

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

CULTURE DE CHONDROCYTES EN AGAROSE : DÉPENDANCE AVEC L'ÂGE
ET CARACTÉRISATION DE LA CROISSANCE EN INTERFACE.

NICOLAS TRAN-KHANH
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

AVRIL 2007



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-29207-5

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-29207-5

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

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

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

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

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée:

CULTURE DE CHONDROCYTES EN AGAROSE : DÉPENDANCE AVEC L'ÂGE
ET CARACTÉRISATION DE LA CROISSANCE EN INTERFACE

présentée par: TRAN-KHANH Nicolas

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

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

M. LESAGE Frédéric, Ph.D., président

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

Mme. HOEMANN Caroline, Ph.D., membre et codirectrice de recherche

Mme. VILLEMURE Isabelle, Ph.D., membre

Mme. RECKLIES Anneliese Dorothea, Ph.D., membre

À ma famille

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement Michael Buschmann et Caroline Hoemann, mes directeurs de recherche, ainsi que tous mes collègues de travail. Je présente toute ma reconnaissance aux membres du jury Anneliese Recklies, Isabelle Villemure et Frédéric Lesage pour avoir accepté de partager leur temps précieux à l'évaluation de mon travail. J'apprécie l'aide financière qui m'a été accordée par le FCAR et l'IRSC. Finalement, merci à mes amis et à ma famille, sans lesquels rien ne serait possible.

Résumé

La recherche sur le cartilage articulaire permet, entre autres, de mieux comprendre les maladies articulaires comme l'arthrose, et d'élaborer de nouvelles thérapies de régénération. Bien que la majorité des troubles du cartilage soient reliés au vieillissement, les chondrocytes utilisés pour les études *in vitro* sont presque toujours prélevés d'animaux immatures. Il est déjà accepté que l'âge module le métabolisme des chondrocytes. Cependant, peu de données sont disponibles concernant le rôle de l'âge dans les systèmes de culture en matrice tridimensionnelle, qui représentent un outil de choix en ingénierie tissulaire.

L'hypothèse de départ de ce travail était que les chondrocytes provenant d'animaux âgés possèdent une capacité réduite de proliférer et de synthétiser une matrice extracellulaire *in vitro*, comparativement aux chondrocytes d'animaux plus jeunes. Pour vérifier cette hypothèse, des chondrocytes bovins provenant de fœtus, de jeunes adultes, et d'animaux âgés ont été cultivés parallèlement en gel d'agarose. Après plus de trois semaines de culture, la densité cellulaire, ainsi que les contenus et taux de synthèse matriciels furent évalués. Nous avons observé une prolifération cellulaire et une accumulation de matrice extracellulaire réduites pour les chondrocytes d'animaux âgés, comparativement aux chondrocytes d'animaux plus jeunes. La diminution de synthèse avec l'âge est plus importante au niveau du collagène qu'au niveau des protéoglycanes. Les tests de relaxation de contraintes, effectués par des compressions en configuration non-confinée,

ont permis d'observer une variation avec l'âge des paramètres mécaniques extraits à l'aide du modèle biphasique renforcé de fibrilles. De plus, ces paramètres mécaniques ont corrélé de façon significative avec les contenus de la matrice extracellulaire.

En fin de culture, nous avons noté la présence de tissu en surface des construits d'agarose. La caractérisation de ces excroissances à l'interface agarose-milieu de culture ont permis d'observer une modulation avec l'âge. Le contenu cellulaire y est maximal pour les échantillons de jeunes adultes, qui produisent une matrice riche en collagène de type II et en glycosaminoglycanes. Le tissu en interface produit par les cellules fœtales contient les collagènes de type I et II, mais est dépourvu de glycosaminoglycanes. Quant aux cellules âgées, elles forment des amas cellulaires pauvres en matrice extracellulaire. Les cellules ont une morphologie arrondie, typique des chondrocytes articulaires non-dédifférenciés, à l'intérieur des excroissances de jeunes adultes. Cependant, elles sont plutôt de forme allongée en périphérie des excroissances, là où s'effectue la prolifération cellulaire.

Afin d'observer la dynamique cellulaire en interface, nous avons mis au point une nouvelle méthode d'imagerie des chondrocytes vivants. Cette dernière consiste en l'observation répétée des chondrocytes par microscopie confocale, en présence d'une faible dose d'acridine orange. À l'aide de cette technique, nous avons pu prendre conscience de l'importante activité migratoire des chondrocytes en surface d'agarose, en plus d'observer directement des divisions cellulaires.

Ce travail a permis de vérifier l'hypothèse de départ et recommande fortement la prise en compte de l'âge des animaux-donneurs dans les études basées sur la culture de chondrocytes. De plus, la vérification de l'hypothèse de base nous a menés vers la caractérisation des tissu formés à la surface des construits d'agarose. À la lumière des résultats obtenus, nous proposons la culture en interface d'agarose comme nouveau système de culture, qui favorise la prolifération de chondrocytes et permet la génération de tissu hyalin *de novo*. Finalement, la technique d'imagerie mise au point en fin de projet permet d'apprécier les phénomènes dynamiques qui ont lieu dans les excroissances, et offre un nouvel outil d'observation des cellules cultivées en système tridimensionnel.

Abstract

Research on articular cartilage allows a better understanding of articular diseases, like osteoarthritis, and the elaboration of new regenerating therapies. Even if most of the cartilage-related troubles are linked to aging, almost all of the *in vitro* studies use chondrocytes isolated from immature animals. It is already known that age modulates chondrocyte metabolism. However, few data are available concerning the role of donor age when chondrocytes are cultivated in tridimensional scaffolds, which are broadly used in tissue engineering.

The initial hypothesis of the present work was that cell proliferation, extracellular matrix synthesis and accumulation are reduced with increased age of the donor. To test this hypothesis, bovine chondrocytes from fetus, young adults and aged animals were cultivated in an agarose gel. After more than three weeks in culture, cell density as well as matrix content and synthesis rates were measured. We observed reduced cell proliferation and matrix accumulation for chondrocytes from aged animals, compared to chondrocytes from younger ones. Collagen synthesis was reduced by a more pronounced manner than proteoglycan synthesis. Stress-relaxation tests, performed by unconfined compressions, showed that the mechanical parameters extracted with the fibril-reinforced biphasic model are age-dependant. The latter parameters correlated significantly with matrix content.

At the end of the culture, we noted the presence of a tissue on the surface of agarose constructs. Characterization of these outgrowths at the agarose-media interface showed that the tissue biochemical composition was modulated with age. Cell content was the greatest in young adult samples, which produced a matrix rich in collagen II and in glycosaminoglycan. Interfacial tissue produced by fetal cells contained both collagen types I and II, but no glycosaminoglycan. Cells from aged donors produced matrix-poor cell clusters. In the central regions of young adult outgrowths, cell morphology was round and representative of normal articular chondrocytes. However, cells were elongated at the periphery of the outgrowths, where cell proliferation occurred.

In order to observe cellular dynamics at the interface, we developed a new live cell imaging technique, using time-lapsed images acquired by confocal microscopy in the presence of low doses of acridine orange. With this method, we could observe that cell migration took place on the agarose surface, and we could directly monitor cell division.

With this work, we verified the initial hypothesis, and strongly recommend to carefully evaluate the effect of donor age when functional properties or behavior of chondrocytes is to be assessed. Furthermore, it led us to the characterization of outgrowing interfacial tissue. In the light of our results, we suggest agarose interface culture as a novel culture system, which supports both cell proliferation and *de novo* hyaline tissue formation. Finally, the imaging technique developed in the last part of the project allows the

observation of dynamic phenomenon happening in the outgrowths, and offers a new tool to analyze living cells cultured in 3-dimensional systems.

Table des matières

DÉDICACE	IV
REMERCIEMENTS.....	V
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT	IX
TABLE DES MATIÈRES	XII
LISTE DES TABLEAUX	XVIII
LISTE DES FIGURES.....	XIX
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XXIII
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	1
1.1 PROBLÉMATIQUE	3
1.2 STRUCTURE DE LA THÈSE	5
CHAPITRE 2: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
2.1 STRUCTURE FONCTIONNELLE DU CARTILAGE ARTICULAIRE.....	7
2.1.1 <i>Les fibrilles de collagène</i>	10
2.1.2 <i>Agrégats de protéoglycanes</i>	12
2.1.3 <i>Anisotropies</i>	15
2.1.4 <i>Dynamique de compression</i>	18
2.1.5 <i>Modélisation du comportement mécanique du cartilage</i>	19
2.2 SYSTÈMES DE CULTURE DE CHONDROCYTES	20
2.2.1 <i>Explants</i>	20

2.2.2	<i>Monocouches</i>	21
2.2.3	<i>Haute densité</i>	22
2.2.4	<i>Matrices tridimensionnelles</i>	22
2.2.5	<i>Suspension</i>	23
2.3	EFFETS DE L'ÂGE SUR LE CARTILAGE ARTICULAIRE ET LES CHONDROCYTES	24
2.3.1	<i>Effets de l'âge in vivo et in situ</i>	24
2.3.2	<i>Effet de l'âge dans les cultures d'explants</i>	26
2.3.3	<i>Effets de l'âge dans les cultures en monocouches</i>	27
2.3.4	<i>Effets de l'âge dans les cultures en matrice tridimensionnelle</i>	28
2.3.5	<i>Synthèse des effets de l'âge</i>	29
CHAPITRE 3: SYNTHÈSE DE L'ARTICLE ET STRUCTURE DU PROJET		31
3.1	SYNTHÈSE DE L'ARTICLE	31
3.1.1	<i>Hypothèses proposées dans l'article</i>	32
3.1.2	<i>Effet de l'âge sur la prolifération, la synthèse et l'accumulation de MEC</i>	33
3.1.3	<i>Effet de l'âge sur les propriétés mécaniques</i>	34
3.1.4	<i>Corrélations entre les propriétés mécaniques et les contenus de la MEC</i>	34
3.1.5	<i>Conclusion de l'article</i>	35
3.2	ORIENTATION ULTÉRIEURE DU PROJET : EXCROISSANCES EN INTERFACE.....	35
3.2.1	<i>Effet de l'âge sur les excroissances en interface</i>	35
3.2.2	<i>Caractérisation des excroissances en interface</i>	36
3.2.3	<i>Imagerie par microscopie confocale des cellules vivantes</i>	36
CHAPITRE 4: DÉTAILS TECHNIQUES ET EXPÉRIMENTAUX – CULTURE DE CHONDROCYTES EN GEL D'AGAROSE		37
4.1	PROVENANCE DES TÊTES HUMÉRALES BOVINES	37

4.2	EXTRACTION DE CARTILAGE ARTICULAIRE	37
4.3	ISOLATION DE CHONDROCYTES.....	40
4.4	PRÉPARATION DE L' AGAROSE, ENCAPSULATION ET CULTURE	41
4.5	DIGESTION À LA PAPAÏNE.....	43
4.6	ESSAI HOECHST	44
CHAPITRE 5: ARTICLE – AGED BOVINE CHONDROCYTES DISPLAY A DIMINISHED CAPACITY TO PRODUCE A COLLAGEN-RICH, MECHANICALLY FUNCTIONAL CARTILAGE EXTRACELLULAR MATRIX		45
5.1	TITLE PAGE.....	45
5.2	SUMMARY	46
5.3	INTRODUCTION	47
5.4	MATERIALS AND METHODS	49
5.4.1	<i>Chondrocytes in Agarose</i>	49
5.4.2	<i>Electron Microscopy</i>	51
5.4.3	<i>Determination of DNA, Collagen and Glycosaminoglycan Contents</i>	51
5.4.4	<i>Histology</i>	52
5.4.5	<i>³⁵S-Sulfate and ¹⁴C-L-Proline Incorporation</i>	53
5.4.6	<i>Mechanical Testing</i>	53
5.4.7	<i>Statistical Analysis</i>	54
5.5	RESULTS	55
5.5.1	<i>Efficiency of Chondrocyte Isolation</i>	55
5.5.2	<i>Cell, GAG and Collagen Contents</i>	57
5.5.3	<i>Sulfate and Proline Incorporation</i>	59
5.5.4	<i>Histology</i>	60

5.5.5	<i>Mechanical Properties</i>	62
5.6	DISCUSSION	66
5.7	ACKNOWLEDGMENTS.....	71
CHAPITRE 6: EFFET DE L'ÂGE SUR LES EXCROISSANCES EN INTERFACE		72
6.1	HYPOTHÈSE.....	72
6.2	MÉTHODOLOGIE.....	73
6.2.1	<i>Culture de chondrocytes en agarose</i>	73
6.2.2	<i>Apparence macroscopique</i>	73
6.2.3	<i>Contenus cellulaires interne et externe</i>	73
6.2.4	<i>Rendements cellulaires</i>	74
6.2.5	<i>Détection des protéoglycanes</i>	76
6.2.6	<i>Détection du collagène type II</i>	76
6.2.7	<i>Détection du collagène type I</i>	77
6.3	RÉSULTATS	79
6.3.1	<i>Apparence macroscopique</i>	79
6.3.2	<i>Contenus cellulaires</i>	80
6.3.3	<i>Rendements cellulaires</i>	82
6.3.4	<i>Rendement effectif des excroissances</i>	83
6.3.5	<i>Détection du collagène de type I, du collagène de type II, et des GAGs</i>	84
6.4	DISCUSSION	87
CHAPITRE 7: CARACTÉRISATION DES EXCROISSANCES EN INTERFACE.....		91
7.1	HYPOTHÈSES.....	92
7.2	MÉTHODOLOGIE.....	93
7.2.1	<i>Production d'excroissances</i>	93

7.2.2	<i>Échantillons avec surface concave</i>	93
7.2.3	<i>Échantillons avec surface convexe</i>	94
7.2.4	<i>Apparence macroscopique</i>	95
7.2.5	<i>Marquage triple de l'actine, de la vimentine et de l'ADN</i>	95
7.2.6	<i>Cryosections</i>	96
7.2.7	<i>Incorporation et détection de BrdU</i>	97
7.2.8	<i>Détection de Ki67</i>	98
7.3	RÉSULTATS	99
7.3.1	<i>Imagerie du cytosquelette</i>	99
7.3.2	<i>Prolifération cellulaire</i>	103
7.3.3	<i>Effet de géométrie</i>	105
7.4	DISCUSSION	108
 CHAPITRE 8: IMAGERIE PAR MICROSCOPIE CONFOCALE DES CELLULES VIVANTES DANS LA CULTURE D'EXCROISSANCES EN INTERFACE		110
8.1	HYPOTHÈSES	112
8.2	MÉTHODOLOGIE.....	113
8.2.1	<i>Internalisation de dextran par pinocytose</i>	113
8.2.2	<i>Marquage membranaire avec PKH26</i>	113
8.2.3	<i>Incubation de Calcein AM</i>	114
8.2.4	<i>Marquage à l'acridine orange</i>	114
8.2.5	<i>Essai MTT</i>	115
8.2.6	<i>Microscopie confocale d'échantillons vivants</i>	115
8.3	RÉSULTATS	117
8.3.1	<i>Dextran fluorescent</i>	117

8.3.2	<i>PKH26</i>	117
8.3.3	<i>Calcein AM</i>	120
8.3.4	<i>Acridine orange</i>	122
8.4	DISCUSSION	133
CHAPITRE 9: DISCUSSION GÉNÉRALE.....		136
CHAPITRE 10: CONCLUSION		144
10.1	RECOMMANDATIONS	146
LISTE DE RÉFÉRENCES.....		147

Liste des tableaux

Tableau 2.1 : Effets de l'âge sur les chondrocytes et le cartilage articulaire.....	30
Tableau 8.1 : Localisation des émissions d'acridine orange.....	122

Liste des figures

Figure 2.1: Le cartilage articulaire.....	8
Figure 2.2 : La matrice extracellulaire du cartilage articulaire.	9
Figure 2.3 : La fibrille de collagène.....	10
Figure 2.4 : L'agrégat de protéoglycanes.	14
Figure 2.5 : Zones en profondeur du cartilage articulaire mature.....	15
Figure 2.6 : Environnement péricellulaire du cartilage articulaire.	17
Figure 5.1 : Kinetics of GAG and cell release during enzymatic treatments.	56
Figure 5.2 : Electron microscopy of enzymatically isolated chondrocytes.	57
Figure 5.3 : Time evolution of cell and matrix content for three age groups.	58
Figure 5.4 : GAG and collagen content normalized to cell density for different age groups.....	59
Figure 5.5 : Sulfate and proline incorporation rates for different age groups.....	60
Figure 5.6 : Histology for different age groups.	61
Figure 5.7 : Time evolution of mechanical parameters for different age groups.	63
Figure 5.8 : Correlation between fibril modulus and collagen content.....	64
Figure 5.9 : Correlation between equilibrium modulus and hydraulic permeability and GAG content.	65
Figure 6.1 : Schéma d'un cylindre d'agarose.	75

Figure 6.2 : Apparence macroscopique des cylindres d'agarose pour les différents groupes d'âge.	79
Figure 6.3 : Apparence macroscopique des cylindres d'agarose pour les différents groupes d'âge (avec CPC dans le fixatif).	80
Figure 6.4 : Graphique du contenu cellulaire à l'intérieur de l'agarose en fonction des jours de culture, pour les trois groupes d'âge.	81
Figure 6.5 : Graphique du contenu cellulaire à l'extérieur de l'agarose en fonction des jours de culture, pour les trois groupes d'âge.	82
Figure 6.6 : Graphique des rendements cellulaires interne et externe, pour les trois groupes d'âge.	83
Figure 6.7 : Graphique du rendement cellulaire effectif des excroissances.	84
Figure 6.8 : Immunohistochimie de Coll I et Coll II pour les excroissances en interface d'agarose, pour les trois groupes d'âge.	85
Figure 6.9 : Coloration des protéoglycanes (Safranine-O) d'une excroissance en interface pour le groupe de jeunes adultes.	86
Figure 7.1 : Photos de la plaque utilisée pour générer les échantillons portant une surface convexe.	94
Figure 7.2 : Réseaux d'actine et de vimentine d'une excroissance imagée par microscopie confocale.	100
Figure 7.3: Zoom du cytosquelette de cellules en surface de l'excroissance.	101
Figure 7.4 : Zoom du cytosquelette de cellules au centre de l'excroissance.	102

Figure 7.5 : Marquage du BrdU incorporé dans une excroissance.	103
Figure 7.6 : Marquage de Ki67 dans une excroissance naissante.	104
Figure 7.7 : Marquage de Ki67 dans une excroissance.	104
Figure 7.8 : Apparence macroscopique des excroissances sur les construits d'agarose portant une surface convexe ou concave.	106
Figure 7.9 : Photo d'une excroissance au fond d'un puits de culture.	107
Figure 8.1 : Image confocale 2D d'une excroissance marquée au PKH26 et à Calcein AM.	118
Figure 8.2 : Reconstruction 3D d'une excroissance marquée au PKH26 et à Calcein AM.	119
Figure 8.3 : Image 3D de chondrocytes marqués à Calcein AM, à l'intérieur et en surface supérieure du construit d'agarose.	120
Figure 8.4 : Images 3D de chondrocytes marqués à Calcein AM, à l'intérieur et en surface latérale du construit d'agarose.	121
Figure 8.5 : Graphique de la toxicité en fonction de la concentration d'acridine orange.	123
Figure 8.6 : Migration d'un chondrocyte en monocouche marqué à l'acridine orange..	125
Figure 8.7 : Dynamique d'un amas cellulaire marqué à l'acridine orange, sur la surface latérale du construit d'agarose.	127
Figure 8.8 : Dynamique des chondrocytes marqués à l'acridine orange, sur la surface supérieure du construit d'agarose.	128

Figure 8.9 : Vue d'ensemble des chondrocytes autour de l'arête du construit d'agarose.

..... 130

Figure 8.10: Dynamisme des cellules en périphérie d'une excroissance ayant accumulé
une matrice extracellulaire..... 132

Liste des sigles et abréviations

2D :	Bidimensionnel
3D :	Tridimensionnel
AAA :	<i>Alliance Against Arthritis</i>
ACI :	<i>Autologous chondrocyte implantation</i>
ACF :	Agent contrastant par fluorescence
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ANOVA :	<i>Analysis of variance</i>
AO :	Acridine orange
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
BJD :	<i>Bone Joint Decade</i>
BrdU :	<i>Bromodeoxyuridine</i>
BSA :	<i>Bovine serum albumin</i>
C_0 :	Concentration cellulaire d'ensemencement
CA :	Cartilage articulaire
C_{eff} :	Concentration cellulaire effective
C_{ext} :	Concentration cellulaire externe
Ch-6S :	Chondroïtine-6-sulfate

Coll II :	Collagène de type II
Coll IX :	Collagène de type IX
Coll XI :	Collagène de type XI
CCD :	<i>Charge coupled device</i>
CPC :	<i>Cetylpyridinium chloride</i>
CS :	Chondroïtine sulfate
δ_{mig} :	Distance de migration dans l'agarose
DAB :	<i>3,3'-Diaminobenzidine</i>
ddH ₂ O :	Eau déionisée
DMB :	<i>Dimethylmethylene blue</i>
DMEM :	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DNA :	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DSHB :	<i>Developmental Studies Hybridoma Bank</i>
ECM :	<i>Extracellular matrix</i>
Em :	<i>Equilibrium modulus</i>
Ef :	<i>Fibril modulus</i>
EULAR :	<i>European League Against Rheumatism</i>
EGF :	<i>Epidermal growth factor</i>
FBS :	<i>Fetal bovine serum</i>
G1 à G3 :	Domaines globulaires sur la protéine centrale de l'agrécan
GAG :	Glycosaminoglycane

GFP :	<i>Green fluorescent protein</i>
GS :	<i>Goat serum</i>
GOC :	Glucose oxydase et catalase
<i>h</i> :	Hauteur du cylindre d'agarose
HA :	<i>Hyaluronic acid</i>
H-DMEM :	<i>High glucose DMEM</i>
IGF-1 :	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IL-1 :	<i>Interleukin-1</i>
ITS :	<i>Insulin, transferrin and selenium</i>
K :	<i>Hydraulic permeability</i>
kPa :	Kilopascal
KS :	Kératane sulfate
LP :	<i>Link protein</i>
MACI :	<i>Matrix-guided autologous transplantation</i>
MANOVA :	<i>Multivariate analysis of variance</i>
MEC :	Matrice extracellulaire
mHBSS :	<i>Modified Hank's buffered salt solution</i>
NAA :	<i>Non-essential amino acids</i>
NC1 à NC3 :	Domaines non collagèneux du collagène de type IX
OMS :	Organisation mondiale de la santé
MPa :	Mégapascal

PBS :	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBE :	<i>Phosphate-EDTA buffer</i>
PCNA :	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PDGF :	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PGE1 et 2:	<i>Prostaglandins E1 and E2</i>
PG :	Protéoglycane
pK _a :	$-\log_{10}$ (constante de dissociation)
PS :	<i>Penicillin-Streptomycin</i>
PTH :	<i>Parathyroid hormone</i>
r :	<i>Pearson product-moment correlation coefficient</i>
R :	Rayon du cylindre d'agarose
R _{eff} :	Rendement cellulaire effectif
TBS :	<i>Tris buffered saline</i>
TGF- β :	<i>Transforming growth factor beta</i>
V _{cyl} :	Volume du cylindre d'agarose
V _{int} :	Volume du cylindre interne
V _{eff} :	Volume effectif
WHO :	<i>World health organization</i>

Chapitre 1: Introduction

Le vieillissement de notre population induira inévitablement une augmentation des maladies dégénératives au cours du XXI^e siècle, du moins jusqu'à la découverte de cures efficaces pour les enrayer. Au Québec, les troubles musculosquelettiques, en plus d'être le principal problème de santé déclaré chez les personnes âgées de 65 ans et plus (Lefebvre, 2001), touchent une grande proportion des travailleurs, et représentent un des plus importants fardeaux économiques associés à une maladie (Institut national de santé publique du Québec, 2006).

Les canadiens sont conscients depuis longtemps de la gravité du problème. Dès 1936, année où l'Association canadienne des maladies rhumatismales fut créée, on tente de s'organiser au pays pour lutter contre l'arthrite (La société d'arthrite, 2002) qui englobe une centaine d'affections différentes dont la plus courante est l'arthrose. Cette association, qui fut ultérieurement rebaptisée « Société d'arthrite », a élaboré des plans stratégiques qui ont permis d'accomplir des progrès considérables dans le domaine des traitements. Quelques années avant l'historique passage à l'an 2000, le Réseau canadien de l'arthrite a été mis en place dans le but de pallier l'absence de programme de recherche concertée et pluridisciplinaire en matière d'arthrite au pays (Le réseau canadien de l'arthrite, 2005).

Ce besoin ressenti au Canada de mettre au point des stratégies efficaces pour trouver des solutions s'est aussi manifesté de façon générale sur la planète. Au mois de janvier 2000,

la décennie de l'os et de l'articulation (BJD pour « Bone and Joint Decade ») a été officiellement décrétée au siège social de l'Organisation mondiale de la santé (OMS ou WHO en anglais) afin que davantage de ressources soient canalisées dans le domaine musculosquelettique (Dreinhöfer, 2006). Dans le même ordre d'idées, le président de nos voisins du sud a proclamé la période 2002-2011 comme la décennie nationale de l'os et de l'articulation aux États-Unis (Bush, 2002), où les coûts annuels associés aux troubles musculosquelettiques sont estimés à 254 milliards de dollars américains (WHO, 2003). Une grande partie de ces coûts sont reliés au cartilage articulaire, qui est grandement touché par les déséquilibres musculosquelettiques.

Les activités quotidiennes induisent inéluctablement des bris au niveau du cartilage articulaire, qui demeure toutefois fonctionnel lorsqu'il est adéquatement remodelé par ses propres cellules. Malheureusement, les dommages subis par le cartilage sont parfois trop importants pour permettre son auto-guérison, menant à une dégradation qui s'accroît avec le temps et à des douleurs articulaires chroniques. La dégénération peut être initiée par certaines forces mécaniques (impact, torsions excessives, obésité, instabilité des ligaments, mauvaise posture, etc.), mais aussi par des failles au niveau du développement (mutations génétiques, carences alimentaires), et par des conditions pathologiques (infections, virus, inflammations, cancers, désordres du métabolisme, ostéoporose, etc.). Tous ces facteurs, en plus du vieillissement, interagissent entre eux. La compréhension des mécanismes d'action impliqués est donc une tâche ardue.

La recherche est nécessaire pour guider efficacement la mise sur pied de programmes de prévention adéquats, la génération de nouveaux médicaments, et l'établissement de techniques chirurgicales novatrices. Les expérimentations sur des individus vivants, mis à part les essais cliniques, sont plutôt restreintes étant donné le caractère invasif des traitements et des analyses reliés au cartilage. Bien que certaines études soient menées à l'aide d'animaux vivants (souris transgéniques, chien au ligament croisé antérieur ligaturé, essai des nouveaux médicaments, modèles de réparation, etc.), la plupart d'entre-elles sont initiées par les expériences *in vitro*. Les systèmes de culture ne représentent pas exactement l'environnement naturel des chondrocytes, mais facilitent l'isolement des paramètres pour la vérification d'une multitude d'hypothèses. De plus, ils permettent de limiter l'utilisation des animaux de laboratoire.

La culture de chondrocytes humains est limitée car elle requiert la récupération de cartilage prélevé lors d'interventions chirurgicales (par exemple lors d'un remplacement total de hanche par une prothèse), ou dans les heures suivant un décès (don d'organe). Il est plus aisé d'obtenir du cartilage provenant d'animaux déjà abattus pour fins d'alimentation. Le cartilage bovin, entre autres, est un tissu qui peut être obtenu en grandes quantités et est largement utilisé en recherche.

1.1 Problématique

Un des buts de la recherche sur le cartilage est la compréhension de l'arthrose qui est reliée, entre autres, au vieillissement (Aigner et al., 2007). La revue « Osteoarthritis and

Cartilage », qui est un journal multidisciplinaire voué à une meilleure compréhension de l'arthrose, présente plusieurs études basées sur la culture de chondrocytes bovins. Étonnamment, la grande majorité de ces études utilisent des cellules prélevées chez des veaux immatures. Il est légitime de se questionner à savoir si les conclusions proposées pour les jeunes animaux sont transposables aux individus âgés. Dans le cas contraire, il serait logique d'utiliser davantage les chondrocytes d'animaux âgés pour les tests *in vitro*, afin de mieux cerner les mécanismes impliqués dans la maladie.

Un second objectif visé par la recherche dans ce domaine est l'élaboration de traitements favorisant la réparation du cartilage articulaire. Une des techniques proposée est l'implantation de chondrocytes autologues (ACI pour « autologous chondrocyte implantation »), parfois guidée à l'aide de matrices tridimensionnelles (MACI pour « matrix-guided ACI »). La performance des chondrocytes sous certaines conditions (ajout de facteurs de croissance, utilisation de différentes matrices, application de stimulations mécaniques, etc.) est évaluée *in vitro* afin d'optimiser l'efficacité des implantations. En recensant ce genre d'études qui utilisent les chondrocytes bovins dans la revue « Tissue Engineering », on remarque que les cellules proviennent presque toujours de veaux immatures. Sachant que la majorité des patients qui nécessitent un traitement de réparation de cartilage sont des adultes, on peut se demander si ces études *in vitro* mèneront réellement à des techniques cliniquement efficaces.

Ce projet a donc été initié par la question suivante : est-ce que l'âge des animaux est un paramètre critique à considérer dans la vérification d'hypothèses par les études de chondrocytes *in vitro*? Ce document présente, dans un premier temps, comment nous avons répondu à cette question. Dans un deuxième temps, il explique comment cette question nous a menés à proposer un nouveau système de culture de chondrocytes. Dans un troisième temps, il expose comment nous en sommes venus à mettre au point une nouvelle technique d'observation de la dynamique des cellules en culture tridimensionnelle.

1.2 Structure de la thèse

Un survol de la structure fonctionnelle du cartilage articulaire, des systèmes de culture de chondrocytes utilisés de nos jours, et des effets de l'âge sur le cartilage articulaire et les chondrocytes, est présenté au chapitre 2. Le chapitre 3 présente la synthèse de l'article publié dans le cadre de la première partie de ce projet, ainsi que la structure générale de la seconde partie. La méthodologie en rapport avec la culture de chondrocytes bovins en agarose est détaillée dans le chapitre 4. L'article sur l'effet de l'âge de l'animal-donneur pour la culture de chondrocytes en agarose est inclus dans le chapitre 5, dans sa version publiée. Le chapitre 6 présente l'effet de l'âge de l'animal-donneur sur la production d'excroissances à l'interface agarose-milieu de culture. L'étude de la morphologie et de la prolifération cellulaires dans les excroissances en interface, ainsi que l'effet de la géométrie du construit d'agarose, sont présentés au chapitre 7. Finalement, le chapitre 8 présente la mise au point d'une méthode microscopique permettant d'observer la

dynamique des chondrocytes vivants en interface, et les résultats observés. Suivent ensuite les chapitres de discussion et de conclusion générales, ainsi que la liste de références.

Chapitre 2: Revue bibliographique

Ce chapitre est divisé en trois sections majeures. Dans la première, un survol de la structure fonctionnelle du cartilage articulaire est présenté. La seconde dresse la liste des différents systèmes *in vitro* utilisés pour la culture de chondrocytes, et tente de faire ressortir les avantages et inconvénients de chacun. La dernière rassemble les informations recensées à propos des effets de l'âge sur le cartilage articulaire et les chondrocytes.

2.1 Structure fonctionnelle du cartilage articulaire

Lorsqu'aucune référence n'est mentionnée dans cette section, c'est que l'information provient du livre « Orthopaedic Basic Science » (chapitre 17 par Mankin et al., 2000) ou du livre « Joint Cartilage Degradation » (chapitre 1 par Poole, chapitre 2 par Aydelotte et Kuettner, chapitre 4 par Mayne et Brewton, 1993).

Le cartilage articulaire est un cartilage hyalin qui recouvre les surfaces articulaires des jointures (figure 2.1 A). Il est dépourvu de nerfs, de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Pendant la croissance et le développement, il est formé d'une épaisse couche de cellules à l'extrémité de la plaque de croissance (figure 2.1 B). En atteignant la maturité, la plaque de croissance et le cartilage articulaire se retrouvent séparés par le second centre d'ossification (figure 2.1 C).

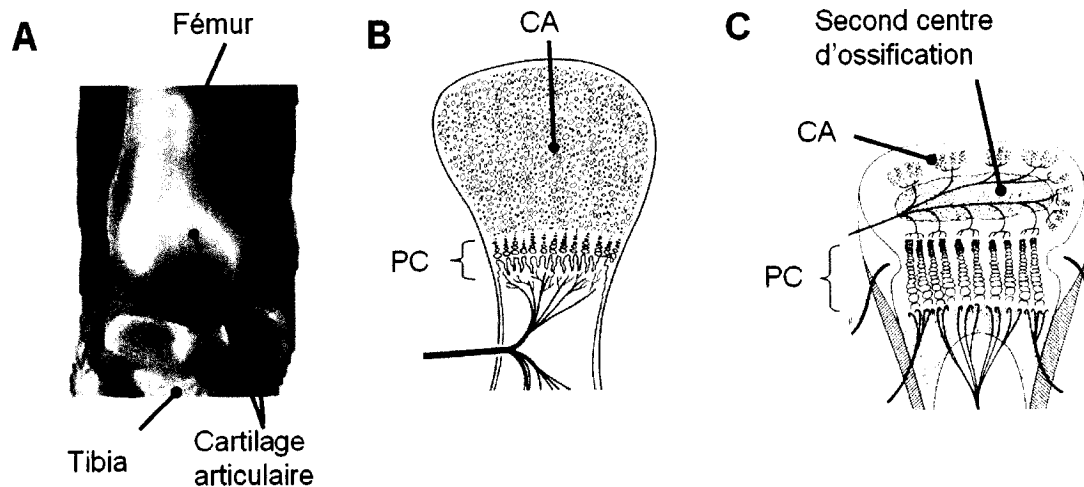


Figure 2.1: Le cartilage articulaire.

A) Dessin montrant le cartilage articulaire du genou. Image tirée de la page éditée par Garg, de iVillage Inc. B) Pendant le développement, le cartilage articulaire (CA) est adjacent à la plaque de croissance (PC). Image tirée de Brighton (1984). C) Ensuite, le second centre d'ossification vient séparer le cartilage articulaire (CA) de la plaque de croissance (PC). Image tirée de Brighton (1978).

Chez les jeunes animaux adultes, la surface articulaire dévoile une couche lisse, luisante et d'un blanc perlé couvrant les extrémités des os longs. Cette couche varie en transparence et en épaisseur d'une région à l'autre dans une même jointure, d'une jointure à l'autre dans la même espèce et, d'une espèce à l'autre. Les fonctions du cartilage articulaire sont les suivantes : couvrir l'os sous-jacent afin de le protéger de l'abrasion et d'autres dommages, transmettre et distribuer les chargements de compression et de cisaillement à cet os, maintenir un contact congru à contraintes minimales entre les os apposés et, finalement, fournir une surface lisse et lubrifiée qui facilite un mouvement presque sans friction.

Le cartilage articulaire est constitué d'une abondante matrice extracellulaire (MEC) clairsemée de cellules hautement spécialisées, les chondrocytes (figure 2.2 A). Principalement, la MEC est composée d'eau, de fibrilles de collagène et de gros agrégats de protéoglycanes (figure 2.2 B). D'autres protéines, petits protéoglycanes et autres glycoprotéines participent aussi à la structure de la MEC, mais s'y retrouvent en plus petites quantités.

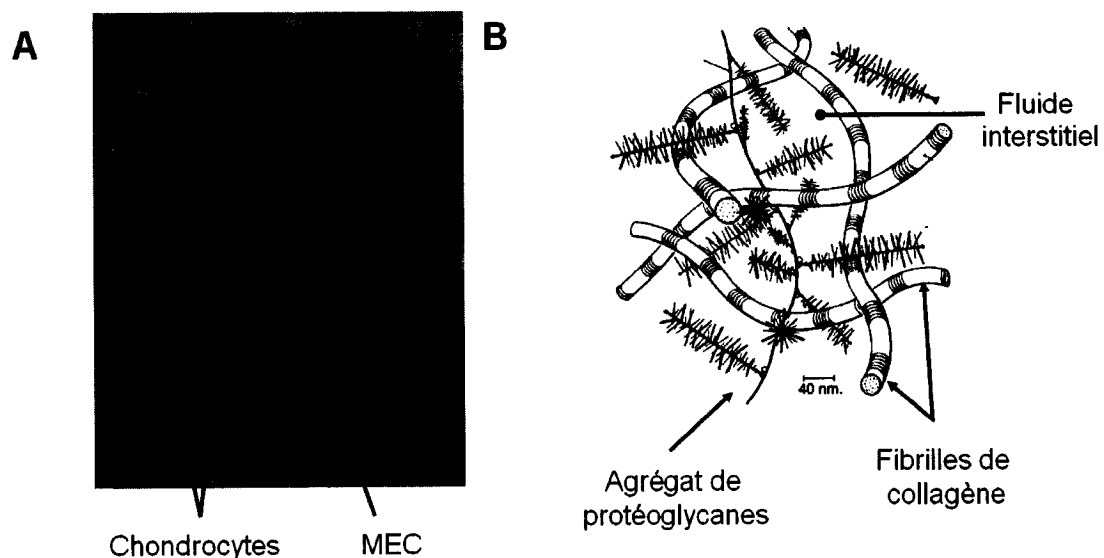


Figure 2.2 : La matrice extracellulaire du cartilage articulaire.

A) Coupe histologique montrant les chondrocytes entourés de matrice extracellulaire (MEC). Image tirée de Hunziker et al. (2007). B) Schéma montrant les composantes principales de la matrice extracellulaire. Image tirée de Mow et al., (1989).

2.1.1 Les fibrilles de collagène

Les fibrilles de collagène (figure 2.3) sont composées du collagène type II (Coll II), majoritairement, et des collagènes type IX et type XI (Coll IX et Coll XI). Elles forment un réseau dense dont la fonction primaire est de donner au tissu une forte résistance en tension et en cisaillement. Ce réseau fournit aussi un support qui immobilise les agrégats de protéoglycanes dans la MEC.

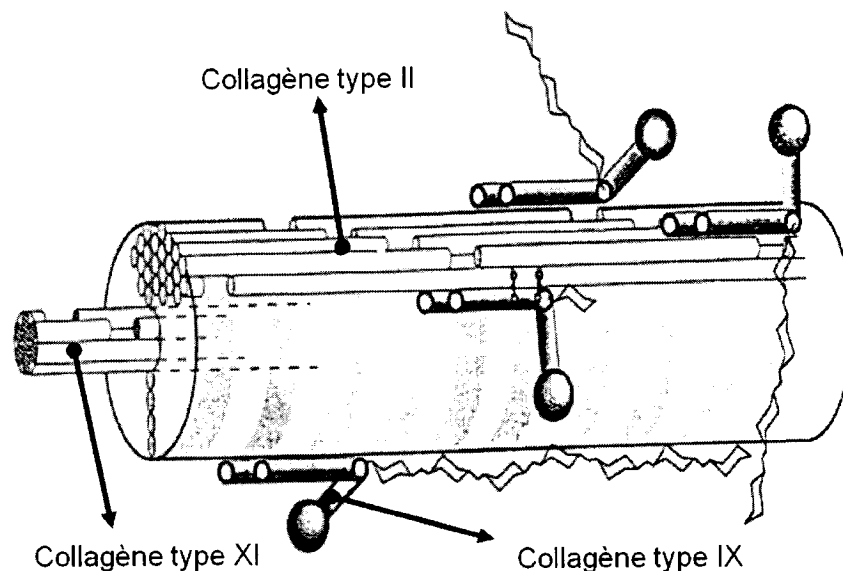


Figure 2.3 : La fibrille de collagène.

Schéma montrant un modèle de la structure d'une fibrille de collagène du cartilage.

Image tirée de Bruckner et Van der Rest (1994).

Le collagène de type II

La molécule de Coll II montre une structure hélicoïdale à trois brins identiques nommés chaînes $\alpha 1(\text{II})$. Ces dernières sont enroulées les unes autour des autres en une super-hélice régulière pour former une molécule à l'allure de corde. Deux épissages différents

mènent à deux formes différentes de Coll II, les types IIA et IIB. Le type IIA est synthétisé par les cellules pré-chondrogéniques, épithéliales et mésenchymateuses, tandis que le type IIB est synthétisé par les chondrocytes (Zhu et al., 1999).

L'association de plusieurs molécules de Coll II est nécessaire à la formation de fibrilles. Le processus exact par lequel les fibrilles s'assemblent n'est pas clair, mais il est probablement gouverné par le clivage systématique des propeptides, les différentes proportions des types de collagène, et la présence d'autres composantes de la MEC, tel que proposé par Bailey et Paul (1997) pour les fibrilles de collagène de type I. La formation de liaisons covalentes intra et intermoléculaires, catalysée par la lysyl oxydase et inhibée par le β -aminopropionitrile, vient stabiliser les fibrilles (Smith-Mungo et Kagan, 1998). La formation de ces liaisons est initiée par l'oxydation de résidus lysyl et hydroxylysyl spécifiques des télopeptides. Des réactions spontanées mènent ensuite à des liaisons divalentes qui seront converties, avec le temps, en liaisons multivalentes pouvant lier plusieurs molécules (Bailey et Paul, 1997).

Le collagène type IX

L'information de ce paragraphe est tirée en partie de Diab et al. (1996). La molécule de Coll IX est un hétérotrimère de trois chaînes génétiquement distinctes : $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$. Chaque chaîne contient quatre domaines non collagèneux (NC1 à NC4) et trois domaines collagèneux. La chaîne $\alpha 2$ peut contenir une chaîne de glycosaminoglycanes dans son domaine NC3. Les chaînes sont liées par des ponts disulfures liant les domaines NC1 et

NC3. Le Coll IX colocalise avec le Coll II et semble tapisser la surface des fibrilles (Hagg et al., 1998). Des liaisons covalentes relient les molécules de collagène type IX entre elles, tout comme elles relient le collagène type IX au collagène type II (Ichimura et al., 2000; Wu et al., 1992).

Le collagène type XI

La molécule de Coll XI est aussi un hétérotrimère. Sa chaîne $\alpha 3$ s'apparente beaucoup à la chaîne $\alpha 1$ du Coll II, ces dernières étant transcrites du même gène ; cependant, les résidus de lysine de la chaîne $\alpha 3$ (type XI) sont modifiés davantage en résidus d'hydroxylysine glycosylée. Sa fonction suggérée antérieurement était de former une microfibrille autour de laquelle le Coll II peut s'organiser (Mendler et al., 1989; Wu et Eyre, 1995), mais il est aussi maintenant proposé qu'il forme un gabarit qui limite la croissance latérale des fibrilles (Blaschke et al., 2000; Gregory et al., 2000).

2.1.2 Agrégats de protéoglycanes

Les agrégats de protéoglycanes (PG) (Roughley, 2006) sont des macromolécules constituées de trois parties principales (figure 2.4 A): l'agrécan, l'acide hyaluronique (HA pour « hyaluronic acid »), et la protéine de liaison (LP pour « link protein »). L'agrécan est composé d'une protéine centrale portant trois régions globulaires (G1, G2 et G3) à laquelle se rattachent de longues chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs). Deux types de GAGs y sont présents: les chaînes de chondroïtine sulfate (CS), majoritaires, se trouvent vers la région G3 tandis que les chaînes de kératane sulfate (KS),

moins abondantes, se situent près de la région G2. Les molécules d'agrécan forment de larges agrégats en attachant leur région G1 à l'HA, un GAG caractérisé par son importante longueur. La LP est relativement petite et dispose d'une structure analogue à celle de la région G1 de l'agrécan. La LP induit un changement de conformation de l'agrécan en interagissant avec sa région G1, afin de faciliter et de stabiliser sa liaison avec l'HA.

La macromolécule ainsi formée se retrouve équipée d'une immense quantité de CS et de KS. Ces dernières, possédant des groupements chargés négativement au pH physiologique (figure 2.4 B), confèrent aux agrégats une haute densité de charges anioniques. Ces charges sont neutralisées par des cations libres, qui attirent par osmose les molécules d'eau (Buschmann et Grodzinsky, 1995). Le gonflement du gel d'agrécats créé par cette pression osmotique est contrebalancé dans le cartilage par le réseau de fibrilles, qui limite son étirement (Maroudas et Venn, 1977).

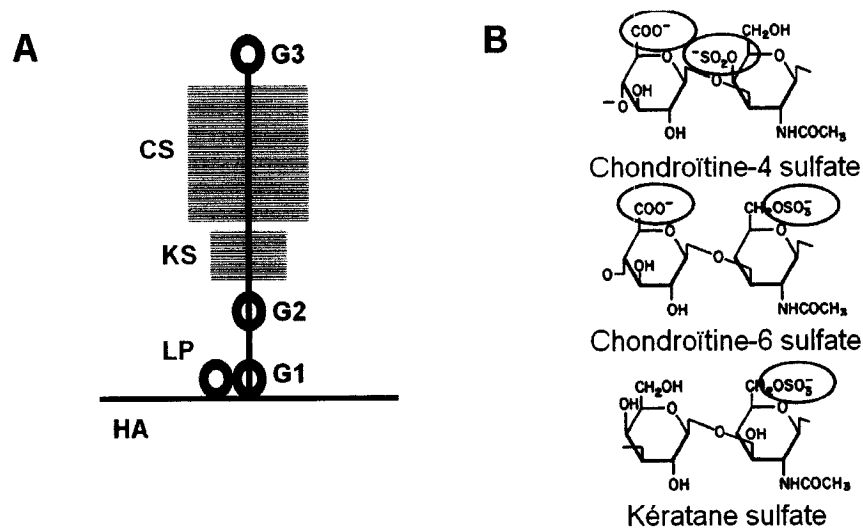


Figure 2.4 : L'agrégat de protéoglycanes.

A) Les chaînes de chondroïtine sulfate et de kératane sulfate (CS et KS, en vert) sont attachées à la protéine centrale (en noire), qui contient trois domaines globulaires (G1, G2 et G3), pour former l'agrécane. Le domaine G1 de l'agrécane se lie à la protéine de liaison (LP, en rouge) pour s'attacher à l'acide hyaluronique (HA, en bleu). Image inspirée de Roughley (2006). **B)** Schéma montrant la structure des disaccharides de CS et de KS, ainsi que les sites anioniques (en rouge). Image tirée du site internet du "Orthopaedic Research Center, Colorado State University".

2.1.3 Anisotropies

La structure et la composition du cartilage articulaire varient selon sa profondeur ; les différences incluent la forme et le volume des cellules, le diamètre et l'orientation des fibrilles de collagène, ainsi que la concentration en protéoglycanes. Le cartilage peut être divisé en quatre zones (figure 2.5) : la zone superficielle (zone I), la zone de transition (zone II), la zone profonde (zone III) et la zone calcifiée (zone IV).

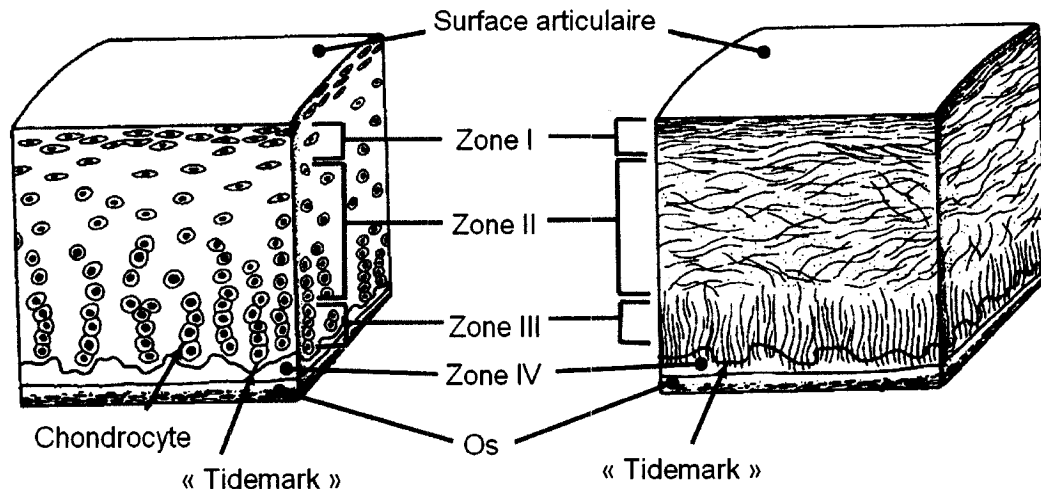


Figure 2.5 : Zones en profondeur du cartilage articulaire mature.

Images montrant les différences entre les différentes zones en profondeur du cartilage articulaire. Image tirée de Mow et al. (1989).

La zone superficielle forme la surface glissante du cartilage. Les minces fibrilles de collagène sont parallèles à la surface, les chondrocytes sont allongés (avec l'axe long parallèle à la surface) et le contenu en protéoglycanes est à son plus bas niveau. La zone

de transition contient des fibres de collagène sans orientation préférentielle qui ont un diamètre plus grand, et les chondrocytes y ont une apparence plus ronde. La zone profonde contient la plus forte concentration de protéoglycanes et la plus faible en eau ; les fibrilles de collagène ont un gros diamètre et sont perpendiculaires à la surface articulaire. Les chondrocytes y sont polygonaux et disposés en colonnes. La zone profonde est séparée de la zone calcifiée par une frontière appelée, en anglais, la « tidemark ». La dernière zone, celle du cartilage calcifié, sépare le cartilage hyalin de l'os sous-jacent (Hunziker et al., 2002). Elle est caractérisée par des chondrocytes sphériques dans des lacunes non calcifiées et l'ancrage de fibrilles de collagène perpendiculaires à la surface articulaire (Poole, 1997).

La MEC est aussi divisée en régions qui dépendent de leur proximité aux chondrocytes : péricellulaire, territoriale et interterritoriale (figure 2.6). Poole (1997) résume bien les différences entre ces trois matrices (c'est la référence de ce paragraphe). La matrice péricellulaire est une fine couche adjacente à la membrane cellulaire et entoure complètement le chondrocyte. Elle est enrichie d'acide hyaluronique, de protéoglycanes sulfatés, de biglycane, et d'une variété de glycoprotéines matricielles comme la protéine de liaison, la fibronectine et la laminine ; c'est aussi dans cette région que les collagènes type VI et IX sont concentrés. Les fibrilles de collagène sont très fines dans la matrice péricellulaire et tissent une enceinte compacte autour de chaque chondrocyte. Dans la matrice territoriale, les fibrilles sont empaquetées radialement au chondrocyte et sont séparées par des régions riches en protéoglycanes. La matrice interterritoriale est la plus

grande des régions et contribue majoritairement aux propriétés mécaniques du cartilage articulaire. Elle comprend toute la matrice entourant les matrices territoriales, contient les grosses fibrilles de collagène et la majorité des protéoglycanes (Mankin et al., 1994). Les protéoglycanes riches en kératane sulfate semblent plus concentrés dans la matrice interterritoriale, alors que les protéoglycanes riches en chondroïtine sulfate semblent plus concentrés dans la matrice territoriale.

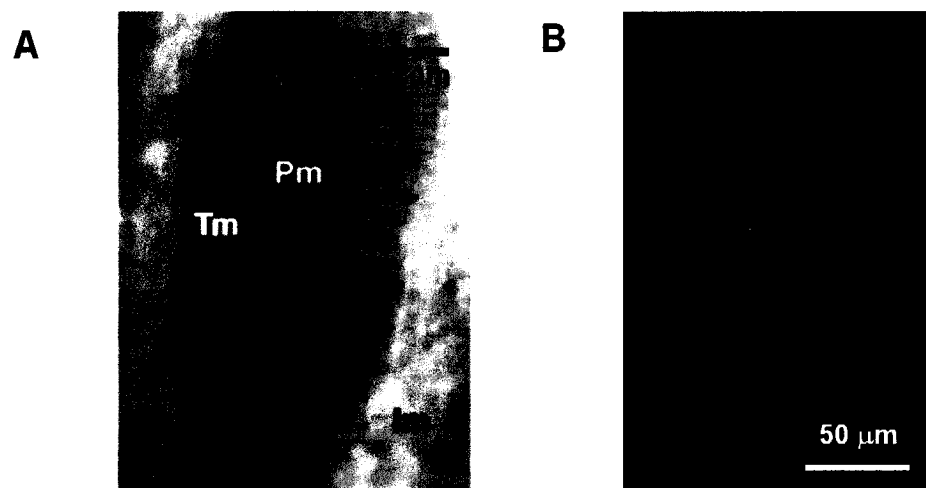


Figure 2.6 : Environnement péri-cellulaire du cartilage articulaire.

A) Image montrant les matrices péri-cellulaire (Pm), territoriale (Tm) et interterritoriale (Im). Image tirée de Poole et al. (1997). B) Marquage du collagène type VI (en bleu) dans la matrice péri-cellulaire. Le noyau (en vert) et l'intégrine $\beta 1$ (en rouge) sont aussi marqués. Image tirée de Söder et al. (2002).

2.1.4 Dynamique de compression

Le cartilage articulaire est constamment sollicité au niveau mécanique. La stabilisation du système squelettique et les mouvements du corps assurés par les ligaments, tendons, muscles et ménisques, tout comme la gravité et les impacts avec les éléments externes, soumettent le cartilage articulaire à des forces de compression et de cisaillement.

L'importance de la structure du cartilage articulaire est mise en évidence lorsqu'on apprécie comment il réagit à une force de compression (expliqué dans Schulz and Bader, 2007). Au début de la compression, la phase fluide tend à s'écouler de la zone sollicitée afin de permettre une réduction de volume. Mais la faible distance entre les chaînes de GAGs, fixées aux agrégats retenus par le réseau de fibrilles, induit une force de friction s'opposant au mouvement de fluide, produisant une pression hydrostatique et prévenant un écrasement trop rapide du cartilage. Si la compression se poursuit, l'exsudation du fluide permet l'amincissement graduel du tissu dans la direction de la force, ce qui augmente la concentration d'agrégats et conduit à une réduction de la perméabilité hydraulique (i.e. qu'il est plus difficile pour le fluide de se déplacer), ainsi qu'une répulsion grandissante des charges négatives entre elles. Parallèlement s'ensuit un étalement radial limité par la forte résistance en tension du réseau de fibrilles. La déformation est stoppée une fois que l'équilibre entre la force extérieure, la répulsion entre les charges négatives, la pression osmotique et la résistance en tension du réseau de fibrilles créent un équilibre. Des compressions trop rapides peuvent endommager la MEC et les cellules du cartilage en créant une pression hydrostatique trop grande (Morel

et Quinn, 2004). Des impacts de grande amplitude peuvent aussi endommager le cartilage, en causant une dénaturation des fibrilles de collagène (Thibault et al, 2002).

2.1.5 Modélisation du comportement mécanique du cartilage

Le comportement du cartilage articulaire soumis à des forces extérieures peut être modélisé mathématiquement. Par exemple, le déplacement relatif du fluide par rapport à la matrice solide et la traînée frictionnelle associée, prédits par la théorie biphasique ou poroélastique, permettent de décrire la réponse mécanique du cartilage soumis à des compressions en configuration confinée (Mow et al., 1980; Frank et Grodzinsky, 1987; Buschmann et al., 1998), qui empêche l'expansion latérale du tissu.

En compression non-confinée, l'anisotropie de la rigidité du solide (Cohen et al., 1992) ou le renforcement par un réseau de fibrilles (Soulhat et al., 1999) doit être inclus au modèle biphasique, venant du fait que le module élastique en tension soit d'environ 10 fois supérieur au module élastique en compression. Le modèle renforcé de fibrilles (modèle composite) permet de relier ses différents constituants (matrice solide et réseau de fibrilles) à la composition biochimique du cartilage (collagène et PGs). De plus, à l'aide du calcul par éléments finis, les hétérogénéités et les non-linéarités du tissu peuvent être incorporées dans le modèle composite (Li et al., 2000 et 2002), tout comme la viscoélasticité du collagène (Li et Herzog, 2004; Li et al., 2005).

D'autres modèles permettent de représenter les effets électrocinétiques (Lai et al., 1991; Gu et al., 1998), ou la présence d'inclusions sphériques représentant les cellules (Federico et al., 2005). Les différents modèles ne sont pas appliqués seulement aux tests en compression, mais aussi aux tests en tension (Li et al., 2005) et en indentation (Korhonen et al., 2002; Li et Herzog, 2005; Lux Lu et al., 2007).

2.2 Systèmes de culture de chondrocytes

La culture *in vitro* permet de réduire les expérimentations effectuées sur les cobayes humains et les animaux de laboratoire. De plus, elle est utilisée comme outil de prolifération et de formation de tissu *de novo* pour les techniques d'implantation autologue.

2.2.1 Explants

La culture de cartilage sous forme d'explants est une technique simple pour maintenir les chondrocytes viables *in vitro* (Dumont et al., 1999). L'avantage de cette dernière est qu'elle conserve les caractéristiques histologiques du tissu d'origine et les interactions structurales entre les cellules et leur environnement immédiat. Les explants sont entre autres adaptés pour la caractérisation mécanique et les études de mécano-transduction. Toutefois, comme les chondrocytes sont emprisonnés dans la MEC, la culture d'explant n'est pas adaptée pour la multiplication cellulaire.

2.2.2 Monocouches

La prolifération des chondrocytes peut-être largement augmentée en utilisant la technique de culture la plus répandue pour plusieurs types cellulaires : la culture en monocouche. Les chondrocytes sont libérés de leur MEC par digestions enzymatiques (qui varient selon l'espèce utilisée), puisensemencés en Pétri. Initialement de forme plutôt sphérique, les chondrocytes en monocouche s'attachent au plastique et adoptent une forme allongée, typique d'une morphologie fibroblastique. Une fois la confluence atteinte après maintes divisions, les chondrocytes sont détachés par un traitement à la trypsine,ensemencés à nouveau (concept de passage cellulaire). À chaque passage sera augmenté le nombre total de cellules, du moins jusqu'à sénescence. Cette capacité de prolifération est mise à profit en ingénierie tissulaire afin de multiplier le peu de chondrocytes prélevés chez un patient, avant de les réimplanter en quantité suffisante.

Le désavantage majeur des monocouches est indiscutablement la dédifférenciation qu'elle induit (Schnabel et al 2002). La perte du potentiel chondrogénique en monocouche est associé avec une diminution des marqueurs cartilagineux et la suppression de l'activation de protéines de signalisation, ce qui peut mener à l'apoptose (Schulze-Tanzil et al., 2004). Il a été montré que les chondrocytes dédifférenciés peuvent retrouver une morphologie chondrocytique, une fois remis en culture tridimensionnelle comme l'agarose (Benya and Shaffer, 1982). Toutefois, cette capacité de redifférenciation diminue rapidement avec le nombre de passages (Zaucke et al., 2001).

2.2.3 Haute densité

La dédifférenciation peut être limitée en ensemençant les chondrocytes à haute densité (Watt, 1988), de façon à ce que leur étalement soit empêché par les contacts entre cellules. Les chondrocytes sont ensemençés à haute densité sur différents substrats : plastique, membranes (Masuoka et al., 2005), polyphosphate de calcium (Waldman et al., 2002), etc. Certains utilisent l'expression « culture en culot » (ou « pellet culture » en anglais) pour désigner les cellules qui sont sédimentées passivement par gravité (Lübke et al., 2005) ou par centrifugation (Tallheden et al., 2004). En plus de prévenir la dédifférenciation, il semble que la culture à haute densité puisse induire la redifférenciation de chondrocytes précultivés en monocouche (Tallheden et al., 2004). L'augmentation de l'épaisseur des culots qui augmente avec le temps de culture est le résultat du développement d'une MEC en presque absence de prolifération (Lübke et al., 2005), les rendant inefficaces en tant que système de multiplication cellulaire. Le faible taux de prolifération observé pour les cultures à haute densité pourrait être le fruit d'un manque de diffusion des nutriments et déchets, ou d'un manque d'adhésion cellulaire avec un substrat matriciel.

2.2.4 Matrices tridimensionnelles

Le manque de diffusion à l'ensemencement peut-être évité en encapsulant les chondrocytes dans des matrices tridimensionnelles. Une multitude de matériaux, naturels ou synthétiques, sont utilisés comme support afin d'étudier les mécanismes de régulation des chondrocytes, et aussi pour fabriquer du cartilage *in vitro* qui pourra être implanté

chez un patient (MACI). D'innombrables études ont pour but d'optimiser ces systèmes de culture afin d'optimiser la production de cartilage hyalin, en variant les matrices utilisées, les stimulations mécaniques appliquées, les facteurs de croissance ajoutés, etc. Bien que la prolifération soit possible dans la plupart de ces matrices, elle demeure quand-même limitée par le manque d'espace. De plus, des problèmes au niveau de la biocompatibilité et de la biodégradabilité peuvent survenir avec certains matériaux une fois implantés.

2.2.5 Suspension

La prolifération n'est pas restreinte par le manque d'espace dans les cultures en suspension car les cellulesensemencées ne sont entourées que par du fluide. Cependant, l'agrégation vient rapidement infirmer la dernière affirmation en induisant rapidement la formation de larges amas cellulaires. Certains voient l'agrégation comme un avantage (Handsichel et al., 2007; Bueno et al., 2004) et l'utilisent comme modèle *in vitro*, parfois appelé « culture en micromasse », qui recrée la condensation survenant lors du développement. D'autres la voient comme un désavantage, qui limite grandement la division cellulaire. La culture en suspension pourrait devenir un important outil de multiplication cellulaire si l'agrégation y était réduite (Gigout et al., 2005). Les chondrocytes ainsi proliférés pourraient être utilisé en ACI avec des chondrocytes non-dédiérenciés, tout en éliminant l'utilisation de matrice.

2.3 Effets de l'âge sur le cartilage articulaire et les chondrocytes

Les processus dégénératifs observés dans le cartilage arthrosique sont distincts du phénomène de vieillissement. Toutefois, ce dernier compromet la stabilité du cartilage de différentes façons, jouant un rôle dans la progression de la maladie. Aigner et al. (2007) ont récemment dressé un portrait rassemblant les effets de l'âge sur le cartilage et ses cellules. Globalement, il semble que la sénescence cellulaire et les modifications de la MEC limitent le remodelage efficace du tissu chez les individus âgés, induisant l'accumulation de dommages causé par les forces mécaniques et les enzymes de dégradation. Les résultats obtenus par des études spécifiques sont énumérés dans les sous-sections suivantes.

2.3.1 Effets de l'âge *in vivo* et *in situ*

Le contenu en ADN normalisé sur le volume diminue pendant la maturation du cartilage articulaire (CA) de cheval (Brama et al., 2000 ; Brama et al., 1999), et le nombre de cellules apoptotiques augmente avec l'âge dans le CA des souris C57BL/6 (Adams et al., 1998). Dans le CA humain, l'activité de la β -galactosidase reliée à la sénescence cellulaire augmente avec l'âge, alors que l'activité mitotique et la longueur moyenne des télomères diminuent (Martin et Buckwalter, 2001).

En vieillissant, la longueur des agrécanes diminue et devient plus hétérogène (Buckwalter et al., 1985), ses fragments libres contenant le domaine G1 s'accumulent (Maroudas et al., 1998), sa concentration en région C-terminale diminue (Dudhia et al., 1996), et le

pourcentage d'agrécanes portant les domaines G1 et G3 est réduit (Flannery et al., 1992). Les contenus en HA et en chaînes de KS augmentent avec l'âge, mais le contenu en chaînes de CS tend à diminuer (Platt et al., 1998 ; Holmes et al., 1988 ; Elliot et Gardner, 1979 ; Bayliss. et Ali, 1978 ; Thonar et al., 1978 ; Inerot et al., 1978). Chez le lapin, la perte de PG induite par IL-1 est moins sévère dans les animaux immatures, augmente jusqu'à maturité de l'animal, puis demeure constante ; la tentative de repeuplement en PG suivant l'injection de IL-1 est plus rapide dans les animaux immatures (Arner, 1994). Dans le genou de souris, TGF- β 1 amplifie l'inflammation induite par IL-1, mais neutralise l'effet nuisible de IL-1 sur la synthèse et le contenu des PG; cette protection offerte par TGF- β 1 n'a pu être démontrée chez les souris matures (van Beuningen et al., 1994). Dans la CA équin, le niveau d'ARNm de TGF- β montre une augmentation jusqu'à l'approche de la maturité, puis une diminution avec le vieillissement (Nixon et al., 2000). Dans le CA humain normal, le tissu âgé contient une plus grande proportion de fragments d'agrécanes tronqués en C-terminal, mais un plus petit contenu en décorine et en biglycane (Vilim et Fosang, 1994), et le ratio du petit PG dermatane sulfate est réduit (Vilim et Krajickova, 1990) ; la forme non-PG de biglycane augmente avec l'âge (Roughley et al., 1993) ; le niveau d'ARNm de biglycane diminue avec l'âge, tandis que celui de décorine augmente (Roughley et al., 1994). Le CA canin est plus susceptible aux dommages induits par le sang (inhibition de la synthèse des PG et diminution du contenu en PG) à un bas âge (Roosendaal et al., 2000).

Dans le CA humain, le niveau de pentosidine augmente avec l'âge (De Groot et al., 1999; Bank et al., 1998), tandis que l'hydroxylation des lysyls ainsi que les liaisons covalentes hydroxyllysylpyridinoline et lysylpyridinoline sont à peu près constantes durant la vie (Bank et al., 1998).

2.3.2 Effet de l'âge dans les cultures d'explants

La synthèse d'ADN diminue avec l'âge dans les condyles mandibulaires des souris CW-1, mais les tissus âgés traités avec PTH-(1-84), PGE1 et dexaméthasone peuvent retrouver leur capacité de synthétiser de l'ADN (Livne et al., 1989). Les différents isoformes de PDGF n'ont aucun effet sur la synthèse d'ADN dans des explants de CA bovin de différents âges, cultivés sans sérum (Schafer et al., 1993).

La synthèse des PG dans les explants de CA mature, en comparaison à celle des explants de CA immature, est soit réduite (Iqbal et al., 2000 ; De Groot et al., 1999 ; Bolton et al., 1999), soit augmentée (Little and Ghosh, 1997). Le taux d'incorporation de l'agrécan en agrégats diminue avec l'âge du donneur (Bayliss. et al., 2000), mais le niveau d'ARNm de l'agrécan est au même niveau (Bolton et al., 1999). Le contenu en décorine augmente (Del Santo et al., 2000), le taux de synthèse et le niveau d'ARNm de la LP diminuent (Bolton et al., 1999), les PG et les GAGs sont plus petits mais enrichis en KS et en Ch-6S (Front et al., 1989), et les patrons de sulfation varient (Bayliss et al., 1999) avec l'âge du donneur. La stimulation de synthèse des PG par TGF- β 1 (Iqbal et al., 2000), PDGF (Schafer et al., 1993), IGF-I et FBS diminue avec l'âge du donneur

(Barone-Vareles et al., 1991). La culture d'explants de CA de lapin montre qu'il y a des changements dus à l'âge de l'animal-donneur qui augmentent la proportion de PG, totaux et nouvellement synthétisés, qui sont susceptibles au catabolisme rapide (Sandy et Plaas, 1986).

La culture de CA de souris démontre une diminution avec l'âge de l'animal-donneur dans la synthèse de protéines collagéniques ; l'incorporation de ^3H -proline est augmentée par PTH-(1-84), dexaméthasone, PGE1, PGE2 et TGF- β dans les cellules des jeunes donneurs, mais seulement par PGE1 et PGE2 pour les cellules d'animaux matures (Livne et Weiss, 1993). Dans les explants bovins, il est montré que les chondrocytes de veau synthétisent beaucoup plus de collagène que les chondrocytes de vaches (Front et al., 1989). Les compressions cycliques ne stimulent pas la synthèse de matrice dans les explants de cartilage humain provenant de personnes âgées, contrairement aux résultats obtenus pour le tissu d'individus plus jeunes (Plumb and Aspden, 2005)

2.3.3 Effets de l'âge dans les cultures en monocouches

Pour les chondrocytes en monocouche, la prolifération diminue de façon marquée avec l'âge de l'animal-donneur chez le lapin (Plaas et Sandy, 1984) et chez le rat (Ribault et al., 1998). La stimulation de la synthèse d'ADN par les facteurs de croissance diminue aussi avec l'âge de l'animal-donneur : la réponse à IGF-I (Messai et al., 2000) et à EGF (Ribault et al., 1998) chez le rat, la réponse à TGF- β 1 (Rosen et al., 1997 ; Guerne et al., 1995) et à PDGF-AA (Guerne et al., 1995) chez l'humain.

Le pourcentage d'agrégation des PG diminue avec l'âge du donneur (Plaas et Sandy, 1984). IGF-I augmente la synthèse des PG et l'expression de l'ARNm de l'agrécan, mais les cellules des vieux animaux répondent faiblement (Messai et al., 2000). IGF-I induit une augmentation de l'ARNm du collagène type II dans les chondrocytes des jeunes rats seulement (Messai et al., 2000).

2.3.4 Effets de l'âge dans les cultures en matrice tridimensionnelle

Le contenu en ADN diminue pendant la première semaine de culture de chondrocytes humains dans l'agarose, indiquant qu'une proportion des cellules ne survit pas à la technique d'ensemencement; pendant la seconde semaine, le contenu d'ADN demeure stable et n'est pas influencé par l'âge du donneur (Verbruggen et al., 2000). Dans l'agarose ou l'alginate, la prolifération des chondrocytes humains est très basse pour les donneurs matures, mais est élevée pour les immatures (Hauselmann et al., 1992). Kamada et al. (2002) ont observé que les chondrocytes bovins en alginate prolifèrent plus rapidement chez les jeunes adultes que chez les fœtus et les animaux âgés.

La culture de chondrocytes humains dans l'agarose montre que la synthèse d'agrécan diminue avec l'âge du donneur, tout comme la proportion de gros agrégats (Verbruggen et al., 2000). Dans les cultures en alginate de chondrocytes de rat, la synthèse de PG diminue avec l'âge, peu importe la dose d'IGF-I ajoutée (Martin et al., 1997). L'agrécan produit par les chondrocytes humains ou bovins cultivés dans l'agarose ou dans l'alginate varie en dimensions, dépendamment de l'âge (Hauselmann et al., 1992).

Les chondrocytes de singe cultivés dans l'alginate démontrent un déclin, relié à l'âge, de la stimulation de la synthèse des PG en réponse à IGF-I (Loeser et al., 2000). La culture en alginate de chondrocytes bovins démontre une augmentation de l'accumulation d'HA dans les billes avec l'âge, accompagnée d'une diminution des contenus en PG et en collagène (Kamada et al., 2002).

2.3.5 Synthèse des effets de l'âge

Les observations sur l'effet de l'âge sont rassemblées dans le tableau 2.1. Les données obtenues *in vivo*, *in situ* et sur les explants cultivés *in vitro* ont montré une baisse généralisée de la synthèse d'ADN, de la synthèse de MEC, et de la réponse aux facteurs externes (cytokines et compressions mécaniques) avec l'âge du donneur. Ces baisses sont accompagnées de modifications au niveau de la composition de la MEC (augmentation de la pentosidine dans le réseau de collagène, baisse d'agrégation des PGs, variations du ratio des différents PGs).

Les études effectuées avec des chondrocytes isolés de leur tissu d'origine permettent d'observer les variations qui sont indépendantes de la MEC déjà présente. Les résultats obtenus avec les cultures en monocouche montrent une baisse de prolifération et de synthèse de MEC, mais leur validité est questionnable étant donnée la dédifférenciation induite.

Dans la culture en matrice 3D, qui permet de conserver le phénotype chondrocytique, la modulation de la prolifération avec l'âge du donneur n'est pas aussi claire que dans les autres systèmes de culture. De plus, au moment de débiter le projet présenté dans le présent document, aucune donnée n'était disponible à propos de la synthèse de collagène en fonction de l'âge du donneur, pour les chondrocytes en matrice 3D. Ce n'est qu'en 2002 que Kamada et al. ont montré une dépendance avec l'âge du contenu de collagène accumulé par les chondrocytes cultivés en alginate (* dans le tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Effets de l'âge sur les chondrocytes et le cartilage articulaire.

	ADN & prolifération	PG	Collagène	Stimulations réduites
<i>In vivo & in situ</i>	↑ Apoptose ↑ Sénescence	≠ Forme d'agrécan ≠ Ratio des différents PGs	↑ Pentosidine	TGF-β1
Explants <i>in vitro</i>	↓ Prolifération	↓ Synthèse ↓ Agrégation ≠ Ratio des différents PGs	↓ Synthèse	TGF-β1 PDGF IGF-I PTH-(1-84) Mécaniques
Monocouche	↓ Prolifération	↓ Synthèse ↓ Agrégation	↓ ARNm	IGF-I EGF TGF-β1 PDGF-AA
Matrice 3D	Différentes modulations	↓ Synthèse ↓ Agrégation ↑ HA	↓ Synthèse *	IGF-I

Chapitre 3: Synthèse de l'article et structure du projet

Le présent chapitre expose une synthèse de l'article présenté au chapitre 5 (dans sa version publiée), ainsi que la structure des étapes ultérieures du projet.

3.1 Synthèse de l'article

Le cartilage articulaire ne possède qu'une capacité limitée de se réparer de lui-même, et les traitements chirurgicaux ne parviennent pas à promouvoir une guérison à long terme. Parmi les techniques en développement pour la régénération de cartilage, certaines stratégies d'ingénierie tissulaire combinent des chondrocytes primaires avec différentes matrices tridimensionnelles afin d'obtenir des tissus de remplacement implantables (MACI). Une multitude d'études utilisant ces systèmes évaluent l'effet des paramètres physiques et des facteurs de croissance afin d'obtenir des construits qui mèneront à un tissu hyalin fonctionnel et bien intégré, une fois implantés dans la lésion. Plusieurs expériences (recensées dans le chapitre 2) ont révélé que le métabolisme intrinsèque et la réponse aux facteurs externes varient avec l'âge de l'animal-donneur. Malgré ces résultats, presque la totalité des études *in vitro* ayant pour but d'optimiser les techniques de MACI utilisent encore des chondrocytes immatures.

Bien qu'une baisse de synthèse ou de contenu de PG liée à l'âge ait été observée à maintes reprises dans les systèmes de culture tridimensionnels (Verbruggen et al., 2000; Martin et al., 1997; Hauselmann et al., 1992; Loeser et al., 2000; Kamada et al., 2002) seulement une étude a reporté une diminution au niveau du collagène (Kamada et al., 2002). Des résultats contradictoires ont été obtenus à propos de la prolifération cellulaire : certains ont observés une baisse de prolifération avec l'âge (Hauselmann et al., 1992), tandis que d'autres n'ont observé aucun effet (Verbruggen et al., 2000). Kamada et al. (2002) ont noté que la prolifération des cellules âgées est supérieure à celle des cellules fœtales.

La caractérisation des propriétés mécaniques est un aspect primordial dans l'évaluation d'un construit cartilagineux produit par ingénierie tissulaire. Cependant, aucune donnée mécanique en fonction de l'âge n'est disponible pour de tels tissus. Le modèle biphasique renforcé de fibrilles (Soulhat et al., 1999) a déjà été utilisé, en combinaison avec des compressions non-confinées, pour décrire les propriétés mécaniques intrinsèques du cartilage articulaire (Fortin et al., 2000). Toutefois, il n'a jamais été utilisé pour des construits *in vitro*.

3.1.1 Hypothèses proposées dans l'article

Dans cette étude, la culture en agarose a été effectuée avec des chondrocytes bovins prélevés d'animaux de trois groupes d'âge différents afin de vérifier les trois hypothèses suivantes : 1) la prolifération cellulaire, la synthèse et l'accumulation de MEC sont

réduites avec l'âge du donneur, 2) ces variations de performance de cellules induisent des différences au niveau des propriétés mécaniques du construit, et 3) les propriétés mécaniques des construits corréleront avec leur contenu matriciel.

3.1.2 Effet de l'âge sur la prolifération, la synthèse et l'accumulation de MEC

Les chondrocytes sont isolés à partir de cartilage articulaire de têtes humérales provenant de trois groupe d'âge différents (fœtus, 1 à 2 ans, 5 à 7 ans), encapsulés en agarose et cultivés pendant 26 jours. La densité cellulaire, le contenu en GAG et en collagène sont évalués à l'aide d'essais déjà établis (essais Hoechst et DMB, dosage d'hydroxyproline) suite à une digestion à la papaïne. De plus, la présence de MEC est évaluée par histologie, à l'aide des colorations à la Safranine-O et au « Fast Green » effectuées sur des sections de paraffine. Les taux de synthèse des PGs et du collagène sont déterminés par la mesure d'incorporation de sulfate et de proline radioactifs, respectivement.

Les résultats montrent que les chondrocytes bovins d'animaux âgés ont une capacité réduite de proliférer, de synthétiser et d'accumuler une MEC, comparativement aux chondrocytes des jeunes adultes et des fœtus et que l'accumulation de collagène est réduite d'une façon plus prononcée. La baisse du contenu en GAGs est majoritairement une conséquence de la densité cellulaire réduite, qui résulte d'une baisse de prolifération. Contrairement, la concentration de collagène montre une forte diminution même une fois normalisée sur la densité cellulaire, accompagnée d'une réduction de l'incorporation de proline.

3.1.3 Effet de l'âge sur les propriétés mécaniques

Des tests de relaxation de contrainte, effectués par des compressions en géométrie non-confinée, sont effectués sur les construits d'agarose. À l'aide du modèle biphasique renforcé de fibrilles, trois paramètres mécaniques sont extraits à partir des courbes expérimentales : le module à l'équilibre en compression (E_m), la perméabilité hydraulique (k), et le module fibrillaire en tension (E_f).

Les résultats montrent que l'effet de l'âge de l'animal-donneur sur le contenu de la MEC a un impact sur les propriétés mécaniques. Les chondrocytes provenant d'animaux âgés présentent un module fibrillaire et un module à l'équilibre plus faibles que pour les chondrocytes d'animaux plus jeunes, ainsi qu'une perméabilité hydraulique plus élevée. Le paramètre variant le plus avec l'âge est le module fibrillaire.

3.1.4 Corrélations entre les propriétés mécaniques et les contenus de la MEC

Les corrélations entre les paramètres mécaniques (E_m , k et E_f) et les contenus de la MEC (GAG et collagène) sont déterminées en utilisant des échantillons d'agarose sans cellules, en plus d'échantillons contenant des chondrocytes cultivés en présence ou en absence d'ascorbate.

Expérimentalement, le module fibrillaire corrèle fortement avec le contenu en collagène, tandis que le module à l'équilibre et la perméabilité corrèlent mieux avec le contenu en GAGs. Même si la nature homogène du modèle biphasique renforcé de fibrilles ne

représente pas fidèlement la structure composite de nos construits où des îlots de chondrocytes sont incorporés dans un gel d'agarose, ses paramètres corréleront avec les contenus mesurés de la MEC.

3.1.5 Conclusion de l'article

Cette étude montre que, dans le système de culture en agarose, les chondrocytes provenant d'animaux âgés affichent une capacité intrinsèque réduite à proliférer ainsi qu'à synthétiser et accumuler une matrice de collagène fonctionnelle, comparativement aux chondrocytes d'animaux plus jeunes. Une conclusion importante de ces observations est que les cellules de jeunes animaux adultes (de 1 à 2 ans) ne se comportent pas comme les cellules d'animaux âgés, et ne devraient pas être utilisées comme modèle de cellules adultes.

3.2 Orientation ultérieure du projet : excroissances en interface

Dans les cultures de chondrocytes en agarose, des excroissances sont parfois observées à la surface des construits. Les étapes du projet ultérieures à l'article sont consacrées à l'étude de ces excroissances.

3.2.1 Effet de l'âge sur les excroissances en interface

Dans cette étape (présentée au chapitre 6), l'hypothèse que le contenu cellulaire et la morphologie des excroissances varient avec l'âge de l'animal-donneur est testée. Les excroissances sont observées macroscopiquement, leur densité cellulaire déterminée par

l'essai Hoechst, et leur MEC analysée par histologie (coloration des PGs avec la Safranine-O) et immunohistochimie (marquage des collagènes de type I et II).

3.2.2 Caractérisation des excroissances en interface

Dans cette étape (présentée au chapitre 7), les chondrocytes de jeunes animaux adultes sont cultivés en agarose afin de tester les hypothèses suivantes : 1) les excroissances contiennent des cellules ayant une morphologie sphérique, 2) les excroissances se développent par un mécanisme appositionnel, et 3) la localisation des excroissances varie selon la géométrie des construits d'agarose. La morphologie cellulaire est observée par imagerie confocale, suite au marquage fluorescent des réseaux d'actine et de vimentine ainsi que du noyau. La prolifération cellulaire est déterminée par détection des marqueurs de prolifération Ki67 et BrdU. Afin de déterminer l'effet de la géométrie, les chondrocytes sont cultivés dans des construits d'agarose portant soit une surface convexe, soit une surface concave.

3.2.3 Imagerie par microscopie confocale des cellules vivantes

Dans cette étape (présentée au chapitre 8), l'hypothèse que les chondrocytes ont des activités de migration et de prolifération en surface des construits d'agarose est testée. Pour se faire, les chondrocytes vivants sont imagés par microscopie confocale à intervalles réguliers pendant plusieurs heures. Parmi quatre agents fluorescents utilisés (le dextran fluorescent, le PKH26, la calcéine AM et l'acridine orange), c'est l'acridine orange qui permet de suivre la dynamique cellulaire.

Chapitre 4: Détails techniques et expérimentaux

– Culture de chondrocytes en gel d'agarose

Ce chapitre présente des détails sur la méthodologie employée afin d'isoler, d'encapsuler, de cultiver, et de quantifier les chondrocytes bovins en agarose. Les techniques supplémentaires seront décrites dans les chapitres où elles furent utilisées.

4.1 Provenance des têtes humérales bovines

Les épaules bovines ont été récupérées moins de 24 heures après le sacrifice des bêtes afin d'assurer un maximum de viabilité cellulaire. Les échantillons de fœtus et d'adultes âgés (5 à 7 ans) proviennent de la compagnie COLBEX Abattoir Inc. située au 455, 4^e rang de Simpson à St-Cyrille de Wendover. Les jeunes adultes (1 à 2 ans) proviennent de l'Abattoir Billette située au 3, rue St-Joseph à St-Louis-de-Gonzague. L'échantillon est recouvert de suffisamment de viande autour de l'articulation pour ne pas endommager la capsule articulaire, évitant ainsi le contact avec les microbes, l'écoulement du liquide synovial, et l'assèchement de la surface articulaire.

4.2 Extraction de cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est extrait dès la réception des articulations, en respectant les normes de sécurité établies dans le laboratoire. Tout le matériel utilisé pendant la dissection doit être stérilisé afin de minimiser les chances de contamination. L'humérus

est fixé à une table de dissection par le biais d'un étau; la table et l'étau ont préalablement été nettoyés à l'eau savonneuse et à l'éthanol 70%, et recouverts de papier absorbant. Il est parfois nécessaire d'enlever la viande entourant l'os ou de scier partiellement ce dernier pour assurer la stabilité de l'échantillon dans l'étau.

L'épaule est ouverte à l'articulation à l'aide d'un bistouri, en prenant soin de ne pas toucher la surface articulaire; les gants et outils ayant été en contact avec l'extérieur de l'articulation ne doivent pas être réutilisés pour les étapes ultérieures. Une observation grossière permet de détecter des anomalies (absence de liquide synovial, présence de sang, cartilage abîmé ou de couleur anormale, etc.). La surface articulaire ne doit s'assécher à aucun moment et doit être périodiquement aspergée de solution PBS/Ca/Mg/PS : « phosphate buffered saline » (PBS) riche en calcium (Ca^{2+}) en en magnésium (Mg^{2+}), à laquelle on a ajouté 1% (v/v) d'antibiotique « Penicillin-Streptomycin » (PS). Le cartilage est retiré de l'os sous-jacent avec un bistouri, puis conservé dans un b cher   moitié empli de PBS/Ca/Mg/PS, recouvert de papier d'aluminium et gardé sur glace. Quelques cylindres de cartilage doivent être prélevés avec un punch   biopsie dans le but d'effectuer un test de viabilité cellulaire. La procédure est répétée pour chaque articulation en prenant soin de garder séparément les morceaux de cartilage provenant d'épaules différentes.

Pour vérifier la viabilité des chondrocytes, les cylindres sont tranchés transversalement avec un tranche-tissu (McIlwain Tissue, Mickle Laboratory Engineering). Les tranches

sont incubées pendant 30 minutes à 37°C dans du PBS/Ca/Mg/PS, auquel on a ajouté de 1 μ M de Calcein AM (Molecular Probes) et 1 μ M d'Ethidium Homodimer-1 (Molecular Probes). Une fois rincées, les tranches sont observées par épifluorescence à l'aide d'un microscope inversé (Axiovert S100 TV, Zeiss): les chondrocytes qui émettent en vert sont vivantes alors que les cellules dont le noyau est rouge sont mortes. Le cartilage des différentes épaules dont la viabilité est élevée (>95%) est combiné par groupe d'âge, tandis que le cartilage contenant une grande proportion de cellules mortes est éliminé.

Les étapes ultérieures doivent être effectuées dans un environnement stérile, i.e. sous une hotte biologique. Le liquide est aspiré du bécher initial et les morceaux de cartilage sont transférés vers un bécher contenant du PBS/Ca/Mg/PS frais. L'étape précédente est répétée quatre fois afin d'effectuer cinq rinçages au total. Le cartilage rincé est redistribué dans des « T-Flasks » pré-pesés, par l'entremise d'entonnoirs. Chaque « T-Flask » est rapidement pesé en absence de liquide afin de déterminer la masse de cartilage obtenue. Du milieu de culture est immédiatement ajouté aux « T-Flasks » qui sont placés dans un incubateur humide (à 37°C avec 5% de CO₂) pour la nuit. Le milieu de culture utilisé est le suivant : DMEM High Glucose (Gibco), 3,7 g/l de bicarbonate de soude, 1% (v/v) de PS, 10% (v/v) de Fetal Bovine Serum (FBS), 1% (v/v) de Non-Essential Amino Acids, 2 mM de L-glutamine et 0,4 mM de L-proline.

4.3 Isolation de chondrocytes

Les chondrocytes sont isolés de la matrice initiale selon une méthode largement utilisée pour le cartilage articulaire bovin (Buschmann et al., 1992). Avant de débiter les digestions, les morceaux sont pesés à nouveau; une augmentation de plus de 10% de la masse initiale est le signe d'un cartilage en mauvais état qui s'est gonflé de liquide, et ne doit pas être utilisé. Le cartilage sain est transféré dans un Pétri contenant assez de PBS/Ca/Mg/PS pour éviter l'exposition à l'air, puis découpé en petits morceaux ($\sim 1 \text{ mm}^3$) à l'aide de deux bistouris.

Le cartilage découpé est ensuite digéré pendant 50 minutes à 37°C dans une solution de pronase (56 U/ml, 8 ml/mg de cartilage). Après trois rinçages avec du milieu de culture, le cartilage est digéré pendant 3 heures et demie à 37°C dans une solution de collagénase (752 U/ml, 8 ml/mg de cartilage) contenant 5% (v/v) de FBS. Après centrifugation de l'échantillon (10 minutes à 190 g), le surnageant est retiré, et le précipité homogénéisé dans du milieu de culture est filtré grossièrement (grille de 380 μm d'ouverture, Sigma S0770) afin de se débarrasser des débris de cartilage non-digérés. L'étape précédente (centrifugation, homogénéisation du précipité et filtration) est répétée une première fois en utilisant un filtre plus fin (grille de 74 μm d'ouverture, Sigma, S4145), et une seconde fois avec une membrane aux pores très petits (membrane de nylon de 20 μm d'ouverture, Spectrum, 146150). La densité cellulaire est mesurée à l'aide d'un hémacytomètre. Finalement, le filtrat est centrifugé une dernière fois afin de resuspendre les cellules à une

concentration finale de 20 millions par ml de milieu de culture. La solution cellulaire est maintenue à 37°C jusqu'à l'encapsulation dans l'agarose.

4.4 Préparation de l'agarose, encapsulation et culture

L'agarose (Mandel Scientific, MC50101) est graduellement ajouté à un Erlenmeyer contenant du PBS (absent de calcium, de magnésium et d'antibiotique) brassé par un barreau magnétique, afin d'obtenir une concentration de 4% (m/v) ; l'ajout trop brusque d'agarose induirait son agrégation. Une fois le mélange homogène, l'Erlenmeyer est placé dans un bain d'eau bouillante pendant 20 minutes avec brassage continu. Ensuite, le barreau magnétique est immobilisé pendant que le mélange est encore chauffé, pendant 10 minutes supplémentaires, afin de se débarrasser des bulles. Il vaut mieux ne pas excéder ces temps de chauffage afin d'éviter la dégradation d'agarose.

L'agarose est ensuite transféré dans des tubes de polypropylène de 50ml préchauffés à 55°C, à l'aide d'une pipette sérologique de plastique de 10 ml (la pipette est aussi préchauffée en aspirant quelques fois du PBS stérile à 55°C). Chaque encapsulation (une par groupe d'âge) requiert un tube contenant 6,5 ml d'agarose. Les tubes sont placés dans un bain-marie à 55°C pour abaisser la température de l'agarose.

Quinze minutes avant l'encapsulation d'une solution cellulaire, un tube d'agarose est transféré dans un bain à 37°C. Dans la hotte biologique, un plateau rectangulaire muni de

vis aux quatre coins est ajusté parallèlement au sol à l'aide d'un niveau à bulle, et un Pétri (10 cm de diamètre) y est déposé. Les tubes contenant les cellules et l'agarose sont transférés sous la hotte, dans un bécher contenant de l'eau à 37°C. Avec une pipette sérologique de 25 ml en plastique préchauffée dans du PBS à 37°C, 6,5 ml de la solution cellulaire est transféré dans le tube contenant l'agarose. Le mélange est homogénéisé par 10 cycles d'aspiration-expulsion avec la même pipette, en prenant soin de ne pas créer de bulles, et est ensuite expulsé tranquillement au centre du Pétri nivelé. Le Pétri est fermé à l'aide de son couvercle. Il faut incliner légèrement le Pétri de façon à distribuer uniformément le mélange, avant de le laisser reposer pendant 10 minutes sous la hotte. Le Pétri est ensuite déposé dans un boîtier stérile en plastique fermé, qui est placé à 4°C pendant une heure. L'opération est répétée pour chacun des groupes d'âge. Pendant la solidification du mélange, les plaques de culture 48 puits sont préparées en insérant une rondelle de treillis de nylon (facilitera la diffusion sous l'échantillon) et 1 ml de milieu de culture par puits.

Les échantillons cylindriques sont générés avec un poinçon à biopsie (6 mm de diamètre, Ultident, 15-33-36), puis transférés dans la plaque de culture (un cylindre par puits) avec une spatule stérile. Quotidiennement, les échantillons sont transférés dans une nouvelle plaque avec du milieu de culture frais, à l'aide de pinces. La culture s'est effectuée avec le milieu de culture suivant: DMEM High Glucose (Gibco), 3,7 g/l de bicarbonate de soude, 1% (v/v) de PS, 10% (v/v) de Fetal Bovine Serum (FBS), 1% (v/v) de Non-Essential Amino Acids, 2 mM de L-glutamine et 0,4 mM de L-proline. L'ascorbate (L-

ascorbate de sodium) est ajouté à une concentration de 30 µg/ml quotidiennement, sauf si spécifié autrement.

4.5 Digestion à la papaïne

Pour évaluer leur densité cellulaire ainsi que leurs contenus en collagène et en GAGs, les échantillons sont prélevés à différents moments de la culture et immédiatement pesés (~50 µl par cylindre), congelés et entreposés à -80°C. Les échantillons sont ensuite soumis à une digestion à la papaïne (EC 3.4.22.2), une protéase non spécifique, fraîchement solubilisée à 125 µg/ml de PBE (46 mM Na₂HPO₄, 54 mM NaH₂PO₄, 10 mM Na₂EDTA*2H₂O, pH 6.5) additionnée de 10 mM L-cystéine, pendant 16 heures à 60°C. Cette digestion a pour but de libérer l'ADN des protéines qui lui sont complexées (comme les histones), de séparer les GAGs de la protéine centrale d'agrécan, et de couper les molécules de collagène en petits fragments. Il est important d'effectuer la digestion à une température suffisamment élevée pour dénaturer le collagène afin qu'il soit digéré par la papaïne. Les GAGs et les fragments de collagène sont bien solubilisés après ce traitement enzymatique, mais l'ADN des cellules encapsulées reste emprisonné dans l'agarose. Une étape supplémentaire est donc requise et consiste en l'écrasement de l'agarose avec un pilon, suivi de sa fonte par chauffage à 70°C pendant 10 minutes.

4.6 Essai Hoechst

La quantification par l'essai Hoechst en plaque opaque de 96 puits doit être exécutée immédiatement après la fonte de l'agarose. Pour chaque échantillon à tester, 10 µL est dilué dans 40 µL de PBE, directement dans un puits de la plaque d'analyse. Une courbe standard est préparée en parallèle à l'aide d'ADN (Calf Thymus Type I DNA, Sigma, D1501) préalablement solubilisé dans du PBE à des concentrations connues, afin d'obtenir de 5 à 125 ng d'ADN par puits. 200 µl de Hoechst H-33258 (Molecular Probes, H1398) à 0,2 µg/ml de solution TEN (10 mM de Tris, 1 mM de Na₂EDTA, 100 mM de NaCl, pH 7,4) est ensuite ajoutée à chaque puits. L'intensité de la fluorescence à 460 nm est lue sous excitation à 360 nm, l'aide d'un fluorimètre (Microplate Spectrofluorometer Spectramax Gemini XS).

Chapitre 5: Article – Aged Bovine Chondrocytes Display a Diminished Capacity to Produce a Collagen-rich, Mechanically Functional Cartilage Extracellular Matrix

5.1 Title Page

Aged Bovine Chondrocytes Display a Diminished Capacity to Produce a Collagen-rich,
Mechanically Functional Cartilage Extracellular Matrix

Nicolas Tran-Khanh*, Caroline D. Hoemann*+, Marc D. McKee§, Janet E. Henderson‡,
and Michael D. Buschmann*+

*Institute of Biomedical Engineering and +Department of Chemical Engineering, Ecole
Polytechnique, Montreal, Quebec, Canada

§Faculty of Dentistry and Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University,
Montreal, Quebec, Canada

‡Faculty of Medicine, Centre for Bone and Periodontal Research, McGill University,
Montreal, Quebec, Canada

5.2 Summary

Most fundamental studies in cartilage tissue engineering investigate the ability of chondrocytes from young animals to produce cartilaginous matrix under various conditions, while current clinical applications such as autologous chondrocyte implantation, use chondrocytes from donors that are decades past skeletal maturity. Previous investigations have suggested that several characteristics of primary chondrocytes are age-dependent but none have quantified cell proliferation, proteoglycan synthesis and accumulation, collagen synthesis and accumulation, compressive and tensile mechanical properties in order to examine the effects of donor age on all of these parameters. We enzymatically isolated primary bovine chondrocytes from fetal, young and aged animals and cultured these cells in agarose gels to assess the above-mentioned properties. We found that fetal and young (but still skeletally mature i.e. 18-month-old bovine) chondrocytes behaved similarly, while aged chondrocytes (5 to 7-year-old bovine) displayed diminished proliferation ($\sim 2\times$ less), a slightly reduced proteoglycan accumulation per cell ($\sim 20\%$), and significantly less collagen accumulation per cell ($\sim 55\%$) compared to the younger cells. Histological observations and mechanical properties supported these findings, where a particularly significant reduction in tensile stiffness produced by aged chondrocytes compared to younger cells was observed. Our findings suggest that donor age is an important factor in determining the outcome and potential success when tissue-engineered cartilage is produced from articular chondrocytes. More specifically, primary chondrocytes from aged donors may not

possess sufficient capacity to produce the extracellular matrix that is required for a mechanically resilient tissue.

Keywords : chondrocyte, ageing, collagen, biomechanics, tissue engineering

5.3 Introduction

Mature articular cartilage has a limited self-repair ability, and current surgical treatments fail to provide proven long term healing (Hunziker, 2002). Among the techniques under development for cartilage regeneration, certain tissue engineering strategies combine primary chondrocytes with various scaffolds to grow tissue equivalents. The effects of specific physical parameters (Hunter et al., 2004; Kisiday et al., 2004; Mauck et al., 2003; Waldman et al., 2003) and growth factors (Chaipinyo et al., 2002; Gooch et al., 2001; Weisser et al., 2001) have been widely studied using these systems in order to produce a tissue construct which, once implanted at the site of the cartilage lesion, should lead to a well-integrated and functional hyaline-like replacement tissue.

Characterization of human (Bolton et al., 1999; Grushko et al., 2001), equine (Iqbal et al., 2000), bovine (Barone-Varelas et al., 1991; DiMicco et al., 2002; Front et al, 1989; Schafer et al., 1993), rabbit (Sandy et Plaas, 1986) and mouse (Livne et Weiss, 1993) cultured articular cartilage explants revealed that intrinsic metabolism of chondrocytes and their response to external factors vary with animal age. It has also been shown that chondrocytes isolated from cartilage behave in an age-dependent manner, although many of these studies involved monolayer culture (Dozin et al., 2002; Martin et al., 1997;

Messai et al., 2000; Plaas and Sandy, 1984; Rosen et al., 1997), which induces dedifferentiation of chondrocytes towards a more fibroblastic-like phenotype.

The loss of chondrocyte phenotype can be avoided by directly culturing isolated primary chondrocytes in three-dimensional environments. In alginate and agarose cultures, human chondrocyte proliferation observed by Hauselmann et al. (1992) was lower for a 66-year-old donor versus a 14-year-old donor. Hauselmann et al. (1992) also reported that chondrocytes from the youngest donor synthesized aggrecan molecules with higher average molecular weights. In contrast, Verbruggen et al. (2000) did not observe any proliferation for 2 to 69-year-old human chondrocytes embedded in agarose, but an increase in donor age correlated with reduced aggrecan synthetic rate and a smaller proportion of large aggregates. Loeser et al. (2000), by measuring sulfate and proline incorporation in alginate culture, found a mitigated response of macaque chondrocytes to IGF-1 with increasing animal age. Kamada et al. (2002) observed that primary aged bovine chondrocytes in alginate proliferate less than chondrocytes from young adults, but nonetheless more than fetal chondrocytes. After 2 weeks of culture, Kamada et al. (2002) also observed that proteoglycan and collagen concentrations decreased with cells from older donors, while hyaluronic acid concentration increased.

Mechanical properties of native and engineered tissues are important features to assess in determining functionality. Aggregate modulus and hydraulic permeability have already been determined for agarose constructs (Buschmann et al., 1992) by fitting a biphasic

model (Mow et al., 1980) to the stress-relaxation curves obtained in confined compression. Unconfined compression avoids some of the drawbacks of confined compression (Buschmann et al., 1998) and, combined with the fibril-reinforced biphasic model (Soulhat et al., 1999), has been used to describe intrinsic biomechanical properties of articular cartilage (Fortin et al., 2000). To date, this latter model has not been applied to tissue engineered constructs.

In the present study, bovine articular chondrocytes from three age groups were embedded in agarose to test the following hypotheses : 1) cell proliferation, extracellular matrix (ECM) synthesis and accumulation are reduced with increased age of the donor, 2) these age-dependent variations in chondrocyte performance result in corresponding differences in construct biomechanical properties, and 3) equilibrium modulus and hydraulic permeability of these constructs correlate with glycosaminoglycan (GAG) content, while the tensile fibril modulus of these agarose cultures correlates with collagen content.

5.4 Materials and Methods

Reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless otherwise indicated.

5.4.1 Chondrocytes in Agarose

Articular cartilage was shaved from humeral heads of *Fetal* (last trimester), *Young* (1 to 2-year-old adolescent) and *Aged* (5-7 years old) bovine shoulder joints. Good cell

viability (>95%) was confirmed with Calcein AM and Ethidium Homodimer (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) as described in Dumont et al. (1999). Chondrocytes were enzymatically released with protease type XIV at 56 U/mL high glucose DMEM (H-DMEM)(Gibco, Gaithersburg, MD, USA) for 40 min, and collagenase CLS2 (4177, Worthington Biochemical, Lakewood, NT, USA) at 752 U/mL H-DMEM supplemented with 5% FBS (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) for 3.5 h, according to previously described methods (Buschmann et al., 1992). Low melting temperature agarose (MC50101; Mandel Scientific, Guelph, ON, Canada) was dissolved at 4% (w/v) in cell culture tested PBS (without calcium chloride and magnesium chloride), then sterilized by heating 30 min in a boiling water bath (20 min with stirring, 10 min without stirring to get rid of the bubbles). For each donor age group, chondrocytes in 6.5 mL media were mixed with an equal volume of the agarose solution at 37 °C to produce 1×10^7 cells/mL in 2% (w/v) agarose, then poured in a 100-mm diameter Petri dish. After gelling at room temperature for 5 min and at 4 °C for 1 h, 6-mm diameter disks of 1.8 to 2.0 mm thickness were cored from the slab gel using a stainless steel biopsy punch (4410025, Ultident Scientific, St-Laurent, Quebec, Canada). The chondrocyte-agarose disks were subsequently cultured in 48-well culture plates (Corning, Acton, MA, USA), on top of 1 mm-thick nylon mesh (Spectrum, Rancho Dominguez, CA, USA) to aid nutrient diffusion. Each day, samples were transferred to a new plate filled with complete media: H-DMEM, 3.7 g/L sodium bicarbonate, PS, 10% FBS, non-essential amino acids (1×NAA), 2 mM L-glutamine and 0.4 mM L-proline. After the first night of culture,

media was supplemented with 30 µg/mL fresh sodium L-ascorbate, unless otherwise mentioned.

5.4.2 Electron Microscopy

The fixative used was 4% (w/v) paraformaldehyde and 1% (w/v) glutaraldehyde (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada) in 0.1 M sodium cacodylate (Fisher, Hampton, NH, USA), pH 7.3. Samples were immersed in fixative for one hour at room temperature, then overnight at 4 °C in fresh fixative. Fixed samples were dehydrated through a graded ethanol series and embedded in LR White acrylic resin (London Resin Company, Berkshire, UK). Following a 2-day polymerization of the resin at 55°C and trimming, thin sections (80 nm) were cut using a diamond knife and an ultramicrotome. Sections were mounted on nickel grids and conventionally stained with uranyl acetate and lead citrate. Transmission electron microscopy was performed using a JEOL JEM-2000FX TEM (Tokyo, Japan) operated at 80 kV.

5.4.3 Determination of DNA, Collagen and Glycosaminoglycan Contents

Disks were removed from culture on days 1, 13 and 26, weighed and then stored frozen (-80 °C). Sample volumes were calculated from mass assuming a specific volume of 0.99 µL/mg for 2% (w/v) agarose. Biochemical analysis was performed according to previously described methods (Hoemann et al., 2002). Samples were papain-digested, and agarose disks were crushed with a pestle and melted at 70 °C for 10 min to release trapped DNA. Aliquots of the papain digest were immediately diluted in PBE buffer to

quantify DNA content by the fluorometric Hoechst 33258 assay. GAG content was measured by the spectrophotometric DMB assay. Hydroxyproline residues from hydrolyzed aliquots of the papain digest were oxidized with chloramine-T hydrate and quantified following the colorimetric reaction with Ehrlich's reagent. Collagen contents were evaluated assuming that 13.2% of collagen mass originated from hydroxyproline residues (Hoemann, 2004; Venn et Maroudas, 1977). Aliquots from identically processed agarose disks, but without cells, were added to standard curves to account for any potential interference from agarose hydrogel.

5.4.4 Histology

Fixation was the same as for electron microscopy (above), but glutaraldehyde was replaced by 2.5% (w/v) cetylpyridinium chloride for GAG-stained samples. Fixed samples were embedded in paraffin and sectioned (6 μm thick). Sections were stained for GAG with 0.1% (w/v) Safranin-O for 3 min. Sections were stained for collagen following GAG digestion with 0.1% (w/v) pronase (12 min at room temperature) and 2.5% (w/v) hyaluronidase (30 min at 37 °C), with 1% (w/v) Fast Green for 1 h. Images were acquired with a CCD camera (Micropublisher 3.3 RTV; Q Imaging, Burnaby, ON, Canada) and Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, ON, Canada) using an Axiolab microscope (Carl Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada).

5.4.5 ^{35}S -Sulfate and ^{14}C -L-Proline Incorporation

On day 20, disks were cultured for 24 h in the presence of 20 $\mu\text{Ci/mL}$ ^{35}S -sulfate or 5 $\mu\text{Ci/mL}$ ^{14}C -L-proline (SJ162 and CFB71, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). As performed by Hauselmann et al. (1992), incorporation in macromolecules was determined by subjecting labeling media, dissociative extracts (GuCl extraction buffer) and solubilized residues to PD-10 columns (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) to obtain the macromolecular fraction that was subjected to liquid scintillation (Fisher, Hampton, NH, USA).

5.4.6 Mechanical Testing

Mechanical properties were assessed on days 2, 14 and 21 via stress-relaxation tests in uniaxial, unconfined compression using the Mach-1 micromechanical testing system (BioSyntech, Laval, QC, Canada). Sample diameter and thickness were determined using a digital caliper (Mitutoyo Canada, Mississauga, ON, Canada). Two successive compression ramps, each with amplitude corresponding to 10% of the sample thickness, were applied at a strain rate of 1%/s. After each ramp, stress relaxation continued for 20 minutes. Using the Mach-1 Analysis software (BioSyntech, Laval, QC, Canada), stress-relaxation curves were fit to the fibril-reinforced biphasic model (Soulhat et al., 1999) to determine compressive equilibrium modulus (E_m), hydraulic permeability (k) and tensile fibril modulus (E_f). Mean values of these parameters from the first and second steps were used for further analysis.

On the days of mechanical tests, additional samples were papain-digested and assessed for GAG and collagen contents using methods described above. Mean values of E_m , k and E_f were plotted versus the mean values of GAG and collagen contents to correlate these parameters. In order to obtain constructs with different biochemical compositions, both ascorbate-supplemented (50 $\mu\text{g/mL}$) and ascorbate-free conditions were used, the latter being known to induce underhydroxylation and major reduction of collagen secretion without greatly affecting proteoglycan secretion (Pacifci, 1990). Agarose plugs without cells were also included as controls.

5.4.7 Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with STATISTICA 6.1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Significant differences between age groups in cell density, GAG and collagen concentrations, as well as sulfate and proline incorporation rates were determined by ANOVA followed by the Tukey/Unequal N HSD post-hoc test. Significant differences between age groups in mechanical parameters were determined by MANOVA, using the general linear model routine with age as categorical predictor and culture time as continuous predictor. The degree of linear relationship between ECM contents and mechanical properties was assessed by the Pearson product-moment correlation coefficient (r).

5.5 Results

5.5.1 Efficiency of Chondrocyte Isolation

We initially verified that the enzymatic digestion method was adequate for both aged and fetal cartilage. We initially determined that most GAG was released during the first 40 min of protease XIV digestion (Figure 5.1 A) for both age groups. Then, for tissue already treated with protease for 40 minutes we found almost complete release of cells during the first 3.5 hours (210 min) of collagenase digestion (Figure 5.1 B) for both age groups. Electron microscopy of freshly isolated chondrocytes (40 min protease, 3.5 h collagenase) cultured for only 12 h following seeding in agarose further confirmed effective enzymatic removal of pericellular matrix for both fetal (Figure 5.2 A) and aged (Figure 5.2 B) chondrocytes, since pericellular matrix could not be observed at this time. Aged chondrocytes cultured for 21 days were similarly imaged, ensuring our ability to detect pericellular matrix (Figure 5.2 C).

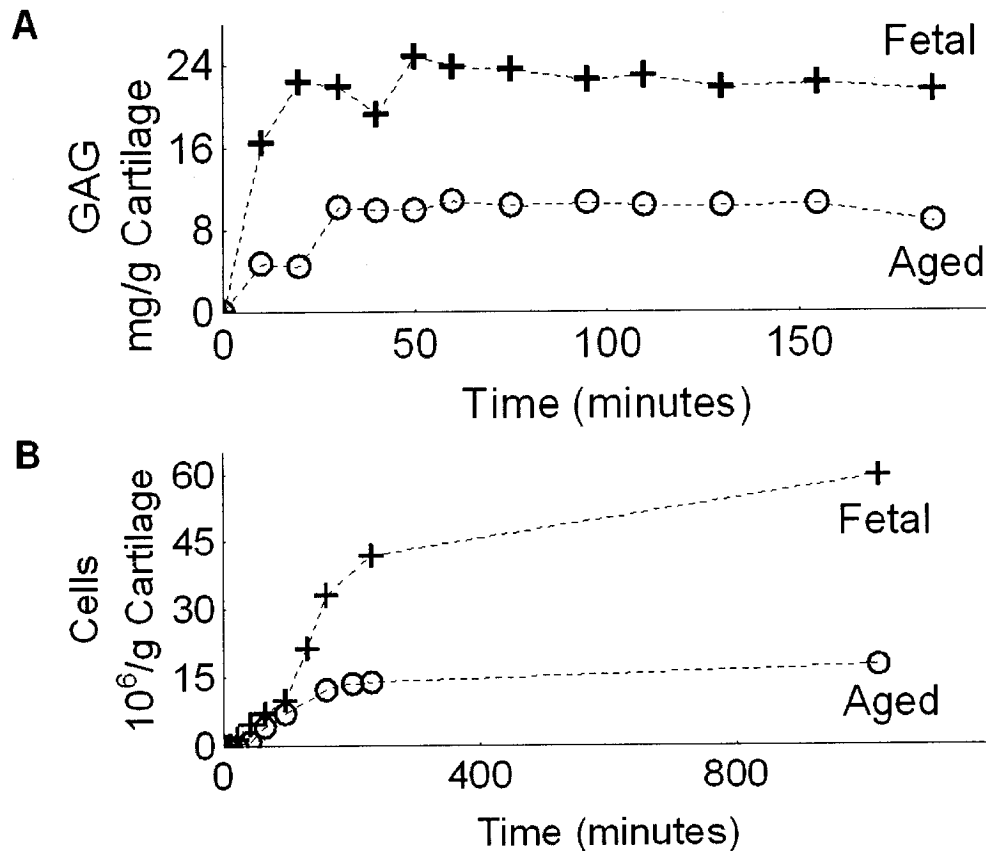


Figure 5.1 : Kinetics of GAG and cell release during enzymatic treatments.

A) Kinetics of GAG release during pronase digestion of fetal and aged fresh articular cartilage were similar, taking into account the greater GAG content of fetal. GAG concentration in the pronase solution was evaluated by the DMB assay.

B) Kinetics of cell release during collagenase digestion of fetal and aged articular cartilage, following a 40 minute pronase digestion, were also similar and reflected a greater cell density in fetal tissue. Cells from the collagenase solution were counted with a hemocytometer.

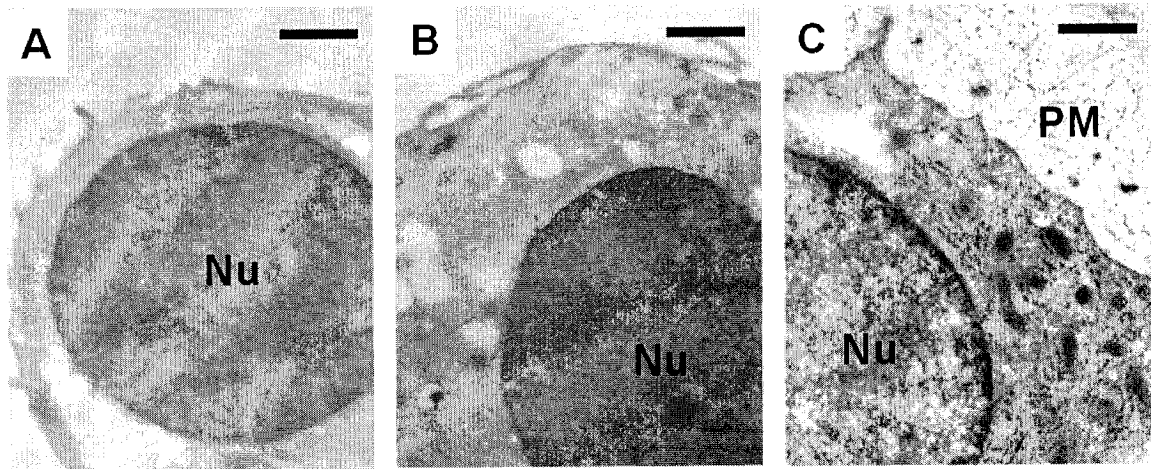


Figure 5.2 : Electron microscopy of enzymatically isolated chondrocytes.

Electron micrographs of enzymatically isolated A) fetal or B) aged chondrocytes after 12 hours of culture in agarose, indicating an absence of pericellular matrix. C) Electron micrograph of an aged chondrocyte after 3 weeks of culture in agarose, showing abundant secreted pericellular matrix. Nu, nucleus; PM, pericellular matrix. Scale bar = 1 μ m.

5.5.2 Cell, GAG and Collagen Contents

Cell density (Figure 5.3 A), GAG content (Figure 5.3 B) and collagen content (Figure 5.3 C) for aged samples were all significantly lower than younger samples during the culture. Only collagen content (Figure 5.3 C) differed between young and fetal samples. Once normalized to cell density, GAG concentration (Figure 5.4, left) was the same for all age groups on day 13, and was 22% lower in aged samples than in fetal samples on day 26. Endpoint normalized collagen concentration (Figure 5.4, right) in aged samples was 60% and 46% lower than in fetal and young samples, respectively.

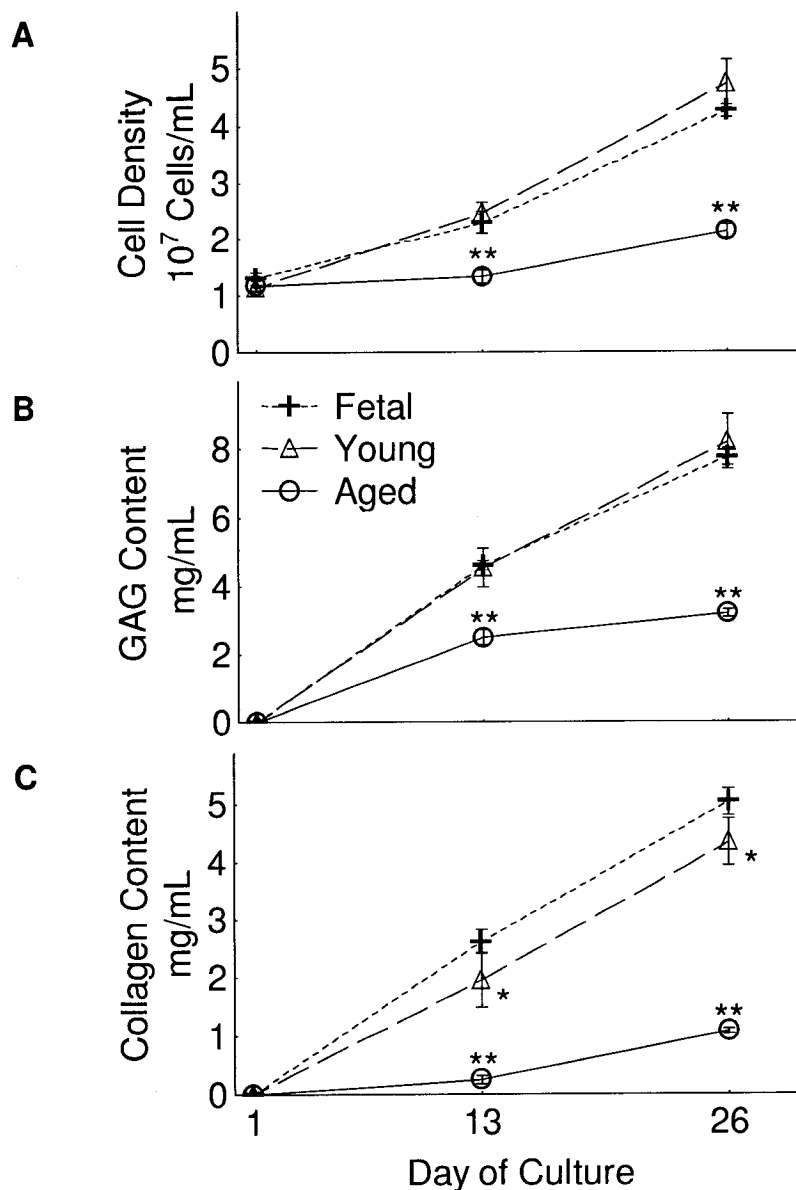


Figure 5.3 : Time evolution of cell and matrix content for three age groups.

Time evolution of cell and matrix content from papain-digested samples of three different age groups (mean $\pm$ SD, n = 3-4). A) Cell density normalized to agarose volume. B) GAG content normalized to agarose volume. C) Collagen content normalized to agarose volume. (*) Significantly lower (p < 0.05) than fetal samples. (**) Significantly lower (p < 0.005) than fetal and young samples.

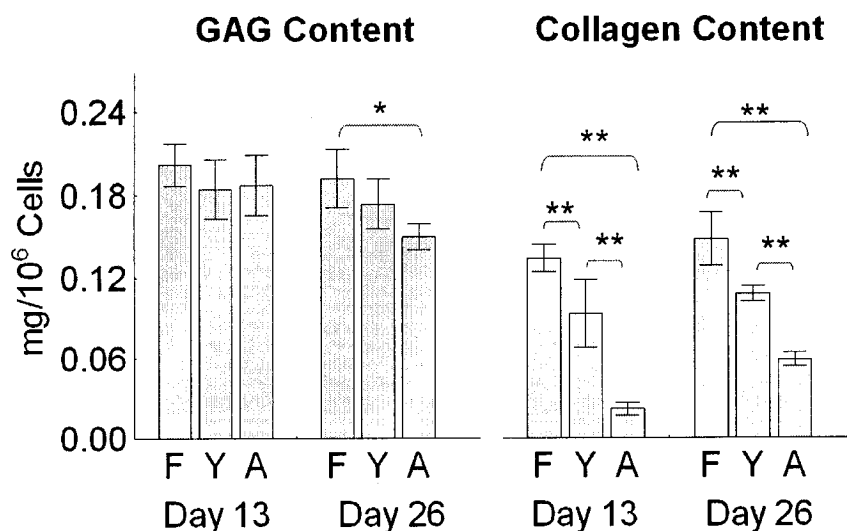


Figure 5.4 : GAG and collagen content normalized to cell density for different age groups.

GAG content and collagen content normalized to cell density (mean $\pm$ SD, $n = 4$) for fetal (F), young (Y) and aged (A) samples on days 13 and 26. Significant differences between age groups are indicated (*) for $p < 0.05$, and (**) for $p < 0.005$.

5.5.3 Sulfate and Proline Incorporation

We did not measure any significant difference with age either in total sulfate incorporation (Figure 5.5, left) nor in the sulfate-labeled macromolecules released in media (which was 11.4% of the total on average). Total proline incorporation (Figure 5.5, right) was significantly reduced in aged samples compared to fetal and young samples (15.9 compared to 19.2-21.9 nmol/10⁶cells/day). The proportion, but not the absolute value, of incorporated proline found in the media was higher in aged than in younger samples (30.9% compared to 24.0-26.8%).

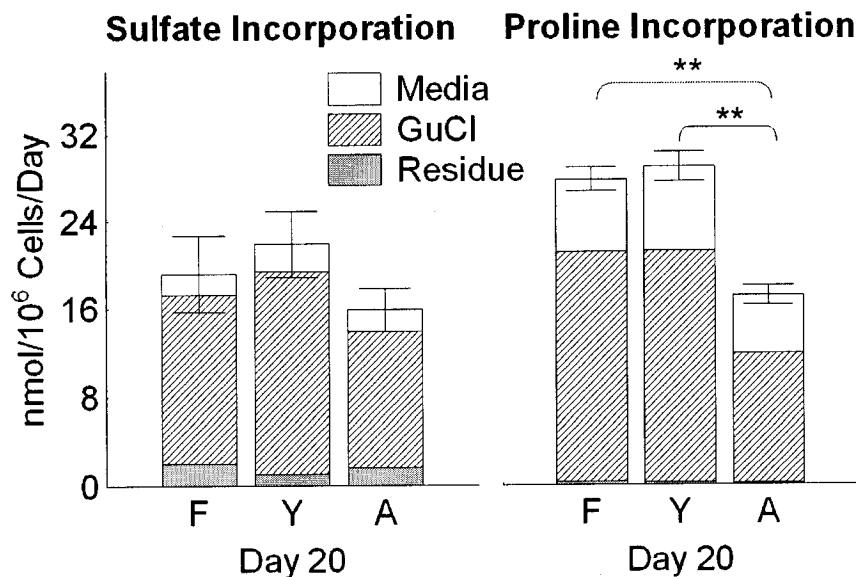


Figure 5.5 : Sulfate and proline incorporation rates for different age groups.

Sulfate and proline incorporation rates for fetal (F), young (Y) and aged (A) samples on day 20. Three fractions are combined (media, dissociative extract, residue) to obtain total mean $\pm$ SD ($n = 3-4$). Significant differences between age groups are indicated (*) for $p < 0.05$, and (**) for $p < 0.005$.

5.5.4 Histology

No differences in staining patterns or intensities were observed when comparing different positions in the radial and axial directions in these cylindrical disks, for any of the three age groups and for both stains (Safranin-O and fast Green). Safranin-O staining for proteoglycan was intense around the fetal (Figure 5.6 A) and young (Figure 5.6 C) chondrocytes, and also around some of the aged chondrocytes (Figure 5.6 E). Safranin-O staining in interterritorial compartments was absent from freshly seeded samples (not shown), but was present for all age groups at the end of the culture. Fast Green staining for collagen was intense and sharp around the edge of fetal chondrocyte islets in a

capsule-like fashion (Figure 5.6 B), while it was less intense and more diffuse in the young (Figure 5.6 D) and barely detectable for aged chondrocytes (Figure 5.6 F).

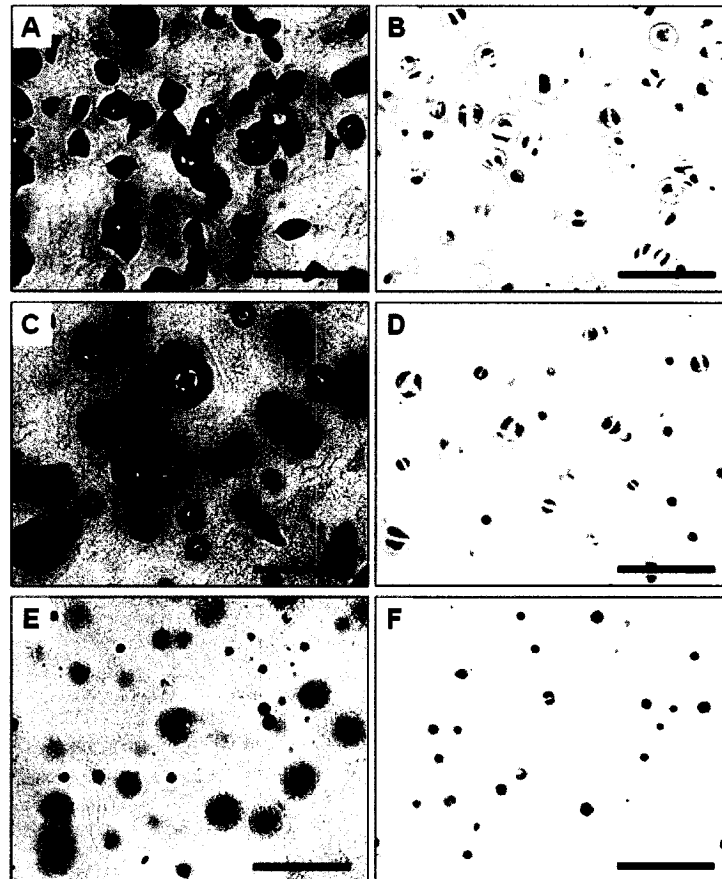


Figure 5.6 : Histology for different age groups.

Paraffin sections showing the histology of chondrocytes and surrounding pericellular matrix after 25 days of culture in agarose. *Left:* Safranin-O stained sections of A) fetal, C) young and E) aged chondrocytes. *Right:* Fast-Green stained sections of B) fetal, D) young and F) aged. Scale bar = 100 μ m.

5.5.5 Mechanical Properties

For cultures with media containing 50 $\mu\text{g/mL}$ ascorbate, fibril modulus (Figure 5.7 A), equilibrium modulus (Figure 5.7 B) and hydraulic permeability (Figure 5.7 C) of the cell-seeded disks were comparable to the controls disks on day 2. On day 14, all three mechanical parameters were more significantly evolved for young compared to aged chondrocytes (Figure 5.7). On day 21, equilibrium modulus (Figure 5.7 B) and hydraulic permeability (Figure 5.7 C) of disks containing aged chondrocytes had almost caught up to those containing young chondrocytes, however the age-dependent difference in fibril modulus continued to increase with time in culture (Figure 5.7 A).

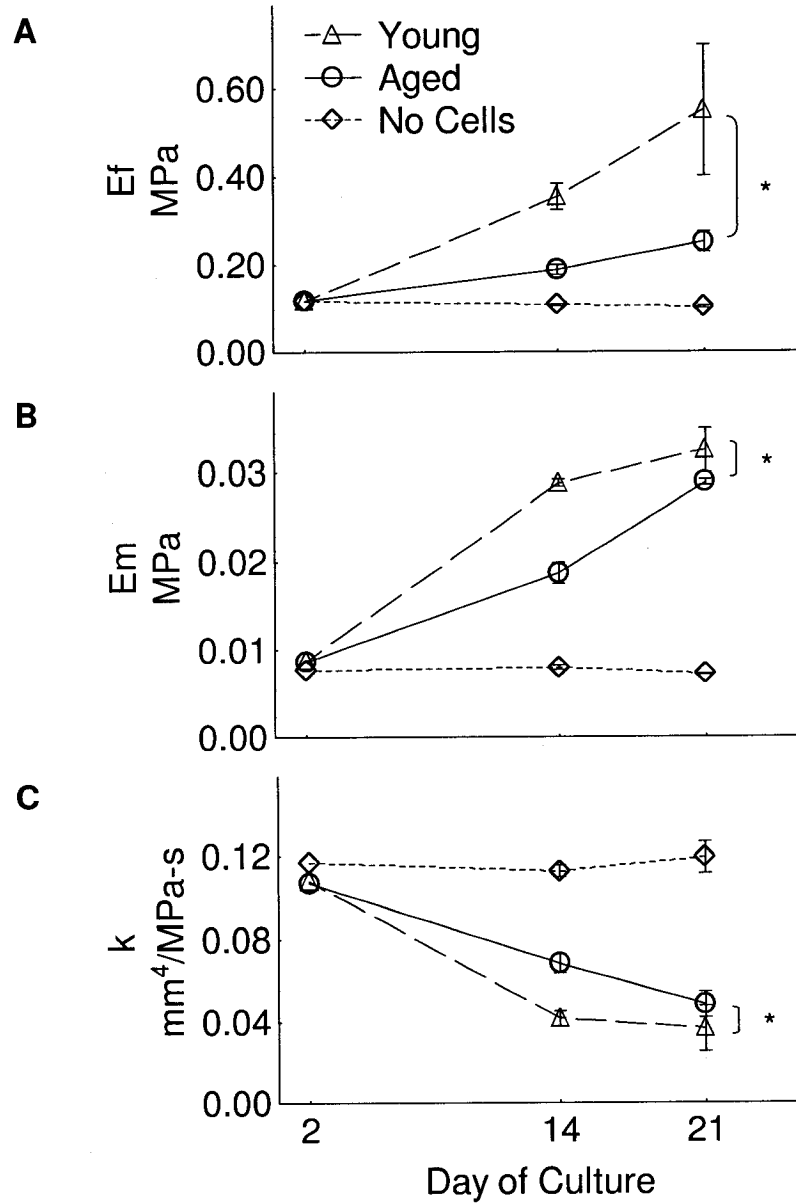


Figure 5.7 : Time evolution of mechanical parameters for different age groups.

Time evolution of A) fibril modulus, B) equilibrium modulus and C) hydraulic permeability for aged and young samples cultured with 50 $\mu\text{g/mL}$ sodium L-ascorbate (mean with error bar showing minimum and maximum, $n = 2$ for days 14 and 21, $n = 1$ for day 2). (*) Significant difference ($p < 0.05$) between young and aged samples by MANOVA.

As expected, culturing chondrocytes in ascorbate-free media had a greater inhibitory effect on collagen content (Figure 5.8, crosses; non-detectable level of hydroxylated collagen) than on GAG content (Figure 5.9 A and B, crosses; reduction of 38% in average). Fibril modulus correlated more strongly with collagen content ($r^2 = 0.95$, Figure 5.8) than with GAG content ($r^2 = 0.66$, plot not shown). Conversely, equilibrium modulus and hydraulic permeability correlated more strongly with GAG content ($r^2 = 0.86$, Figure 5.9 A; $r^2 = 0.94$, Figure 5.9 B) than with collagen content ($r^2 = 0.77$ and $r^2 = 0.57$, plots not shown).

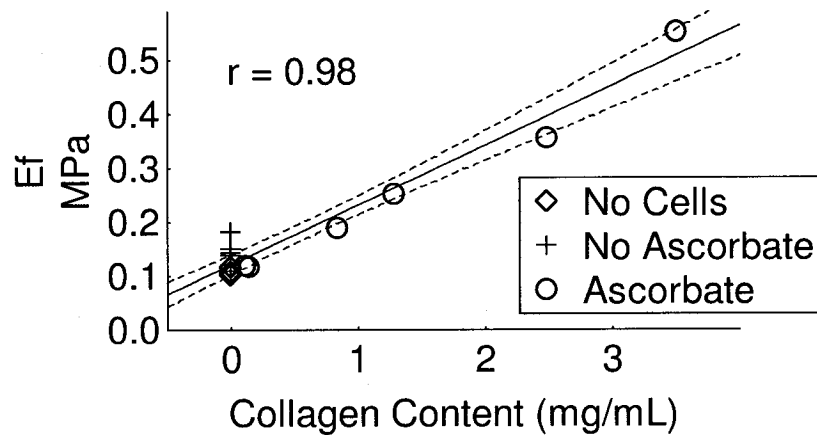


Figure 5.8 : Correlation between fibril modulus and collagen content.

Linear regression (solid line) and 95% confidence interval (dashed lines) showing correlations between fibril modulus and collagen content. This correlation was significant with $p < 0.005$. Each data point represents a mean mechanical parameter value ($n = 1$ for day 2, $n = 2$ for days 14 and 21) versus a mean ECM component concentration ($n = 3-4$). Each plot contains 15 circles, representing five different experimental conditions (controls without cells, young without ascorbate, aged without ascorbate, young with ascorbate and aged with ascorbate) evaluated at three time points (days 2, 14 and 21).

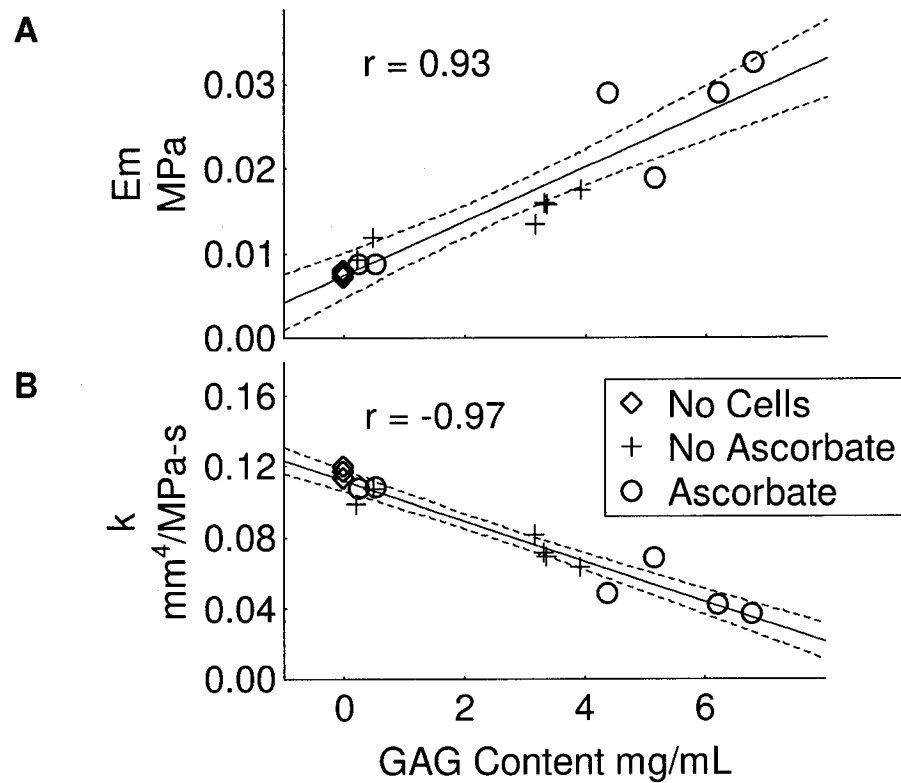


Figure 5.9 : Correlation between equilibrium modulus and hydraulic permeability and GAG content.

Linear regressions (solid lines) and 95% confidence intervals (dashed lines) showing correlations between A) equilibrium modulus and GAG content, and B) hydraulic permeability and GAG content. These two correlations were significant with $p < 0.005$. Each data point represents a mean mechanical parameter value ($n = 1$ for day 2, $n = 2$ for days 14 and 21) versus a mean ECM component concentration ($n = 3-4$). Each plot contains 15 circles, representing five different experimental conditions (controls without cells, young without ascorbate, aged without ascorbate, young with ascorbate and aged with ascorbate) evaluated at three time points (days 2, 14 and 21).

In an additional culture, fibril modulus was also lower in aged compared to fetal samples ($p < 0.005$, MANOVA, $n = 6$ per age group) and, again, correlated better with collagen content ($r^2 = 0.95$ with $p < 0.005$) than with GAG content ($r^2 = 0.46$ with $p > 0.05$).

5.6 Discussion

Using the agarose culture system, we first confirmed the hypothesis that aged bovine articular chondrocytes (5-7 years old) have a reduced capacity to proliferate, and to synthesize and accumulate extracellular matrix compared to young (1-2 years old) and fetal bovine articular chondrocytes. We found that collagen accumulation by aged compared to young and fetal chondrocytes was reduced in the most pronounced manner (Figure 5.3). Lower GAG content in aged samples was mostly accounted for by lower proliferation resulting in lower cell density (Figure 5.4, left). In contrast, collagen concentration showed a large decrease in aged samples even after normalization to cell density (Figure 5.4, right), and was accompanied by reduced proline incorporation (Figure 5.5, right). Secondly, we showed that these effects of donor age on ECM composition had an impact on biomechanical properties, shown by lower fibril and equilibrium modulus and higher hydraulic permeability for aged chondrocytes compared to younger chondrocytes (Figure 5.7). Finally, we confirmed that fibril modulus correlated strongly with collagen content (Figure 5.8), whereas equilibrium modulus and hydraulic permeability were more clearly correlated with GAG content (Figure 5.9).

Verbruggen et al. (2000) noted that human chondrocytes (2-69 years old) do not proliferate at all once embedded in 1.5% autoclaved agarose, whereas Hauselmann et al. (1992) observed that human chondrocytes proliferate in 1% agarose, and proliferate more for younger donors, similar to our results (Figure 5.3 A). Agarose concentration, site of donor tissue, method of digestion for cell isolation, frequency of medium change, ascorbic acid concentration, and the choice of serum supplement are all potential parameters that could lead to the discrepancies between the results of Verbruggen (2000) versus Hauselmann (1992) and the results of our study. Kamada et al. (2002) observed an age-dependence in proliferation of bovine chondrocytes embedded in alginate, but they noted that fetal chondrocytes proliferate less than aged ones, a result different from our study. These contradictory results could be caused by differences in the nature of the gel used, in the cell isolation protocol, and in ascorbic acid and serum supplementation. These differences could also come from the fact that Kamada et al. (2002) took fetal cartilage from shoulder, hip and knee joints, although they obtained adult and aged cartilage from metacarpophalangeal joints. These inter-study differences also underscore the importance of specific culture conditions that may accentuate or eliminate age-related differences.

We measured GAG and collagen concentrations (7.8 mg/mL and 5.0 mg/mL, respectively, for fetal chondrocytes cultured 26 days in agarose) that are comparable to those measured in other studies using agarose culture (6-16 mg/mL and ~10mg/mL for GAG and collagen respectively after 20-36 days) with calf chondrocytes from

carpometacarpal joint (Mauck et al., 2003) or from the femoropatellar groove (Buschmann et al., 1992; Hoemann et al., 2005). Sulfate and proline incorporation (respectively 22 and 28 nmol/ 10^6 cells/day for young adult chondrocytes on the 20th day of culture) were also similar to previously reported data (37 and 25 nmol/ 10^6 cells/day on the 36th day of culture for calf chondrocytes) (Buschmann et al., 1992). GAG concentration in alginate obtained by Kamada et al. (2002) is also very close to our measurements for fetal chondrocytes. However, Kamada et al. (2002) observed a large decrease (~75%) in GAG content comparing aged to fetal chondrocytes, while we found only a slight decrease (~22%). It is possible that aggrecan, which is known to display reduced molecular size (Hauselmann et al., 1992) and decreased capability of assembling large molecular size aggregates (Verbruggen et al., 2000) in aged tissue, is retained less in 1.2% alginate than in 2% agarose for bovine aged chondrocytes. We found a level of aggrecan loss to the medium (data not shown) similar to that of a previous study using agarose culture (Buschmann et al., 1992). Collagen contents obtained by Kamada et al. (2002) are very similar to our measurements and displayed a similar decrease for aged compared to fetal chondrocytes (~60% reduction on average), again confirming the effect of increased age in diminishing the ability of chondrocytes to produce a collagen-rich ECM. Although we could not measure collagen loss to the media due to an interfering colorimetric signal in the hydroxyproline assay, we can assert that the primary deficit in aged chondrocytes is reduced collagen synthesis rather than increased loss to the media, given the parallel reduction in collagen content and total proline incorporation for aged versus younger cells.

Equilibrium, or Young's, modulus for our culture (32 kPa for young adult chondrocytes on the 14th day of culture) was very close to values reported by others for similar culture conditions (~33kPa) (Mauck et al., 2003). The hydraulic permeability of agarose measured directly using permeation (Johnson et Deen, 1996), once corrected for a 15% compression (Gu et al., 2003), also gives a value (~0.3 mm⁴/MPa/s for 2% agarose) in the same range as the value we measured at the beginning of the culture and for controls without cells (~0.11 mm⁴/MPa/s). After 3 weeks of culture, the hydraulic permeability in our cultures dropped by a factor of 3 for the samples cultured with chondrocytes, as previously observed (Buschmann et al., 1992). For calf articular cartilage, fibril modulus obtained by unconfined compression (Fortin et al., 2000) was found to be very close to dynamic peak modulus obtained during uniaxial tension testing (Charlebois et al., 2004). In the same manner, the fibril modulus obtained for our samples, ranging from 0.12 MPa initially to 0.55 MPa after 3 weeks of culture, is similar to the reported tensile peak modulus of 0.16 MPa for 2% agarose gel submitted to a 15% stretch (Zile et al., 1998). Thus even though the homogeneous nature of the fibril-reinforced biphasic model does not exactly represent the composite structure of our gels where chondrocyte islets are embedded in an agarose gel, its parameters are expected to reflect average bulk properties. For example, in our cultures, mechanical parameters correlated well with GAG and collagen contents and allowed us to correlate age dependent changes in mechanical properties with biochemical composition. Nonetheless we do not always expect that changes in mechanical properties are explained solely by variations of the major ECM components bulk concentrations, but might also be modulated by minor

ECM components and assembly. For example, Mauck et al. (2003) observed that dynamic loading can increase the mechanical stiffness of agarose constructs, without affecting their GAG and collagen bulk contents. We also point out that biomechanical characterization of chondrocyte-seeded constructs, if applied to long-term cultures, will have to take into account two additional factors: 1) a fixed relaxation time such as that used for this study (20 minutes) may not be long enough to obtain equilibrium for samples with high GAG content but low collagen content, and 2) matrix growth at the external surface of these disks (Buschmann et al., 1992; Hoemann et al., 2005; Mauck et al., 2003) will more greatly influence the interpretation of measured parameters. However, these two factors were negligible in our 3-week cultures for biomechanical analysis.

Our study has shown that, in the agarose culture system, aged chondrocytes display a reduced intrinsic capacity to synthesize and accumulate a collagenous matrix compared to younger chondrocytes. Along with reduced proteoglycan synthesis and reduced cell proliferation, this globally reduced performance in the ability to make new cartilage was reflected in diminished mechanical properties of chondrocyte-agarose constructs containing aged versus younger chondrocytes. Analysis of these mechanical properties using current fibril-reinforced biphasic models also identified the primary source of diminished mechanical performance as due to a less developed collagen network. An important ancillary conclusion from our studies is that 18 month old bovine chondrocytes do not behave in a similar manner as 5-7 year old adult bovine chondrocytes and should

not be used as a model for adult cells. It would be interesting in future studies to refine these observations by examining various ages between these two limits. Based on these results and those of others that are consistent with our findings, it is suggested to carefully evaluate the effect of donor age when functional properties or behavior of chondrocytes is to be assessed.

5.7 Acknowledgments

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research and Nicolas Tran-Khanh had fellowship support from the Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche du Quebec.

Chapitre 6: Effet de l'âge sur les excroissances en interface

Pendant la culture de chondrocytes bovins de différents groupes d'âge (Tran-Khanh et al., 2005), nous avons remarqué la présence d'excroissances à la surface des cylindres d'agarose. Des capsules constituées de cellules allongées ont déjà été observées à la surface de disques d'agarose, lorsqu'ensemencés de chondrocytes de veaux âgés de 1 à 2 semaines (Buschmann et al. 1992; Hoemann et al. 2005; Kisiday et al. 2005; Hu et al. 2005). Une étude utilisant des veaux plus âgés (1 à 2 mois) présente plutôt la présence de masses (Mauck et al. 2003), qui n'ont pas été analysées. L'âge de l'animal-donneur pourrait bien influencer la morphologie des excroissances. La présence de cellules à l'interface de l'agarose et du milieu de culture est habituellement négligée, tout comme la présence potentielle de MEC.

6.1 Hypothèse

Dans la présente étude, la culture de chondrocytes bovins en agarose est utilisée afin de vérifier l'hypothèse que le contenu cellulaire et la morphologie des excroissances varient avec l'âge de l'animal-donneur. Pour ce faire, trois aspects en fonction du groupe d'âge seront étudiés. Premièrement, nous vérifierons si des différences peuvent être observées macroscopiquement. Deuxièmement, nous analyserons séparément les contenus cellulaires à l'intérieur et à l'extérieur de l'agarose. Troisièmement, nous déterminerons

si une MEC est présente en interface, par détection histologique des GAGs et immunohistochimie des collagènes de types I et II.

6.2 Méthodologie

6.2.1 Culture de chondrocytes en agarose

Les cylindres d'agarose (6 mm de diamètre et 1,9 mm de hauteur en moyenne) sont ensemencés de chondrocytes primaires bovins et cultivés tel que décrit au chapitre 4.

6.2.2 Apparence macroscopique

L'apparence macroscopique des excroissances est obtenue à l'aide d'un microscope à dissection (Zeiss) muni d'une caméra CCD, et du logiciel Northern Eclipse (Empix Imaging). Le cylindre fixé (voir protocoles de fixation pour l'histologie et l'immunohistochimie) est placée à plat dans un Pétri, qui est déposé sur une surface noire. La caméra capte la vue de dessus du cylindre.

6.2.3 Contenus cellulaires interne et externe

Les concentrations cellulaires sont déterminées à partir des mesures d'ADN par l'essai Hoechst, tel que décrit au chapitre 4. Cependant, les fractions d'ADN obtenues par les deux étapes successives d'extraction sont séparément mesurées. La première extraction, par digestion à la papaïne, contient l'ADN des cellules à l'interface (concentration externe). La deuxième extraction, par écrasement et fonte des cylindres, contient l'ADN

des cellules emprisonnées dans l'agarose (concentration interne). Les concentrations sont exprimées en contenu par échantillon.

6.2.4 Rendements cellulaires

Le rendement des cellules interne est calculé en divisant le contenu cellulaire interne au jour 26 par celui du jour 1. Le contenu interne au jour 1 correspond en fait au contenu de cellulesensemencées. En divisant aussi le contenu cellulaire externe par le contenu interne du jour 1, un rendement des cellules externe est calculé.

Le rendement effectif des cellules externes (R_{eff}) peut être calculé en supposant que seulement les cellules encapsulées près de la surface du cylindre peuvent participer à la prolifération à l'interface (figure 6.1). Le volume effectif (V_{eff}) est le volume total du cylindre (V_{cyl}) auquel on soustrait le volume d'un cylindre interne (V_{int}). En posant δ_{mig} la distance maximale qu'un chondrocyte encapsulé peut parcourir pour atteindre la surface, R et h le rayon et la hauteur du cylindre, on obtient la relation suivante : $V_{eff} = V_{cyl} - V_{int} = (\pi R^2 h) - \pi (R - \delta_{mig})^2 (h - 2\delta_{mig})$.

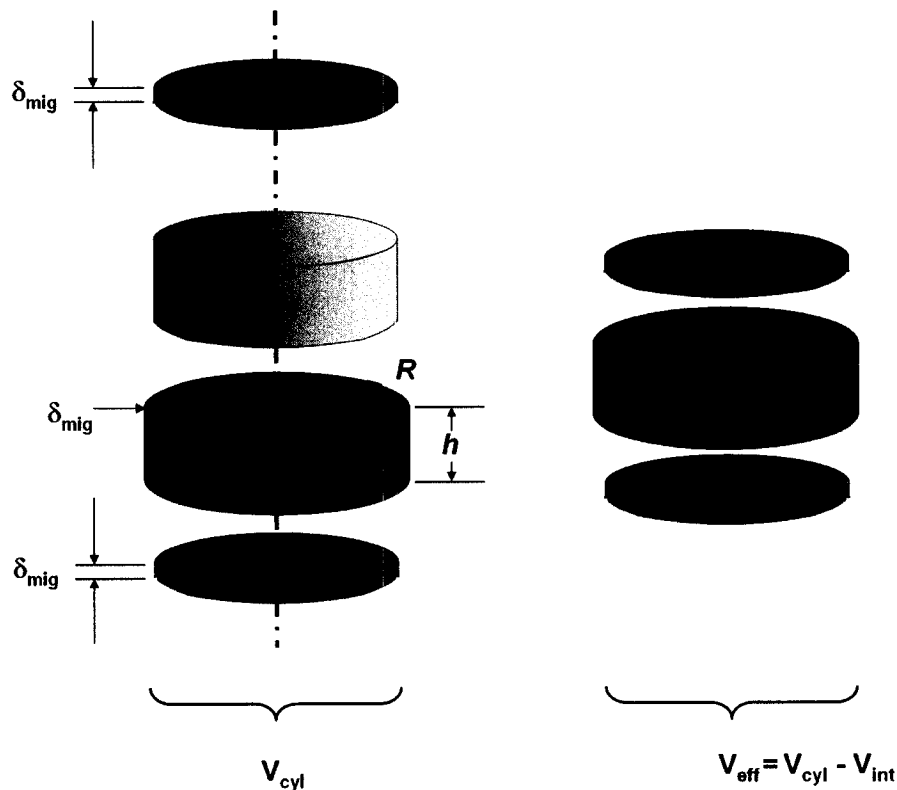


Figure 6.1 : Schéma d'un cylindre d'agarose.

La partie en bleu représente le volume contenant les cellules trop éloignées de la surface pour l'atteindre par migration (V_{int}). La profondeur de migration (δ_{mig}) délimite le volume où se trouvent les cellulesensemencées qui peuvent migrer jusqu'à l'interface avec le milieu de culture (V_{eff} , les trois parties en rouge). R et h : rayon et hauteur du cylindre complet. V_{cyl} : volume du cylindre complet.

La concentration cellulaire initiale effective (C_{eff}), qui peut participer activement à la prolifération de cellules à la surface du cylindre, est donc : $C_{eff} = C_0 (V_{eff} / V_{cyl})$, où C_0 est la concentration cellulaire à l'ensemencement. Le rendement effectif des excroissances est finalement : $R_{eff} = C_{ext} / C_{eff}$, où C_{ext} est la concentration cellulaire externe en fin de

culture. Comme toutes les variables sont connues à part la distance de migration hypothétique δ_{mig} , on peut évaluer R_{eff} en fonction de valeurs de δ_{mig} estimées.

6.2.5 Détection des protéoglycanes

Le cylindre est fixé dans 2,5% (m/v) de chlorure de cétylpyridinium (CPC) et 4% (m/v) de paraformaldéhyde dans 0,1 M de cacodylate de sodium, à pH 7,3. L'échantillon est immergé dans le fixatif pendant une heure à la température de la pièce, puis 16 heures à 4 °C dans du fixatif frais. L'échantillon fixé est enrobé dans la paraffine et tranché à une épaisseur de 6 μm . Les sections sont colorées avec 0,1% (m/v) de Safranine-O pendant 3 minutes. Les images sont acquises à l'aide d'une caméra CCD (Micropublisher 3.3 RTV; Q Imaging) et du logiciel Northern Eclipse (Empix Imaging), en utilisant un microscope à histologie (Axiolab, Zeiss).

6.2.6 Détection du collagène type II

Les sections en paraffine sont obtenues de la même façon que décrite dans le paragraphe précédent. Toutefois, le CPC est omis de la solution de fixation car il induit la précipitation des GAGs, risquant de masquer les épitopes. Le protocole d'immunohistochimie du collagène de type II est adapté de Chevrier et al. (2005). Pour récupérer les épitopes, les sections sont immergées dans une solution Tris (10 mM, pH 10) préchauffée : une première fois pendant 10 minutes, et une seconde fois pendant 20 minutes. Après 3 rinçages dans PBS, elles sont digérées à 37°C : 30 minutes dans une solution 0,1% (m/v) de pronase (Sigma, P5147) en PBS, suivi de 30 minutes dans une

solution 2,5% (m/v) de hyaluronidase (EC 3.2.1.35, Sigma, H3506) en PBS. Après trois rinçages au PBS, les sections sont traitées pendant 1 heure à la température de la pièce avec une solution de blocage: 20% (v/v) de GS et 0,1% (v/v) de Triton-X100 en PBS. Ensuite, l'anticorps primaire (DSHB, II-II6B3), dilué par un facteur 10 dans une solution 10% (v/v) de GS et 0,1% (v/v) de Triton-X100 en PBS, est incubé pendant 10 heures à 4°C, puis rincé 3 fois avec PBS. L'anticorps couplé à la biotine (Sigma, B7151), dilué par un facteur 200 dans une solution 10% (v/v) de GS et 0,1% (v/v) de Triton-X100 en PBS, est incubé pendant une heure à la température de la pièce, puis rincé trois fois dans PBS. Une solution de phosphatase alcaline biotinylée couplée à l'avidine (Vectastain ABC-AP Kit, Vector Laboratories, AK-5000) est appliquée aux sections pendant 1 heure à la température de la pièce, pour fins d'amplification du signal. Le signal est révélé en incubant un substrat rouge (Vector Red Substrate Kit, Vector Laboratories, SK-5100) pendant 20 minutes à la température de la pièce. L'ajout de levimasole (Levimasole Solution, Vector Laboratories, SP-5000) à la solution de substrat rouge permet d'inhiber la phosphatase alcaline endogène. Pour donner une coloration de fond, les sections ont été trempées pendant 1 minute dans une solution de Weigert Iron Hematoxylin (Sigma, HT10-7 et HT10-9) reconstituée quelques jours auparavant. Finalement, les sections sont rincées dans ddH₂O, déshydratées et montées sur lames à l'aide de Permount.

6.2.7 Détection du collagène type I

Le protocole pour détecter le collagène type I ne diffère de celui du collagène type II que dans son traitement enzymatique : la digestion à la pronase est remplacée par une

digestion dans 0,25% (w/v) de trypsine (EC 3.4.21.4, Sigma, T8802) en TBS (50mM, 150 mM NaCl, pH 7,6). L'anticorps primaire (Canlab, ICN/EMD, Clone I-8H5) est dilué pas un facteur 50.

6.3 Résultats

6.3.1 Apparence macroscopique

Les photos macroscopiques de la figure 6.2 montrent bien que les excroissances des jeunes adultes (figure 6.2 D) sont de taille supérieure que celles des adultes âgés (figure 6.2 A) et des fœtus (figure 6.2 B). L'absence d'excroissances visibles est observée pour les jeunes adultes cultivés sans ascorbate (figure 6.2 C).

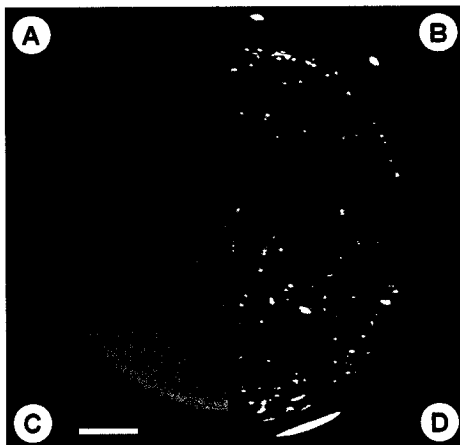


Figure 6.2 : Apparence macroscopique des cylindres d'agarose pour les différents groupes d'âge.

Les photos, acquises à l'aide d'un microscope à dissection, montrent des quartiers de cylindre vus de dessus. Les échantillons ont été cultivés pendant 26 jours et fixés dans 4% de paraformaldéhyde et 0.1M de cacodylate de sodium à pH 7.3. A) Cellules fœtales. B) Cellules âgées. C) Cellules de jeunes adultes cultivés en absence d'ascorbate. D) Cellules de jeunes adultes. Barre d'échelle = 1 mm.

Les mêmes tendances sont observées pour les échantillons fixés en présence de CPC (figure 6.3). Nous avons observé que les excroissances des jeunes adultes sont généralement de taille supérieure sur la surface latérale et convexe des cylindres, que sur les surfaces planes supérieures et inférieures.

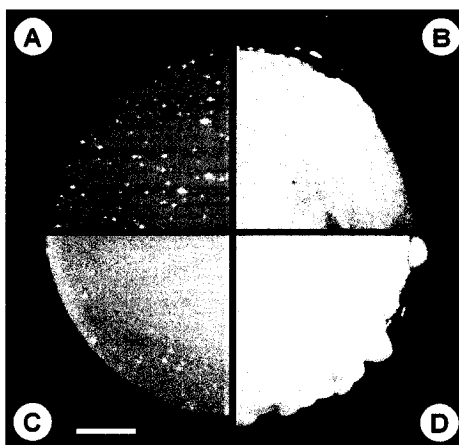


Figure 6.3 : Apparence macroscopique des cylindres d'agarose pour les différents groupes d'âge (avec CPC dans le fixatif).

Les photos, acquises à l'aide d'un microscope à dissection, montrent des quartiers de cylindre vus de dessus. Les échantillons ont été cultivés pendant 26 jours et fixés dans 2.5% de CPC et 4% de paraformaldéhyde en 0.1M de cacodylate de sodium à pH 7.3. A) Cellules fœtales. B) Cellules âgées. C) Cellules de jeunes adultes cultivés en absence d'ascorbate. D) Cellules de jeunes adultes. Barre d'échelle = 1 mm.

6.3.2 Contenus cellulaires

La densité cellulaire à l'intérieur de l'agarose (figure 6.4) augmente avec le temps de culture pour les échantillons fœtaux, augmente en début de culture puis se stabilise pour

les jeunes adultes, et n'augmente que légèrement (différence non significative) pour les adultes âgés. Le contenu cellulaire en périphérie est sous la limite de détection au jour 1, et augmente avec le temps de culture pour les trois groupes d'âge (figure 6.5). Cette augmentation est plus grande pour les échantillons fœtaux que pour les âgés, mais est la plus importante pour les jeunes adultes.

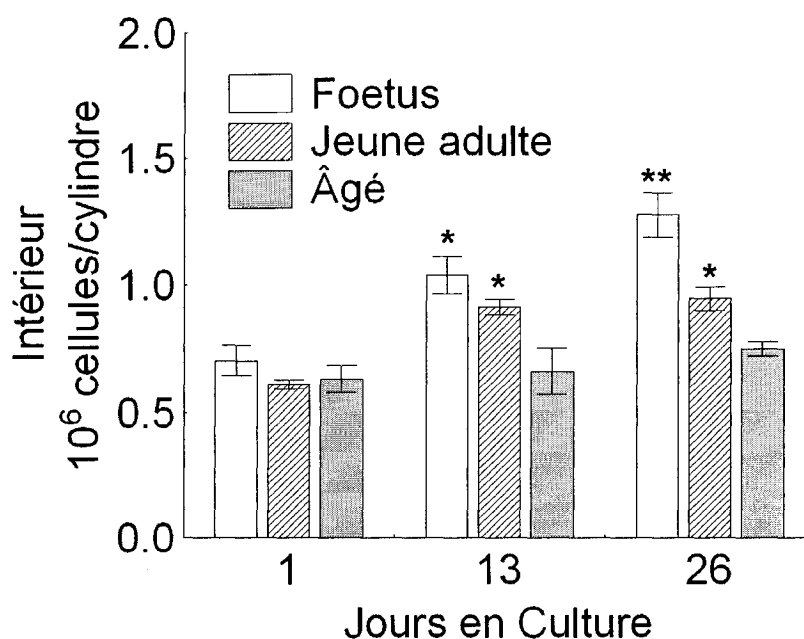


Figure 6.4 : Graphique du contenu cellulaire à l'intérieur de l'agarose en fonction des jours de culture, pour les trois groupes d'âge.

Le contenu cellulaire interne est calculé à partir de l'ADN des cellules emprisonnées dans l'agarose. Cet ADN est extrait par écrasement et fonte de l'agarose (après la digestion à la papaïne), et est mesuré à l'aide de l'essai fluorométrique Hoechst. Moyenne $\pm$ écart type, $n = 4$. (*) Différence significative ($p < 0.05$) avec le jour 1 de culture. (**) Différence significative ($p < 0.05$) avec le jour 13 de culture. MANOVA suivi d'un test post-hoc Tukey HSD.

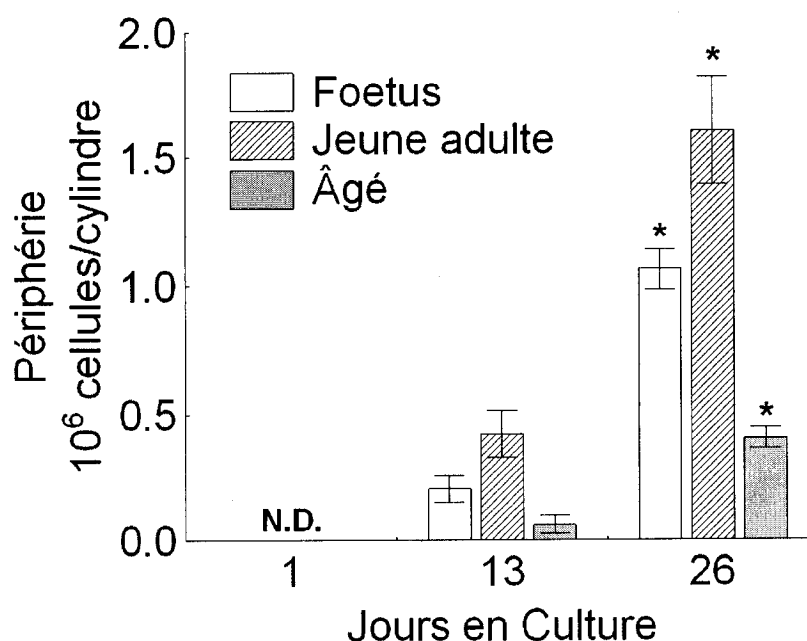


Figure 6.5 : Graphique du contenu cellulaire à l'extérieur de l'agarose en fonction des jours de culture, pour les trois groupes d'âge.

Le contenu cellulaire externe est calculé à partir de l'ADN des cellules situées à l'extérieur de l'agarose. Cet ADN est extrait par simple digestion à la papaine, et est mesuré à l'aide de l'essai fluorométrique Hoechst. Moyenne $\pm$ écart type, $n = 4$. (*) Différence significative ($p < 0.05$) avec le jour 13 de culture. MANOVA suivi d'un test post-hoc Tukey HSD. N.D.: Non-délectable.

6.3.3 Rendements cellulaires

Le rendement cellulaire interne décroît significativement avec l'âge (figure 6.6). Le rendement externe est inférieur au rendement interne pour les fœtus (1,5 versus 1,8) et les âgés (0,6 versus 1,2), mais est supérieur pour les jeunes adultes (2,6 versus 1,6).

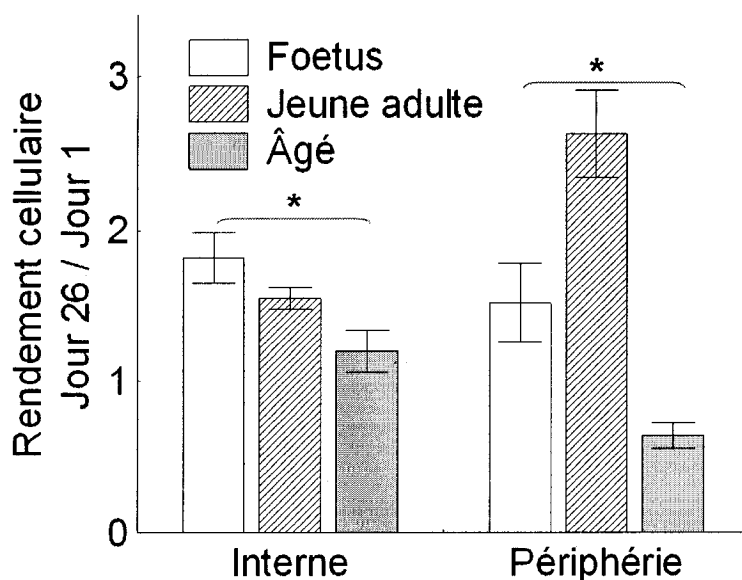


Figure 6.6 : Graphique des rendements cellulaires interne et externe, pour les trois groupes d'âge.

Les rendements cellulaires sont calculés en divisant le contenu cellulaire au jour 26 (interne et externe séparément) par celui du jour 1 de culture (contenu interne représentant le contenu cellulaire à l'ensemencement). Moyenne $\pm$ écart type, $n = 4$. (*) Différence significative ($p < 0.05$) entre les trois groupes d'âge. MANOVA suivi d'un test post-hoc Tukey HSD.

6.3.4 Rendement effectif des excroissances

Le rendement effectif des excroissances (R_{eff}), calculé pour différentes profondeurs de migration (δ_{mig}) estimées, est présenté à la figure 6.7. Le rendement effectif chez les fœtus et les jeunes adultes est toujours supérieur à 10 pour les distances de migration proposées ($\leq 80 \mu\text{m}$). Chez les cellules âgées, le rendement effectif passe sous la barre de la dizaine pour les distances de migration supérieures à $40 \mu\text{m}$.

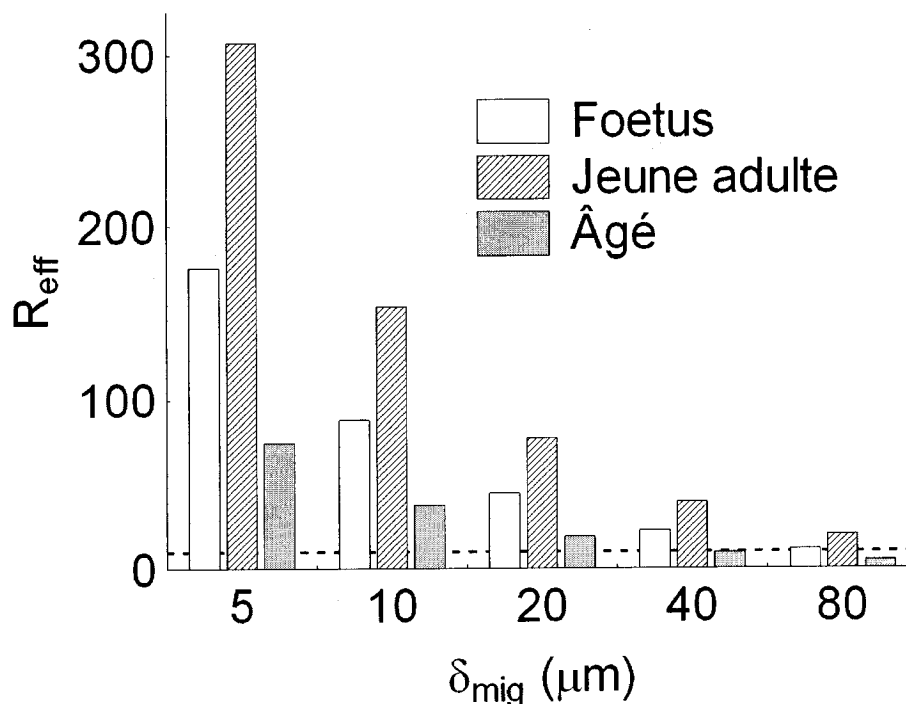


Figure 6.7 : Graphique du rendement cellulaire effectif des excroissances.

Le rendement cellulaire des excroissances (R_{eff}) est calculé en divisant le contenu cellulaire externe au jour 26 de culture, par le nombre de cellulesensemencées capables de parcourir la distance δ_{mig} pour atteindre l'interface avec le milieu de culture. La ligne horizontale montre $R_{eff} = 10$.

6.3.5 Détection du collagène de type I, du collagène de type II, et des GAGs

Les échantillons fœtaux présentent des excroissances à l'allure plutôt fibreuse, contenant du collagène de type I (figure 6.8 A) et du collagène de type II (figure 6.8 B). Le collagène de type I est à peine détecté dans les excroissances de jeunes adultes (figure 6.8 C), qui révèlent cependant un signal intense pour le collagène de type II (figure 6.8 D). Les excroissances pour les adultes âgées sont constituées d'amas cellulaires pauvres en

MEC; les collagènes de type I (figure 6.8 E) et de type II (figure 6.8 F) n'y ont pas été détectés.

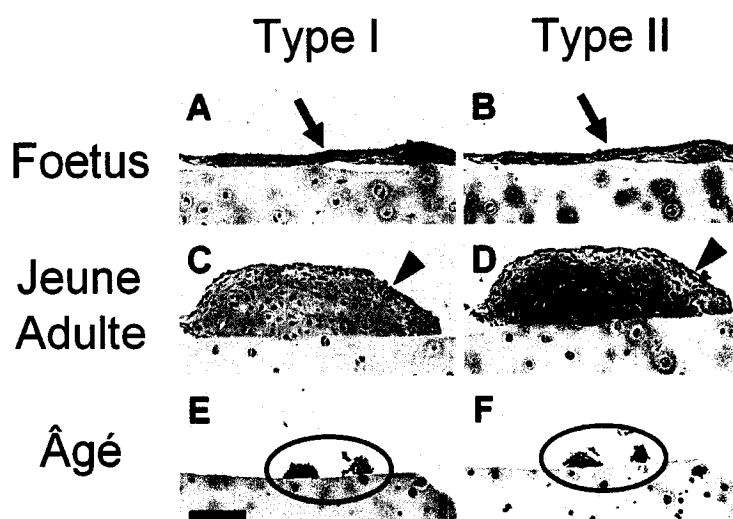


Figure 6.8 : Immunohistochimie de Coll I et Coll II pour les excroissances en interface d'agarose, pour les trois groupes d'âge.

Sections de paraffine montrant les excroissances en interface d'agarose, après 26 jours de culture. Le marquage du Coll I (rouge) est dans la colonne de gauche pour les trois groupes d'âge : fœtal (A), jeune adulte (C) et âgé (E). Le marquage du Coll II (rouge) est dans la colonne de droite pour les trois groupes d'âge : fœtal (B), jeune adulte (D) et âgé (F). Flèche : cellules allongées dans un tissu fibreux. Tête de flèche : cellules dans une MEC. Ovaies : amas cellulaires. Barre d'échelle = 100 μ m. Immunohistochimie effectuée par Anik Chevrier.

La coloration à la Safranine-O est intense pour les excroissances de jeunes adultes (figure 6.9), montrant la présence de GAGs. Le tissu fibreux du groupe fœtal et les amas cellulaires du groupe âgé ne révèlent pas de coloration métachromatique représentative de la coloration des GAGs (résultat non montré).

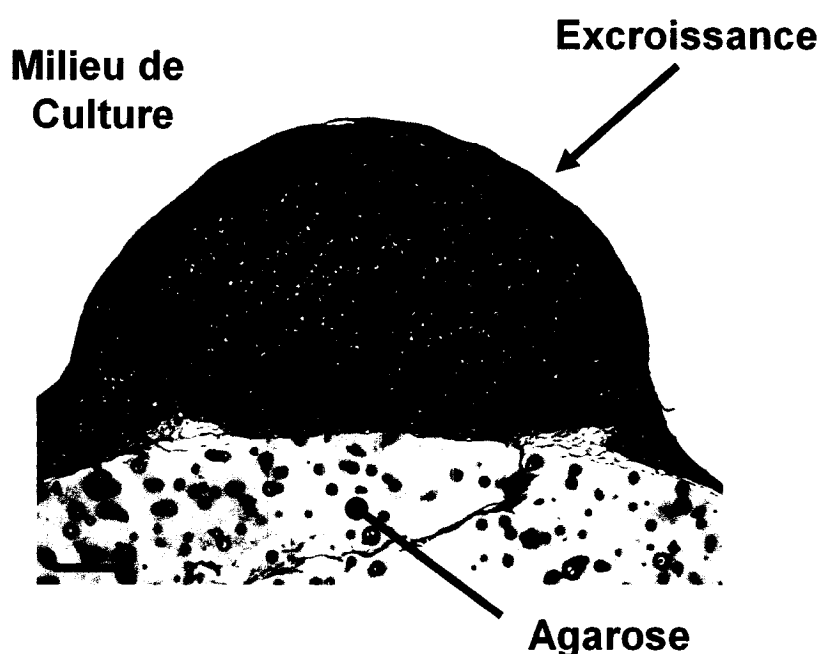


Figure 6.9 : Coloration des protéoglycanes (Safranine-O) d'une excroissance en interface pour le groupe de jeunes adultes.

Section de paraffine montrant les PG dans une excroissance de la surface convexe d'un cylindre d'agaroseensemencé de chondrocytes de jeunes adultes, après 26 jours de culture. Barre = 200 μm .

6.4 Discussion

Nos observations confirment l'hypothèse que l'âge de l'animal-donneur module la production d'excroissances à l'interface agarose-milieu de culture. Les chondrocytes provenant de fœtus ont produit des capsules plutôt fibreuses, tel que décrites pour les chondrocytes de jeunes veaux (Buschmann et al. 1992; Hoemann et al. 2005; Kisiday et al. 2005; Hu et al. 2005). Des masses plus imposantes, ressemblant à celles observées par Mauck et al. (2003), ont été générées à l'aide de chondrocytes de veaux plus âgés (jeunes adultes). Les capsules fibreuses observées pour les fœtus contiennent les collagènes de types I et II, mais sont démunies de PG. Par contre, les excroissances produites par les jeunes adultes contiennent du collagène de type II et des PG, ce qui leur confère un caractère hyalin. La présence de petits amas cellulaires absents de MEC, générés par les chondrocytes âgés, reflète bien les réductions de prolifération cellulaire et de synthèse de macromolécules généralement associées au vieillissement.

Le fait que les cellules fœtales accumulent moins de cellules en interface que les jeunes adultes, alors que c'est l'inverse qui est observé à l'intérieur de l'agarose, est un peu contre-intuitif. La première hypothèse tentant d'expliquer ce fait est que le collagène de type I détecté pour les chondrocytes fœtaux favorise leur adhésion et leur allongement, inhibant ainsi la prolifération en épaisseur et la production de MEC. Watt et Dudhia (1998), en cultivant des chondrocytes à basse densité sur un gel composite d'agarose et de collagène de type I, ont d'ailleurs observé que l'adhésion ainsi que la formation de réseaux de cellules allongées augmentent avec la proportion de collagène de type I du

substrat. De plus, ils ont observés qu'une diminution du contenu en kératane sulfate accompagne cette augmentation d'adhésion. La deuxième hypothèse est reliée au fait que les excroissances peuvent se détacher de l'interface et tomber dans le fond du puits pendant la culture (observations qualitatives non-montrées). Il serait possible que ce phénomène soit plus important pour les chondrocytes fœtaux, résultant en une sous-évaluation de leur prolifération totale.

Les rendements cellulaires internes et externes obtenus (de 0,6 à 2,6) se situent dans la gamme généralement observée pour les systèmes de culture tridimensionnels. En fin de culture, le contenu cellulaire externe équivaut à 102% du contenu cellulaire interne, en moyennant les trois groupes d'âge (83% pour les fœtus, 170% pour les jeunes adultes et 54% pour les âgés). Cette observation suggère que l'interprétation des résultats biochimiques obtenus avec les cultures en agarose devraient tenir compte de cette distribution cellulaire hétérogène. De plus, la présence de MEC devrait aussi être prise en compte, particulièrement dans les conclusions tirées à partir des caractérisations biomécaniques.

En supposant que seulement les cellules près de la surface des construits d'agarose participent activement au développement des excroissances, nous obtenons des rendements effectifs qui dépassent largement les rendements normalement obtenus en systèmes tridimensionnels *in vitro*. Le rendement maximal recensé pour les chondrocytes bovins cultivés en matrices ou à haute densité fut obtenu par Freyria et al. (2004), qui ont

obtenu un rendement de 6,5 après un mois de culture de chondrocytes fœtaux ensemencés dans des éponges de collagène. Ce rendement équivaut au rendement effectif des excroissances calculé avec une distance de migration de 145 μm pour les fœtus, 268 μm pour les jeunes adultes, et 58 μm pour les âgés (calculs non montrés, basés sur les relations exposées dans la section méthodologie). Il serait intéressant de vérifier expérimentalement la capacité de migration des chondrocytes en agarose, afin de déterminer les rendements effectifs réels. Si la capacité de migration s'avérait faible, le système de culture en interface pourrait devenir un puissant outil de multiplication de chondrocytes, qui dépasse largement les rendements moyens des systèmes actuels, et ce même pour les individus âgés.

Nous avons observé que les excroissances sont de plus grandes tailles sur la surface latérale (convexe) des cylindres d'agarose que sur les surfaces planes, supérieure et inférieure. Plusieurs hypothèses peuvent être émises dont les trois suivantes. La première est que les excroissances se développent préférentiellement sur les surfaces convexes, tandis qu'elles s'étalent sur les surfaces planes. La deuxième est que les échantillons soient aléatoirement retournés lors des changements de milieu de culture, laissant les excroissances se trouvant sur la face inférieure tomber au fond du puits. La troisième est que la croissance du tissu soit favorisée sur les surfaces parallèles à la force de gravité.

En conclusion, nous avons montré que l'âge de l'animal-donneur module la production d'excroissances en interface d'agarose. Les jeunes adultes y cumulent le plus de cellules et de MEC, qui semble être hyaline. Les fœtus produisent un tissu plutôt fibreux, alors que les âgés forment de petits amas cellulaires pauvres en MEC. Le calcul de rendement effectif propose la culture d'excroissances en interface comme outil de multiplication cellulaire. Finalement, il semble que la géométrie et l'orientation des construits d'agarose pourraient influencer le développement des excroissances.

Chapitre 7: Caractérisation des excroissances en interface

Dans le chapitre précédent, nous avons conclu que les chondrocytes bovins provenant de jeunes animaux adultes produisent des excroissances en interface d'agarose, qui contiennent du collagène de type II et des GAGs. Il serait intéressant de déterminer si ce tissu formé *in vitro* contient des chondrocytes de forme arrondie, représentative d'un phénotype de chondrocyte non-dédiérencié. L'imagerie confocale du cytosquelette permet d'observer la morphologie sphérique des chondrocytes dans les explants de cartilage articulaire (Langelier et al 2000; Durrant et al. 1999) ainsi que dans les cultures en agarose (Blanc et al. 2005).

Certains patrons de prolifération cellulaire observés dans la plaque de croissance (Hunziker, 1998) et en surface articulaire (Hayes et al. 2001) supportent le modèle de croissance par apposition, plutôt que le modèle de croissance interstitielle. Différentes méthodes peuvent être utilisées pour localiser la prolifération cellulaire, comme la détection de différents antigènes présents lors de la division cellulaire : PCNA (« proliferating cell nuclear antigen ») (Colitti et al., 2005), Ki67 (Apte et Athanasou, 1992) et « phospho-histone H3 » (Cobb et al., 1999). Une autre technique consiste à ajouter au milieu de culture un nucléoside synthétique analogue à la thymine, le BrdU, afin qu'il soit incorporé dans l'ADN nouvellement synthétisé des cellules en réplication;

il peut ensuite être détecté pour indiquer les cellules qui ont proliféré durant l'incubation (Farquharson et Loveridge, 1990).

Certaines observations du chapitre précédent proposent que les excroissances se développent préférentiellement sur la surface convexe latérale des cylindres d'agarose. Cependant, nous n'avons pas déterminé la cause de cette préférence.

7.1 Hypothèses

Dans la présente étude, la culture en agarose de chondrocytes bovins provenant de jeunes adultes est utilisée afin de vérifier les hypothèses suivantes : 1) les excroissances produites à l'interface contiennent des cellules ayant une morphologie sphérique, 2) les excroissances se développent par un mécanisme appositionnel, et 3) la localisation des excroissances varie selon la géométrie et l'orientation de la surface. La première hypothèse sera vérifiée par imagerie confocale du cytosquelette, et la seconde par détection des marqueurs de prolifération Ki67 et de BrdU. Pour vérifier la troisième hypothèse, des échantillons portant une surface supérieure courbée (convexe ou concave) seront générés.

NOTE : PCNA n'a pas été utilisé comme marqueur de prolifération car sa présence n'est pas exclusive aux cellules en division (Prosperi, 1997).

7.2 Méthodologie

7.2.1 Production d'excroissances

Les chondrocytes bovins provenant de jeunes adultes matures (1 à 2 ans) sont isolés et encapsulés en agarose, tel que décrit au chapitre 4. Toutefois, des échantillons portant soit une surface concave soit une surface convexe sont générés (au lieu des cylindres décrits dans le chapitre 4).

7.2.2 Échantillons avec surface concave

Le dessous d'une plaque de culture de 96 puits (avec les fonds de puits arrondis), posée à l'envers, est utilisé comme moule pour générer des surfaces concaves (figure 7.1). Tout d'abord, une solution 4% (m/v) d'agarose en PBS (absente de cellules) est versée afin d'emplir le dos de la plaque jusqu'au niveau des rebords (figure 7.1 B). Une fois l'agarose acellulaire rigidifié, des carrées de deux puits par deux puits sont découpés avec un bistouri et enlevés à l'aide d'une spatule. C'est dans ces espaces vides, au dessous de la plaque, où sont versés les chondrocytes primaires en solution dans l'agarose 2% (figure 7.1 B). Les blocs d'agarose contenant les chondrocytes sont enlevés et contiennent alors 4 surfaces concaves, moulées par quatre puits (2 rangées de 2 puits). Ces blocs sont cultivés dans une plaque de culture à 6 puits, contenant 9 ml de milieu complet par puits. Une grille de nylon est posée au fond de chaque puits de culture pour faciliter la diffusion des nutriments et déchets. Le milieu de culture est changé à intervalles de 2 ou 3 jours pendant les deux premières semaines, puis à tous les jours.

Toutefois, pendant la durée de la culture, l'ascorbate est ajouté quotidiennement. Les surfaces concaves sont orientées vers le haut pendant toute la culture.

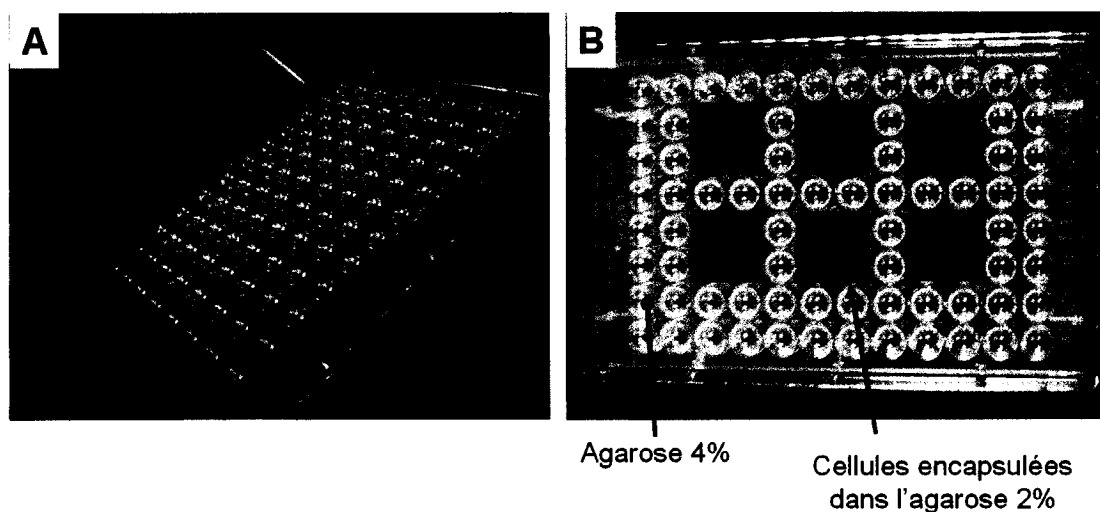


Figure 7.1 : Photos de la plaque utilisée pour générer les échantillons portant une surface convexe.

A) Photos montrant le dessous d'une plaque de 96 puits. B) Photos montrant la vue de dessous de la plaque. La couleur bleutée représente l'agarose 4 %, tandis que les carrés rougeâtres représentent les chondrocytes encapsulés dans l'agarose 2 %.

7.2.3 Échantillons avec surface convexe

Un bloc d'agarose acellulaire est moulé sur le dos d'une plaque 96 puits, tel que décrit ci-haut. Une fois rigide, ce bloc muni de surfaces concaves est utilisé comme moule pour obtenir des surfaces convexes. Les chondrocytes primaires en solution dans l'agarose 2% y sont versés, et démoulés après solidification. Des blocs de 4 surfaces convexes sont

ainsi produits (2 rangées de 2 puits) et cultivés tel que décrit pour les blocs de surfaces concaves.

7.2.4 Apparence macroscopique

L'apparence macroscopique des excroissances est obtenue à l'aide d'un microscope à dissection (Zeiss) muni d'une caméra CCD, et du logiciel Northern Eclipse (Empix Imaging). En fin de culture, les échantillons sont rincés et fixés, tel que décrit dans le paragraphe suivant. Les carrées contenant 4 surfaces convexes ou concaves sont tranchés afin de générer des échantillons ne portant qu'une surface courbée (les carrés 2 par 2 sont trop grands pour le champ du microscope à dissection). L'échantillon est placé à plat dans un Pétri afin d'acquérir une image du dessus. Puis, l'échantillon est tranché en moitiés afin d'obtenir une vue de côté.

7.2.5 Marquage triple de l'actine, de la vimentine et de l'ADN

La méthode utilisée est basée sur la technique développée par Blanc et al. (2005). Le mHBSS est utilisé à un pH 6,5. En fin de culture, l'échantillon vivant est rincé une fois dans mHBSS, fixé pendant 40 minutes dans 0,6% (v/v) de glutaraldéhyde et 5% (v/v) de Triton-X100 en mHBSS, puis rincé 3 fois dans mHBSS; ces étapes sont effectuées à 37°C. Un traitement pour réduire l'autofluorescence est ensuite appliqué en incubant deux fois pendant 10 minutes dans une solution 5 mg/ml de NaBH₄ sur glace. Après deux rinçages dans mHBSS, l'excroissance est coupée en son centre à l'aide d'une lame de rasoir. Ensuite, les moitiés d'excroissance sont digérées à 37°C pendant 16 heures

dans une solution de 200 mU chondroïtinase ABC et 400 mU kératanase par millilitre de tampon : 100 mM de NaCl et 0,01% (m/v) de BSA dans une solution Tris à 100 mM, à pH 7,4. Toutes les étapes ultérieures sont effectuées à température de la pièce. Après un rinçage de 30 minutes dans mHBSS, un blocage d'une heure est appliqué avec une solution 10% (v/v) de GS et 0,1% (v/v) de Tween-20 en mHBSS. La phalloïdine couplée à l'Alexa Fluo 488 (Molecular Probes), qui lie spécifiquement l'actine, et l'anticorps reconnaissant la vimentine couplée à Cy3 (Sigma) sont dilués par des facteurs 40 et 600 respectivement dans une solution contenant 1% (m/v) de BSA et 0,05% (v/v) de Tween-20 en mHBSS, et incubés pendant 4 heures. Après deux rinçages de 30 minutes chacun avec 10% (v/v) de GS et 0,1% (v/v) de Tween-20 en mHBSS, l'ARN est digéré avec RNaseA (Qiagen) diluée à 1 mg/ml dans 1% (w/v) de BSA en PBS. L'ADN est marqué avec une solution 3 μ M de TOTO-3 (Molecular Probes) dans PBS pendant 3 heures. Un traitement GOC (glucose oxydase et catalase), pour réduire le « photobleaching », est appliqué pendant 1 heure avant de monter l'échantillon avec une solution de Mowiol.

7.2.6 Cryosections

L'échantillon est rincé deux fois dans PBS avant d'être fixé dans une solution fraîchement préparée 4% (m/v) de paraformaldéhyde en 0,1M de cacodylate de sodium à pH 7,3. Une fixation d'une heure à la température de la pièce est suivie d'une fixation de 48 heures à 4°C. Après deux rinçages dans PBS, l'échantillon est immergé successivement dans des concentrations croissantes de sucrose dilué dans PBS, sous léger brassage à la température de la pièce : 2 heures dans 5%, 2 heures dans 10%, et 16 heures

dans 20% (m/v) de sucre. Puis, l'échantillon est immergé successivement dans des concentrations croissantes d'OCT mélangé avec 20% sucre, sous léger brassage à la température de la pièce : 24 heures dans un mélange comprenant une partie d'OCT pour 3 parties de sucre, 24 heures dans un mélange 1 pour 1, et 24 heures dans un mélange 3 pour 1. L'échantillon est ensuite placé dans un moule et enrobé d'OCT. La congélation s'effectue en déposant le moule dans un Pétri flottant sur une surface d'azote liquide. L'échantillon est retiré du Pétri avant d'être complètement solidifié (afin d'éviter un abaissement excessif de la température causé par l'azote liquide) et est immédiatement entreposé à -80°C. L'échantillon est tranché en sections de 6 µm d'épaisseur avec un microtome cryostat.

7.2.7 Incorporation et détection de BrdU

Les 19^e et 20^e jours de culture, le BrdU a été ajouté au milieu de culture, à une concentration de 10 µM. BrdU a été omis pour le 21^e jour de culture. L'échantillon a ensuite été fixé, infiltré au sucre et à l'OCT, congelé et tranché tel que décrit plus haut. Après quelques minutes de séchage et l'encerclement avec le « Pap Pen », les cryosections sont rincées avec ddH₂O, puis avec PBS. Elles sont ensuite digérées à la chondroïtinase (Sigma C2905) à 0.25 U/ml de PBS pendant 1 heure à 37°C, puis rincées trois fois dans PBS. L'ADN est ensuite dénaturé par un traitement avec une solution 2N de HCl à 37°C pendant 30 minutes, puis rincé deux fois dans PBS. Un traitement de perméabilisation (0,4% de Triton-X100 en PBS) est ensuite appliqué pendant 20 minutes à la température de la pièce, suivi de deux rinçages dans PBS. La peroxydase endogène

est bloquée en laissant s'écouler sur les sections une solution composée de 4 parts de méthanol pour une part de H_2O_2 à 3% (v/v); une technique alternative est d'immerger les sections pendant 20 minutes dans une solution 3% H_2O_2 en PBS. Après trois rinçages aux PBS, les sections sont bloquées pendant 1 heure à la température de la pièce avec une solution 5% (m/v) de lait en poudre et 3% (m/v) de BSA en PBS. L'anticorps primaire (Sigma B8434, clone BU-33), dilué par un facteur 2000 dans une solution 1% (m/v) de BSA en PBS, est incubé pendant 10 heures à 4°C, puis rincé trois fois avec PBS. L'anticorps couplé à la biotine (Vector), dilué par un facteur 200 dans 1% (m/v) de BSA en PBS, est incubé pendant une heure à la température de la pièce puis rincé trois fois dans PBS. Une solution de peroxydase biotinylée couplée à l'avidine (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, PK-6100) est ensuite appliquée aux sections pendant 1 heure à la température de la pièce, pour fins d'amplification du signal. Le signal est révélé en incubant avec DAB (Sigma, DAB Substrate Kit) pendant 8 minutes à la température de la pièce. Finalement, les sections sont rincées dans ddH₂O, déshydratées et montées sur lames à l'aide de Permount.

7.2.8 Détection de Ki67

Le protocole de détection de Ki67 par immunohistochimie est presque le même que celui décrit ci-haut pour BrdU. La seule différence est que la dénaturation au 2N de HCl est remplacée par un traitement de révélation d'antigène. Après la digestion à la chondroïtinase, les sections sont rincées une fois dans PBS et une fois dans ddH₂O, puis immergées dans un bain contenant une solution tamponnée au citrate (10 mM, pH 6,1)

préchauffée. Le bain contenant les échantillons est ensuite chauffé pendant 1 minute à l'aide d'un four à micro-ondes, en ajustant la puissance de façon à ce que la solution ne bouille pas. Le bain repose ensuite pendant 20 minutes à la température de la pièce avant d'être rincé et d'appliquer l'étape de perméabilisation. L'anticorps primaire (Chemicon MAB4062) est dilué par un facteur 50.

7.3 Résultats

7.3.1 Imagerie du cytosquelette

Le marquage des réseaux d'actine (en vert) et de vimentine (en jaune) observé par microscopie confocale révèle une différence entre la périphérie des excroissances et la partie centrale (figure 7.2). Les cellules périphériques ont une morphologie allongée et sont en contact entre elles (figures 7.2 A et B), alors que les cellules centrales ont une forme plus compacte et sont séparées par une MEC (figure 7.2 C et D). Dans une zone transitoire entre la couche superficielle et la zone centrale, des cellules semblent terminer une division cellulaire parallèle à la surface (Figure 7.2 A, encerclé).

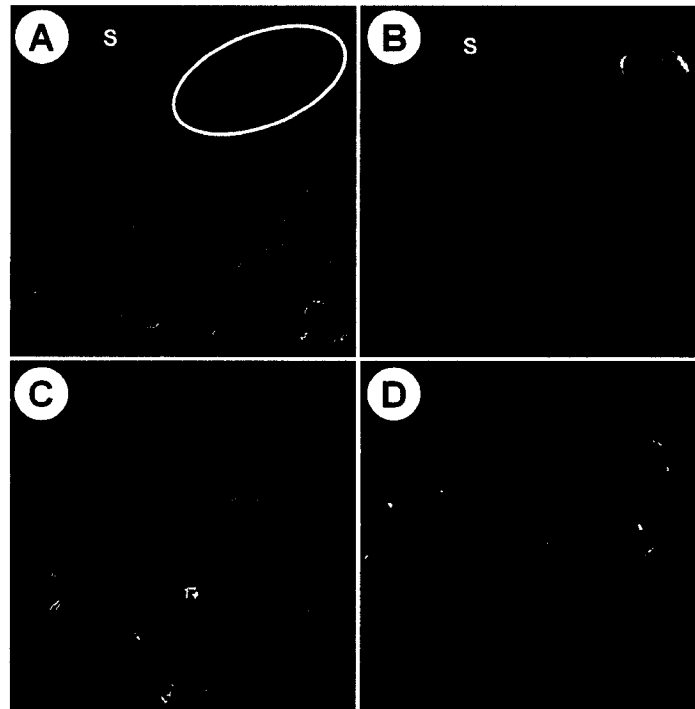


Figure 7.2 : Réseaux d'actine et de vimentine d'une excroissance imagée par microscopie confocale.

L'actine (vert), la vimentine (jaune) et l'ADN (rouge) d'une excroissance en interface d'agarose cultivée pendant 30 jours, sont imagés par microscopie confocale. A) Périphérie de l'excroissance. B) Périphérie à fort grossissement. C) Partie centrale de l'excroissance. D) Partie centrale à fort grossissement. S : surface de l'excroissance. Ovale : cellules se divisant parallèlement à la surface. Barre d'échelle = 30 μm .

Dans la zone superficielle, les cellules portent parfois des filaments d'actine en périphérie cellulaire (figure 7.3 A), sans toutefois contenir de larges fibres de stress. Certaines cellules arborent des extensions d'actine regroupées et orientées vers l'extérieur de l'excroissance (figure 7.3 B). La vimentine est majoritairement distribué en un réseau

uniforme dans le cytosol (figure 7.3 C), mais forme parfois une capsule dense recouvrant le noyau (figure 7.3 D).

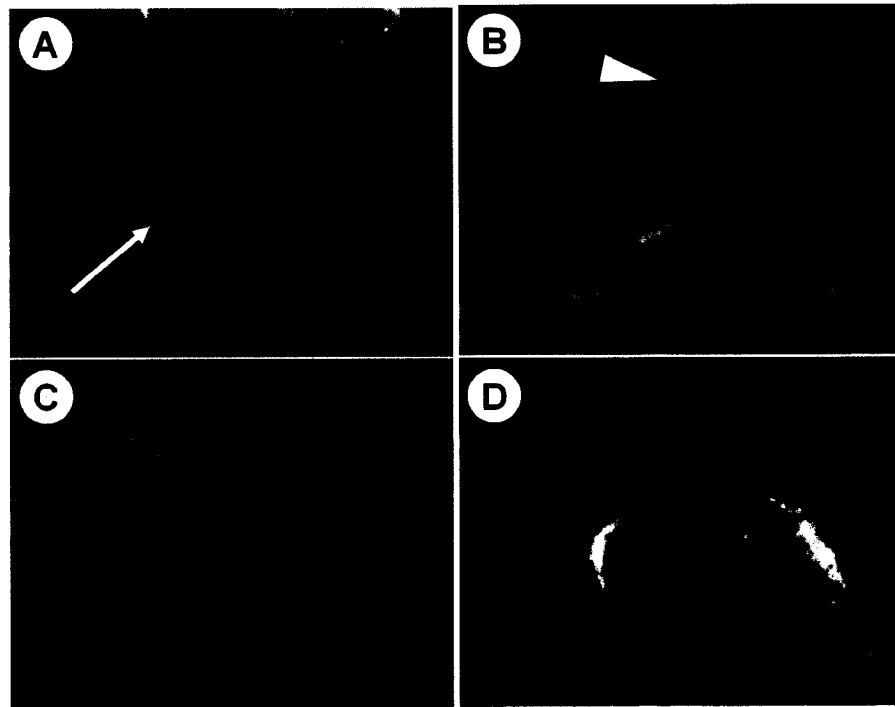


Figure 7.3: Zoom du cytosquelette de cellules en surface de l'excroissance.

Agrandissements de la figure 7.2 B. Imagerie confocale de l'actine (vert), de la vimentine (jaune), et de l'ADN. A) Cellule portant de fins câbles d'actine (flèche). B) Cellule portant des extensions d'actine orientées vers l'extérieur de l'excroissance (tête de flèche). C) Vimentine distribuée dans le cytosol. D) Vimentine concentrée autour du noyau.

Dans la zone centrale, l'actine forme une coquille (figure 7.4 A) portant de petites extensions qui rayonnent de la membrane cellulaire vers la MEC (figure 7.4 B). La vimentine forme une structure qui relie le noyau au réseau d'actine (figures 7.4 C et D). Les cavités délimitées par la charpente de vimentine ont l'allure de vacuoles (figures 7.4 C et D), absentes des cellules en périphérie de l'excroissance (figure 7.3).

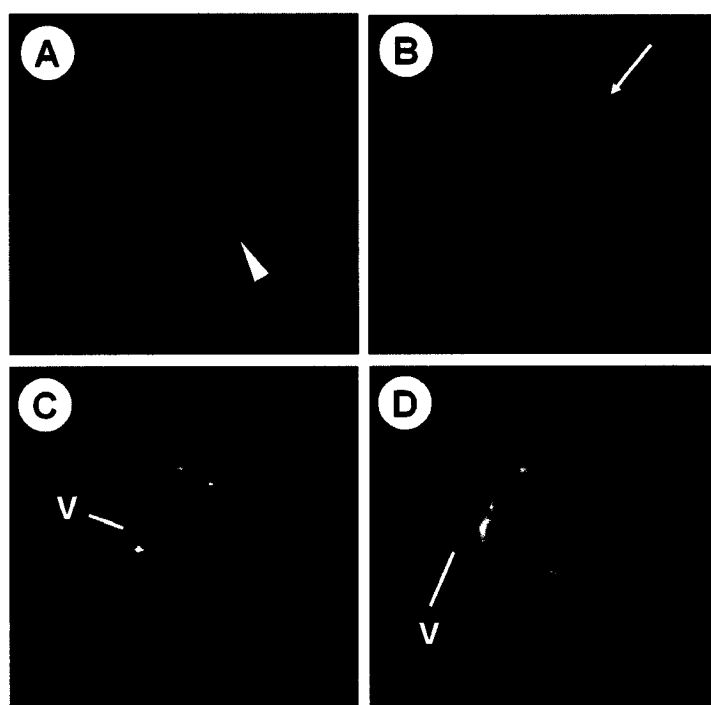


Figure 7.4 : Zoom du cytosquelette de cellules au centre de l'excroissance.

Agrandissements des figures 7.2 C et D. Imagerie confocale de l'actine (vert), de la vimentine (jaune), et de l'ADN. A) Coquille d'actine (tête de flèche) en périphérie cellulaire. B) Fines extensions d'actine (flèche) orientées radialement. C) et D) Vimentine délimitant des cavités ressemblant à des vacuoles (V).

7.3.2 Prolifération cellulaire

BrdU est majoritairement présent dans les cellules périphériques, mais est aussi détecté dans quelques cellules profondes ainsi qu'à l'interface avec l'agarose (figure 7.5 A). Ki67 n'a été détecté que dans le noyau de cellules périphériques, pour les excroissances naissantes (figure 7.6 A) comme pour celles qui sont plus développées (Fig. 7.7 A et B).

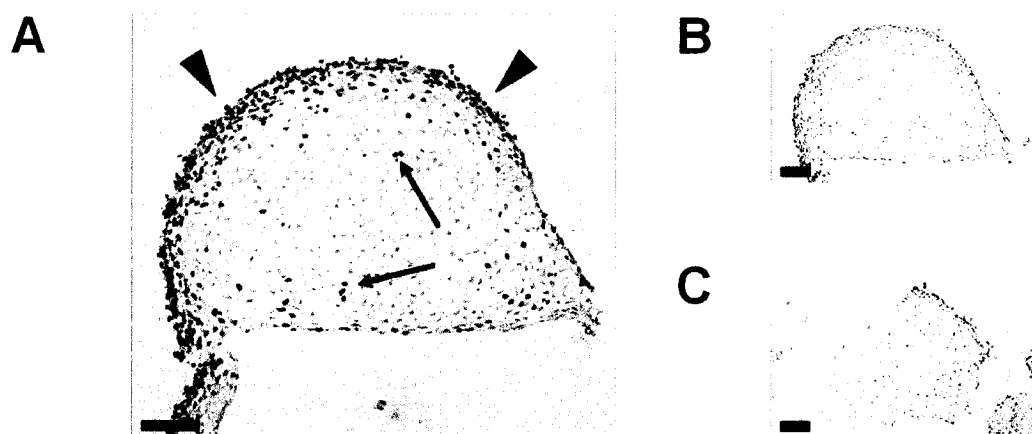


Figure 7.5 : Marquage du BrdU incorporé dans une excroissance.

Immunohistochimie sur cryosections pour détecter le BrdU incorporé dans une excroissance pendant 48 heures en fin de culture (22 jours en culture au total). A) Marquage intracellulaire foncé pour les cellules ayant incorporé le BrdU. B) Contrôle négatif : omission de l'anticorps primaire α -BrdU. C) Contrôle négatif : échantillon cultivé sans BrdU. Têtes de flèche : cellules positives en surface de l'excroissance. Flèches : cellules positives dans les régions internes. Barre d'échelle = 100 μ m.

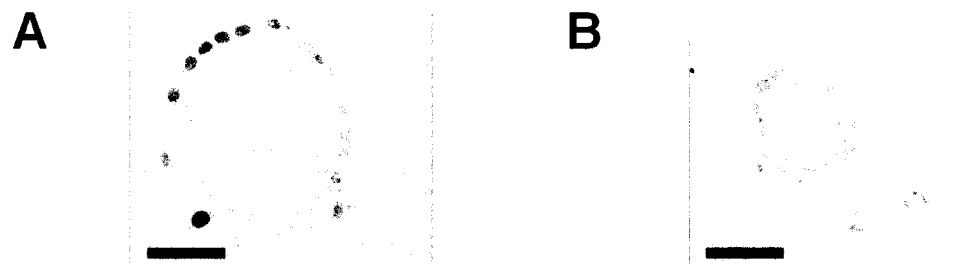


Figure 7.6 : Marquage de Ki67 dans une excroissance naissante.

Immunohistochimie sur cryosections d'un échantillon cultivé pendant 22 jours. A) Détection de Ki67 dans une excroissance de petite taille. B) Contrôle négatif : omission de l'anticorps primaire α -Ki67. Barre d'échelle = 50 μ m. Immunohistochimie effectuée par Viorica Lascau-Coman.

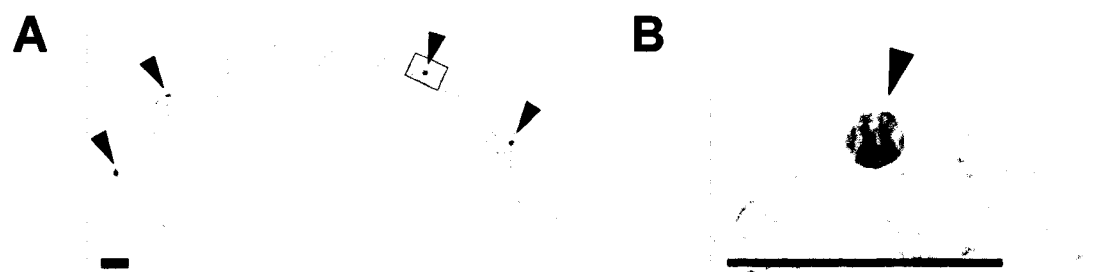


Figure 7.7 : Marquage de Ki67 dans une excroissance.

Immunohistochimie sur cryosections d'un échantillon cultivé pendant 26 jours. A) Marquage de Ki67 dans une excroissance. B) Zoom d'une cellule positive pour Ki67. Têtes de flèche : noyau marqués. Encadrée : partie zoomée. Barre d'échelle = 30 μ m. Immunohistochimie effectuée par Viorica Lascau-Coman.

7.3.3 Effet de géométrie

Les excroissances sont absentes du sommet du dôme formé par la surface convexe, alors qu'elles sont présentes près de sa base (flèches rouges dans les figures 7.8 A et C). Le puits formé par la surface concave contient des excroissances tant sur sa pente descendante (flèches rouges dans les figures 7.8 B et D) que dans son fond (têtes de flèche rouge dans les figures 7.8 B et D). Des excroissances sont observées sur la surface plane latérale de l'échantillon convexe (flèches jaunes dans les figures 7.8 A et C); elles ont aussi été observé pendant la culture pour les échantillons concaves, mais se sont détachées lors des manipulations précédant la capture d'images. La surface supérieure plane contient aussi des excroissances (flèches bleus dans les figures 7.8 C et D), quoique petites pour les échantillons ayant une surface convexe. Finalement, dans tous les cas les excroissances sont exclues de la surface plane inférieure (flèches vertes dans les figures 7.8 C et D). Il est intéressant de noter que pendant la culture, des excroissances se retrouvaient au fond des puits de culture (figure 7.9).

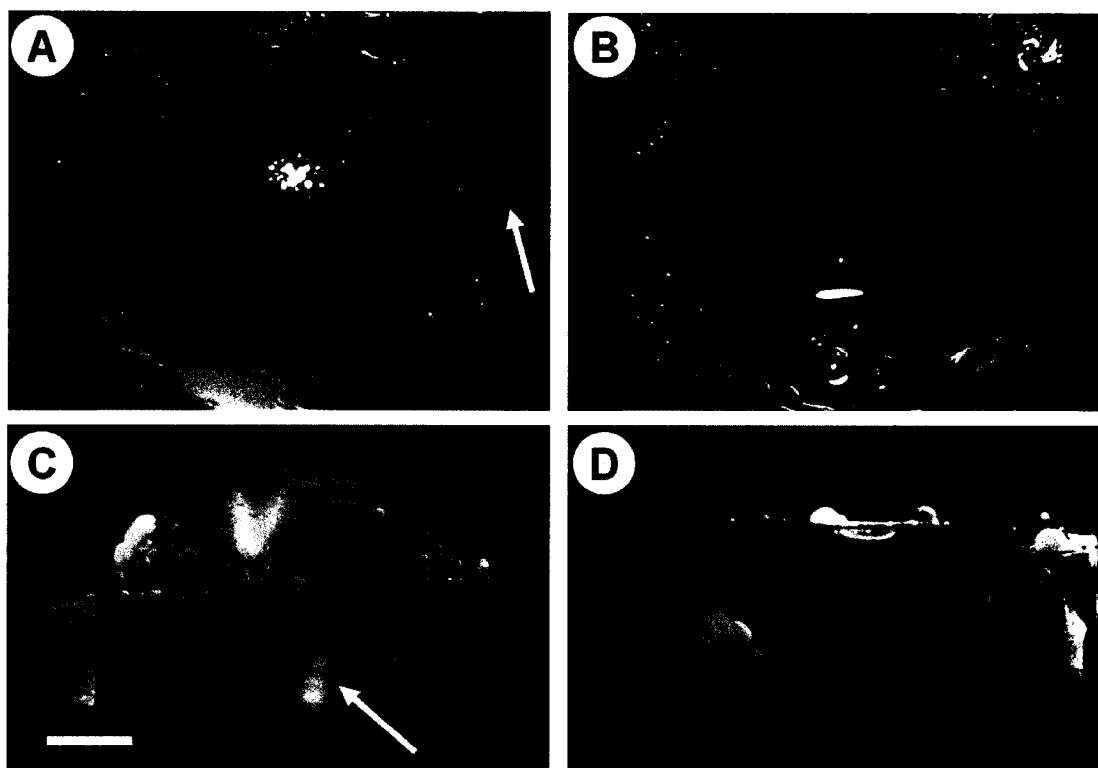


Figure 7.8 : Apparence macroscopique des excroissances sur les construits d'agarose portant une surface convexe ou concave.

Les échantillons ont été fixés après 30 jours en culture. Les photos, acquises à l'aide d'un microscope à dissection, montrent des vues de dessus d'échantillons complets, et des vues de côté d'échantillons coupés en moitiés. A) Vue de dessus d'un échantillon portant une surface convexe. B) Vue de dessus d'un échantillon portant une surface concave. C) Vue de côté d'une moitié d'échantillon portant une surface convexe. Le plan tranché est posé sur le Pétri, afin de voir de dessus la partie bombée. D) Vue de côté d'une moitié d'échantillon portant une surface concave. Le plan tranché est tourné vers le dessus, afin de voir de dessus la partie creusée. Les flèches de couleur correspondent aux descriptions dans le texte. Barre d'échelle = 2 mm.

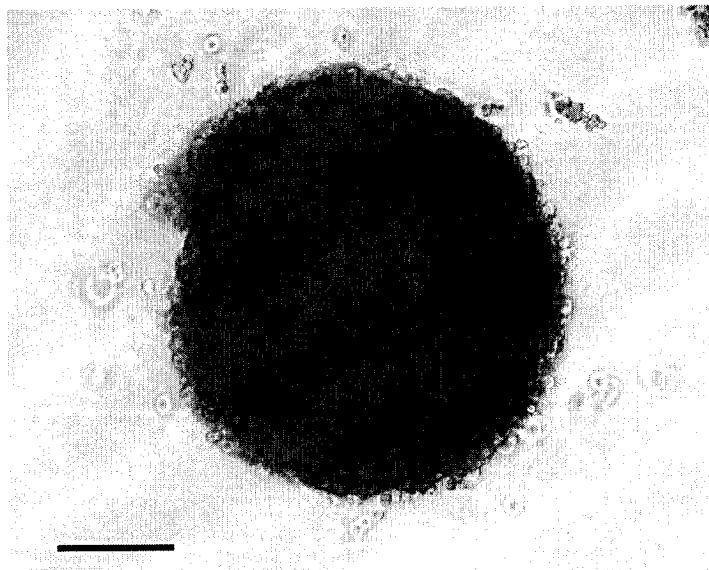


Figure 7.9 : Photo d'une excroissance au fond d'un puits de culture.

Photo acquise à l'aide d'un microscope inversée, d'une excroissance ayant tombé au fond du puits de culture après 15 jours de culture. Barre d'échelle = 150 μ m.

7.4 Discussion

Nous avons vérifié l'hypothèse que les excroissances contiennent des cellules de forme compacte arrondie, tel qu'observé dans le cartilage articulaire (Langelier et al., 2000; Durrant et al. 1999). Des cellules allongées ont aussi été observée en surface, mais ces dernières ne sont pas munies de larges câbles d'actine (fibres de stress) représentatifs des chondrocytes dédifférenciés en monocouche (Mallein-Gerin et al. 1991).

Nous avons aussi vérifié que la croissance s'effectue par un mécanisme appositionnel, i.e. que les cellules prolifèrent majoritairement en surface. Il est normal que BrdU soit détecté en plus grande quantité que Ki67 (figure 7.5 versus figure 7.7 A). En effet, BrdU est ajouté pendant 48 heures au milieu de culture, et est donc incorporé dans toutes les cellules s'étant divisées durant cette période. Quant à Ki67, il n'est présent que dans les cellules qui sont en division (Scholzen et Gerdes, 2000) au moment de la fixation de l'échantillon.

Nous avons observé que la géométrie et l'orientation des surfaces modulent la localisation des excroissances. Cette modulation semble être un effet de la gravité, et non un effet direct de la courbure de surface. Nous proposons que les cellules en interface tendent à migrer vers le bas, s'agglomérant en chemin pour se stabiliser et développer des excroissances. Quant aux excroissances qui se développent sous le construit (surface inférieure, orientée vers le bas), elles finissent par tomber dans le fond du puits.

En conclusion, nous avons montré que des cellules arrondies sont dispersées dans la MEC des excroissances. Nous avons aussi montré que des cellules allongées et en contact entre elles tapissent la surface des excroissances, là où s'effectue la prolifération. Finalement, nous proposons que la gravité influence le déplacement des cellules sur la surface d'agarose et, par le fait même, la localisation des excroissances sur le construit.

Chapitre 8: Imagerie par microscopie confocale des cellules vivantes dans la culture d'excroissances en interface

Dans le chapitre précédent, la modulation par gravité des déplacements cellulaires a été proposée afin d'expliquer la distribution des excroissances sur les construits d'agarose. Cependant, aucune migration n'a été directement observée. La dynamique des cellules en monocouches peut facilement être visualisée en microscopie, par transmission de lumière blanche. Par contre, cette technique n'est pas toujours adaptée à l'observation des activités cellulaires dans les environnements tridimensionnels. En effet, l'opacité et l'épaisseur de certains échantillons ne permettent d'obtenir que des images floues et ayant peu de contraste. L'utilisation de la microscopie confocale, combinée à un agent contrastant par fluorescence (ACF), permet d'éliminer ces inconvénients.

Bien que la microscopie confocale soit utilisée dans le domaine de la recherche orthopédique depuis une quinzaine d'années (Jones et al. 2005), ses applications en imagerie des chondrocytes vivants demeurent encore rares. L'observation répétée pendant plusieurs heures, nécessaire pour suivre entre autres les déplacements cellulaires, n'est pas facilement réalisable. À chaque acquisition d'image, l'énergie d'excitation fournie par le laser risque d'induire des dommages directs (interaction laser-cellule) ou indirects (radicaux libres produits par l'interaction laser-ACF) à la cellule. C'est

pourquoi il est préférable d'utiliser un ACF qui absorbe et réémet efficacement l'énergie fournie par le laser (coefficient d'extinction et rendement quantique élevés), afin d'utiliser ce dernier à faible puissance. Il arrive souvent que les ACF eux-mêmes soient toxiques, et qu'ils modifient le métabolisme cellulaire avec le temps. De plus, l'exposition au laser peut endommager l'ACF et le rendre moins fluorescent (phénomène de « photobleaching »), diminuant progressivement l'intensité de l'image. Finalement, la réduction du signal peut aussi être causée par une mauvaise rétention intracellulaire de l'ACF, ou par des phénomènes de « quenching ». Le choix du composé fluorescent est donc critique. La « green fluorescent protein » (GFP) est outil de choix pour la microscopie confocale de cellules vivantes (Prasher, 1995). Cependant, les étapes de transfection nécessaires à l'utilisation de la GFP s'avèrent inappropriées pour la culture de chondrocytes primaires non-dédiérenciés.

Dans le but de mettre au point une méthode adéquate à l'observation de la migration des chondrocytes dans le système d'excroissances en interface, nous testerons quatre agents fluorescents différents. Le premier est un dextran fluorescent. Le dextran est un polysaccharide de haut poids moléculaire ayant une bonne solubilité dans l'eau, peu toxique, relativement inerte, et résistant à la plupart des glucosidases cellulaires. Il peut être incorporé à la cellule par une procédure simple et rapide basée sur la lyse osmotique des vésicules de pinocytose (Okada et Rechsteiner, 1982), afin d'obtenir un marquage uniforme du cytosol. Le deuxième est le PKH26. Ce dernier est un composé fluorescent qui peut être incorporé dans les régions lipidiques de la membrane, grâce à sa queue

aliphatique. D'après la documentation commerciale (écrite par Gaskill, de la compagnie Sigma), il permet de réaliser un marquage stable, uniforme, intense et reproductible des cellules vivantes. De plus, il serait non-cytotoxique et sans effet sur la prolifération. Le troisième est la Calcein AM. Cette substance est non-fluorescente à la base, mais le devient une fois convertie en calcéine après hydrolyse par les estérases intracellulaires. Elle est utilisée, entre autres, pour vérifier la viabilité et le volume des chondrocytes (Bush et Hall, 2003). Le quatrième est l'acridine orange. L'AO est un colorant chargé positivement au pH physiologique ($pK_a = 9.8$). Bien que ses liaisons exactes avec les composantes intracellulaires soient controversées (Kusuzaki et al., 2000), les affirmations suivantes sont souvent énoncées. Sous forme monomérique, l'AO fluoresce en vert et peut se lier aux chaînes d'ADN par intercalation. Il peut aussi lier l'ARN et les GAGs par liaisons électrostatiques, formant souvent des dimères qui émettent en rouge. La polymérisation, accompagnée d'une émission en rouge, peut aussi survenir lorsque l'AO est concentrée dans les lysosomes.

8.1 Hypothèses

Dans la présente étude, la microscopie confocale est utilisée afin de vérifier l'hypothèse que les chondrocytes ont des activités de migration et de prolifération importantes en surface d'agarose. Pour ce faire, nous comparerons premièrement le signal obtenu pour un marquage cytosolique (dextran fluorescent introduit par pinocytose), un marqueur membranaire (PKH26), un marqueur de viabilité (Calcein AM), et un marqueur de polyanions et de lysosomes (acridine orange). Deuxièmement, le meilleur candidat pour

les observations répétées en microscopie confocale sera utilisé pour observer les mouvements et divisions cellulaires.

8.2 Méthodologie

8.2.1 Internalisation de dextran par pinocytose

Le dextran est lié à l'Alexa Fluor 647 (Invitrogen, D22914). Son introduction par pinocytose s'est effectuée à 2 mg/ml, selon le protocole du produit Influx Pinocytic Cell-Loading Reagent (Molecular Probes, I14402). Les cellules marquées ont ensuite été encapsulée tel que décrit au chapitre 4.

8.2.2 Marquage membranaire avec PKH26

Diluent C ainsi que PKH26 font partie d'un kit (PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit, Sigma MINI26). Une solution exempte de FBS et contenant 10 millions de chondrocytes est centrifugée (10 minutes à 190g). Toutes les étapes ultérieures sont effectuées à température de la pièce. Immédiatement après avoir enlevé le surnageant en prenant soin de laisser moins de 25 μ L de milieu au dessus de précipité, les cellules sont resuspendues dans 500 μ L de Diluent C. Il est important de pipeter quelques fois pour assurer une bonne dispersion. Ajouter rapidement 500 μ L de PKH26, préalablement dilué avec Diluent C à une concentration de 4 μ M (stock à 1mM, dilué par un facteur 250). Il faut pipeter immédiatement de façon à obtenir rapidement un mélange homogène. Le mélange est incubé pendant 5 minutes, en inversant le tube périodiquement. La réaction

de marquage est stoppée par l'ajout de 1 ml de FBS, incubé pendant 1 minute. Le mélange est ensuite dilué par l'ajout de 2 ml de milieu de culture complet. Les cellules sont ensuite rincées trois fois, chaque rinçage consistant en la centrifugation, le retrait du surnageant, la resuspension des cellules dans 5 ml de milieu de culture complet, et le transfert dans un nouveau tube. Les cellules ainsi marquées sont ensuite encapsulées en agarose, tel que décrit dans le chapitre 4.

8.2.3 Incubation de Calcein AM

L'échantillon est incubé pendant 30 minutes à 37°C dans du milieu de culture, absent de FBS, comprenant 1 μ M de Calcein AM. L'échantillon est ensuite transféré dans du milieu de culture complet.

8.2.4 Marquage à l'acridine orange

Des tests préliminaires ont été effectués avec des chondrocytes cultivés en monocouche afin de déterminer la toxicité de l'AO. Les cellules sontensemencées dans une plaque de 24 puits à une concentration de 0,2 million par ml, et cultivés pendant 48 heures en présence de différentes concentrations d'AO (de 0 à 10 μ g/ml). Les cellules ont ensuite été observées en épifluorescence à l'aide d'un microscope inversé (Axiovert S100 TV, Zeiss) afin de localiser les marquages qui émettent en vert et en rouge. Le test MTT a aussi été effectué sur ces cellules afin de détecter les effets d'AO sur le métabolisme. Le choix des concentrations utilisées ultérieurement pour l'imagerie confocale est basé sur ces évaluations.

8.2.5 Essai MTT

Les cellules cultivées en présence d'AO sont incubées en présence de MTT pendant 3 heures, à une concentration de 0,5 mg/ml. Le milieu est ensuite aspiré, et les cristaux de formazan sont solubilisés pendant 30 minutes avec une solution d'extraction : 96% (v/v) d'isopropanol et 4% (v/v) de HCl à 0.1N. La densité optique est mesurée à 530 nm.

8.2.6 Microscopie confocale d'échantillons vivants

Une enceinte a été ajoutée au système de microscopie confocale afin de contrôler la température. Cette dernière permet de maintenir la température de l'échantillon, des objectifs ainsi que du plateau de déplacement. Un système d'injection de CO₂ comprimé permet de maintenir l'air humidifié à une concentration de 5%, dans une petite chambre fermée entourant l'échantillon. L'échantillon ne doit pas être introduit avant que la température de l'enceinte soit équilibrée à 37°C. Pour ce faire, le système de chauffage doit être mis en marche quelques heures auparavant. De plus, la chambre et les objectifs doivent être soigneusement nettoyés et stérilisés à l'aide d'éthanol 70% pour éviter la contamination bactérienne. Afin de minimiser l'évaporation de milieu de culture pendant l'acquisition, il est aussi essentiel d'introduire de petits réservoirs d'eau stérile dans la chambre; trois bouchons stériles de tubes de polypropylène de 15 ml sont utilisés à cet effet. L'ajout de 10% (v/v) de PS à l'eau stérile empêchera la prolifération de bactéries qui pourraient être présentes.

Une fois le système prêt, l'échantillon est transféré de sa plaque de culture vers un Pétri contenant du milieu de culture sans rouge de phénol. Il est préférable d'utiliser du milieu de culture qui ne contient pas de rouge de phénol, ce dernier devenant toxique sous excitation lumineuse. L'apport de L-ascorbate de sodium fraîchement préparé augmentera le taux de prolifération des chondrocytes, et agit en tant qu'antioxydant pour réduire le « photobleaching » (Knight et al., 2003). Le Pétri est ensuite inséré dans la chambre, à l'intérieur de l'enceinte préchauffée. L'objectif est tranquillement immergé dans le milieu de culture du Pétri, après avoir délicatement placé une goutte de milieu sous l'objectif pour empêcher la présence de bulle d'air. La mise au point à l'aide de la lumière halogène est facilitée en approchant le condenseur, muni d'une goutte d'huile, tout prêt de la base du Pétri, et en ajustant les diaphragmes de champ et d'ouverture afin d'augmenter le contraste. Une fois la zone à imager choisie, des images 2D sont acquises à différentes profondeurs, permettant la reconstruction d'images 3D. Dans certains cas, les acquisitions seront répétées à intervalles réguliers afin d'observer l'évolution des cellules dans le temps.

8.3 Résultats

8.3.1 Dextran fluorescent

Le marquage cytosolique au dextran fluorescent était très faible (résultat non-montré), et n'a pas permis d'obtenir des images tridimensionnelles.

8.3.2 PKH26

Le marquage membranaire au PKH26 (14 jours après le marquage et l'encapsulation) est détecté majoritairement dans les cellules situées à l'intérieur des excroissances (en rouge, têtes de flèche dans la figure 8.1), contrairement au marquage à Calcein AM, effectué juste avant l'observation microscopique et qui est présent dans les cellules internes (en vert, têtes de flèche dans la figure 8.1) et dans les cellules périphériques (en vert, flèches dans la figure 8.1). Ce résultat est clairement visible dans la reconstruction tridimensionnelle (figure 8.2). Comme le signal de PKH26 est dilué à chaque division cellulaire, ce résultat indique que les cellules périphériques ont une activité de prolifération supérieure aux cellules internes.

Le phénomène de « photobleaching » du PKH26 était trop important pour effectuer des acquisitions répétées du même échantillon. La dynamique des cellules n'a donc pas pu être observée avec ce marqueur.

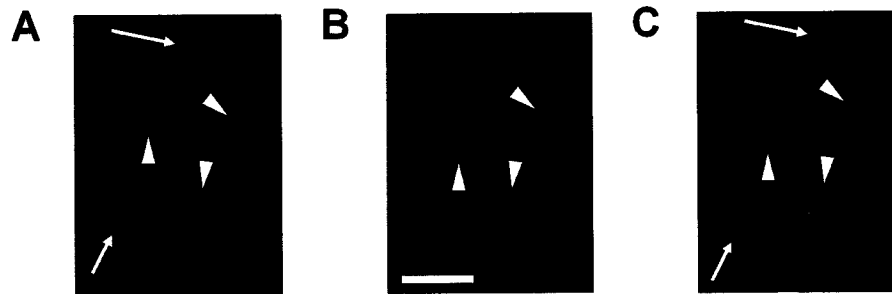


Figure 8.1 : Image confocale 2D d'une excroissance marquée au PKH26 et à Calcein AM.

Les chondrocytes ont été marqués au PKH26 (rouge) avant l'encapsulation en agarose. Après 14 jours en culture, l'excroissance a été incubée avec Calcein AM (vert) et imagée par microscopie confocale. A) Marquage à Calcein AM, de chondrocytes situés au centre (têtes de flèche) et en périphérie (flèches) de l'excroissance. B) Marquage membranaire au PKH26 des chondrocytes du centre de l'excroissance seulement (têtes de flèche). C) Image combinée de Calcein AM (vert) et de PKH26 (rouge). Têtes de flèche : cellules à l'intérieur de l'excroissance. Flèches : cellules en périphérie de l'excroissance. Barre d'échelle = 30 μm .

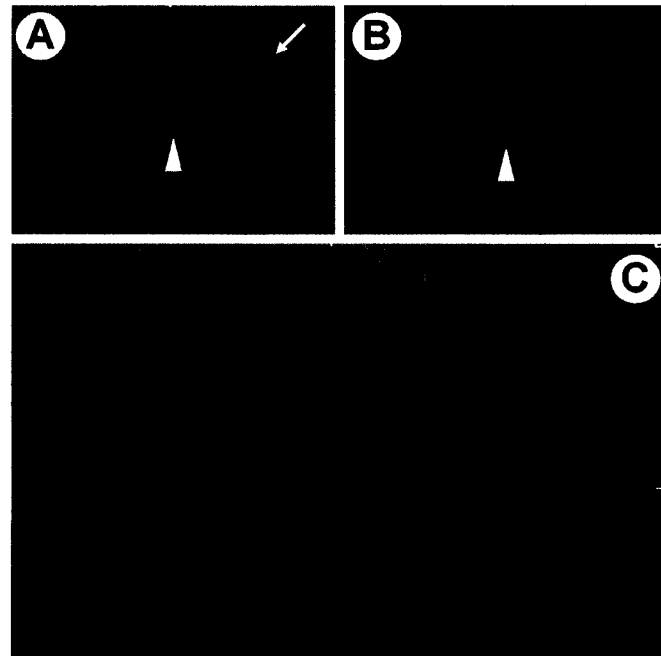


Figure 8.2 : Reconstruction 3D d'une excroissance marquée au PKH26 et à Calcein AM.

Les chondrocytes ont été marqués au PKH26 (rouge) avant l'encapsulation en agarose. près 14 jours en culture, l'excroissance a été incubée avec Calcein AM (vert) et imagée par microscopie confocale. Ces images sont des vues de côté de la reconstruction 3D de l'excroissance, obtenue en utilisant la fonction Iso Surface du logiciel Surpass (Bitplane). A) Section élargie transversale montrant le marquage à Calcein AM, des cellules intérieures (tête de flèche) et superficielles (flèche). B) Section élargie transversale montrant le marquage au PKH26, surtout des cellules intérieures (tête de flèche). C) Reconstruction totale du marquage au PKH26 (rouge), combinée à la reconstruction partielle (moitié arrière) du marquage à Calcein AM. La moitié avant du marquage à Calcein AM a été omise afin de visualiser les cellules intérieures.

8.3.3 Calcein AM

Le marquage à Calcein AM est très net, et permet d'observer différentes morphologies cellulaires. Des cellules plates et allongées (flèche dans la figure 8.3 A), d'allure fibroblastique (flèche dans la figure 8.3 B), se trouvent sur la surface supérieure du construit d'agarose (ligne brisée dans la figure 8.3 A). Cette morphologie fait contraste avec les cellules arrondies situées à l'intérieur du gel d'agarose (têtes de flèche dans les figures 8.3 A et B). Un amas cellulaire (flèche dans la figure 8.4 A), probablement une excroissance naissante, est attaché à la face latérale du construit d'agarose (ligne brisée dans la figure 8.4 A).

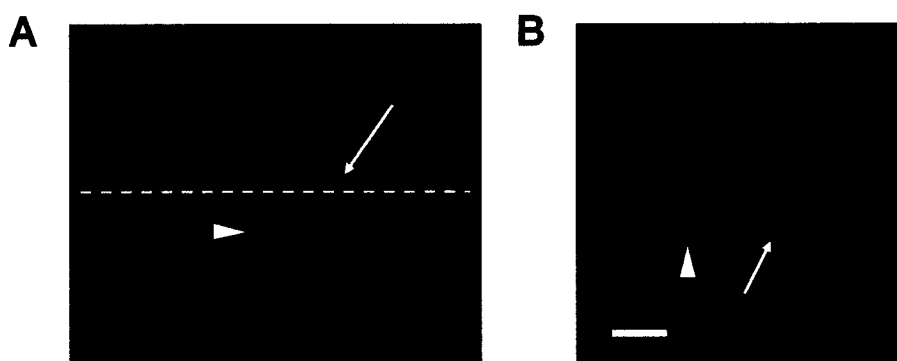


Figure 8.3 : Image 3D de chondrocytes marqués à Calcein AM, à l'intérieur et en surface supérieure du construit d'agarose.

Image 3D, acquise par microscopie confocale, du marquage à Calcein AM de chondrocytes après 11 jours de culture. A) Vue de côté montrant les chondrocytes dans le gel d'agarose (tête de flèche), ainsi que les cellules étendues (flèche) sur la surface supérieure (ligne brisée) du construit d'agarose. B) Vue de dessus montrant les morphologies arrondie des cellules dans l'agarose (tête de flèche), et allongée des cellules en surface (flèche). Barre d'échelle = 25 μ m.

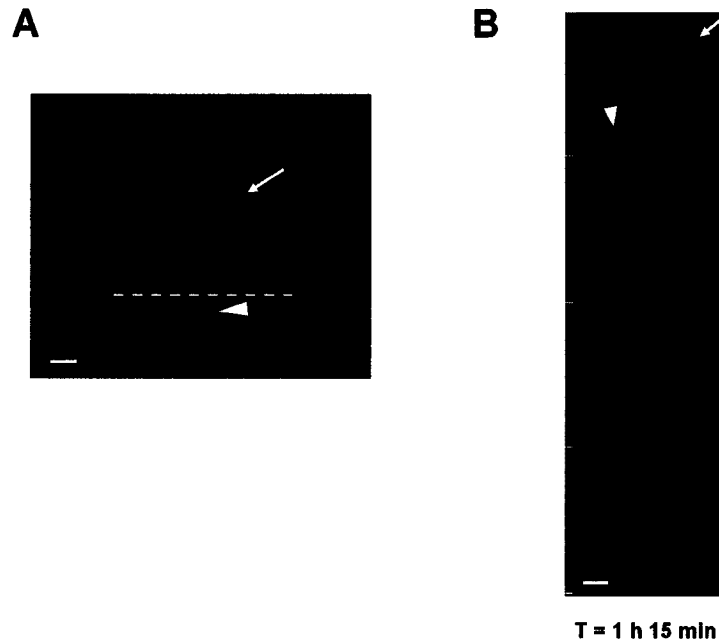


Figure 8.4 : Images 3D de chondrocytes marqués à Calcein AM, à l'intérieur et en surface latérale du construit d'agarose.

Images 3D, acquise par microscopie confocale, du marquage à Calcein AM de chondrocytes après 11 jours de culture. A) Vue de côté montrant les chondrocytes dans le gel d'agarose (tête de flèche), ainsi qu'une excroissance (flèche) sur la surface latérale (ligne brisée) du construit d'agarose. B) Vue en angle montrant les chondrocytes dans l'agarose (tête de flèche), ainsi qu'une excroissance (flèche) sur la surface latérale du construit d'agarose. La séquence de 4 images (extraites d'une série de 8 acquisitions étalées sur 1 heure et quart) montrent la perte d'intensité du signal de l'excroissance. Barre d'échelle = 25 μ m.

Le signal de Calcein AM décroît en intensité avec le temps, donnant une image des excroissances qui manque de contraste après moins de 2 heures (figure 8.4 B). Le signal est d'une très faible intensité après 4 heures (résultat non montré). La dynamique des cellules à long terme est donc difficilement observable avec Calcein AM.

8.3.4 Acridine orange

Le marquage des chondrocytes en monocouche, observé par épifluorescence, est modulé par la concentration d'AO utilisée (tableau 8.1). Le signal vert est principalement nucléaire pour les concentrations supérieures à 0,1 µg/ml, alors qu'il est cytosolique pour les concentrations inférieures. Le signal rouge est ponctuel et intense pour les concentrations de 0,1 et 1 µg/ml, alors qu'il n'est pas détectable pour les concentrations plus petites. Il semble donc qu'aux concentrations supérieures à 0,1 µg/ml, l'AO interagisse fortement avec différentes composantes cellulaires.

Tableau 8.1 : Localisation des émissions d'acridine orange.

[AO], µg/ml	Signal vert	Signal rouge
10	Noyau	Cytosol
1	Noyau	Points intenses
0,1	Noyau et cytosol	Points intenses
0,01	Cytosol	Non détectable
0,001	Cytosol	Non détectable

Dans le même ordre d'idée, c'est à ces mêmes concentrations que la toxicité d'AO est détectable par le test MTT (figure 8.5). Nous avons décidé d'utiliser les concentrations

d'AO inférieures à 0,1 $\mu\text{g/ml}$, plus particulièrement 1 ng/ml et 10 ng/ml , afin d'obtenir un marquage cytosolique pour effectuer l'imagerie par microscopie confocale.

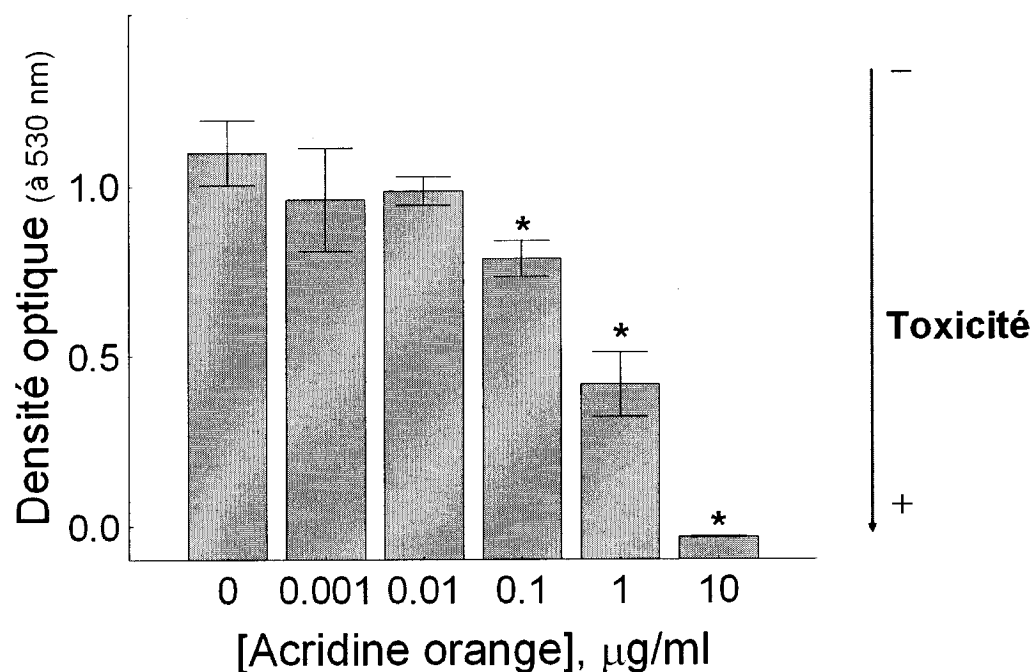


Figure 8.5 : Graphique de la toxicité en fonction de la concentration d'acridine orange.

Les chondrocytes cultivés en monocouche pendant 48 heures en présence de différentes concentrations d'acridine orange, ont été soumis à l'essai MTT. Dans cet essai, la densité optique diminue avec l'augmentation de toxicité. Moyenne $\pm$ écart type ($n = 4$). (*) Différence significative ($p < 0.05$) avec la culture en absence d'acridine orange. ANOVA suivi d'un test post-hoc Tukey HSD.

Migration des chondrocytes en monocouche

Avant de débiter l'imagerie des excroissances en présence d'AO, nous avons imagé une culture de chondrocytes en monocouche. Le signal s'est avéré suffisamment intense, à une concentration de 1 ng/ml, pour observer les cellules en utilisant la puissance minimale du laser. De plus, le signal n'a pas diminué d'intensité au cours des observations répétées, et ce même après 180 acquisitions étalées sur 3 heures et demie. Nous avons ainsi pu observer la migration d'un chondrocyte sur plusieurs dizaines de micromètres (tête de flèche dans la figure 8.6). Le marquage est diffus dans cytosol, alors qu'il est intense dans certaines vacuoles (figure 8.6).

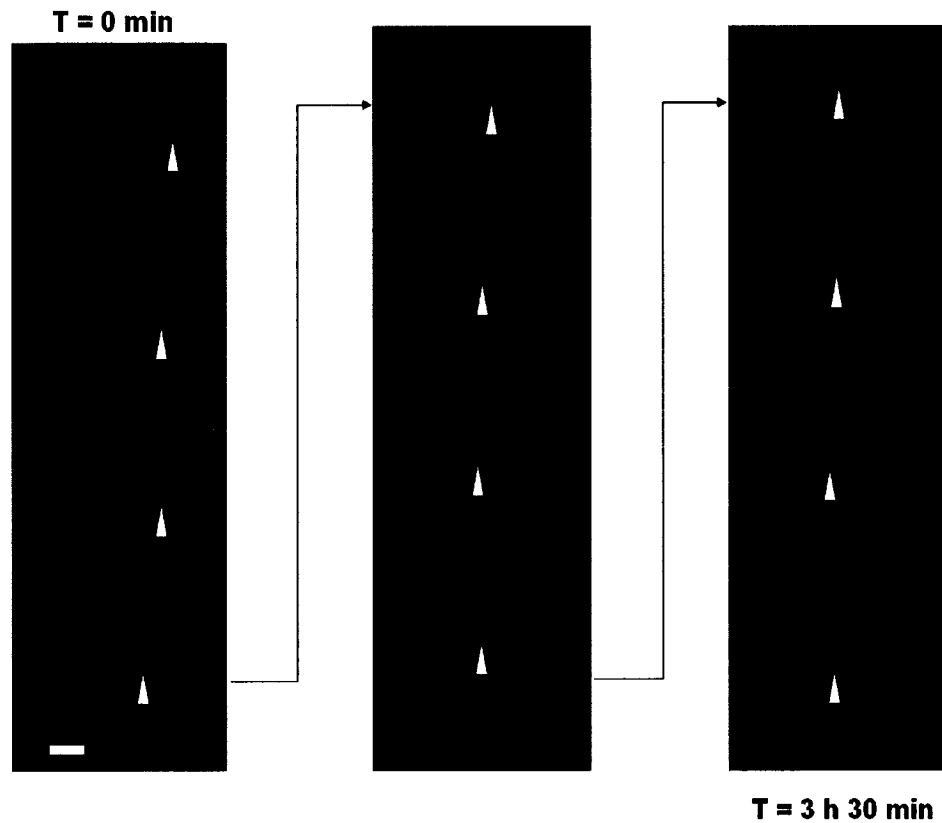


Figure 8.6 : Migration d'un chondrocyte en monocouche marqué à l'acridine orange.

Les chondrocytes en Pétri ont été imagés par microscopie confocale en présence d'AO à une concentration de 1 ng/ml. Les 12 images présentées (extraites d'une série de 180 acquisitions étalées sur 3 heures et demie) montrent un chondrocyte qui migre sur une distance d'environ 60 μm en 3 heures et demie (tête de flèche). Barre d'échelle = 30 μm .

Dynamique des cellules sur la face latérale des construits d'agarose

Bien que la concentration d'AO de 1 ng/ml soit suffisante pour imager les chondrocytes en monocouche, elle donnait un signal quelque peu faible pour les excroissances. Une concentration de 10 ng/ml a donc été utilisée pour les acquisitions ultérieurement présentées dans ce chapitre.

Les amas liés à la face latérale des construits d'agarose (ligne brisée dans la figure 8.7 A) sont dynamiques, et peuvent se remodeler (tête de flèche dans la figure 8.7 A), entre autres grâce à la mobilité des chondrocytes (cellule encerclée dans la figure 8.7 B). Les cellules dans l'agarose ne démontrent aucun mouvement (cellules situées à gauche de la ligne brisée dans la figure 8.7 A). Il est intéressant de noter que le signal ne diminue pas d'intensité, même après 72 acquisitions étalées sur 12 heures (figure 8.7 A). Comme pour les cellules en monocouche, le marquage est diffus dans cytosol, alors qu'il est intense dans certaines vacuoles (figure 8.7).

Dynamique des cellules sur la face supérieure des construits d'agarose

Sur la face supérieure des construits d'agarose, les cellules arrondies se promènent (cellule encerclée dans la figure 8.8 A) sur un réseau de cellules allongées. Des divisions cellulaires (ligne brisée dans la figure 8.8 B) sont clairement visibles.

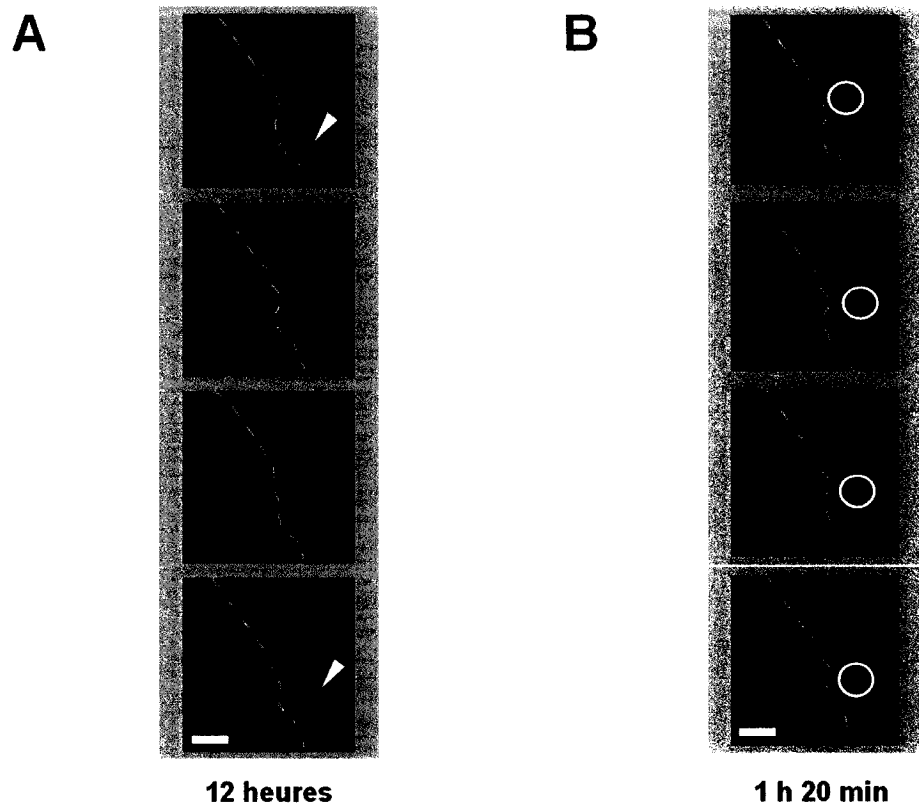


Figure 8.7 : Dynamique d'un amas cellulaire marqué à l'acridine orange, sur la surface latérale du construit d'agarose.

Une culture en excroissance a été imagée par microscopie confocale en présence de 10 ng/ml d'AO, à la surface latérale du construit d'agarose. Les images présentées sont extraites d'une série de 72 acquisitions étalées sur 12 heures. A) La ligne brisée délimite la surface convexe et latérale du construit d'agarose, vue d'en haut. L'amas cellulaire en surface (à droite de la ligne brisée) double en épaisseur (tête de flèche, la première image versus la dernière), alors que les chondrocytes à l'intérieur de l'agarose demeurent statiques (à gauche de la ligne brisée). B) Une cellule en migration sur la surface de l'amas (encerclée). Barre d'échelle = 30 μm .

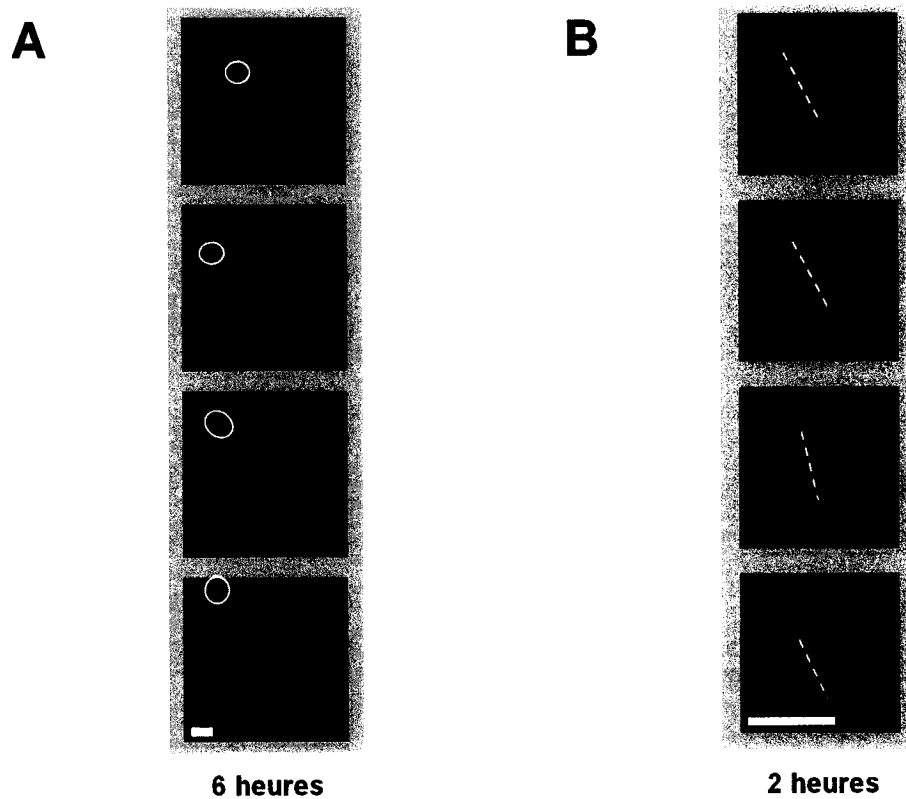


Figure 8.8 : Dynamique des chondrocytes marqués à l'acridine orange, sur la surface supérieure du construit d'agarose.

Une culture en excroissance a été imagée par microscopie confocale en présence de 10 ng/ml d'AO, à la surface supérieure du construit d'agarose. Les images présentées sont extraites d'une série de 72 acquisitions étalées sur 12 heures. A) Des chondrocytes de forme arrondie se déplacent (un exemple est encerclé) sur un réseau de cellules allongées. B) Division d'une cellule arrondie (ligne brisée). Barre d'échelle = 20 μm .

Vue d'ensemble autour de l'arête du construit d'agarose

Une vue d'ensemble autour de l'arête du construit d'agarose (ligne brisée dans les figures 8.9 B et C) permet d'observer à la fois les cellules de la face supérieure (région « SUP » dans la figure 8.9 B) et les masses cellulaires accrochés à la face latérale (région « M » dans la figure 8.9 B et C). Les projections des images 2D acquises à différentes profondeurs (voir le schéma de la figure 8.9 A) révèlent les inhomogénéités dans la distribution cellulaire. Des cellules de forme ronde (« R » dans la figure 8.9 C) se déplacent sur le réseau de cellules allongées (« Al » dans la figure 8.9 C). Les cellules situées près de l'arête (flèche dans la figure 8.9 C) sont très mobiles, alors qu'elles sont statiques dans l'agarose (tête de flèche dans la figure 8.9 C). Les cellules sont aussi très mobiles sur la masse cellulaire (« M » dans la figure 8.9 C). Pour obtenir cette vue globale, l'acquisition s'est effectuée à un grossissement relativement faible. La résolution n'est donc pas suffisante pour observer les déplacements sur des images successives imprimées sur papier. Sur l'animation des 144 acquisitions étalées pendant 14 heures (non-montrée ici), il est possible de voir des cellules qui migrent de la face supérieure jusqu'à l'arête, ainsi que des cellules qui se déplacent de l'arête vers la masse cellulaire de la face latérale.

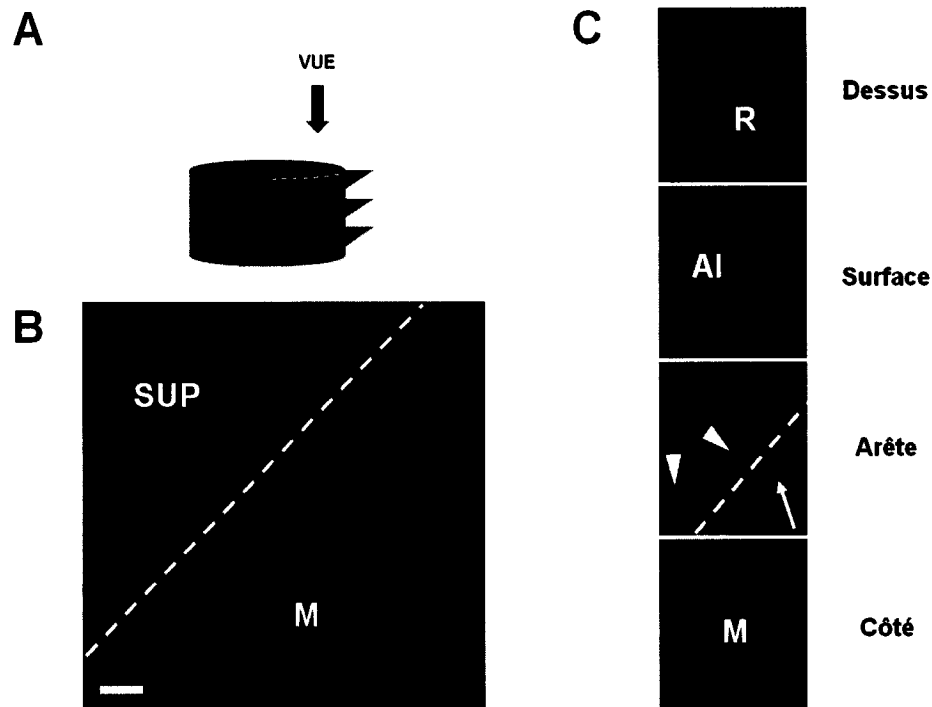


Figure 8.9 : Vue d'ensemble des chondrocytes autour de l'arête du construit d'agarose.

Une culture en excroissance a été imagée par microscopie confocale en présence de 10 ng/ml d'AO. A) Schéma montrant que le cylindre d'agarose a été imagée de dessus, de façon à voir la face supérieure ainsi que les cellules accrochées sur la face latérale. Des images 2D ont été acquises à différentes profondeurs. B) Projection de la reconstruction 3D totale. La ligne brisée représente l'arête joignant la surface supérieure (SUP) et la surface latérale (qui descend sous la ligne brisée, perpendiculairement au plan de l'image). Une masse cellulaire de taille importante (M) est accrochée à la face latérale. C) Projections des reconstructions 3D partielles, montrant les cellules rondes (R) sur le dessus du réseau de cellules allongées (Al), en surface du cylindre. Des amas cellulaires parcourent l'arête (flèche), tandis que les cellules dans l'agarose sont statiques (têtes de flèche). Plus bas, une masse importante de cellules est accrochée à la face latérale. Barre d'échelle = 50 μ m.

Dynamique d'une excroissance ayant accumulé une matrice extracellulaire

Le marquage à l'AO permet aussi le marquage d'excroissances ayant accumulé une MEC. Les cellules emprisonnées dans la MEC sont statiques (tête de flèche dans la figure 8.10 A). Par contre en périphérie, le remodelage de groupes de cellules (encerclées dans la figure 8.10 A), la migration (encerclée dans la figure 8.10 B) ainsi que la division cellulaire (ligne brisée dans la figure 8.10 C) sont observées. Il est intéressant de noter qu'il y ait un marquage de l'ADN pendant la division (figure 8.10 C).

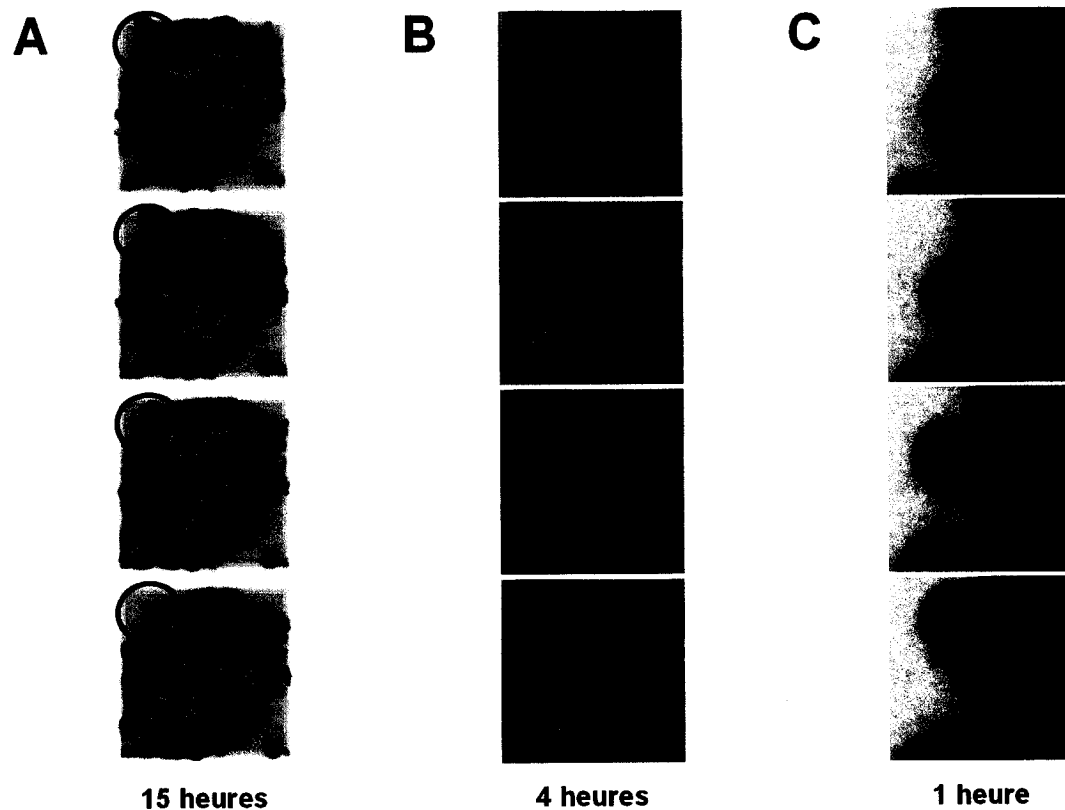


Figure 8.10 : Dynamisme des cellules en périphérie d'une excroissance ayant accumulé une matrice extracellulaire.

Une excroissance a été imagée par microscopie confocale en présence de 10 ng/ml d'AO. Les images présentées sont extraites d'une série de 101 acquisitions étalées sur 17 heures. A) Un amas cellulaire (encerclé) est très dynamique en périphérie de l'excroissance, tandis que les cellules emprisonnées dans la MEC sont statiques (tête de flèche). B) Une cellule (encerclée) migre en surface de l'excroissance. C) Une cellule de l'amas encerclé en A se divise (ligne brisée). Barre d'échelle = 20 μm .

8.4 Discussion

Nous avons mis au point une technique simple et efficace de marquage, qui nous a permis de vérifier par microscopie confocale que les chondrocytes ont des activités de migration et de prolifération importantes en surface d'agarose.

Le signal cytosolique généré par le dextran fluorescent, introduit dans les cellules par pinocytose, était très faible et ne nous a pas permis d'imager adéquatement les chondrocytes. Nous n'avons pas tenté d'optimiser ce marquage par la suite. Le signal membranaire de PKH26 était suffisant pour obtenir une image tridimensionnelle. Il nous a permis de confirmer un des résultats du chapitre 7 (figures 7.4 A, 7.5 A et 7.6) voulant que les cellules en périphérie des excroissances prolifèrent davantage que les cellules centrales. Cependant, le laser était utilisé à une puissance si élevée qu'il induisait la perte du signal de PKH26 (« photobleaching » important), empêchant d'obtenir des images successives. L'utilisation de Calcein AM nous a permis d'acquérir des images de qualité. Nous avons ainsi pu observer la présence de cellules allongées sur la surface supérieure du construit d'agarose, et la présence d'excroissances de petite taille sur la surface latérale. La réduction avec le temps de l'intensité et du contraste du marquage des excroissances ne nous a pas permis de suivre la dynamique des cellules. Il semble que cette perte soit associée à un manque de rétention du marqueur plutôt qu'au « photobleaching ».

La méthode de marquage choisie est basée sur l'ajout d'une très faible concentration d'acridine orange (10 ng/ml), pendant toute la durée de l'acquisition d'images. À cette concentration, l'AO semble ne pas être toxique (test MTT, graphique de la figure 8.5). Il est connu qu'à des concentrations plus élevées, l'AO peut induire la rétention intracellulaire de PG dans des fibroblastes (Handrock et al., 1992), caractérisée par la présence d'un signal vésiculaire rouge intense. Nous avons noté l'absence de ce signal pour les faibles doses d'AO (tableau 8.1), suggérant qu'elle n'interagit pas avec les PG intracellulaires. Kusuzaki et al. (2001) ont rapporté que l'AO utilisé à 500 ng/ml inhibe transitoirement la mitose des chondrocytes, menant à la binucléation. Nous n'avons pas observé cet effet en utilisant 10 ng/ml.

Ce protocole de marquage avec l'AO permet d'acquérir plus d'une centaine d'images tridimensionnelles étalées sur plus d'une douzaine d'heures, sans perte de signal et sans signe apparent de dommages cellulaires. Le marquage obtenu est diffus dans le cytosol, et ponctuel dans certaines vacuoles, qui pourraient être des lysosomes. L'ADN est aussi marqué à certains stades de la division cellulaire.

Nous avons observé que les cellules à la surface de l'agarose sont très dynamiques. Sur la face supérieure du construit est posé un réseau de cellules allongées, auquel s'attachent des cellules sphériques qui peuvent se déplacer rapidement et se diviser. Des amas cellulaires mouvants ont été observés sur la face latérale du gel d'agarose, et semblent être alimentés en partie par les cellules de la face supérieure. Les cellules à l'intérieur

des excroissances, encastrées dans la MEC, sont plutôt statiques, tout comme les cellules encapsulées dans l'agarose. En périphérie des excroissances, les cellules peuvent toujours migrer et se diviser, et forment parfois de petits amas dynamiques.

En conclusion, nous avons vérifié l'hypothèse que les chondrocytes ont une activité migratoire importante sur la surface des construits d'agarose, en plus d'une activité de prolifération. Pour y parvenir, nous avons choisi le marquage continu avec l'acridine orange, à faible concentration. Avec cette technique, nous avons aussi pu observer que les cellules à l'intérieur des excroissances sont statiques, alors qu'elles sont très dynamiques en périphérie.

Chapitre 9: Discussion générale

Les résultats que nous avons publiés dans l'article intitulé « Aged Bovine Chondrocytes Display a Diminished Capacity to Produce a Collagen-rich, Mechanically Functional Cartilage Extracellular Matrix » sont complémentaires aux précédents sur l'effet de l'âge, pour les cultures de chondrocytes encapsulés en matrice tridimensionnelle. Nos analyses biochimiques et histologiques indiquent clairement que les chondrocytes provenant d'animaux âgés ont une capacité réduite de proliférer et de produire une matrice riche en collagène, comparativement aux chondrocytes d'animaux plus jeunes. Par contre, nos expériences ne permettent pas de déterminer la cause exacte de la baisse d'activité cellulaire avec l'âge. Elle pourrait être reliée entre autres à la sénescence, à une réponse réduite aux facteurs de croissance, ou à une baisse de sécrétion d'éléments paracrines. Il serait intéressant de vérifier si la méthylation de l'ADN y joue un rôle. Des expériences plus poussées pourraient mener à de nouvelles stratégies permettant de « rajeunir » les cellules qui ne sont plus performantes.

La caractérisation mécanique des construits *in vitro* montre pour la première fois que les chondrocytes « âgés » produisent une matrice moins rigide et plus perméable que celle élaborée par les jeunes. Les paramètres extraits à l'aide du modèle biphasique renforcé de fibrilles présentent une forte corrélation avec les contenus matriciels. Il serait intéressant de vérifier si ces corrélations peuvent être observées dans d'autres systèmes de culture tridimensionnelle, dans le but d'utiliser le modèle comme outil de

caractérisation fonctionnelle. L'utilisation d'un modèle qui représente plus fidèlement les chondrocytes et leur matrice péri-cellulaire encapsulés dans une matrice homogène, semblable à celui développé par Alexopoulos et al. (2005), pourrait optimiser l'interprétation des courbes expérimentales obtenues par les compressions mécaniques.

Nous sommes conscients que la présence d'excroissances à la surface des construits d'agarose peut aussi participer à la réponse mécanique des échantillons sous compression, mais n'avons pas évalué directement leur effet. La caractérisation des ces excroissances révèle qu'elles diffèrent selon l'âge des animaux-donneurs. Le maximum de cellules interfaciales a été mesuré pour les chondrocytes de jeunes veaux adultes, qui produisent une MEC riche en GAGs et en Coll II. Nous n'avons pratiquement pas détecté de Coll I dans cette MEC, par immunohistochimie sur sections de paraffine. Or, il sera important de confirmer ce résultat en utilisant des cryosections, sachant que l'anticorps utilisé (Clone I-8H5) ne reconnaît pas toujours le Coll I enrobé dans la paraffine, tel qu'observé par Chevrier et al. (2005) pour le tissu osseux. Les chondrocytes de fœtus bovins en surface d'agarose adoptent plutôt une forme allongée de type fibroblastique, et produisent une MEC contenant le Coll II et le Coll I, dépourvue de GAGs. La présence de Coll I dans ce tissu concorde avec la détection de son ARNm par Hoemann et al. (2005), lors de cultures de chondrocytes de jeunes veaux dans des gels d'agarose ou de chitosane. Quant aux chondrocytes de vaches âgées, ils ne forment principalement que de petits amas cellulaires, pauvres en MEC.

Le fait que les cellules d'animaux âgés ne produisent pas d'excroissances est peu surprenant, étant donnée leur baisse de prolifération et de synthèse de MEC observée dans plusieurs systèmes. Par contre, l'absence d'excroissances hyalines pour les chondrocytes fœtaux est intrigante. Hiscock et al. (2000) ont noté qu'une des trois enzymes de synthèse d'HA est régulée différemment selon l'âge. De plus, Kamada et al. (2002) ont noté que les chondrocytes fœtaux accumulent moins de HA en culture d'alginate, par rapport aux chondrocytes matures. Une concentration insuffisante de HA pourrait expliquer l'incapacité de ces cellules à développer une matrice hyaline. Une autre hypothèse est que les chondrocytes fœtaux ne secrètent pas le ou les facteurs chimiques qui favorisent le développement d'excroissances, hypothèse qui pourrait être vérifiée par une co-culture avec des chondrocytes matures. Chen et al. (2004) ont observé que TGF- β 1 n'est pas exprimé dans le cartilage articulaire fœtal. Il serait intéressant de tester si l'ajout de cette cytokine au milieu de culture peut induire la production d'excroissances hyalines.

TGF- β semble jouer un rôle crucial dans l'induction de la formation d'ostéophytes par les cellules du périoste (Van der Kraan et Van den Berg, 2007). Comme les excroissances ont une apparence macroscopique semblable aux ostéophytes, la présence de cellules du périoste dans nos cultures pourrait être soupçonnée. Toutefois, il est peu probable que cette contamination ait eu lieu car seulement la zone de chargement était prélevée (au centre de la surface articulaire de la tête fémorale). De plus, les cellules localisées dans les premières dizaines de micromètres sous la surface du tissu d'origine sont toujours

mortes (résultat du test de viabilité cellulaire Calcein AM / Ethidium Homodimer-1, non montré) pour les veaux adultes utilisés. Il semble donc que les cellules provenant de la zone superficielle du cartilage ne soient pas responsables de la formation des excroissances, mais il est probable qu'une autre sous-population soit spécifiquement impliquée.

La morphologie cellulaire dans la région centrale des excroissances est la même que celle observée antérieurement pour les chondrocytes dans leur environnement naturel, i.e. le cartilage articulaire, et ceux encapsulés en agarose. Cependant, les cellules périphériques sont de forme plus allongées, et certaines d'entre elles portent des extensions d'actine pointant vers l'extérieur des excroissances. Ces extensions ne semblent pas être un artéfact dû à la fixation et au marquage, car elles ont aussi été observées pour des échantillons vivants (résultat non-montré). De plus, des résultats préliminaires (non-montrés) ont révélé la forte concentration d'intégrine β_1 sur ces extensions. Des expériences supplémentaires sont nécessaires à l'évaluation du rôle de ces dernières dans la génération d'excroissances.

La prolifération cellulaire, localisée majoritairement en périphérie des excroissances, suggère le développement de ces dernières par un mécanisme appositionnel semblable à certains mécanismes observés dans la plaque de croissance. La détection de marqueurs spécifiques à certaines zones de la plaque de croissance pourrait fournir de l'information supplémentaire quant à la formation des excroissances. Par exemple, des résultats

préliminaires (non-montrés) nous ont révélé la présence de Patched-1 (récepteur de Ihh localisé dans la zone de prolifération de la plaque de croissance) dans les chondrocytes près de l'interface agarose-milieu de culture, suggérant l'implication de Ihh dans la génération d'excroissances. Des expériences systématiques sur la localisation de différents récepteurs pourront mettre en évidence la participation de facteurs de croissance spécifiques.

Après un mois de culture, le contenu cellulaire externe (en surface d'agarose) est du même ordre de grandeur que le contenu interne (dans l'agarose). Des études supplémentaires, portant sur la migration des chondrocytes à travers le gel d'agarose, sont requises afin de déterminer le rendement effectif des chondrocytes à l'interface. S'il était montré que la migration est faible, donc que le rendement effectif est élevé, la culture de chondrocytes en interface d'agarose deviendrait un puissant outil de multiplication de chondrocytes non différenciés. Il est important de réaliser que la migration cellulaire dans l'agarose ne s'effectue vraisemblablement pas à travers les pores du gel, ces derniers ayant un diamètre d'environ 100 nm (Narayanan et al., 2006), mais plutôt en se créant des orifices vers le milieu de culture.

En plus de la migration s'effectuant de l'intérieur de l'agarose vers l'interface, la migration en surface des construits d'agarose semble être un facteur important dans la formation des excroissances. Cette migration cellulaire a d'abord été proposée afin d'expliquer la distribution inhomogène des excroissances sur différents construits

d'agarose, puis a été observée directement par microscopie confocale. Nous avons mis au point une technique simple de marquage des chondrocytes, par incubation continue de faibles doses d'acridine orange, permettant d'observer pendant plusieurs heures la dynamique des chondrocytes vivants. Cette méthode ne semble pas être toxique (essai MTT, observation de morphologie cellulaire), mais des études plus poussées doivent être effectuées afin d'évaluer ses effets sur les différentes activités cellulaires. Par exemple, nous avons noté que l'acridine orange (à faible concentration) ne semble pas colorer l'ADN des chondrocytes en excroissance, sauf lors de la division. Il est possible que l'ADN devienne plus facilement accessible à l'acridine orange lors du déroulement de la chromatine, et que le marquage devienne toxique à ce moment-là. Malgré ce fait, nous avons pu observer le réarrangement des excroissances, la migration des cellules, ainsi que la division cellulaire par cette méthode.

À la lumière de nos observations, nous proposons le modèle suivant de formation des excroissances. Les chondrocytes encapsulés prolifèrent à l'intérieur de l'agarose et forment des îlots. Les îlots situés près de la surface du construit d'agarose exercent une pression vers l'extérieur, et finissent par se créer une ouverture vers le milieu de culture. Les cellules qui atteignent la surface supérieure s'étalent et forment un réseau de cellules allongées, sur lequel des cellules arrondies s'accrochent ensuite afin de se déplacer et se diviser. Les cellules qui atteignent la surface latérale ressentent une force de cisaillement, induite par la gravité, et forment des « grappes » au lieu de s'étaler. Quand les cellules de la face supérieure réussissent à se regrouper en quantité suffisante, elles

initient la formation d'une excroissance. Dans le cas contraire, elles se déplacent jusqu'à atteindre l'arête du construit d'agarose, pour ensuite migrer vers le bas de la surface latérale et rejoindre les grappes déjà présentes. La prolifération cellulaire se poursuit à toutes les étapes. Toutefois, dans la partie centrale des excroissances s'effectue la production de MEC qui limite la division cellulaire. Parallèlement, les excroissances qui se forment sur la surface inférieure (sous le construit d'agarose), finissent par tomber au fond du puits. Des acquisitions supplémentaires sont requises afin de confirmer comment se comportent les cellules aux premiers moments de leur arrivée à la surface du construit. La vérification de ce modèle permettrait d'optimiser la géométrie des échantillons d'agarose en fonction du but visé (observer la migration, étudier l'effet du cisaillement sur l'adhésion et la production de MEC, optimiser la multiplication cellulaire, etc.).

En plus de la géométrie, les facteurs chimiques peuvent aussi être variés afin de maximiser la production d'excroissances, et de mieux comprendre leurs mécanismes d'action. Kisiday et al. (2005) ont montré que le remplacement du FBS par ITS (insuline, transferrine et sélénium) inhibe la formation d'excroissances en interface d'agarose. Des facteurs de croissance présents dans le FBS semblent donc être impliqués, et leur utilisation pourrait être optimisée. Des résultats préliminaires (non montrés) suggèrent que la concentration d'ascorbate est critique dans la formation d'excroissances au caractère hyalin : une concentration trop faible limite grandement la prolifération cellulaire, tandis qu'une concentration élevée semble induire l'allongement des cellules et la production d'un tissu fibreux. Il serait intéressant de vérifier si les effets observés pour

les fortes doses d'ascorbate sont reliés à la production de Coll I. Un milieu de culture ostéogénique pourrait aussi être utilisé afin de tenter l'induction de l'hypertrophie et de la calcification des excroissances.

Finalement, des macromolécules impliquées dans les interactions cellules-MEC devraient être étudiées dans les excroissances (fibronectine, HA, Coll VI, etc.), tout comme les récepteurs impliqués dans les interactions cellules-MEC et cellules-cellules (intégrines, cadhérines, CD44, etc.). En lien avec la migration observée, il serait intéressant de vérifier la présence de cadhérine-11, qui semble être impliqué dans la mobilité des cellules (Kiener et al., 2006) et a été détecté dans des chondrocytes primaires de la plaque de croissance (Matsusaki et al., 2006).

Chapitre 10: Conclusion

Dans un rapport publié en 2003 (WHO, 2003), la directrice générale de l'OMS souligne le fait suivant : bien que les maladies mortelles attirent la majeure partie de l'attention publique, ce sont les maladies musculosquelettiques ou rhumatoïdes qui sont la cause majeure de morbidité dans le monde, influençant substantiellement la santé et la qualité de vie, et infligeant d'énormes coûts aux systèmes de santé. L'EULAR (« European League Against Rheumatism ») est d'avis que les autorités n'aient pas pris ce message au sérieux en Europe et initie l'AAA (« Alliance Against Arthritis »), qui organisera des activités publiques à travers le continent européen afin de changer l'attitude des politiciens (Smolen, 2007). Il est clair que l'augmentation des budgets alloués à la recherche permettrait de former davantage de jeunes chercheurs ainsi que d'augmenter le nombre de laboratoires, ce qui favoriserait l'éclosion de découvertes menant à des thérapies cliniquement applicables. Cependant, comme les sources de financement sont inévitablement limitées, il est primordial de se questionner périodiquement sur la pertinence des voies de recherche entreprises afin d'éviter le gaspillage de temps et de ressources. En ce sens, nous croyons que la présente étude guide vers une certaine réorientation des projets reliés au cartilage articulaire, et apportent de nouveaux outils expérimentaux.

La première partie de ce travail permet de répondre à la question de départ qui a initié notre étude : est-ce que l'âge des animaux est un paramètre critique à considérer dans la

vérification d'hypothèses par les études de chondrocytes *in vitro*? À la lumière de nos observations, il apparaît que l'âge est effectivement un paramètre critique, voire primordial. Les techniques de MACI sont extrêmement coûteuses et la démonstration de leur efficacité, qui demande des tests cliniques de longue durée sur beaucoup de patients, n'est pas encore convaincante (Clar et al., 2005). Avant de passer aux tests cliniques, il semble nécessaire de retourner aux études préliminaires *in vitro* avec des chondrocytes âgés afin de déterminer la réelle participation des chondrocytes autologues dans la génération de cartilage *de novo*. Il serait probablement plus efficace de concentrer davantage de ressources dans l'établissement de techniques de régénération de cartilage qui n'utilisent pas l'implantation de chondrocytes autologues.

La seconde partie de ce travail permet de proposer la génération d'excroissances en interface d'agarose comme nouveau système de culture de chondrocytes. Contrairement aux systèmes existants, ce dernier favorise la prolifération cellulaire en plus de la formation d'une matrice hyaline. L'étude du développement des excroissances pourrait aussi devenir un modèle d'étude de croissance par apposition.

Finalement, la technique d'observation par microscopie confocale des chondrocytes vivants, marqués à l'acridine orange en faible dose, offre un nouvel outil pour étudier la dynamique des cellules primaires en environnement tridimensionnel. Particulièrement, elle permet d'observer la migration cellulaire, qui est rarement caractérisée dans les

cultures de chondrocytes et qui semble jouer un rôle important dans l'élaboration d'un nouveau tissu.

10.1 Recommandations

En guise de conclusion finale, ce travail se termine par trois recommandations principales. Premièrement, l'âge des animaux dans lesquels sont prélevés les chondrocytes est un facteur qui doit absolument être pris en compte dans les études *in vitro*. Deuxièmement, les études de chondrocytes *in vitro* doivent profiter des avantages qu'offre la culture d'excroissances en interface. Troisièmement, la migration des chondrocytes doit être étudiée davantage, par le marquage à l'acridine orange en faible dose par exemple, afin de mieux comprendre leur comportement dans le développement, dans la réparation de cartilage, et dans les situations pathologiques.

Bien que ces recommandations visent principalement l'étude des chondrocytes, elles peuvent aussi s'appliquer à d'autres types cellulaires, tels les cellules souches et les cellules cancéreuses, afin de faire avancer la recherche non seulement dans le domaine musculosquelettique, mais dans le domaine de la santé en général.

Liste de références

ADAMS, C. S. AND W. E. HORTON JR. 1998. Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. Anat Rec 250: 418-25.

AIGNER, T., J. HAAG, J. MARTIN, AND J. BUCKWALTER. 2007. Osteoarthritis: aging of matrix and cells - going for a remedy. Curr Drug Targets 8: 325-31.

ALEXOPOULOS, L. G., L. A. SETTON, AND F. GUILAK. 2005. The biomechanical role of the chondrocyte pericellular matrix in articular cartilage. Acta Biomater 1: 317-25.

APTE, S. S. AND N. A. ATHANASOU. 1992. An immunohistological study of cartilage and synovium in primary synovial chondromatosis. J Pathol 166: 277-81.

ARNER, E. C. 1994. Effect of animal age and chronicity of interleukin-1 exposure on cartilage proteoglycan depletion in vivo. J Orthop Res 12: 321-30.

AYDELOTTE, M. B., AND K. E. KUETTNER. 1993. Heterogeneity of articular chondrocytes and cartilage matrix. Dans Joint cartilage degradation, New York, Marcel Dekker Inc, pages 37-65.

BAILEY, A. J. AND R. G. PAUL. 1997. Collagen : a not so simple protein. Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists 82: 104-110.

BANK, R. A., M. T. BAYLISS, LAFEVER FPJG, A. MAROUDAS, AND J. M. TEKOPPELE. Ageing and zonal variation in post-translational modification of collagen in normal human articular cartilage - the age-related increase in non-enzymatic glycation affects biomechanical properties of cartilage. Biochemical Journal 330 (1), 345-351. 1998.

BARONE-VARELAS, J., T. J. SCHNITZER, Q. MENG, L. OTTEN, AND E. J. THONAR. 1991. Age-related differences in the metabolism of proteoglycans in bovine articular cartilage explants maintained in the presence of insulin-like growth factor I. Connect Tissue Res 26: 101-20.

BAYLISS, M. T. AND S. Y. ALI. 1978. Age-related changes in the composition and structure of human articular- cartilage proteoglycans. Biochem J 176: 683-93.

BAYLISS, M. T., S. HOWAT, C. DAVIDSON, AND J. DUDHIA. 2000. The organization of aggrecan in human articular cartilage. Evidence for age-related changes in the rate of aggregation of newly synthesized molecules. J Biol Chem 275: 6321-7.

BAYLISS, M. T., D. OSBORNE, S. WOODHOUSE, AND C. DAVIDSON. 1999. Sulfation of chondroitin sulfate in human articular cartilage. The effect of age, topographical position, and zone of cartilage on tissue composition. J Biol Chem 274: 15892-900.

BENYA, P. D. AND J. D. SHAFFER. 1982. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. Cell 30 (1), 215-224.

BLANC, A., N. TRAN-KHANH, D. FILION, AND M. D. BUSCHMANN. 2005. Optimal processing method to obtain four-color confocal fluorescent images of the cytoskeleton and nucleus in three-dimensional chondrocyte cultures. J Histochem Cytochem 53: 1171-5.

BLASCHKE, U. K., E. F. EIKENBERRY, D. J. HULMES, H. J. GALLA, AND P. BRUCKNER. 2000. Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. J Biol Chem 275: 10370-8.

BOLTON, M. C., J. DUDHIA, AND M. T. BAYLISS. 1999. Age-related changes in the synthesis of link protein and aggrecan in human articular cartilage: implications for aggregate stability. Biochem J 337 (1): 77-82.

BRAMA, P. A., J. M. TEKOPPELE, R. A. BANK, A. BARNEVELD, AND P. R. VAN WEEREN. 2000. Functional adaptation of equine articular cartilage: the formation of regional biochemical characteristics up to age one year. Equine Vet J 32: 217-21.

BRAMA, P. A., J. M. TEKOPPELE, R. A. BANK, P. R. VAN WEEREN, AND A. BARNEVELD. 1999. Influence of site and age on biochemical characteristics of the collagen network of equine articular cartilage. Am J Vet Res 60: 341-5.

BRIGHTON, C. T. 1978. Structure and function of the growth plate. Clin Orthop Relat Res 22-32.

BRIGHTON, C. T. 1984. The growth plate. Orthop Clin North Am 15: 571-95.

BRUCKNER, P. AND M. VAN DER REST. 1994. Structure and function of cartilage collagens. Microsc Res Tech 28: 378-84.

BUCKWALTER, J. A., K. E. KUETTNER, AND E. J. THONAR. 1985. Age-related changes in articular cartilage proteoglycans: electron microscopic studies. J Orthop Res 3: 251-7.

BUENO, E. M., B. BILGEN, R. L. CARRIER, AND G. A. BARABINO. 2004. Increased rate of chondrocyte aggregation in a wavy-walled bioreactor. Biotechnol Bioeng 88: 767-77.

BUSH, G. W. 2002. National Bone and Joint Decade Proclamation. The White House. Consulté le 3 février 2007, tiré de <http://www.whitehouse.gov/>

BUSH, P. G. AND A. C. HALL. 2003. The volume and morphology of chondrocytes within non-degenerate and degenerate human articular cartilage. Osteoarthritis Cartilage 11: 242-51.

BUSCHMANN, M. D., Y. A. GLUZBAND, A. J. GRODZINSKY, J. H. KIMURA, AND E. B. HUNZIKER. 1992. Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix. J Orthop Res 10: 745-58.

BUSCHMANN, M. D. AND A. J. GRODZINSKY. A Molecular Model of Proteoglycan-associated Electrostatic Forces in Cartilage Mechanics. Journal of Biomechanical Engineering 117 (2), 179-192. 1995.

BUSCHMANN, M. D., J. SOULHAT, A. SHIRAZI-ADL, J. S. JURVELIN, AND E. B. HUNZIKER. Confined compression of articular cartilage: linearity in ramp and sinusoidal tests and the importance of interdigitation and incomplete confinement. Journal of Biomechanics 31 (2), 171-8. 1998.

CHAIPINYO, K., B. W. OAKES, AND M. P. VAN DAMME. 2002. Effects of growth factors on cell proliferation and matrix synthesis of low-density, primary bovine chondrocytes cultured in collagen I gels. J Orthop Res 20: 1070-8.

CHARLEBOIS, M., M. D. MCKEE, AND M. D. BUSCHMANN. 2004. Nonlinear tensile properties of bovine articular cartilage and their variation with age and depth. J Biomech Eng 126: 129-37.

CHEN, A. L., C. FANG, C. LIU, M. P. LESLIE, E. CHANG, AND P. E. DI CESARE. 2004. Expression of bone morphogenetic proteins, receptors, and tissue inhibitors in human fetal, adult, and osteoarthritic articular cartilage. J Orthop Res 22: 1188-92.

CHEVRIER, A., E. ROSSOMACHA, M. D. BUSCHMANN, AND C. D. HOEMANN. 2005. Optimization of Histoprocessing Methods to Detect Glycosaminoglycan, Collagen Type II, and Collagen Type I in Decalcified Rabbit Osteochondral Sections. The Journal of Histotechnology, 28: 165-175.

CLAR, C., E. CUMMINS, L. MCINTYRE, S. THOMAS, J. LAMB, L. BAIN, P. JOBANPUTRA, AND N. WAUGH. 2005. Clinical and cost-effectiveness of autologous chondrocyte implantation for cartilage defects in knee joints: systematic review and economic evaluation. Health Technol Assess, 9 (47).

COBB, J., M. MIYAIKE, A. KIKUCHI, AND M. A. HANDEL. 1999. Meiotic events at the centromeric heterochromatin: histone H3 phosphorylation, topoisomerase II alpha localization and chromosome condensation. Chromosoma 108: 412-25.

COHEN, B., W. M. LAI, G. S. CHORNEY, H. M. DICK, AND V. C. MOW. 1992. Unconfined compression of transversely-isotropic biphasic tissues. Trans. American Society of Mechanical Engineering, 187-190.

COLITTI, M., S. P. ALLEN, AND J. S. PRICE. 2005. Programmed cell death in the regenerating deer antler. J Anat 207: 339-51.

DEGROOT, J., N. VERZIIL, R. A. BANK, LAFEBER FPJG, J. W. J. BIJLSMA, AND J. M. TEKOPPELE. 1999. Age-related decrease in proteoglycan synthesis of human articular chondrocytes - The role of nonenzymatic glycation. Arthritis & Rheumatism 42 (5), 1003-1009.

DEL SANTO, M. JR, F. MARCHES, M. NG, AND R. J. HINTON. 2000. Age-associated changes in decorin in rat mandibular condylar cartilage. Arch Oral Biol 45: 485-93.

DIAB, M., J. J. WU, AND D. R. EYRE. 1996. Collagen type IX from human cartilage: a structural profile of intermolecular cross-linking sites. Biochem J 314 (Part 1): 327-32.

DIMICCO, M. A., S. N. WATERS, W. H. AKESON, AND R. L. SAH. 2002. Integrative articular cartilage repair: dependence on developmental stage and collagen metabolism. Osteoarthritis Cartilage 10: 218-25.

DOZIN, B., M. MALPELI, L. CAMARDELLA, R. CANCEDDA, AND A. PIETRANGELO. 2002. Response of young, aged and osteoarthritic human articular chondrocytes to inflammatory cytokines: molecular and cellular aspects. Matrix Biol 21: 449-59.

DUDHIA, J., C. M. DAVIDSON, T. M. WELLS, D. H. VYNIOS, T. E. HARDINGHAM, AND M. T. BAYLISS. 1996. Age-related changes in the content of the C-terminal region of aggrecan in human articular cartilage. Biochem J 313 (3): 933-40.

DUMONT, J., M. IONESCU, A. REINER, A. R. POOLE, N. TRAN-KHANH, C. D. HOEMANN, M. D. MCKEE, AND M. D. BUSCHMANN. 1999. Mature full-thickness articular cartilage explants attached to bone are physiologically stable over long-term culture in serum-free media. Connect Tissue Res 40: 259-72.

DURRANT, L. A., C. W. ARCHER, M. BENJAMIN, AND J. R. RALPHS. 1999. Organisation of the chondrocyte cytoskeleton and its response to changing mechanical conditions in organ culture. J Anat 194 (3): 343-53.

ELLIOTT, R. J. AND D. L. GARDNER. 1979. Changes with age in the glycosaminoglycans of human articular cartilage. Ann Rheum Dis 38: 371-7.

FARQUHARSON, C. AND N. LOVERIDGE. 1990. Cell proliferation within the growth plate of long bones assessed by bromodeoxyuridine uptake and its relationship to glucose 6-phosphate dehydrogenase activity. Bone Miner 10: 121-30.

FEDERICO, S., A. GRILLO, G. LA ROSA, G. GIAQUINTA, AND W. HERZOG. 2005. A transversely isotropic, transversely homogeneous microstructural-statistical model of articular cartilage. J Biomech 38: 2008-18.

FLANNERY, C., V. STANESCU, M. MORGELIN, R. BOYNTON, J. GORDY, AND J. SANDY. 1992. Variability in the G3 domain content of bovine aggrecan from cartilage extracts and chondrocyte cultures. Arch Biochem Biophys 297: 52-60.

FORTIN, M., J. SOULHAT, A. SHIRAZI-ADL, E. B. HUNZIKER, AND M. D. BUSCHMANN. 2000. Unconfined compression of articular cartilage: nonlinear behavior and comparison with a fibril-reinforced biphasic model. J Biomech Eng 122: 189-95.

FRANK, E. H. AND A. J. GRODZINSKY. 1987. Cartilage electromechanics--II. A continuum model of cartilage electrokinetics and correlation with experiments. J Biomech 20: 629-39.

FREYRIA, A. M., D. CORTIAL, M. C. RONZIERE, S. GUERRET, AND D. HERBAGE. 2004. Influence of medium composition, static and stirred conditions on the proliferation of and matrix protein expression of bovine articular chondrocytes cultured in a 3D collagen scaffold. Biomaterials 25: 687-97.

FRONT, P., F. APRILE, D. R. MITROVIC, AND D. A. SWANN. 1989. Age-related changes in the synthesis of matrix macromolecules by bovine articular cartilage. Connect Tissue Res 19: 121-33.

GARG, V. Rheumatoid arthritis. iVillage Inc. Consulté le 3 février 2007, tiré de <http://pain.health.ivillage.com>.

GASKILL, L. Cell Signalling. PKH Linker Kits for Fluorescent Cell Labelling. Sigma-Aldrich Corporation. Consulté le 3 février 2007, tiré de <http://www.sigmaaldrich.com/>

GIGOUT, A., M. JOLICOEUR, AND M. D. BUSCHMANN. 2005. Low calcium levels in serum-free media maintain chondrocyte phenotype in monolayer culture and reduce chondrocyte aggregation in suspension culture. Osteoarthritis Cartilage 13: 1012-24.

GOOCH, K. J., T. BLUNK, D. L. COURTER, A. L. SIEMINSKI, P. M. BURSAC, G. VUNJAK-NOVAKOVIC, AND L. E. FREED. 2001. IGF-I and mechanical environment interact to modulate engineered cartilage development. Biochem Biophys Res Commun 286: 909-15.

GREGORY, K. E., J. T. OXFORD, Y. CHEN, J. E. GAMBEE, S. P. GYGI, R. AEBERSOLD, P. J. NEAME, D. E. MECHLING, H. P. BACHINGER, AND N. P. MORRIS. 2000. Structural organization of distinct domains within the non-collagenous N-terminal region of collagen type XI. J Biol Chem 275: 11498-506.

GRUSHKO, G., R. SCHNEIDERMAN, AND A. MAROUDAS. 1989. Some biochemical and biophysical parameters for the study of the pathogenesis of osteoarthritis: a comparison between the processes of ageing and degeneration in human hip cartilage. Connect Tissue Res 19: 149-76.

GU, W. Y., W. M. LAI, AND V. C. MOW. 1998. A mixture theory for charged-hydrated soft tissues containing multi-electrolytes: passive transport and swelling behaviors. J Biomech Eng 120: 169-80.

GU, W. Y., H. YAO, C. Y. HUANG, AND H. S. CHEUNG. 2003. New insight into deformation-dependent hydraulic permeability of gels and cartilage, and dynamic behavior of agarose gels in confined compression. J Biomech 36: 593-8.

GUERNE, P. A., F. BLANCO, A. KAE LIN, A. DESGEORGES, AND M. LOTZ. 1995. Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development. Arthritis Rheum 38: 960-8.

HAGG, R., P. BRUCKNER, AND E. HEDBOM. 1998. Cartilage fibrils of mammals are biochemically heterogeneous: differential distribution of decorin and collagen IX. J Cell Biol 142: 285-94.

HANDROCK, K., A. LASCHKE, R. LULLMANN-RAUCH, R. D. VOGT, AND M. ZIEGENHAGEN. 1992. Lysosomal storage of sulfated glycosaminoglycans in cultured fibroblasts exposed to immunostimulatory acridine derivatives. Toxicol Appl Pharmacol 114: 204-14.

HANDSCHEL, J. G., R. A. DEPPRICH, N. R. KUBLER, H. P. WIESMANN, M. OMMERBORN, AND U. MEYER. 2007. Prospects of micromass culture technology in tissue engineering. Head Face Med 3: 4.

HAUSELMANN, H. J., M. B. AYDELOTTE, B. L. SCHUMACHER, K. E. KUETTNER, S. H. GITELIS, AND E. J. THONAR. Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads. Matrix 12 (2), 116-129. 1992.

HAYES, A. J., S. MACPHERSON, H. MORRISON, G. DOWTHWAITE, AND C. W. ARCHER. 2001. The development of articular cartilage: evidence for an appositional growth mechanism. Anat Embryol (Berl) 203: 469-79.

HISCOCK, D. R., B. CATERSON, AND C. R. FLANNERY. 2000. Expression of hyaluronan synthases in articular cartilage. Osteoarthritis Cartilage 8: 120-6.

HOEMANN, C.D. 2004. Molecular and biochemical assays for cartilage components. Cartilage and osteoarthritis. Humana Press, New Jersey, volume 2, chapitre 8, pages 127-156.

HOEMANN, C. D., J. SUN, V. CHRZANOWSKI, AND M. D. BUSCHMANN. 2002. A multivalent assay to detect glycosaminoglycan, protein, collagen, RNA, and DNA

content in milligram samples of cartilage or hydrogel- based repair cartilage. Anal Biochem 300: 1-10.

HOEMANN, C. D., J. SUN, A. LEGARE, M. D. MCKEE, AND M. D. BUSCHMANN. 2005. Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle. Osteoarthritis Cartilage 13: 318-29.

HOLMES, M. W., M. T. BAYLISS, AND H. MUIR. 1988. Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size. Biochem J 250: 435-41.

HU, J. C. AND K. A. ATHANASIOU. 2005. Low-density cultures of bovine chondrocytes: effects of scaffold material and culture system. Biomaterials 26: 2001-12.

HUNTER, C. J., J. K. MOUW, AND M. E. LEVENSTON. 2004. Dynamic compression of chondrocyte-seeded fibrin gels: effects on matrix accumulation and mechanical stiffness. Osteoarthritis Cartilage 12: 117-30.

HUNZIKER, E. B. 2002. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. Osteoarthritis Cartilage 10: 432-63.

HUNZIKER, E. B., E. KAPFINGER, AND J. GEISS. 2007. The structural architecture of adult mammalian articular cartilage evolves by a synchronized process of tissue

resorption and neoformation during postnatal development. Osteoarthritis Cartilage 15: 403-13.

HUNZIKER, E. B., T. M. QUINN, AND H. J. HAUSELMANN. 2002. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. Osteoarthritis Cartilage 10: 564-72.

HUNZIKER, E. B. 1988. Growth plate structure and function. Pathol Immunopathol Res 7: 9-13.

ICHIMURA, S., J. J. WU, AND D. R. EYRE. Two-dimensional peptide mapping of cross-linked type IX collagen in human cartilage. Arch Biochem Biophys 378 (1), 33-9. 2000.

INEROT, S., D. HEINEGARD, L. AUDELL, AND S. E. OLSSON. 1978. Articular-cartilage proteoglycans in aging and osteoarthritis. Biochem J 169: 143-56.

INSTITUT NATIONAL DE SANTÉ PUBLIQUE. 2006. Troubles musculosquelettiques. Institut national de santé publique. Consulté le 3 février 2007, tiré de <http://www.inspq.qc.ca/>

IQBAL, J., J. DUDHIA, J. L. BIRD, AND M. T. BAYLISS. 2000. Age-related effects of TGF-beta on proteoglycan synthesis in equine articular cartilage. Biochem Biophys Res Commun 274: 467-71.

JOHNSON, E. M. AND W. M. DEEN. 1996. Hydraulic permeability of agarose gels. AIChE Journal 42: 1220-1224.

JONES, C. W., D. SMOLINSKI, A. KEOGH, T. B. KIRK, AND M. H. ZHENG. 2005. Confocal laser scanning microscopy in orthopaedic research. Prog Histochem Cytochem 40 (1), 1-71.

KAMADA, H., K. MASUDA, A. L. D'SOUZA, M. E. LENZ, D. PIETRYLA, L. OTTEN, AND E. J. THONAR. 2002. Age-related differences in the accumulation and size of hyaluronan in alginate culture. Arch Biochem Biophys 408: 192-9.

KIENER, H. P., C. S. STIPP, P. G. ALLEN, J. M. HIGGINS, AND M. B. BRENNER. 2006. The cadherin-11 cytoplasmic juxtamembrane domain promotes alpha-catenin turnover at adherens junctions and intercellular motility. Mol Biol Cell 17: 2366-76.

KISIDAY, J. D., M. JIN, M. A. DIMICCO, B. KURZ, AND A. J. GRODZINSKY. 2004. Effects of dynamic compressive loading on chondrocyte biosynthesis in self-assembling peptide scaffolds. J Biomech 37: 595-604.

KISIDAY, J. D., B. KURZ, M. A. DIMICCO, AND A. J. GRODZINSKY. 2005. Evaluation of medium supplemented with insulin-transferrin-selenium for culture of primary bovine calf chondrocytes in three-dimensional hydrogel scaffolds. Tissue Eng 11: 141-51.

KNIGHT, M. M., S. R. ROBERTS, D. A. LEE, AND D. L. BADER. 2003. Live cell imaging using confocal microscopy induces intracellular calcium transients and cell death. Am J Physiol Cell Physiol 284: C1083-9.

KORHONEN, R. K., M. S. LAASANEN, J. TOYRAS, J. RIEPPO, J. HIRVONEN, H. J. HELMINEN, AND J. S. JURVELIN. 2002. Comparison of the equilibrium response of articular cartilage in unconfined compression, confined compression and indentation. J Biomech 35: 903-9.

KUSUZAKI, K., H. MURATA, H. TAKESHITA, S. HASHIGUCHI, T. NOZAKI, K. EMOTO, T. ASHIHARA, AND Y. HIRASAWA. 2000. Intracellular binding sites of acridine orange in living osteosarcoma cells. Anticancer Res 20: 971-5.

KUSUZAKI, K., H. TAKESHITA, H. MURATA, S. HASHIGUCHI, T. NOZAKI, K. EMOTO, T. ASHIHARA, AND Y. HIRASAWA. 2001. Acridine orange induces binucleation in chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage 9: 147-51.

LAI, W. M., J. S. HOU, AND V. C. MOW. 1991. A triphasic theory for the swelling and deformation behaviors of articular cartilage. J Biomech Eng 113: 245-58.

LANGELIER, E., R. SUETTERLIN, C. D. HOEMANN, U. AEBI, AND M. D. BUSCHMANN. 2000. The chondrocyte cytoskeleton in mature articular cartilage: structure and distribution of actin, tubulin, and vimentin filaments. J Histochem Cytochem 48: 1307-20.

LA SOCIÉTÉ D'ARTHRITE. 2002. Un résumé de notre histoire. La société d'arthrite. Consulté le 3 février 2007, tiré de <http://www.arthrite.ca/>

LEFEBVRE, C. 2001. Un portrait de la santé des Québécois de 65 ans et plus. Institut national de santé publique du Québec. Consulté le 3 février 2007, tiré de <http://www.inspq.qc.ca>.

LE RÉSEAU CANADIEN DE L'ARTHRITE. 2005. Histoire. Le réseau canadien de l'arthrite. Consulté le 3 février 2007, tiré de <http://www.arthritisnetwork.ca/>

LI, L. P., M. D. BUSCHMANN, AND A. SHIRAZI-ADL. 2000. A fibril reinforced nonhomogeneous poroelastic model for articular cartilage: inhomogeneous response in unconfined compression. J Biomech 33: 1533-41.

LI, L. P. AND W. HERZOG. 2005. Electromechanical response of articular cartilage in indentation--considerations on the determination of cartilage properties during arthroscopy. Comput Methods Biomech Biomed Engin 8: 83-91.

LI, L. P. AND W. HERZOG. 2004. The role of viscoelasticity of collagen fibers in articular cartilage: theory and numerical formulation. Biorheology 41: 181-94.

LI, L. P., W. HERZOG, R. K. KORHONEN, AND J. S. JURVELIN. 2005. The role of viscoelasticity of collagen fibers in articular cartilage: axial tension versus compression. Med Eng Phys 27: 51-7.

LI, L. P., A. SHIRAZI-ADL, AND M. D. BUSCHMANN. 2002. Alterations in mechanical behaviour of articular cartilage due to changes in depth varying material properties--a nonhomogeneous poroelastic model study. Comput Methods Biomech Biomed Engin 5: 45-52.

LITTLE, C. B. AND P. GHOSH. Variation in proteoglycan metabolism by articular chondrocytes in different joint regions is determined by post-natal mechanical loading. Osteoarthritis & Cartilage 5 (1), 49-62. 1997.

LIVNE, E. AND A. WEISS. 1993. In vitro effect of hormones and growth factors on the incorporation of ^3H -leucine, ^{35}S -sulfate and ^3H -proline by chondrocytes of aging mice. Mech Ageing Dev 72: 213-29.

LIVNE, E., A. WEISS, AND M. SILBERMANN. 1989. Articular chondrocytes lose their proliferative activity with aging yet can be restimulated by PTH-(1-84), PGE1, and dexamethasone. J Bone Miner Res 4: 539-48.

LOESER, R. F., G. SHANKER, C. S. CARLSON, J. F. GARDIN, B. J. SHELTON, AND W. E. SONNTAG. 2000. Reduction in the chondrocyte response to insulin-like growth factor 1 in aging and osteoarthritis: studies in a non-human primate model of naturally occurring disease. Arthritis Rheum 43: 2110-20.

LUBKE, C., J. RINGE, V. KRENN, G. FERNAHL, S. PELZ, R. KREUSCH-BRINKER, M. SITTINGER, AND M. PAULITSCHKE. 2005. Growth characterization of neo porcine cartilage pellets and their use in an interactive culture model. Osteoarthritis Cartilage 13: 478-87.

LUX LU, X., C. MILLER, F. H. CHEN, X. EDWARD GUO, AND V. C. MOW. 2007. The generalized triphasic correspondence principle for simultaneous determination of the mechanical properties and proteoglycan content of articular cartilage by indentation. J Biomech.

MALLEIN-GERIN, F., R. GARRONE, AND M. VAN DER REST. 1991. Proteoglycan and collagen synthesis are correlated with actin organization in dedifferentiating chondrocytes. Eur J Cell Biol 56: 364-73.

MANKIN, H. J., V. C. MOW, J. A. BUCKWALTER, J. P. IANNOTTI, AND A. R. RATCLIFFE. 2000. Articular cartilage structure, composition, and function. Orthopaedic basic science, deuxième édition, AAOS, pages 443-470.

MAROUDAS, A., M. T. BAYLISS, N. UCHITELKAUSHANSKY, R. SCHNEIDERMAN, AND E. GILAV. Aggrecan turnover in human articular cartilage - use of aspartic acid racemization as a marker of molecular age. Archives of Biochemistry & Biophysics 350 (1) : 61-71. 1998.

MAROUDAS, A. AND M. VENN. 1977. Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. II. Swelling. Ann Rheum Dis 36: 399-406.

MARTIN, J. A. AND J. A. BUCKWALTER. 2001. Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 56 B: 172-9.

MARTIN, J. A., S. M. ELLERBROEK, AND J. A. BUCKWALTER. 1997. Age-related decline in chondrocyte response to insulin-like growth factor-I: the role of growth factor binding proteins. J Orthop Res 15: 491-8.

MASUOKA, K., T. ASAZUMA, M. ISHIHARA, M. SATO, H. HATTORI, M. ISHIHARA, Y. YOSHIHARA, T. MATSUI, B. TAKASE, M. KIKUCHI, AND K. NEMOTO. 2005. Tissue engineering of articular cartilage using an allograft of cultured

chondrocytes in a membrane-sealed atelocollagen honeycomb-shaped scaffold (ACHMS scaffold). J Biomed Mater Res B Appl Biomater 75: 177-84.

MATSUSAKI, T., T. AOYAMA, K. NISHIJO, T. OKAMOTO, T. NAKAYAMA, T. NAKAMURA, AND J. TOGUCHIDA. 2006. Expression of the cadherin-11 gene is a discriminative factor between articular and growth plate chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage 14: 353-66.

MAUCK, R. L., C. C. WANG, E. S. OSWALD, G. A. ATESHIAN, AND C. T. HUNG. 2003. The role of cell seeding density and nutrient supply for articular cartilage tissue engineering with deformational loading. Osteoarthritis Cartilage 11: 879-90.

MAYNE, R., AND R. G. BREWTON. 1993. Extracellular matrix of cartilage : collagen. Dans Joint cartilage degradation, New York, Marcel Dekker Inc, pages 81-108.

MESSAI, H., Y. DUCHOSSOY, A. M. KHATIB, A. PANASYUK, AND D. R. MITROVIC. 2000. Articular chondrocytes from aging rats respond poorly to insulin-like growth factor-1: an altered signaling pathway. Mech Ageing Dev 115: 21-37.

MENDLER, M., S. G. EICH-BENDER, L. VAUGHAN, K. H. WINTERHALTER, AND P. BRUCKNER. 1989. Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. J Cell Biol 108: 191-7.

MOREL, V. AND T. M. QUINN. 2004. Cartilage injury by ramp compression near the gel diffusion rate. J Orthop Res 22: 145-51.

MOW, V. C., S. C. KUEI, W. M. LAI, AND C. G. ARMSTRONG. Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression: Theory and experiments. J. Biomech. Eng. 102 (1), 73-84. 1980.

MOW, V. C., C. S. PROCTOR, AND M. A. KELLY. 1989. Biomechanics of articular cartilage. Dans Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System, deuxième édition, Philadelphie, Lea & Febiger, pages 31-57.

NARAYANAN, J., J. Y. XIONG, AND X. Y. LIU. 2006. Determination of agarose gel pore size : Absorbance measurements vis-à-vis other techniques. Journal of Physics : Conference Series 28 : 83-86.

NIXON, A. J., B. D. BROWER-TOLAND, AND L. J. SANDELL. 2000. Molecular cloning of equine transforming growth factor-beta1 reveals equine-specific amino acid substitutions in the mature peptide sequence. J Mol Endocrinol 24: 261-72.

OKADA, C. Y. AND M. RECHSTEINER. 1982. Introduction of macromolecules into cultured mammalian cells by osmotic lysis of pinocytic vesicles. Cell 29: 33-41.

ORTHOPAEDIC RESEARCH CENTER. Colorado State University. Consulté le 3 février 2007, tiré de <http://www.equineortho.colostate.edu>.

PACIFICI, M. 1990. Independent secretion of proteoglycans and collagens in chick chondrocyte cultures during acute ascorbic acid treatment. Biochem J 272: 193-9.

PLAAS, A. H. AND J. D. SANDY. 1984. Age-related decrease in the link-stability of proteoglycan aggregates formed by articular chondrocytes. Biochem J 220: 337-40.

PLATT, D., J. L. BIRD, AND M. T. BAYLISS. 1998. Ageing of equine articular cartilage: structure and composition of aggrecan and decorin. Equine Vet J 30: 43-52.

PLUMB, M. S. AND R. M. ASPDEN. 2005. The response of elderly human articular cartilage to mechanical stimuli in vitro. Osteoarthritis Cartilage 13: 1084-91.

POOLE, C. A. 1997. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. J Anat 191 (1): 1-13.

POOLE, C. A. 1993. The structure and function of articular cartilage matrices. Dans Joint cartilage degradation, New York, Marcel Dekker Inc, pages 1-35.

PRASHER, D. C. 1995. Using GFP to see the light. Trends Genet 11: 320-3.

PROSPERI, E. 1997. Multiple roles of the proliferating cell nuclear antigen : DNA replication, repair and cell cycle control. Prog Cell Cycle Res 3 :193-210.

RIBAUT, D., M. HABIB, K. ABDEL-MAJID, A. BARBARA, AND D. MITROVIC. 1998. Age-related decrease in the responsiveness of rat articular chondrocytes to EGF is associated with diminished number and affinity for the ligand of cell surface binding sites. Mech Ageing Dev 100: 25-40.

ROOSENDAAL, G., J. M. TEKOPPELE, M. E. VIANEN, H. M. VAN DEN BERG, F. P. LAFEVER, AND J. W. BIJLSMA. 2000. Articular cartilage is more susceptible to blood induced damage at young than at old age. J Rheumatol 27: 1740-4.

ROSEN, F., G. MCCABE, J. QUACH, J. SOLAN, R. TERKELTAUB, J. E. SEEGLER, AND M. LOTZ. 1997. Differential effects of aging on human chondrocyte responses to transforming growth factor beta: increased pyrophosphate production and decreased cell proliferation. Arthritis Rheum 40: 1275-81.

ROUGHLEY, P. J. 2006. The structure and function of cartilage proteoglycans. Eur Cell Mater 12: 92-101.

ROUGHLEY, P. J., L. I. MELCHING, AND A. D. RECKLIES. Changes in the expression of decorin and biglycan in human articular cartilage with age and regulation by TGF-beta. Matrix Biology 14 (1), 51-59. 1994.

ROUGHLEY, P. J., R. J. WHITE, M. C. MAGNY, J. LIU, R. H. PEARCE, AND J. S. MORT. 1993. Non-proteoglycan forms of biglycan increase with age in human articular cartilage. Biochem J 295 (2): 421-6.

SANDY, J. D. AND A. H. PLAAS. 1986. Age-related changes in the kinetics of release of proteoglycans from normal rabbit cartilage explants. J Orthop Res 4: 263-72.

SCHAFER, S. J., F. P. LUYTEN, M. YANAGISHITA, AND A. H. REDDI. 1993. Proteoglycan metabolism is age related and modulated by isoforms of platelet-derived growth factor in bovine articular cartilage explant cultures. Arch Biochem Biophys 302: 431-8.

SCHNABEL, M., S. MARLOVITS, G. ECKHOFF, I. FICHTEL, L. GOTZEN, V. VECSEI, AND J. SCHLEGEL. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. Osteoarthritis Cartilage 10 (1), 62-70. 2002.

SCHOLZEN, T. AND J. GERDES. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol 182: 311-22.

SCHULZ, R. M. AND A. BADER. 2007. Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. Eur Biophys J.

SCHULZE-TANZIL, G., A. MOBASHERI, P. DE SOUZA, T. JOHN, AND M. SHAKIBAEI. 2004. Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient Shc-Erk interaction and apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 12 (6), 448-58.

SHIKICHI, M., H. P. KITAMURA, H. YANASE, A. KONNO, H. TAKAHASHI-IWANAGA, AND T. IWANAGA. 1999. Three-dimensional ultrastructure of synoviocytes in the horse joint as revealed by the scanning electron microscope. *Arch Histol Cytol* 62: 219-29.

SMITH-MUNGO, L. I. AND H. M. KAGAN. 1998. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol* 16: 387-98.

SMOLEN, J. S. 2004. Combating the burden of musculoskeletal conditions. *Ann Rheum Dis* 63: 329.

SODER, S., L. HAMBACH, R. LISSNER, T. KIRCHNER, AND T. AIGNER. 2002. Ultrastructural localization of type VI collagen in normal adult and osteoarthritic human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 464-70.

SOULHAT, J., M. D. BUSCHMANN, AND A. SHIRAZI-ADL. 1999. A fibril-network-reinforced biphasic model of cartilage in unconfined compression. *J Biomech Eng* 121: 340-7.

TALLHEDEN, T., C. KARLSSON, A. BRUNNER, J. VAN DER LEE, R. HAGG, R. TOMMASINI, AND A. LINDAHL. 2004. Gene expression during redifferentiation of human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 12 (7) : 525-35.

THIBAUT, M., A. R. POOLE, AND M. D. BUSCHMANN. 2002. Cyclic compression of cartilage/bone explants in vitro leads to physical weakening, mechanical breakdown of collagen and release of matrix fragments. *J Orthop Res* 20: 1265-73.

THONAR, E. J., M. B. SWEET, A. R. IMMELMAN, AND G. LYONS. 1978. Hyaluronate in articular cartilage: age-related changes. *Calcif Tissue Res* 26: 19-21.

TRAN-KHANH, N., C. D. HOEMANN, M. D. MCKEE, J. E. HENDERSON, AND M. D. BUSCHMANN. 2005. Aged bovine chondrocytes display a diminished capacity to produce a collagen-rich, mechanically functional cartilage extracellular matrix. *J Orthop Res* 23: 1354-62.

VAN BEUNINGEN, H. M., P. M. VAN DER KRAAN, O. J. ARNTZ, AND W. B. VAN DEN BERG. 1994. In vivo protection against interleukin-1-induced articular cartilage damage by transforming growth factor-beta 1: age-related differences. *Ann Rheum Dis* 53: 593-600.

VAN DER KRAAN, P. M., AND W. B. VAN DEN BERG. 2007. Osteophytes : relevance and biology. *Osteoarthritis and Cartilage* 15 : 237-244.

VENN, M. AND A. MAROUDAS. 1977. Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. I. Chemical composition. *Ann Rheum Dis* 36 (2) : 121-9.

VERBRUGGEN, G., M. CORNELISSEN, K. F. ALMQVIST, L. WANG, D. ELEWAUT, C. BRODDELEZ, L. DE RIDDER, AND E. M. VEYS. 2000. Influence of aging on the synthesis and morphology of the aggrecans synthesized by differentiated human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 8: 170-9.

VILIM, V. AND A. J. FOSANG. 1994. Proteoglycans isolated from dissociative extracts of differently aged human articular cartilage: characterization of naturally occurring hyaluronan-binding fragments of aggrecan. *Biochem J* 304 (3): 887-94.

VILIM, V. AND J. KRAJICKOVA. 1990. Changes in proteoglycans in human articular cartilage in relation to age. *Cas Lek Cesk* 129: 1557-61.

WALDMAN, S. D., M. D. GRYNPAS, R. M. PILLIAR, AND R. A. KANDEL. 2002. Characterization of cartilaginous tissue formed on calcium polyphosphate substrates in vitro. *J Biomed Mater Res* 62: 323-30.

WALDMAN, S. D., C. G. SPITERI, M. D. GRYNPAS, R. M. PILLIAR, AND R. A. KANDEL. 2003. Long-term intermittent shear deformation improves the quality of cartilaginous tissue formed in vitro. *J Orthop Res* 21: 590-6.

WATT, F. M. 1988. Effect of seeding density on stability of the differentiated phenotype of pig articular chondrocytes in culture. J Cell Sci 89 (3): 373-8.

WATT, F. M. AND J. DUDHIA. 1988. Prolonged expression of differentiated phenotype by chondrocytes cultured at low density on a composite substrate of collagen and agarose that restricts cell spreading. Differentiation 38: 140-7.

WEISSER, J., B. RAHFOTH, A. TIMMERMAN, T. AIGNER, R. BRAUER, AND K. VON DER MARK. 2001. Role of growth factors in rabbit articular cartilage repair by chondrocytes in agarose. Osteoarthritis Cartilage 9 Suppl A: S48-54.

WHO. 2003. The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millenium. World Health Organization. Consulté le 3 février 2007, tiré de <http://whqlibdoc.who.int>.

WU, J. J., P. E. WOODS, AND D. R. EYRE. 1992. Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. J Biol Chem 267: 23007-14.

WU, J. J. AND D. R. EYRE. 1995. Structural analysis of cross-linking domains in cartilage type XI collagen. Insights on polymeric assembly. J Biol Chem 270: 18865-70.

ZAUCKE, F., R. DINSER, P. MAURER, AND M. PAULSSON. 2001. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes. *Biochem J* 358 (1), 17-24.

ZHU, Y., A. OGANESIAN, D. R. KEENE, AND L. J. SANDELL. 1999. Type IIA procollagen containing the cysteine-rich amino propeptide is deposited in the extracellular matrix of prechondrogenic tissue and binds to TGF-beta1 and BMP-2. *J Cell Biol* 144: 1069-80.

ZILE, M. R., M. K. COWLES, J. M. BUCKLEY, K. RICHARDSON, B. A. COWLES, C. F. BAICU, G. COOPER IV, AND V. GHARPURAY. 1998. Gel stretch method: a new method to measure constitutive properties of cardiac muscle cells. *Am J Physiol* 274 H: 2188-202.