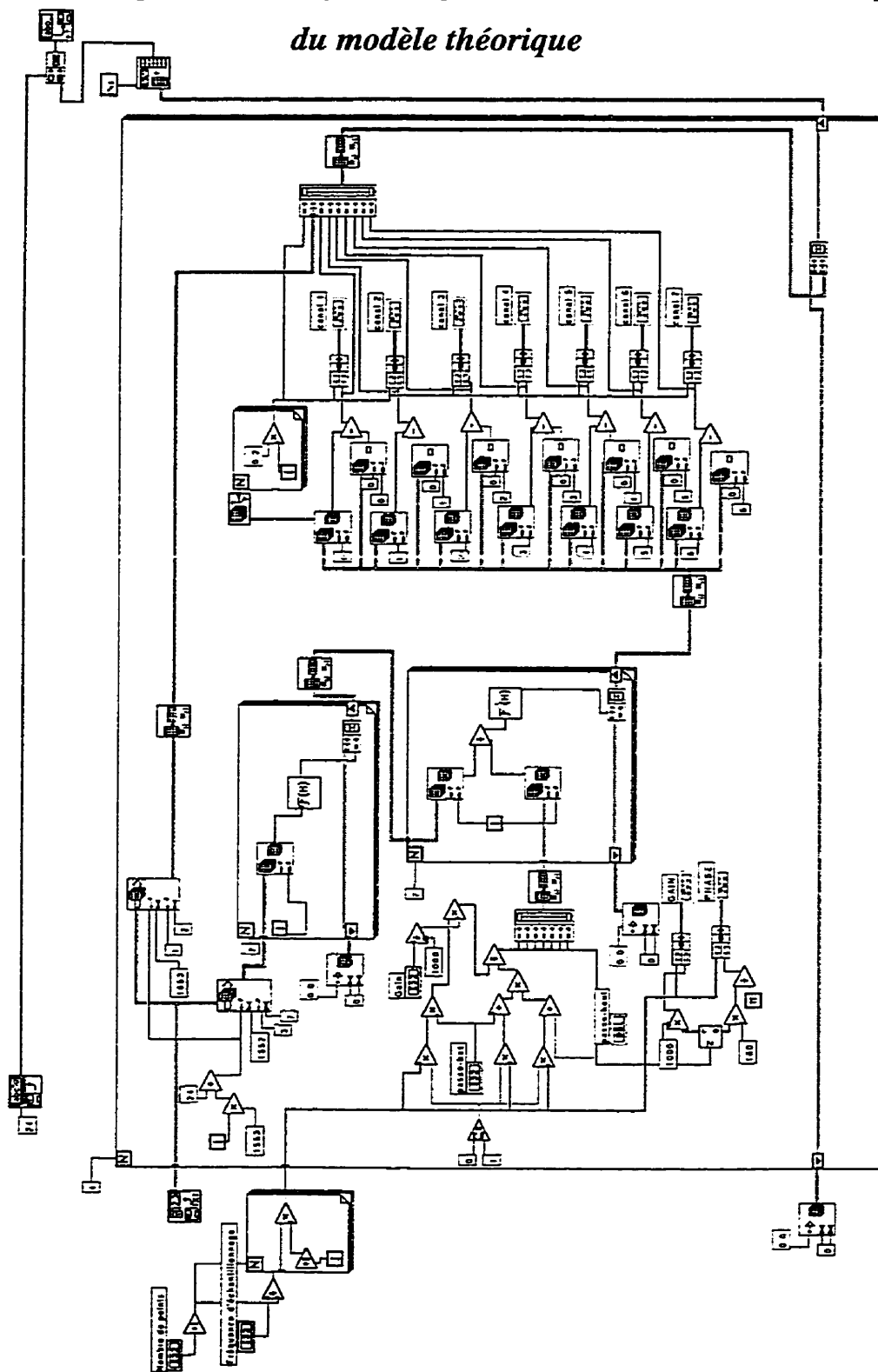
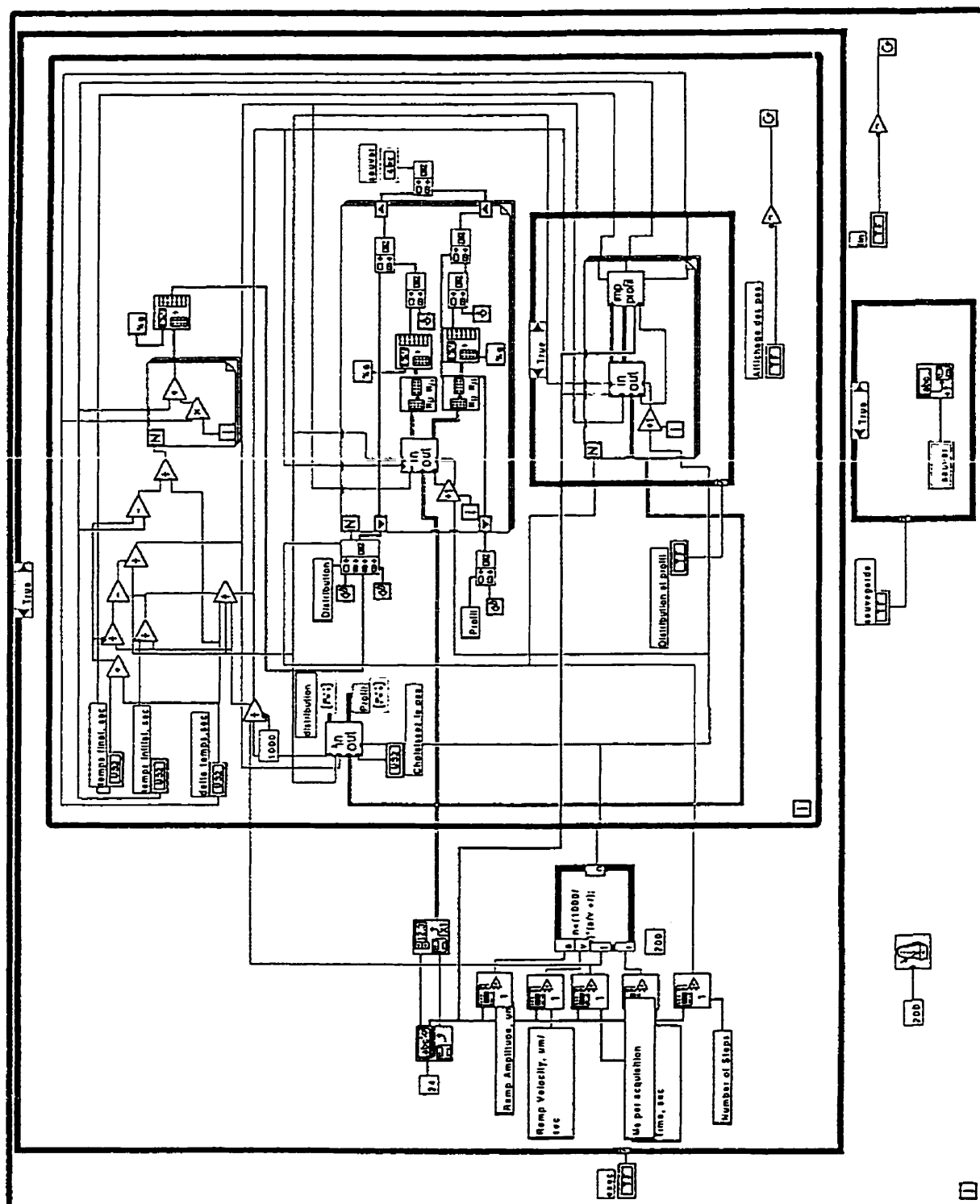


*Diagramme du programme qui construit les profils de potentiels
d'écoulement à partir des courbes de relaxation*



Annexe VI : Modélisation du filtrage par un bruit blanc non moyenné à zéro

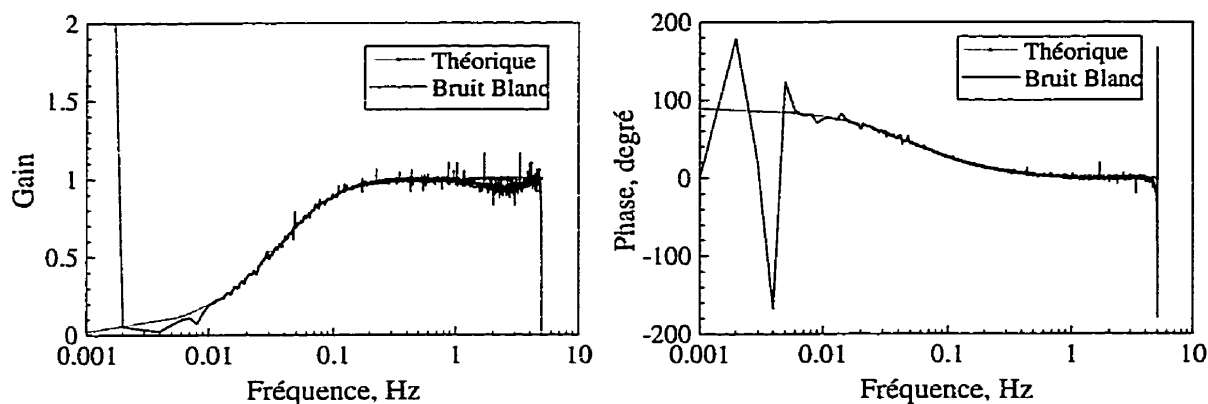


Figure VI.1 : Amplitude et phase de la fonction de transfert expérimentale calculée à partir d'un bruit blanc

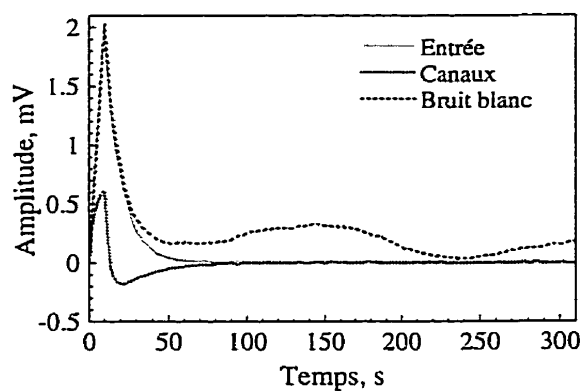


Figure VI.2 : Correction du signal expérimental avec la fonction de transfert calculée à partir du bruit blanc