

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDE MÉCANOBIOLOGIQUE IN VIVO : EFFETS DE LA
MODULATION MÉCANIQUE DE CROISSANCE DANS LA
MATRICE EXTRACELLULAIRE DES PLAQUES DE
CROISSANCE DE VERTÈBRES CAUDALES D'UN MODÈLE
ANIMAL DE RAT

MATHILDE CANCEL
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)
MARS 2008



Library and
Archives Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-46040-5

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-46040-5

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

Ce mémoire intitulé :

ÉTUDE MÉCANOBIOLOGIQUE IN VIVO : EFFETS DE LA MODULATION
MÉCANIQUE DE CROISSANCE DANS LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DES
PLAQUES DE CROISSANCE DE VERTÈBRES CAUDALES D'UN MODÈLE
ANIMAL DE RAT

présenté par : CANCEL Mathilde

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

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

M. BUSCHMANN Michael, Ph.D., président

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

Mme MOLDOVAN Florina, MD, Ph.D., membre et codirectrice de recherche

M. GRIMARD Guy, MD, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

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

Remerciements

Ce travail a été réalisé sous la direction de la Dre Isabelle Villemure, professeure au département de génie mécanique de l'École Polytechnique de Montréal, que je remercie pour m'avoir proposé ce projet de maîtrise. Je tiens à lui exprimer ma gratitude et à remercier tout particulièrement sa rigueur scientifique, sa grande disponibilité et son investissement dans l'encadrement de ce projet.

J'ai aussi été encadrée par deux codirecteurs les Dre Florina Moldovan, de l'Université de Montréal, et Dr Guy Grimard, orthopédiste à l'hôpital Sainte-Justine de Montréal. Je tiens à les remercier pour leur participation active dans ce projet, leurs nombreux conseils ainsi que leur soutien tout au long de ma maîtrise.

Je voudrais encore remercier les Dre Isabelle Villemure et Dre Florina Moldovan, ainsi que le Dr Alain Moreau pour m'avoir permis de travailler dans leur laboratoire et d'utiliser leur équipement.

Je tiens aussi à exprimer toute ma reconnaissance aux membres des laboratoires des Dre Isabelle Villemure, Dre Florina Moldovan et Dr Alain Moreau pour leur disponibilité, leur gentillesse et leur aide précieuse tout au long de mon séjour parmi eux. Je tiens à remercier tout particulièrement Claire Pinaud qui a participé activement dans la réalisation de différentes expériences de ce projet de maîtrise, et surtout Michael Cademartori, technicien en radiologie qui a pris les clichés radiographiques et nous a assistés lors des chirurgies des rats, Josée Dépôt, qui a fait les études histomorphométriques, et enfin Delphine Thuillard Crisinel, qui s'est efforcée d'optimiser le protocole d'immunohistochimie et a fait les essais complémentaires sur le collagène clivé. Je voudrais aussi remercier Karen Dahan, Kareen Letellier, Marie-Claude Guyot, Dominique Leboeuf, Michelle Dion et Regdy Renous pour leur bonne humeur et leur soutien tout au long de ma maîtrise.

Résumé

La croissance osseuse longitudinale s'effectue dans les plaques de croissance situées aux extrémités des os longs et des vertèbres. La plaque de croissance comprend trois zones successives (réserve, proliférative, hypertrophique), dont la composition, la structure et la morphologie diffèrent tant au niveau des cellules que de la matrice extracellulaire. Plusieurs hormones systémiques, facteurs de croissance locaux, facteurs génétiques et nutritionnels, ainsi que des médicaments régulent la croissance osseuse. L'évidence clinique démontre de plus que l'environnement mécanique est nécessaire à la croissance osseuse normale. Cependant, les charges excessives peuvent conduire à des anomalies de croissance osseuse ou des conditions pathologiques progressives du système musculosquelettique. Parmi les facteurs biologiques d'influence sur le taux de croissance, la synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance, en combinaison avec l'hypertrophie et la prolifération cellulaires, joue un rôle important dans la croissance osseuse longitudinale, car ses modifications sont nécessaires au passage des cellules de la prolifération vers l'hypertrophie.

Un chargement statique *in vitro* a montré que la production d'ARN messagers (ARNm) des deux principaux collagènes composant la plaque de croissance, le collagène de type II et le collagène de type X, était diminuée avec le chargement. Cette observation n'a cependant pas été confirmée lors d'une expérimentation *in vivo* sur un modèle animal de poulet. Cette étude ne contrôlait toutefois pas précisément la charge appliquée tant au niveau de la magnitude de la charge que de sa direction. Par ailleurs, deux études *in vivo* sur des modèles animaux de rats, ont montré qu'un chargement en compression dynamique ne modifiait pas l'expression des protéines du collagène de type II ni du collagène de type X dans la matrice extracellulaire. Ces études qui ont été menées avec un chargement dynamique et intermittent pourraient induire des réponses biologiques différentes à celles d'un chargement de type statique.

Le présent projet avait pour objectif d'étudier *in vivo* un modèle animal de rat soumis à un chargement statique constant et contrôlé avec précision, puis de quantifier la modulation mécanique de la croissance osseuse et de déterminer le rôle de la matrice

extracellulaire (sa synthèse et/ou sa dégradation) dans ce processus de modulation. Afin de remplir cet objectif, un appareil de chargement a été fixé sur les sixième (Cd6) et huitième (Cd8) vertèbres caudales de rats mâles de 28 jours afin de solliciter mécaniquement la septième vertèbre caudale (Cd7) avec une contrainte (force/aire) de 0,2 MPa pendant une période de 15 jours. Trois groupes expérimentaux ont été étudiés : un groupe contrôle, un groupe « sham » (appareil installé mais aucune mise en charge), et un groupe chargé. Les rats de chaque groupe ont été séparés en deux sous-groupes pour les différentes analyses biologiques, dans lesquelles les vertèbres caudales Cd5 et Cd9 ont fourni des contrôles internes situés à l'extérieur de l'appareil de chargement. Un premier sous-groupe a été utilisé pour mesurer les taux de croissance des vertèbres Cd5, Cd7 et Cd9, à l'aide de deux injections de calcéïne - un antibiotique qui se lie aux lieux de minéralisation active - préalablement au sacrifice ainsi que pour compléter différents essais histologiques. Ces essais ont inclus des immunohistochimies pour caractériser la distribution du collagène de type II et du collagène de type X, et une coloration à la safranine-O pour étudier la distribution des protéoglycanes, dans la matrice extracellulaire des plaques de croissance des vertèbres Cd5, Cd7 et Cd9. Des mesures histomorphométriques ont également été complétées pour la vertèbre caudale Cd7. Le second sous-groupe a été utilisé pour des essais de RT-PCR quantitative (qRT-PCR) permettant de quantifier l'expression des gènes des trois composants principaux de la matrice extracellulaire (les collagènes de type II et X et l'aggrécane) et de quatre enzymes protéolytiques dégradant ces composants (MMP-3 et -13 et ADAMTS-4 et -5).

Les expérimentations ont montré que le chargement en compression ralentissait la croissance des vertèbres Cd7 du groupe chargé de 29% ($p < 0,05$) par rapport au groupe contrôle et de 15% ($p = 0,07$) par rapport au groupe « sham ». Au niveau de la plaque de croissance, les collagènes de type X et II ont été moins exprimés dans la matrice du groupe chargé que dans celle des deux autres groupes, leurs expressions étant diminuées respectivement dans 50% et 83% des rats chargés. Aucune modification significative n'a

cependant été observée pour leurs ARNm ni pour l'une des enzymes protéolytiques capable de les cliver, la MMP-13. Une surexpression significative de l'autre de leurs enzymes dégradatrices testées, la MMP-3, a été observée pour le groupe chargé par rapport au groupe contrôle ($p < 0,05$) mais pas par rapport au groupe « sham » ($p = 0,72$). Cette surexpression du groupe chargé n'a néanmoins pu être exclusivement associée au chargement, car elle était très similaire au groupe « sham ». Le troisième composant principal de la matrice, l'aggrécane, n'a montré aucun changement dans sa propre distribution, sa production d'ARNm ou celle de ses dégradeurs protéolytiques étudiés, ADAMTS-4 et -5. Par ailleurs, les études histomorphométriques ont montré que la vertèbre Cd7 chargée avait un cortex plus large à porosité plus élevée que la même vertèbre dans le groupe contrôle.

Cependant l'étude a certaines limites dans son design même, car elle n'a été menée que sur un petit nombre de rats, en particulier pour le groupe « sham ». Par ailleurs, les résultats ne s'appuient que sur un type d'essai biologique et il faudrait ainsi les confirmer par d'autres types d'essais. De plus, la précision de la charge appliquée par l'appareil présentait certaines limites dans le contrôle de son intensité et de son orientation. Enfin, le modèle animal du rat présentait certains inconvénients, en particulier sa petite taille et la quantité correspondante de tissus pour les essais biologiques.

Cette étude a démontré que le chargement statique *in vivo* en compression induit un remodelage de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance, ce qui pourrait conduire à des modifications des activités cellulaires de prolifération et d'hypertrophie, puis conséquemment expliquer la réduction de taux de croissance observée. La nature de cette réorganisation des protéines de la matrice n'a cependant pu être déterminée. Des études ultérieures pourraient investiguer la possibilité d'une dénaturation mécanique des collagènes, comme il a déjà été observé dans le cas du chargement mécanique du cartilage articulaire, et d'autres stades de chargement pourraient être investigués pour

confirmer les résultats obtenus pour 0,2 MPa. Les connaissances découlant de ces études mécanobiologiques de la plaque de croissance permettront de mieux comprendre le processus de modulation mécanique de croissance et de fournir une base plus scientifique au traitement médical des déformations squelettiques progressives.

Abstract

Longitudinal bone growth occurs within the growth plate at the end of long bones and vertebrae. The growth plate is divided in three zones (reserve, proliferative, hypertrophic), in which the composition, structure and morphology are different at the cellular level as well as in the extracellular matrix. Several factors, such as systemic hormones, local growth factor, genetics, nutrients and drugs, regulate bone growth. Clinical evidence demonstrates that loads are essential to normal bone growth, yet, if too elevated, these loads can result in skeletal deformities or progressive pathological conditions of the musculoskeletal system. Among the different biological factors influencing growth rate like cellular proliferation and hypertrophy, the synthesis and degradation of the growth plate extracellular matrix has an important role to play in longitudinal bone growth, because the modification of the matrix is necessary for the proliferative cells to undergo their morphological changes and become hypertrophic.

A static *in vitro* loading showed that the mRNA productions of the two main growth plate collagens, type II and X collagens, were reduced with loading. Yet, it was not confirmed by an *in vivo* study on a chicken model. However, this study did not precisely control the load applied neither in intensity nor in direction. Two other *in vivo* studies on a rat model observed no change in the expression of the two collagens proteins after a dynamic compressive load. These studies, which were using a dynamic intermittent loading, could have implied a different biological response as compared to those using a static loading.

The present work was aimed to study *in vivo* a rat animal model under a constant static compressive loading precisely control, to quantify the mechanical bone growth modulation and to determine the role of the extracellular matrix (synthesis and/or degradation) in the modulation process. In order to fulfill this goal, a loading device was fixed on the sixth (Cd6) and the eight (Cd8) caudal vertebrae of male rats 28 days old to mechanically load the seventh caudal (Cd7) vertebra with a stress (force/area) of 0.2 MPa for 15 days. Three experimental groups were studied: a baseline control group, a sham group (loading device installed but no load applied), and a loaded group. The Cd5

and Cd9 vertebrae, external to the external fixator, were used as internal controls. In the three groups, the rats were divided in two subgroups for the different biological analysis. A first subgroup was used to measure the growth rates on the Cd5, Cd7 and Cd9 vertebrae, using two calcein -an antibiotic which binds specifically to actively mineralizing matrix- injections made before sacrifice. This subgroup was also used to perform different histological assays, including immunohistochemistries to characterize the type II and X collagens distribution and safranin-O coloration to study the proteoglycans distribution, in the growth plate extracellular matrix of the Cd5, Cd7 and Cd9 vertebrae. Histomorphometric measures were also performed on the Cd7 vertebra. The second subgroup was used for qRT-PCR assays to quantify the three main extracellular matrix components (type II and X collagens and aggrecan) and four proteolytic enzymes degrading the above mentioned components (MMP-3 and -13 and ADAMTS-4 and -5).

The experimentations showed that the compressive loading reduced the Cd7 growth of the loaded group by 29% ($p<0.05$) and 15% ($p=0.07$) as compared to the control group and the sham group, respectively. In the growth plate matrix, the type X and II collagens were less expressed in the loaded group than in the other group in 50% and 83% of the rats, respectively. No significant change was observed neither in the mRNA production of the two collagens nor in MMP-13, one of the proteolytic enzyme studied able to degrade the collagens. A significant over-expression was observed in the loaded group for MMP-3, the second collagens degradative enzyme studied, as compared to the control group ($p<0.05$), yet the difference was not significant as compared to the sham group ($p=0.72$).

Then this over-expression in the loaded group could not exclusively be attributed to the load applied, because it was very similar to the expression measured in the sham group. The aggrecan, the third main component studied, did not demonstrate any change in the protein distribution, in the mRNA production or in the mRNA production of the proteolytic degraders studied, ADAMTS-4 and -5. In addition, the histomorphometric

studies showed that the loaded Cd7 vertebra had a cortex thicker and porosity more important than the same vertebra in the control group.

The study has a number of limits because it was conducted only in a limited number of rats, especially in the sham group. Moreover, the results are based only on one type of biological assay and hence the use of other techniques would be required to confirm the results. In addition, the accuracy of the load applied with the device was somehow limited in the control of its magnitude and orientation. Finally, the use of the rat animal model includes some disadvantages, mostly because of its small size, and the corresponding amount of tissue for biological assays.

This study showed that an *in vivo* static compressive loading induces a remodeling of the growth plate extracellular matrix, which could lead to modifications in the proliferative and hypertrophic cellular activities, and in consequence explain the growth rate reduction observed. The nature of the reorganization in the matrix proteins though, was not determined. Following studies could investigate the possibility of a mechanical denaturation of the collagens, as it has already been observed in articular cartilage under mechanical loading. Other loading levels could also been investigated to confirm the results obtained here with 0.2 MPa. The increase understanding in the growth plate mechanobiology that will come from these studies will provide new insights in the mechanical growth modulation mechanism and a more scientific basis for the medical treatments of progressive skeletal deformities.

Table des matières

Résumé	v
Abstract.....	ix
Table des matières.....	xii
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des figures.....	xv
Liste des sigles et abréviations	xvii
Introduction	1
CHAPITRE 1 : Revue des connaissances	3
1.1. Le système squelettique	3
1.1.1. Rôles du système squelettique	3
1.1.2. Composition du système squelettique.....	3
1.2. Ostéogenèse	17
1.2.1. Mécanismes d'ossification	18
1.2.2. Croissance latérale	21
1.2.3. Croissance longitudinale.....	22
1.3. Mécanobiologie des plaques de croissance	29
1.3.1. Effet d'un chargement mécanique sur le taux de croissance	29
1.3.2. Effet d'un chargement mécanique sur la biologie de la plaque de croissance	33
CHAPITRE 2 : Rationnelle du projet et cadre méthodologique.	40
CHAPITRE 3 : Article.....	42
3.1. Présentation de l'article.....	42
3.2. Article : EFFECTS OF <i>IN VIVO</i> STATIC COMPRESSIVE LOADING ON AGGRECAN AND TYPE II AND X COLLAGENS IN THE RAT GROWTH PLATE EXTRACELLULAR MATRIX	43
3.2.1. Abstract	44
3.2.2. Introduction	45
3.2.3. Material and methods	47
3.2.4. Results.....	53
3.2.5. Discussion	56
3.2.6. Acknowledgments.....	61
3.2.7. Références	62
3.2.8. Table	66
3.2.9. Figures	67
CHAPITRE 4 : Résultats complémentaires.....	73
4.1. Études préliminaires.....	73

4.1.1.	Tests de trois niveaux de chargement.....	73
4.1.2.	Technique de marquage de croissance	74
4.1.3.	Technique d'immunohistochimie pour le collagène de type II	74
4.1.4.	Technique d'immunohistochimie pour le collagène de type X.....	75
4.2.	Mesures de croissance.....	78
4.2.1.	Groupe contrôle.....	78
4.2.2.	Vertèbres caudales Cd4	78
4.2.3.	Vertèbres caudales Cd5	80
4.2.4.	Vertèbres caudales Cd9	80
4.3.	Immunohistochimies et coloration à la safranine-O.....	81
4.3.1.	Vertèbres caudales Cd5	81
4.3.2.	Vertèbres caudales Cd9	83
4.4.	Analyses qRT-PCR.....	85
4.4.1.	Vertèbres caudales Cd5	85
4.4.2.	Vertèbres caudales Cd9	86
4.5.	Mesures d'histomorphométrie sur la vertèbre caudale.....	88
4.5.1.	Méthodologie.....	88
4.5.2.	Résultats	89
4.6.	Localisation des néofragments de collagène de type II	90
4.6.1.	Méthodologie.....	90
4.6.2.	Résultats	91
	CHAPITRE 5 : Discussion générale.....	92
	CHAPITRE 6 : Conclusion et recommandations.....	99
	Bibliographie	103

Liste des tableaux

Tableau 1. 1 : Principaux composants de la matrice extracellulaire.	16
Tableau 1. 2 : Agents de régulation de la production des différents constituants de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance.	26
Tableau 1. 3 : Molécules régulatrices de la synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire, classées selon leur localisation dans la plaque de croissance chez le rat.	27
Tableau 1. 4 : Marquage de croissance pour des rats.	30
Tableau 1. 5 : Comparaison des techniques de détection de l'ARNm.	36
Tableau 1. 6 : Comparaison des techniques de détection de protéines.	39
 Table 3. 1: Primers used in qRT-PCR.	 66
Tableau 4. 1 : Mesures histomorphométriques pour les vertèbres Cd7 des groupes contrôle et chargé (moyenne $\pm$ SD).	89

Liste des figures

Figure 1. 1 : Les cellules de l'os (adapté de Pépin, 1981, [10]). A : ostéoblaste, B : ostéocyte, C : ostéoclaste.....	4
Figure 1. 2 : Schéma en coupe d'un os contenant de l'os cortical et de l'os spongieux (adapté de Marieb, 2005, [11]).	5
Figure 1. 3 : Structure d'un os long. A : vue antérieure avec coupe frontale, B : coupe transversale agrandie (adapté de Marieb, 2005, [11])......	6
Figure 1. 4 : Photomicrographie de cartilage hyalin (adapté de http://fr.wikipedia.org/wiki/Cartilage consulté le 10 août 2007, droits autorisés par Fanny Castets).	8
Figure 1. 5 : Plaque de croissance (grossissement original x200).....	8
Figure 1. 6 : Structure de la plaque de croissance.....	12
Figure 1. 7 : Ossification endoconjonctive (adapté de Marieb, 2005, [11]). Note : les schémas A et B sont à un grossissement supérieur aux deux autres.....	19
Figure 1. 8 : Ossification endochondrale (pour un os long) (adapté de Marieb, 2005, [11]).	20
Figure 1. 9 : Croissance latérale par apposition (adapté de Marieb, 2005, [11]).	22
Figure 1. 10 : Importance relative de chaque facteur dans la croissance quotidienne de rats (adapté de Wilsman et al. [79]).....	24
Figure 1. 11 : Marquage de croissance d'une vertèbre de rat : deux injections de calcéïne à 6 jours d'intervalle. Taux de croissance = $\Delta x / (t_2 - t_1)$	29
Figure 1. 12 : Vérification par Stokes de la loi de Hueter-Volkmann ([3])......	31
Figure 1. 13 : Mesures de la hauteur de la zone hypertrophique (Stokes et al. 2002, [134]).	33
Figure 1.14 : Déroulement d'un Northern blot (adapté de Alberts et al. 2002, [162]).	35
Figure 1. 15 : Déroulement d'une PCR (adapté d'Alberts et al. 2002, [162]).	35
Figure 1. 16 : Déroulement d'un « Western blot » (adapté de Kurien et Scofield, 2006, [165])......	38
Figure 1. 17 : Trois exemples d'essais d'immunohistochimies pour le collagène de type X avec différentes concentrations d'anticorps : 1/200 pour A, 1/2500 pour B, 1/3000 pour C.	39
 Figure 3. 1: Loading device installed on the rat tail. (A) Radiography of a loaded rat showing the apparatus loading Cd7 vertebra. (B) Photograph y of the loading apparatus installed on a rat tail and, in the top-right corner, a transversal view showing the tail centered using the concentricity system.	67
Figure 3. 2: Experimental relationships used to recalibrate the device every four days. (A) Relationship used to determine the spring compression needed to maintain an applied stress of 0.2 MPa over Cd7 vertebra. (B) Cd7 diameter evolution with rat age. The dash-lined square shows at a higher scale the corresponding linear relationship during the growth period from 26 to 80 days old. This relationship was used to estimate Cd7 diameter over the two-week loading phase, and to evaluate Cd7 transverse area as circular surface.	68
Figure 3. 3: Measurement of growth modulation. (A) Labeling of growth with calcein. The gray square is displayed at higher magnification and the growth labels are marked by the two white lines. Growth rate is the measurement of the distance Δx between the two lines divided by the time between the two injections $\Delta t = 3$ days. (B) Growth rate variation along the rat tail for the sham and loaded groups for Cd4 (sham, n=5; loaded, n=10), Cd5 (sham, n=3; loaded, n=6), Cd7 (sham, n=3; loaded, n=6) and Cd9 (sham, n=2; loaded, n=6) (mean value $\pm$ SD). a: $p < 0.05$ compared to loaded Cd7. (C) Cd7 growth rate for the control (n=5), sham (n=3) and loaded (n=6) groups (mean value $\pm$ SD). b: $p < 0.05$ compared to control.....	69
Figure 3. 4: Immunohistochemistries and safranin-O on the growth plate of the Cd7 vertebra of 43-day-old rats. The pictures display type II collagen staining (A to I), type X collagen staining (J to R) and safranin-O staining (S to X). Three groups are studied: the control group (left), the sham group (middle) and the loaded group (right). Panels E, G, I, N, P, R are negative controls	

of their respective group. Bars represent 1 mm in lower magnifications and 100 μ m in higher magnifications.....	70
Figure 3. 5: Evaluation by qRT-PCR of selected gene expression in the growth plates of the Cd7 vertebrae of control (n=6), sham (n=3) and loaded (n=6) rats. (A) Δ CT (mean $\pm$ SD) values for type II collagen, type X collagen and aggrecan, with 18S used as the endogenous control gene. The gene-targeted mRNA expression is decreased when Δ CT increases. (B) Fold change (FD) in gene expression for type II collagen, type X collagen and aggrecan in the growth plates of the Cd7 vertebrae between groups. Values represent the ratio of relative quantity (RQ) means between two groups at a time. FD>1 means that the gene targeted mRNA is more expressed in the first group than in the second one.....	71
Figure 3. 6: Evaluation by qRT-PCR of selected gene expression in the growth plates of the Cd7 vertebrae of control (n=6), sham (n=3) and loaded (n=6) rats. (A) Δ CT (mean $\pm$ SD) values for MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4 and ADAMTS-5, with 18S used as the endogenous control gene. The gene-targeted mRNA expression is decreased when Δ CT increases. a: p<0.05 compared to control. (B) Fold change (FD) in gene expression for MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in the growth plates of the Cd7 vertebrae between groups. Values represent the ratio of relative quantity (RQ) means between two groups at a time. FD>1 means that the gene targeted mRNA is more expressed in the first group than in the second one.	72
Figure 4. 1 : Essais d'optimisation du protocole d'immunohistochimie pour le collagène de type II, avec de gauche à droite : sans hyaluronidase, avec hyaluronidase pendant 15 minutes à température ambiante, avec hyaluronidase pendant 30 minutes à température ambiante et avec hyaluronidase pendant 15 minutes à 37°C.....	75
Figure 4. 2 : Essai de dilutions de l'anticorps de collagène de type X, de gauche à droite du plus concentré 1/200 au plus dilué 1/3000.....	75
Figure 4. 3 : Essais d'optimisation du temps de pose de la DAB pour l'immunohistochimies pour le collagène de type X, de gauche à droite du plus court (1 minute) au plus long (3 minutes).....	76
Figure 4. 4 : Essai en ajoutant la hyaluronidase (à droite) pour l'immunohistochimie pour le collagène de type X.	76
Figure 4. 5 : Comparaison de trois protocoles pour l'immunohistochimie pour le collagène de type X, à gauche : protocole habituel, au milieu : hyaluronidase seulement, à droite : trypsine seulement.....	77
Figure 4. 6 : Comparaison de deux protocoles pour l'immunohistochimie pour le collagène de type X, à gauche : protocole habituel, à droite : blocage avec du lait.	77
Figure 4. 7 : Mesures de croissance pour les vertèbres du groupe contrôle. a : p<0,05 par rapport à Cd7, b : p<0,05 par rapport à Cd9.....	78
Figure 4. 8 : Taux de croissance des vertèbres Cd4.	79
Figure 4. 9 : Taux de croissance des vertèbres Cd4 par sous-groupe.....	79
Figure 4. 10 : Taux de croissance des vertèbres Cd5.	80
Figure 4. 11 : Taux de croissance des vertèbres Cd9.	80
Figure 4. 12 : Immunohistochimies et coloration à la safranine-O pour les vertèbres Cd5.	82
Figure 4. 13 : Immunohistochimies et coloration à la safranine-O pour les vertèbres Cd9.	84
Figure 4. 14 : Résultats de qRT-PCR pour les composants de la matrice pour les vertèbres Cd5. ...	86
Figure 4. 15 : Résultats de qRT-PCR pour les composants de la matrice pour les vertèbres Cd9. ...	87
Figure 4. 16 : Coloration au Goldner-Masson de vertèbres Cd7 des groupes contrôle (A) et chargé (B).	90
Figure 4. 17 : Immunohistochimie pour le collagène de type II clivé par la MMP-1 et la MMP-13 pour les vertèbres Cd7.	91

Liste des sigles et abréviations

Δ CT : delta des cycles seuil, signifie « delta between threshold cycles »

$\Delta\Delta$ CT : delta des delta des cycles seuil, signifie « delta between delta between threshold cycles »

ADAMTS : nom des aggrecanases, signifie adamalysin-thrombospondins

ADN : acide désoxyribonucléique

ANOVA : analysis of variance

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

bFGF : basic fibroblast growth factor

BMPs : bone morphogenetic proteins

BrdU : bromodioxyuridine

Cd4, Cd5, Cd6, Cd7, Cd8 and Cd9 vertebrae: vertèbres caudales 4, 5, 6, 7, 8 et 9

cDNA : abréviation anglaise pour acide désoxyribonucléique complémentaire

CO₂ : dioxyde de carbone

DAB : diaminobenzidine

dNTPs : abréviation utilisée pour désigner les quatre désoxyribonucléotides

DTT : dithiothreitol

EF : fixateur externe, signifie « external fixator »

FD : fold change

FGFs : fibroblast growth factors

GH : hormone de croissance, signifie « growth hormone »

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

IGF-I et II : insulin-like growth factor-I et II

IgG : immunoglobuline G

IHH : Indian hedgehog

KCl : chlorure de potassium

MgCl₂ : chlorure de magnésium

MMPs : métalloprotéinases

MOPS : 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid

MPa : méga pascal

mRNA : abréviation anglaise pour acide ribonucléique messenger

PBS : phosphate buffered saline

pH : potentiel hydrogène

PTH : hormone parathyroïdienne

PTHrP : peptide lié à l'hormone parathyroïdienne

qRT-PCR : quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction

RNA : abréviation anglaise pour acide ribonucléique

RQ : quantité relative, signifie « relative quantity »

RT-PCR : reverse transcriptase-polymerase chain reaction

SD : standard deviation

SDS : sodium dodecyl sulfate

T3 et T4 : hormones thyroïdiennes 3 et 4

TGF- β : transforming growth factor β

TIMPs : inhibiteurs des MMPs, signifie « tissue inhibitor of MMPs »

Tris : trishydroxyméthylaminométhane

UV : ultra-violet

VEGF : vascular endothelial growth factor

Introduction

La croissance osseuse longitudinale s'effectue dans les plaques de croissance situées aux extrémités des os longs et des vertèbres. La plaque de croissance, un tissu de type cartilagineux, comprend trois zones successives (réserve, proliférative, hypertrophique) dont la composition, la structure et la morphologie diffèrent tant au niveau des cellules que de la matrice extracellulaire.

Plusieurs facteurs hormonaux systémiques et locaux, génétiques et nutritionnels, ainsi que des médicaments, régulent la croissance osseuse. Elle peut également être modulée de façon mécanique, comme le suggère la loi d'Hueter-Volkmann, qui énonce qu'un chargement mécanique en compression ralentit la croissance alors qu'une diminution du chargement l'accélère. L'évidence clinique démontre d'ailleurs qu'un chargement mécanique est nécessaire à la croissance osseuse normale. Cependant, les charges excessives peuvent conduire à des anomalies de croissance osseuse ou des conditions pathologiques progressives du système musculosquelettique comme la scoliose idiopathique de l'adolescent ou les *genu vara/valga*.

Différentes études expérimentales sur des modèles animaux ont été menées afin de mieux comprendre le mécanisme de croissance normale d'une part et l'influence du chargement mécanique dans ce processus d'autre part. Parmi les facteurs biologiques d'influence sur le taux de croissance, la synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance joue un rôle important dans la croissance osseuse longitudinale, car ces modifications sont nécessaires au passage des cellules de la prolifération vers l'hypertrophie [1]. Les études biomécaniques ont pour leur part confirmé la loi de Hueter-Volkmann [2-5]. Cependant, très peu d'études ont étudié la mécanobiologie de la plaque de croissance. Une étude *in vitro* a montré que la production d'ARNm des deux principaux collagènes composant la plaque de croissance, le collagène de type II et le collagène de type X, était diminuée avec le chargement, surtout pour le collagène de type II [6]. Une étude *in vivo* menée sur un modèle animal de poulet n'a néanmoins pas confirmé ce résultat, aucun changement dans la production de ces deux gènes n'ayant été observé [7]. Cette étude ne contrôlait toutefois pas

précisément la charge appliquée tant au niveau de la magnitude de la charge que de sa direction. Par ailleurs, deux études *in vivo* sur des modèles animaux de rats, ont montré qu'un chargement en compression dynamique ne modifiait pas l'expression des protéines du collagène de type II [8] et du collagène de type X [9] dans la matrice extracellulaire. Ces études qui ont été menées avec un chargement dynamique et intermittent pourraient induire des réponses biologiques différentes à celles d'un chargement de type statique.

L'objectif principal du projet est d'étudier *in vivo* un modèle animal de rat pour quantifier la modulation mécanique de la croissance osseuse due à un chargement contrôlé avec précision en intensité et maintenu constant au cours du temps, et pour déterminer plus particulièrement le rôle de la matrice extracellulaire (sa synthèse et/ou sa dégradation) dans cette modulation.

Ce mémoire par article est divisé en 6 chapitres. Le premier présente une revue des connaissances nécessaires à la bonne compréhension du projet. Il contient des notions sur le système squelettique et la plaque de croissance, les différents mécanismes d'ostéogenèse et la croissance longitudinale des os au niveau de la plaque de croissance, puis résume l'état des connaissances sur la mécanobiologie de la plaque de croissance. Le chapitre 2 décrit la rationnelle du projet, son hypothèse de recherche et ses objectifs spécifiques. Le corps du mémoire est constitué d'un article constituant le troisième chapitre. Il présente les principaux résultats obtenus après chargement statique de la septième vertèbre caudale (Cd7) chez le rat. Le chapitre 4 contient des résultats complémentaires à ceux présentés dans l'article. Le chapitre 5 comprend une discussion générale sur le projet. Une conclusion et des recommandations pour des travaux futurs clôturent ce mémoire par un sixième chapitre.

CHAPITRE 1 : Revue des connaissances

1.1. Le système squelettique

Le système squelettique est composé de l'ensemble des os, cartilages et articulations, incluant les tendons et les ligaments.

1.1.1. Rôles du système squelettique

Le système squelettique a d'abord un rôle de soutien. En effet, les os par leur rigidité permettent à l'homme de se tenir debout et droit, bien que la majorité du corps soit composée de tissus mous. Le système squelettique joue aussi un rôle de protection, en entourant d'une matière dure et rigide les organes vitaux qui sont très importants et fragiles comme le cœur, les poumons, le cerveau et la moelle épinière. Le troisième rôle, non moins négligeable, est de permettre le mouvement par un jeu complexe d'articulations dans lequel interviennent aussi les muscles, les tendons et les ligaments. Le système squelettique a par ailleurs une fonction hématopoïétique. En effet, les cellules sanguines se forment dans les cavités médullaires de certains os appelées « moelle rouge ». Finalement, les os sont des réservoirs de minéraux, principalement de calcium et de phosphore, et ils assurent la régulation de ces minéraux dans le sang [10, 11].

1.1.2. Composition du système squelettique

1.1.2.1. Os

Composition

L'os est à la base un **tissu conjonctif** formé de cellules (ostéoblastes, ostéocytes, ostéoclastes, cellules ostéoformatrices) et d'une matrice rigide qui a la particularité d'être calcifiée. Les **ostéoblastes** (Figure 1.1A) sont des cellules qui produisent des fibres de collagène et de la substance fondamentale. Elles sont polyédriques et possèdent des prolongements cytoplasmiques. Les **ostéocytes** (Figure 1.1B) sont des ostéoblastes entourés de substance fondamentale et de collagène calcifiés. Leurs apports vitaux sont assurés par des petits canaux, appelés canicules, reliés entre eux et aux capillaires. Ils ont

pour rôle de renouveler et entretenir la matrice osseuse qui les entoure. Les **ostéoclastes** (Figure 1.1C) sont de volumineuses cellules contenant 10 à 15 noyaux. Ils synthétisent de la collagénase et le libèrent pour dégrader le collagène de la matrice osseuse, puis ils phagocytent les minéraux et la matière organique libérée par la résorption et vont les libérer dans les capillaires. Ce mécanisme a lieu lors du remodelage osseux. Les **cellules ostéoformatrices** sont des cellules mésenchymateuses qui se différencient ultérieurement en ostéoblastes ou bien ostéoclastes. Elles sont très présentes chez l'enfant en croissance mais aussi chez l'adulte lors de la réparation d'une fracture par exemple.

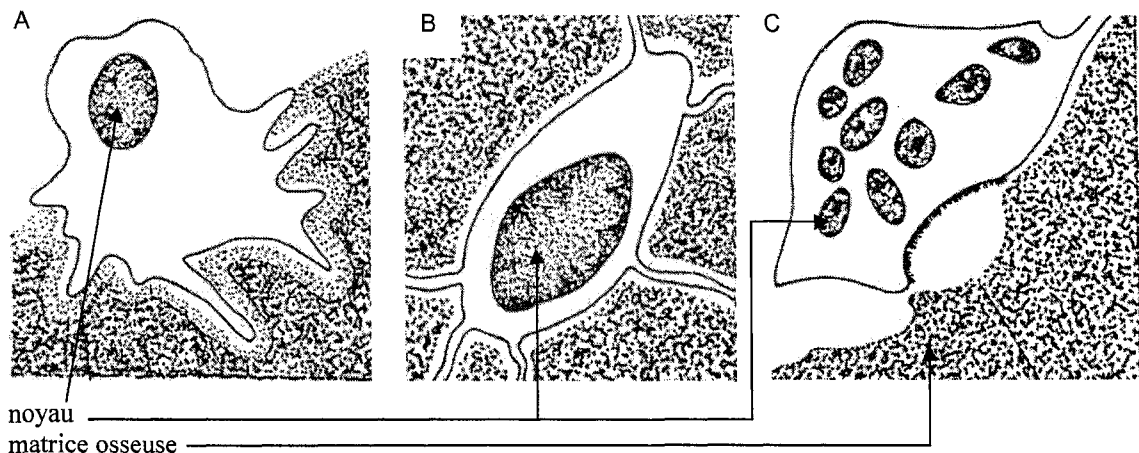


Figure 1. 1 : Les cellules de l'os (adapté de Pépin, 1981, [10]). A : ostéoblaste, B : ostéocyte, C : ostéoclaste.

La matrice de l'os est composée de fibres de collagène, de substance fondamentale (c'est-à-dire de complexes glucoprotéiques) et de sels minéraux dont 10% de carbonate de calcium et 90 % de phosphate de calcium. Cette matrice calcifiée confère sa rigidité à l'os. Elle est organisée en lamelles, où les fibres de collagène sont disposées parallèlement. Leur direction change d'une lamelle à l'autre. Dans l'**os cortical**, ces lamelles sont concentriques : elles forment des complexes appelés ostéons (Figure 1.2) et comblent également les espaces entre les ostéons. Dans un ostéon, les ostéocytes sont entre les lamelles et ne sont reliés qu'aux ostéocytes du même ostéon. Au centre se trouve un canal, le canal de Havers, qui laisse passer un ou deux capillaires et des cellules conjonctives. Les capillaires sont reliés à d'autres canaux et à la moelle par des

canaux transversaux, dits de Volkman. Dans l'**os spongieux**, les lamelles sont disposées en travées, dont les dimensions sont variables et les arrangements sont plus ou moins irréguliers et d'orientations variables, contrairement à l'os cortical (Figure 1.2). L'os spongieux est organisé de manière à donner un maximum de force avec un minimum de matériel [12].

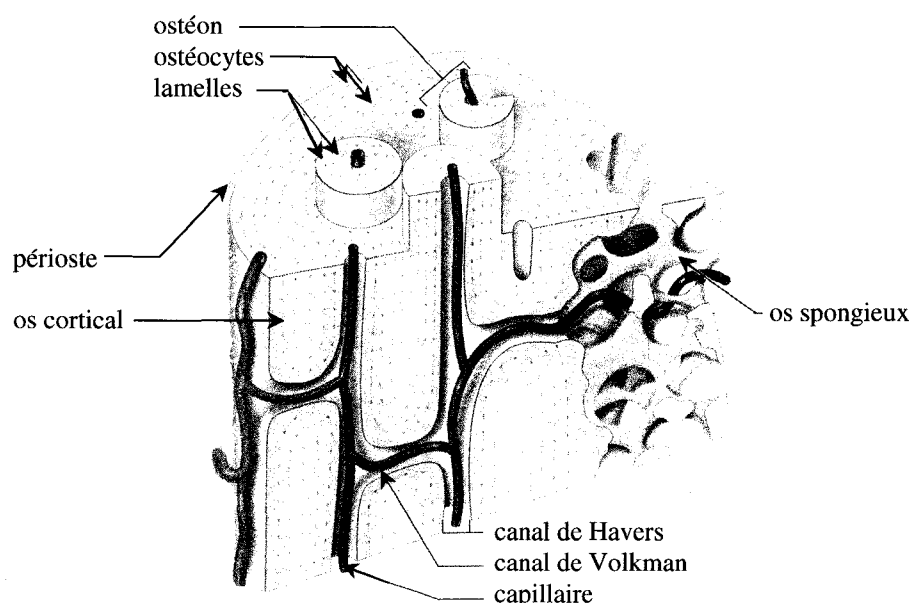


Figure 1. 2 : Schéma en coupe d'un os contenant de l'os cortical et de l'os spongieux (adapté de Marieb, 2005, [11]).

Structure

Tous les os sont **vascularisés**, c'est-à-dire qu'ils possèdent des canaux sanguins reliés à la circulation centrale, et **innervés**, donc reliés aux centres nerveux. Ils **contiennent de la moelle osseuse** (Figure 1.3B) dans leur cavité médullaire ou entre leurs travées. L'**endoste** (Figure 1.3B) est une mince couche de tissu conjonctif tapissant les parois de la cavité médullaire, des travées du tissu spongieux et des canaux de Havers. Le **tissu périostique lamellaire** se retrouve en périphérie extérieure de l'endoste et confère sa solidité à l'os. Enfin, un **périoste** (Figure 1.2) est situé en surface externe ; il est formé d'une membrane fibreuse de collagène et aussi d'ostéoblastes, lors de la croissance ou en cas de fracture par exemple.

Les os sont classifiés selon leur forme : os longs, os courts, os plats et enfin os irréguliers. Il existe cependant de petites différences de structures selon la forme de l'os. Les **os longs**, que l'on retrouve dans les membres supérieurs et inférieurs, sont comme leur nom l'indique plus longs que larges. On peut séparer un os long en trois parties : la diaphyse au centre et des épiphyses aux extrémités (Figure 1.3A). La **diaphyse** constitue l'axe longitudinal de l'os et renferme la cavité médullaire. L'**épiphyse**, souvent plus épaisse que la diaphyse, contient de l'os spongieux recouvert d'os cortical, lui-même recouvert de cartilage hyalin au niveau de l'articulation. A la jonction entre ces deux parties de l'os se trouve la ligne épiphysaire chez l'adulte, vestige de la plaque de croissance, responsable de la croissance osseuse longitudinale chez l'enfant. On appelle parfois cette jonction **métaphyse**.

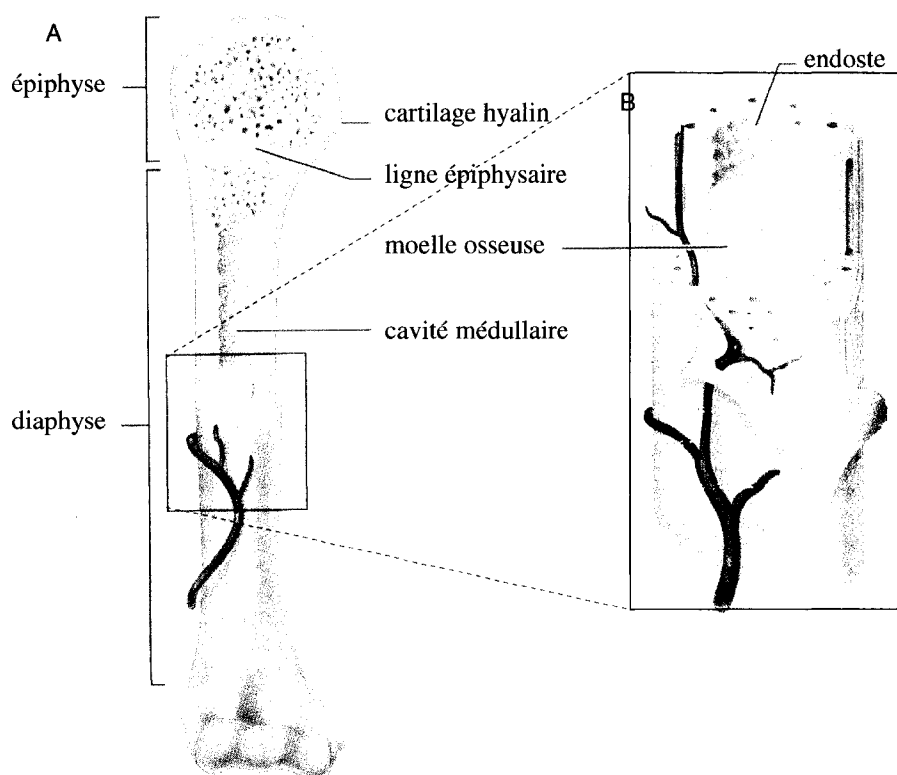


Figure 1. 3 : Structure d'un os long. A : vue antérieure avec coupe frontale, B : coupe transversale agrandie (adapté de Marieb, 2005, [11]).

Les **os courts, plats et irréguliers** ont des structures semblables. Les os courts sont à peu près aussi larges que longs, et les os irréguliers, comme les vertèbres, sont faits d'une mince couche de périoste autour d'une couche de tissu osseux spongieux. Les os plats, comme ceux du crâne, ont la particularité d'avoir deux couches d'os cortical.

Rôles

En tant que composants principaux du système squelettique, les os interviennent dans toutes les fonctions de celui-ci : soutien, protection, locomoteur, hématopoïétique. Il faut noter que la forme de chaque os est adaptée au rôle spécifique qu'il doit jouer.

1.1.2.2. Cartilage

Composition

Le cartilage est principalement constitué d'**eau** qui, combinée aux sels minéraux, protéines et lipides, représente entre 60 à 85% du volume tissulaire. Sa composition inclut aussi des cellules appelées **chondrocytes** (environ 10% du volume), et une matrice extracellulaire autosynthétisée [13]. Cette matrice est constituée de **substance fondamentale** (essentiellement de la chondromucoprotéine, pour 4 à 7% du volume), de **fibres de collagène** (15 à 22% du volume) et parfois de fibres élastiques. Sa grande teneur en eau lui confère ses propriétés d'élasticité.

Structure

Il existe trois types de cartilage, basés sur l'organisation et les proportions des composants. Le **cartilage élastique** est très riche en fibres élastiques, ce qui lui confère une teinte jaune et une grande opacité. On le retrouve au niveau du pavillon de l'oreille, du conduit auditif externe, de l'épiglotte et du larynx. Le **cartilage hyalin** (Figure 1.4) est le plus répandu : c'est un support flexible et élastique. Il présente un aspect de verre semi-transparent blanc et se situe principalement sur les surfaces articulaires.

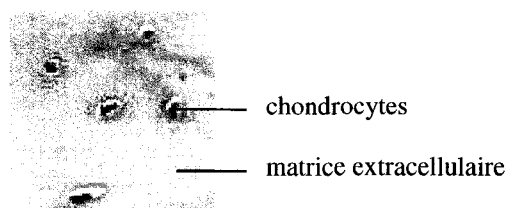


Figure 1. 4 : Photomicrographie de cartilage hyalin (adapté de <http://fr.wikipedia.org/wiki/Cartilage> consulté le 10 août 2007, droits autorisés par Fanny Castets).

Il existe une configuration particulière de ce cartilage [8] qu'on appelle **cartilage épiphysaire ou plaque de croissance** (Figure 1.5). Il a la particularité d'être très organisé [14] : les chondrocytes sont ordonnés en colonnes dans une partie importante du tissu [1, 15-20]. La plaque de croissance est présentée plus en détails à la section 1.1.2.3.

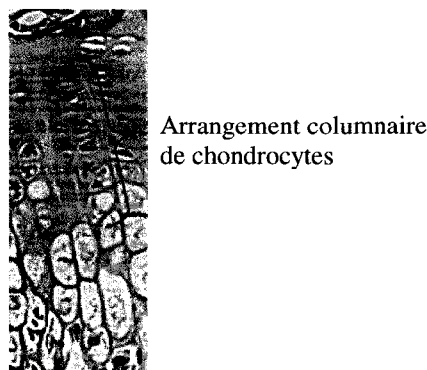


Figure 1. 5 : Plaque de croissance (grossissement original x200).

Enfin, le **cartilage fibreux** est riche en fibres de collagènes orientées parallèlement les unes par rapport aux autres, ce qui lui permet de se comprimer de façon importante et aussi de bien résister aux tensions. Il est à mi-chemin entre les cartilages élastiques et hyalin. On le retrouve en particulier dans les disques intervertébraux.

Le cartilage, surtout celui de la plaque de croissance, est entouré du **périchondre**, c'est un tissu conjonctif dense et irrégulier qui permet de limiter l'expansion du cartilage quand il est comprimé. Le périchondre contient des vaisseaux sanguins d'où partent les nutriments destinés aux cellules du cartilage, qu'ils rejoignent par diffusion à travers la matrice, car le cartilage est avasculaire.

Rôles

Le cartilage élastique est à la fois rigide et élastique ; il offre une très bonne résistance aux chargements en flexion cycliques ou répétés. Le cartilage hyalin présente un comportement **viscoélastique**, i.e. à mi-chemin entre celui d'un solide élastique et celui d'un liquide visqueux. Il agit essentiellement dans la transmission d'efforts de traction et/ou compression [21]. Plus particulièrement, le cartilage articulaire assure la distribution de charges élevées sur une grande surface, et les mouvements relatifs avec une friction et une usure minimales. Le cartilage fibreux a pour principale fonction de faire la jonction entre le cartilage hyalin et un ligament ou un tendon. La plaque de croissance est le site de la croissance longitudinale des os longs et des vertèbres et n'a pas de rôle biomécanique primaire.

1.1.2.3. La plaque de croissance en détails

Dans la suite, à moins de mention contraire, les renseignements sont valables pour la plaque de croissance de rat, objet d'étude dans ce projet.

Composition

La plaque de croissance comprend des cellules (les chondrocytes) et de la matrice extracellulaire. La **matrice extracellulaire** est constituée d'un réseau de fibres de collagène incorporées dans un complexe très hydraté de protéoglycanes et d'acides hyaluroniques agrégés dont la composition varie selon les zones cellulaires [1, 16, 22].

Les collagènes caractéristiques du cartilage sont listés ci-dessous :

- le **collagène de type II** est le plus abondant [1, 16, 23, 24]. Il est composé de trois chaînes $\alpha 1$ identiques qui se replient en une hélice. Il joue un rôle structurant [25], et, de plus, il inhibe la calcification et empêche le centre d'ossification secondaire de se propager vers l'épiphyse [26] ;
- le **collagène de type IX** est aussi un collagène fibrillaire. Il est encore composé de trois chaînes α , mais c'est aussi un protéoglycane car une chaîne de glycosaminoglycane lui est liée de façon covalente à une de ses chaînes α [27, 28]. Il est lié par covalence à la surface des fibres de collagène de type II [28-31]. Il est très exprimé dans la plaque de croissance [32], bien qu'il soit en quantité beaucoup moins importante que le collagène

de type II [23]. Ballock et al. [32] ont postulé que le collagène de type IX permet au collagène de type II d'interagir avec les autres composants de la matrice extracellulaire et il est aussi probable qu'il participe au contrôle de la croissance et du diamètre des fibres de collagène de type II [23] ;

- le **collagène de type XI** est le dernier collagène fibrillaire de la matrice extracellulaire et il est composé de trois chaînes α [24, 33]. Il est lié au collagène de type II par des liaisons structurelles et non de surface [16, 31, 34]. Comme le collagène de type IX, il est lui aussi très exprimé dans la plaque de croissance [32], bien qu'il soit en quantité beaucoup moins importante que le collagène de type II [16, 23]. Il est lui aussi supposé jouer un rôle dans le contrôle de la croissance et du diamètre des fibres de collagène de type II [23] ;

- et le **collagène de type X** qui est non fibrillaire, est composé de trois chaînes $\alpha 1$ identiques mais plus courtes que celles des collagènes précédents [24]. Il pourrait jouer un rôle dans la calcification du cartilage [22, 24, 35]. Anderson [36] lui prête plutôt un rôle structurant et de support dans la matrice.

En ce qui concerne les protéoglycanes, le plus abondant est l'**aggrécane** [1, 16, 32], formé d'au moins 100 molécules de chondroïtine sulfate [16]. Il se trouve dans toute la plaque de croissance [16, 37-39]. L'aggrécane, de par ses charges négatives, joue un rôle dans la rétention d'eau, chargée positivement. Le fluide interstitiel incompressible ainsi emprisonné offre une résistance à la compression [32, 40]. Les protéoglycanes (l'aggrécane, mais aussi la versicane, la décorine, le biglycane, la fibromoduline, la lumican, la glypicane, la chondroïtine et l'agrine [32, 38, 41-46]) se retrouvent dans des proportions différentes selon la zone cellulaire considérée [45]. En particulier, la décorine recouvre les fibres de collagène [32]. L'agrine, un protéoglycane récemment identifié dans la plaque de croissance, semble jouer un rôle important dans la croissance osseuse, car les souris privées du gène permettant de le produire grandissent moins et la matrice de leur plaque de croissance contient moins de collagène de type II et d'aggrécane [38].

L'**aggrécane** et le **collagène de type II** sont les principaux responsables des capacités de résistance aux tensions et aux compressions de la plaque de croissance [45]. Considérant que ces molécules se retrouvent en proportions différentes à travers l'épaisseur de la plaque de croissance, les propriétés mécaniques sont différentes selon la zone cellulaire [45, 47].

La matrice contient également des facteurs de croissance (voir section 1.2.3.2) et des enzymes qui remodelent la matrice, en particulier des **métalloprotéinases** (ou MMPs), qui sont des enzymes protéolytiques Zn^{2+} -dépendantes, et des **aggrécánases** [48-51]. Il existe 4 principaux sous-groupes de MMPs : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines et les métalloprotéinases de type membranaire [52]. Les **collagénases** sont les plus intéressantes parce que ce sont les plus efficaces dans la dégradation des fibres de collagène de la matrice native. Il en existe 3 types chez l'homme (MMP-1 ou collagénase 1, MMP-8 ou collagénase 2 et MMP-13 ou collagénase 3) et au moins 2 chez le rat qui seraient équivalentes à MMP-8 et MMP-13. La MMP-13 est reconnue pour dégrader le collagène de type II de façon plus efficace [53, 54], mais elle peut aussi dégrader le collagène de type X [51, 55]. Elle a aussi le potentiel d'action des gélatinases [53] et peut donc dégrader le collagène dénaturé. Elle peut de plus dégrader l'aggrécane [56]. Parmi les **stromélysines**, la MMP-3 a des propriétés intéressantes, car elle peut dégrader non seulement les collagènes de type II et X comme la MMP-13, mais elle peut aussi dégrader les collagènes de type IX et XI [51]. Elle est aussi connue pour être un activateur des collagénases [57, 58] et pour dégrader les protéoglycanes [59].

D'autres MMPs ont été étudiées comme MMP-2, MMP-9, MMP-10, MMP-11 et MMP-14. MMP-2 et MMP-9 sont des **gélatinases** [52] ; MMP-2 dégrade en particulier le collagène de type II dénaturé [60], et les deux ont un rôle d'activation d'autres MMPs au moins *in vitro* [61]. MMP-14 est une **métalloprotéinase de type membranaire** capable de dégrader le collagène de type II et l'aggrécane et a été détecté chez l'humain dans toutes les zones de la plaque de croissance [61].

Les **aggrécánases** sont des ADAMTS (adamalysin-thrombospondins) et dégradent donc l'aggrécane [49, 50]. Au moins deux aggrécánases sont identifiées chez l'humain et chez

le rat : l'aggrécanase I ou ADAMTS-4, et l'aggrécanase II ou ADAMTS-5. L'aggrécanase I est capable de dégrader l'aggrécane mais aussi la versicane alors que l'aggrécanase II ne semble dégrader que l'aggrécane parmi les protéoglycanes de la plaque de croissance [49, 62, 63].

Il existe des inhibiteurs des MMPs appelés **TIMPs** (tissue inhibitor of MMP), qui sont au nombre de 4 [64, 65]. TIMP-1 a été détecté à travers toute la plaque de croissance [52, 61]. Cependant TIMP-3 est un meilleur inhibiteur des aggrécanases que des MMPs [66].

Structure

La plaque de croissance est en forme de disque ondulé et elle est anisotrope [67, 68]. Histologiquement, même si certains auteurs divisent la plaque de croissance autrement [Radhakrishnan, 2004 #5; Alvarez, 2000 #17; Sandell, 1994 #57; Weissner, 2002 #73; Takahashi, 2005 #102; Anderson, 1995 #92], elle est généralement séparée en trois zones disposées perpendiculairement à l'axe longitudinal de l'os : la zone de réserve, la zone proliférative et la zone hypertrophique (Figure 1.6) [14, 15, 69-73].

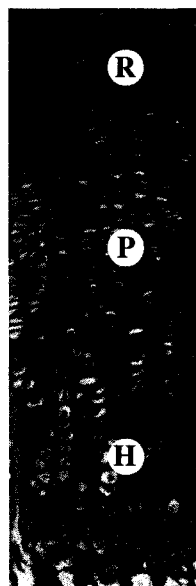


Figure 1. 6 : Structure de la plaque de croissance.

La zone de réserve

Elle est adjacente à la zone épiphysaire (Figure 1.6, R) [67, 69, 73]. Elle pourrait regrouper des cellules avec différentes fonctions physiologiques [71]. C'est la seule zone de la plaque de croissance qui soit vascularisée [67, 74]. L'orientation des cellules est aléatoire [26, 69], et ces dernières sont isolées ou en petits groupes [67, 73]. Le cycle cellulaire est particulièrement long dans la zone de réserve et les divisions cellulaires sont très rares [20, 67, 71].

Les chondrocytes y sont presque sphériques [69]. Ils ont d'abord une fonction de cellules souches [67-69, 71, 75], ensuite stimulés pour initier l'expansion clonale des cellules prolifératives [46, 68, 71] ; ce sont des cellules germinales [46, 67, 69, 71]. Dans cette zone, la matrice est composée en particulier de collagène de type II dont les fibres sont orientées aléatoirement ainsi que de protéoglycanes [76-78].

Le ratio volumique de matrice extracellulaire par rapport aux cellules est élevé [26, 32]. La taille de la zone de réserve, qui peut être déterminée via un marquage à la lectine, varie selon le stade développemental pour une même plaque de croissance, d'un os à un autre pour une même espèce et en proportion par rapport aux autres zones d'une espèce à une autre [15, 71]. Ces marquages montrent que les cellules souches ne se situent que dans une bande très étroite et qu'un groupe beaucoup plus important de cellules révèle des propriétés matricielles s'apparentant au cartilage articulaire, comparativement aux cellules des autres zones [71].

La zone proliférative

Les cellules de la zone proliférative sont plates [17, 26, 32, 46, 69, 73] et organisées en colonnes selon l'axe longitudinal (Figure 1.6, P) [26, 32, 46, 73]. Le cycle cellulaire y est très rapide [14, 15, 26, 69], ce qui fait de cette zone la région la plus dense en cellules [73].

Les chondrocytes synthétisent activement de la matrice [14, 15, 69] ; cette zone est donc riche en matrice [46, 73, 78]. Excepté l'étude d'Alvarez et al. [1] qui semble détecter le maximum d'expression du collagène de type II au début de la zone hypertrophique, plusieurs autres études établissent que la zone proliférative est la zone la plus riche en

collagène de type II (Tableau 1.1) [16, 23], et ses fibres de collagène sont orientées de façon longitudinale [26, 78]. L'agrine apparaît dans cette zone [38]. Cette dernière contient aussi des hormones de croissance qui sont à leur activité maximale surtout lors de la transition avec la zone de réserve. La zone proliférative produit les métalloprotéinases, en particulier MMP-2 et MMP-9, surtout proche de la transition avec la zone hypertrophique [52] et aussi, mais plus faiblement, MMP-13 [1], ainsi que leurs inhibiteurs : TIMP-1 et TIMP-2 [52]. Une étude chez l'humain n'a détecté aucune des MMPs citées précédemment dans la zone proliférative [61]. Elle n'a pas non plus observé la présence de TIMP-2, mais seulement celle de TIMP-1 dans cette zone. Le nombre de cellules de la zone proliférative varie selon le stade développemental et est lié au taux de croissance [71, 79].

La zone hypertrophique

La zone hypertrophique est située entre la zone proliférative et la métaphyse (Figure 1.6, H). Elle peut être considérée en deux parties : la zone préhypertrophique ou de transition entre la prolifération et l'hypertrophie, et la zone hypertrophique comme telle [16, 18, 23, 26, 46, 67, 71].

Dans la zone préhypertrophique, les cellules arrêtent de se diviser [46, 71], probablement après un nombre fini de divisions cellulaires [46, 67] ou bien sous l'influence d'un facteur de croissance local (le peptide lié à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP) est souvent pressenti pour jouer ce rôle, mais une controverse existe encore à ce sujet pour le stade postnatal) [18, 32, 46, 71]. Puis, les cellules commencent la différenciation particulièrement en s'allongeant [46, 80]. Les cellules perdent un peu leur organisation en colonnes [16]. La zone préhypertrophique est très étroite, ce qui reflète la grande coordination temporelle avec laquelle les cellules arrêtent de se diviser et commencent à grossir [71]. Par ailleurs, elle est métaboliquement plus active que la zone proliférative [15, 26, 81], en particulier la matrice extracellulaire contient plus de protéoglycanes et de phosphatase alcaline [1, 32, 82]. Cette matrice est aussi la plus riche en collagène de type IX [46]. Elle contient encore du collagène de type II [1, 16, 23, 38, 39, 77, 83] et de l'agrine [38]. De plus, le collagène de type X commence à être

produit [16, 26, 38, 84]. La présence de MMP-13 permet le remodelage de la matrice [1, 85]. C'est aussi dans cette zone que la MMP-3 et les aggrécanases I et II apparaissent [37, 86]. On détecte encore la MMP-9 et un peu de MMP-2, ainsi que TIMP-1 et encore un peu TIMP-2 [52], ce résultat étant encore en désaccord avec une étude chez l'homme [61] qui ne détecte ni MMP-2 et MMP-9 ni TIMP-2 dans cette première partie de la zone hypertrophique.

Dans la zone d'hypertrophie comme telle, les chondrocytes achèvent leur différenciation terminale [32, 46]. Ils s'arrondissent en continuant à s'allonger dans la direction de la croissance, et ils grossissent beaucoup et rapidement [14, 32, 46, 70, 73], de 10 à 20 fois leur taille initiale [70]. Contrairement au mécanisme classique d'hypertrophie qui est un grossissement cellulaire dû à une augmentation de volume des organelles [73], le grossissement cellulaire est dans ce cas-ci majoritairement causé par une accumulation de fluides intracellulaires [17, 73] et une modification de la matrice extracellulaire [73]. C'est la zone de la plaque de croissance la moins dense en cellules [73].

En outre, les chondrocytes sécrètent beaucoup de matrice extracellulaire [46, 73], environ deux fois plus par cellule que dans la zone proliférative [15, 73] et ses fibres restent orientées selon l'axe longitudinal [78]. Les cellules sécrètent en particulier les collagènes de type II et X (Tableau 1.1) [1, 16, 23, 24, 38, 39, 77, 84] et aussi de la MMP-13 [1, 32, 39]. Les aggrécanases sont toujours détectées dans cette zone, l'aggrécanase II étant globalement plus exprimée que l'aggrécanase I [37]. Les MMP-2 et MMP-3 y sont encore faiblement détectées [52, 86]. De plus, TIMP-1 est toujours exprimé et TIMP-3 apparaît aussi [52]. Chez l'humain, TIMP-2 est lui aussi détecté dans cette zone [61].

Enfin, dans la région de la zone hypertrophique la plus proche de la métaphyse, la matrice commence à se minéraliser [26, 46, 67].

Tableau 1. 1 : Principaux composants de la matrice extracellulaire.

Molécule		Localisation chez l'homme	Localisation chez le rat	Rôle
collagène type II		toute la plaque [83], surtout zone proliférative [46]	toute la plaque [1, 23, 39], mais surtout zone proliférative [23] ou début de zone hypertrophique [1]	support structural [1, 16], résistance aux tensions et aux compressions de la plaque de croissance [45] et inhibition de la calcification [26]
collagène type IX		surtout zone préhypertrophique [46]	toute la plaque [23] mais surtout zone proliférative [23]	liaison entre le collagène de type II et d'autres composants de la matrice extracellulaire [32] et contrôle de la croissance et du diamètre des fibres de collagène de type II [23]
collagène type X		zone hypertrophique [26, 32, 83]	zone hypertrophique [1, 39]	facilite la calcification de la matrice [16, 24, 32] et rôle structurant et de support de la matrice [36]
collagène type XI		surtout zone hypertrophique [46]	toute la plaque [23]	contrôle de la croissance et du diamètre des fibres de collagène de type II [23]
protéoglycanes	aggrécane	toute la plaque [32]	toute la plaque [37, 39]	rétenion d'eau [87] qui permet une résistance aux tensions et aux compressions de la plaque de croissance [32, 45, 87]
	chondroïtine	toute la plaque [32]		
	versicane, décorine, biglycane, fibromoduline, lumicane, glypicane			

Rôle

La zone de réserve

La zone de réserve produit de la matrice extracellulaire et emmagasine des nutriments nécessaires pour les zones proliférative et hypertrophique [26]. Elle pourrait aussi jouer un rôle de support mécanique dans certaines espèces où la croissance est relativement lente pendant de longues périodes et qui, du fait de leur grande taille, doivent imposer des charges mécaniques supplémentaires à leurs plaques de croissance pendant toute la période de croissance [71]. Enfin, elle jouerait un rôle important dans l'organisation de la plaque de croissance. Elle produirait en effet les premiers chondrocytes en prolifération, mais aussi un facteur les orientant en colonnes et un deuxième facteur qui inhiberait la différenciation terminale des chondrocytes et empêcherait donc l'hypertrophie des cellules prolifératives proches de la zone de réserve [75]. Ce dernier

aspect expliquerait en partie la présence de deux zones distinctes pour la prolifération d'une part et pour l'hypertrophie d'autre part dans la plaque de croissance.

La zone proliférative

La zone proliférative produit beaucoup de nouveaux chondrocytes, ce qui est nécessaire pour maintenir le nombre de cellules dans la plaque de croissance à un moment donné, en compensant les pertes cellulaires qui ont lieu au front de minéralisation [79]. La prolifération cellulaire participe à la régulation du taux de croissance. Selon Wilsman et al., c'est le troisième facteur le plus important après l'hypertrophie des chondrocytes et la synthèse de matrice extracellulaire [79]. Cette étape permettrait à la cellule de changer son phénotype et de devenir « prête » à entrer en hypertrophie après un nombre donné de divisions cellulaires. La prolifération aurait ainsi un rôle dans le processus de maturation cellulaire [88].

La zone hypertrophique

La zone hypertrophique régule le plus efficacement la croissance longitudinale par le grossissement des cellules et leur allongement dans la direction de croissance [15, 79]. Le taux et l'efficacité de l'hypertrophie varient d'une espèce à l'autre [70, 89].

1.2. Ostéogenèse

L'**ostéogenèse** est un terme qui regroupe non seulement la formation prénatale des os, mais aussi tous les mécanismes postnataux de croissance de l'os. Elle se fait toujours en deux étapes : accroissement de matériel (cartilagineux ou conjonctif) puis ossification de ce nouveau matériel.

L'ossification, qui s'opère différemment suivant l'origine du matériel primaire sur lequel repose l'ossification, sera d'abord présentée. Puis, les mécanismes postnataux de croissances latérale et longitudinale seront détaillés.

1.2.1. Mécanismes d'ossification

1.2.1.1. Généralités

L'ossification se fait toujours à partir d'un autre tissu, de type conjonctif ou cartilagineux. L'ossification s'opérant à partir d'un tissu conjonctif fibreux primaire est appelée **ossification endoconjonctive ou ossification intramembraneuse**, alors que celle qui se fait à partir de cartilage hyalin est appelée **ossification endochondrale**.

Dans les deux cas, on peut observer une ossification primaire et une ossification secondaire. L'**ossification primaire** se fait comme suit : les cellules mésenchymateuses se différencient en ostéoblastes, ces derniers produisent de la substance fondamentale et du collagène, puis il y a calcification, i.e. des sels minéraux se déposent dans la matrice organique. Un tissu osseux temporaire, appelé **os primaire**, est ainsi formé avec des fibres de collagènes disposées de façon très irrégulière et de nombreux ostéocytes. L'os primaire peut être remanié très rapidement et est métaboliquement actif.

L'**ossification secondaire** s'opère par la suite en transformant l'os primaire en os lamellaire, soit de type cortical ou spongieux. Cette deuxième étape se fait par différenciation de cellules mésenchymateuses en ostéoclastes, qui détruisent le tissu osseux et forment des lacunes, ou en ostéoblastes, qui édifient le tissu lamellaire. On obtient alors un tissu osseux avec une structure plus ou moins organisée de type cortical ou spongieux (section 1.1.2.1).

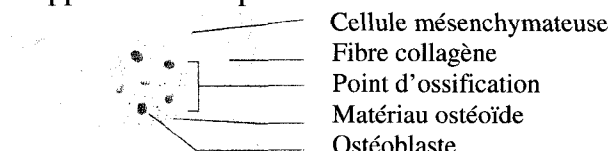
Malgré que ce mécanisme d'ossification soit observé dans tous les tissus, il présente des différences au niveau de son initiation suivant le tissu d'origine. Les prochaines sections présentent plus en détails l'ossification endoconjonctive et endochondrale [10, 11].

1.2.1.2. Ossification endoconjonctive

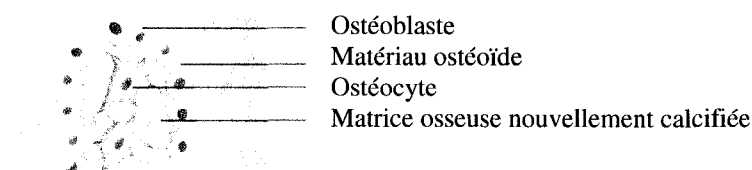
L'ossification endoconjonctive a lieu dans les os plats du crâne, les clavicules et certains os de la face. Elle débute en général au centre du futur os, appelé le **centre primaire d'ossification**, par la multiplication par mitose de cellules mésenchymateuses et leur différenciation en ostéoblastes (Figure 1.7A). L'ossification se déroule ensuite comme expliquée précédemment (Section 1.2.1.1 et Figure 1.7B), se propageant de proche en proche en formant une dentelle osseuse, pour donner de l'os spongieux immature. Le

périoste se forme alors autour de la structure osseuse encore en développement par association de cellules mésenchymateuses vascularisées à la surface externe de l'os fibreux (Figure 1.7C). Des ostéoblastes apparaissent sur la surface interne du périoste et commencent ce qu'on appelle **l'ossification périostique** (Figure 1.7D). Il faut noter que ce mécanisme d'ossification n'est pas encore terminé à la naissance [10, 11].

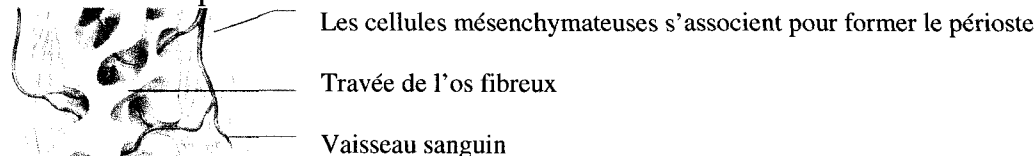
A. apparition d'un point d'ossification



B. matrice osseuse sécrétée dans la matrice fibreuse



C. formation du périoste



D. formation de la gaine osseuse en os compact et apparition de la moelle rouge

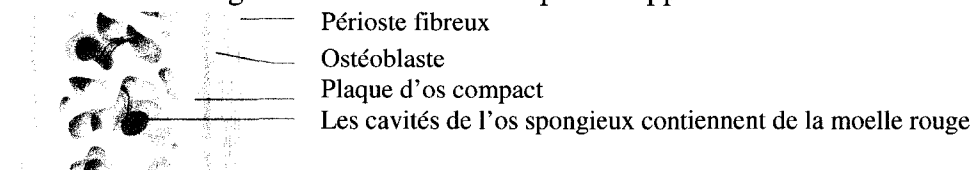


Figure 1. 7 : Ossification endoconjonctive (adapté de Marieb, 2005, [11]). Note : les schémas A et B sont à un grossissement supérieur aux deux autres.

1.2.1.3. Ossification endochondrale

L'ossification endochondrale s'opère dans les os longs, courts et irréguliers. L'exemple d'un os long est détaillé dans les prochains paragraphes. L'ossification endochondrale est plus complexe que celle de type endoconjonctive, car elle doit être précédée de la destruction du tissu cartilagineux à la base de l'ossification. De plus, elle est combinée à une ossification endoconjonctive qui tout autour de l'os, forme le périoste à partir du périchondre.

L'ossification endochondrale prénatale (Figure 1.8) s'opère à partir d'un cartilage de départ qui a déjà la forme quasiment définitive de l'os. Elle démarre au centre de la pièce cartilagineuse au niveau de la diaphyse, appelé **centre primaire d'ossification** (Figure 1.8A). Elle est précédée par des changements au niveau des chondrocytes à cet endroit : accroissement du cartilage aux extrémités et maturation des chondrocytes puis hypertrophie et sécrétion de phosphatase qui calcifie la matrice cartilagineuse. Les chondrocytes sont alors prisonniers de cette matrice imperméable à la diffusion des nutriments ; ils dégènèrent et meurent [90]. La matrice commence alors à se désintégrer (Figure 1.8B) : les fines travées de substance intercellulaire se désagrègent et forment des **cavités médullaires primaires** (Figure 1.8C). Ces dernières sont ensuite envahies par des capillaires sanguins provenant du périoste, qui apportent des cellules mésenchymateuses. Elles se différencient en cellules hématopoïétiques ou en ostéoblastes, ces derniers procèdent alors à l'ossification [90] décrite précédemment. Ultérieurement, les ostéoclastes détruisent l'os spongieux central et forment le canal médullaire (Figure 1.8D). Ils s'arrêtent à la naissance et l'os spongieux reste donc en place aux extrémités de l'os long.

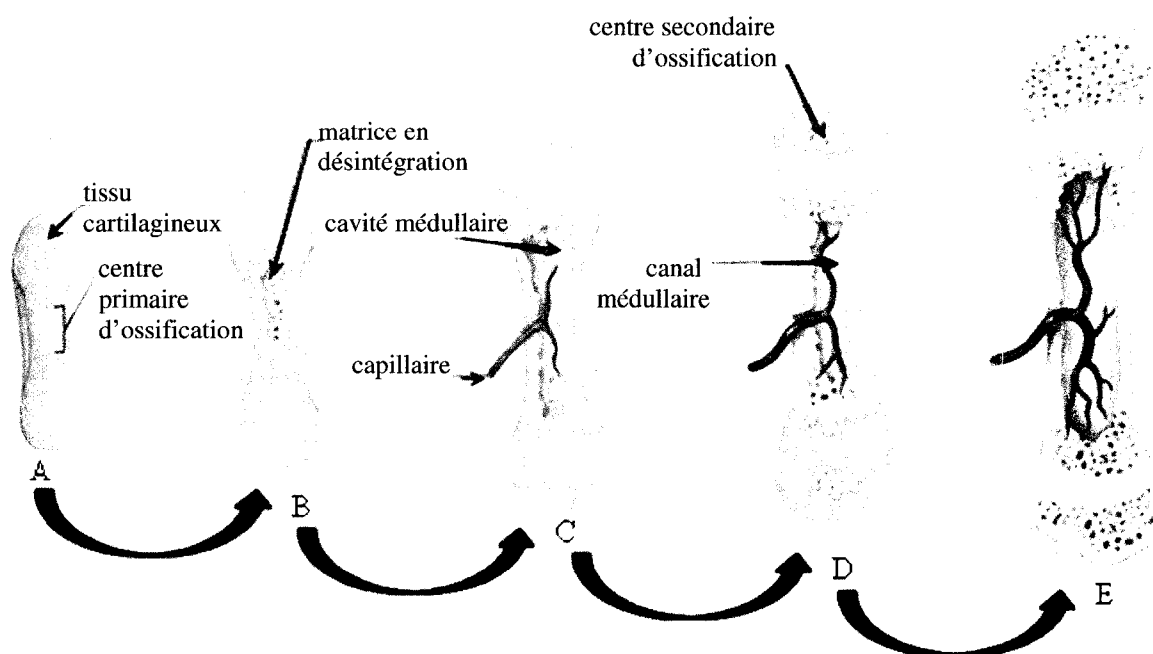


Figure 1. 8 : Ossification endochondrale (pour un os long) (adapté de Marieb, 2005, [11]).

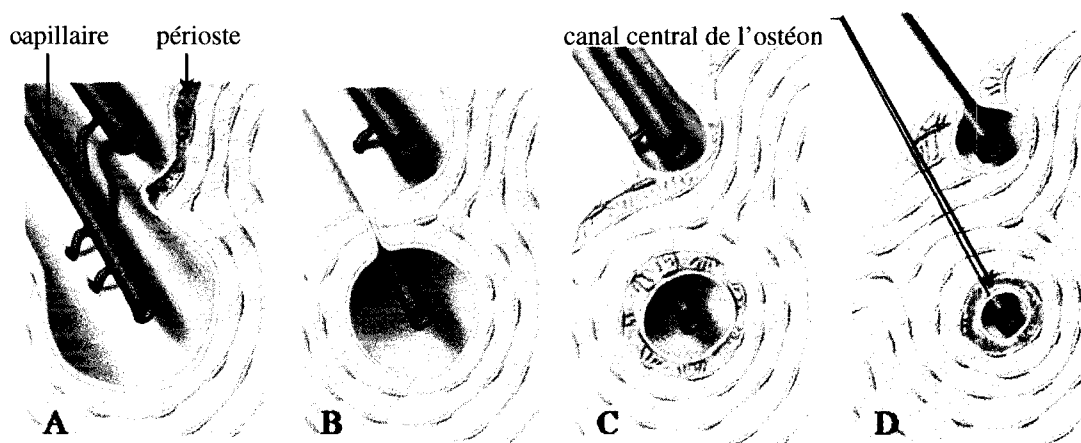
Au fur et à mesure de l'ossification, le centre primaire s'étend vers les épiphyses, puis les **centres secondaires d'ossification** (Figure 1.8D) se forment à chaque extrémité. Ces centres sont spécifiques aux mammifères [90, 91] ; ils constituent les seuls vestiges du cartilage hyalin à partir duquel l'os s'est formé. A la fin de l'ossification, il ne reste du cartilage qu'à deux endroits, soit de part et d'autre du centre secondaire d'ossification. Sur la surface des épiphyses, il porte le nom de cartilage articulaire, et à la jonction de la métaphyse et de l'épiphyse, il est appelé cartilage épiphysaire, ou cartilage de conjugaison [91] ou plaque de croissance. Cette dernière a été présentée en détails à la section 1.1.2.3.

Après la naissance, bien que l'ossification soit achevée (ou presque), les os continuent leur développement jusqu'à la fin de la puberté, ou même jusqu'à la fin de la vie (os du nez et de la mâchoire). Une croissance en épaisseur (croissance latérale) se fait en parallèle dans tous les os et peut continuer tout au long de la vie. Les os longs et les vertèbres subissent aussi une croissance en longueur (croissance longitudinale). Ces mécanismes de croissance latérale et longitudinale sont présentés en détails dans les prochaines sections [10, 11].

1.2.2. Croissance latérale

La croissance latérale commence par un ajout de matériel par **apposition**, c'est-à-dire par un ajout de couches périphériques de matrice osseuse sécrétée par des ostéoblastes de la couche profonde du périoste (Figure 1.9) [10, 11].

Le matériel ajouté est ensuite ossifié suivant le mécanisme d'**ossification endoconjonctive**. Simultanément, les ostéoclastes situés sous l'endoste de la diaphyse [90], agrandissent la cavité médullaire. Ainsi le poids de l'os n'augmente pas considérablement avec la croissance, mais l'os devient tout de même plus épais et plus solide.



Légende : en vert → nouvelle matrice sécrétée

- A. Sécrétion de matrice osseuse
- B. Fusion des crêtes osseuses
- C. Le périoste devient de l'endoste
- D. Formation d'un ostéon

Figure 1. 9 : Croissance latérale par apposition (adapté de Marieb, 2005, [11].

1.2.3. Croissance longitudinale

1.2.3.1. Mécanisme général

La croissance longitudinale inclut d'abord la formation du nouveau matériel par ce qu'on appelle la **croissance interstitielle** [10, 11]. Ce processus s'opère au niveau de la plaque de croissance (Figure 1.7) où les chondrocytes prolifèrent, s'hypertrophient et produisent de la matrice extracellulaire, puis meurent (pour plus de détails sur son fonctionnement revoir la section 1.1.2.3). Ils remplissent leurs fonctions selon un ordre défini et synchronisé avec celui de leurs voisins dans la colonne cellulaire [15, 20]. Une fois que les chondrocytes sont morts, il reste de longs spicules de cartilage calcifié, comparables à des stalactites. L'**ossification endochondrale** commence alors réellement. Différentes cellules venues de la moelle par le canal médullaire entrent en action. Tout d'abord, les ostéoclastes érodent partiellement les spicules de cartilage, puis les ostéoblastes les recouvrent d'une couche de matrice osseuse ; de l'os spongieux est ainsi formé. Les ostéoclastes digèrent l'extrémité des spicules, ce qui permet l'élongation du canal médullaire [10, 11].

Un processus de croissance comparable existe dans les vertèbres, qui ont également un cartilage de croissance. Cependant, ces os n'ont pas d'épiphyes chez l'humain et la plaque de croissance se trouve à l'extrémité de l'os d'un côté et le disque intervertébral de l'autre [92].

Les déterminants cellulaires majeurs au niveau de la plaque de croissance pour la croissance en longueur (surtout la croissance rapide) sont la prolifération et l'hypertrophie des chondrocytes [15, 68-70, 73, 79, 93]. Une modélisation de la croissance est d'ailleurs proposée par la relation suivante : croissance = (nb de nouvelles cellules/jour)x(hauteur cellulaire finale) [2, 4]. Cependant, la prolifération a une plus faible influence que l'hypertrophie dans la régulation de la croissance [15, 79].

Par ailleurs, un troisième facteur est important dans la croissance longitudinale, c'est la production de la matrice extracellulaire et il est d'ailleurs le deuxième plus important après l'hypertrophie [79]. De plus, le remodelage de la matrice est nécessaire pour permettre les changements de forme et de volume de la cellule lors de l'hypertrophie [1, 15], et aussi pour assurer la séquence spatio-temporelle de la prolifération, de l'hypertrophie et de la migration des chondrocytes [1]. De ce fait, la production/dégradation de la matrice est considérée comme un autre élément clé dans la croissance longitudinale [1, 15, 67, 70, 73, 79, 82, 94].

Globalement, Wilsman et al. ont montré que la croissance longitudinale est due pour 40-60% à l'hypertrophie des chondrocytes, pour environ 30-50% à la synthèse de matrice extracellulaire et pour environ 10% à la prolifération des chondrocytes (Figure 1.10) [79].

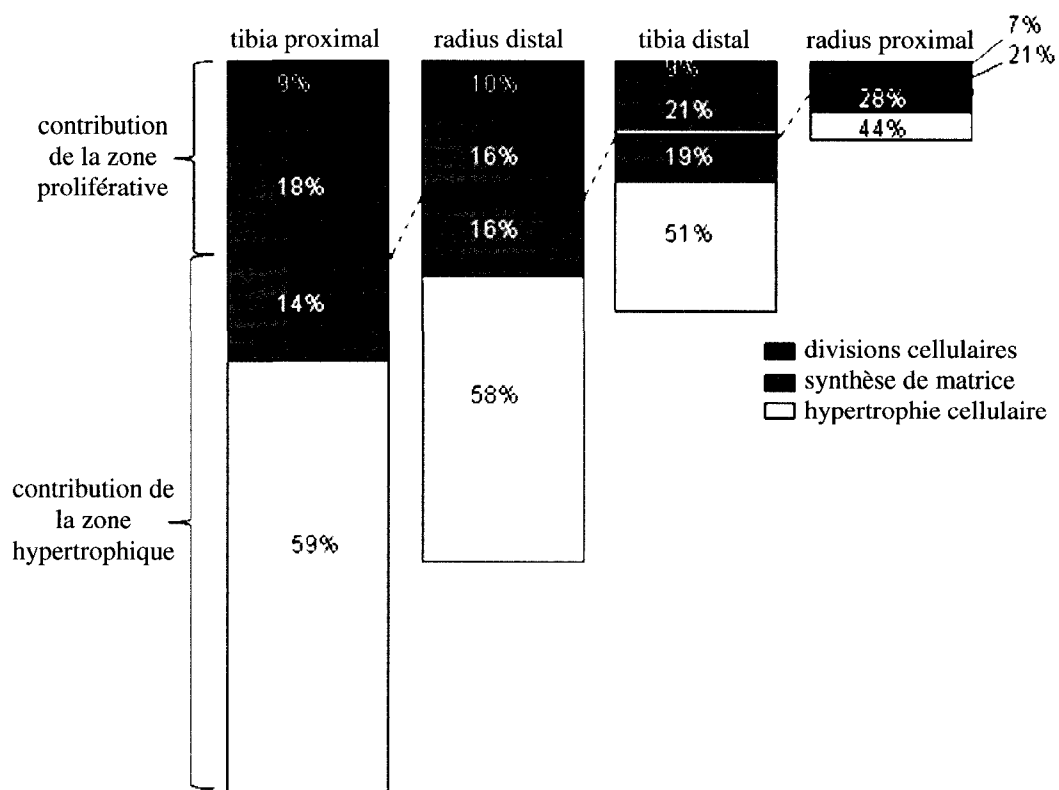


Figure 1. 10 : Importance relative de chaque facteur dans la croissance quotidienne de rats (adapté de Wilsman et al. [79]).

La croissance longitudinale s'arrête à la fin de l'adolescence, quand les chondrocytes ralentissent leur prolifération. Le cartilage est alors remplacé graduellement par de l'os, c'est ce qu'on appelle la fermeture de la plaque de croissance [32]. Ce phénomène n'est pas observé chez le rat, qui garde ses plaques de croissance, même une fois la croissance longitudinale achevée [61].

1.2.3.2. La régulation biologique de la croissance

Plusieurs mécanismes biologiques sont impliqués dans la croissance et le fonctionnement de la plaque de croissance. Ces mécanismes sont régulés par différents facteurs dont :

- Des hormones systémiques dont l'hormone de croissance GH (growth hormone) [95-98], IGF-I (insulin-like growth factor I) [99, 100], les hormones thyroïdiennes T3 et T4 [101, 102] et les stéroïdes androgènes et estrogènes pendant la puberté [103-107]. Elles sont nécessaires pour permettre aux os de s'allonger au même rythme sur les côtés gauche et droit du corps [108] ;
- Des facteurs de croissance locaux, connus pour leur rôle primordial pendant le développement embryonnaire, mais qui continuent à jouer un rôle dans la croissance postnatale, même s'il est moins bien caractérisé à ce jour, permettant aux différentes plaques de croissance de grandir à des rythmes différents suivant leur localisation dans le corps [108]. En particulier, la boucle de rétroaction IHH-PTHrP (Indian hedgehog-PTHrP) semble participer à l'équilibre dynamique entre la prolifération et la différenciation [18], ainsi que des BMPs (bone morphogenetic proteins) de la superfamille des TGF- β (transforming growth factor β) [46, 109], des FGFs (fibroblast growth factor) [46, 67] et VEGF (vascular endothelial growth factor) [46] ;
- Des protéines transmembranaires : les intégrines, qui permettent une communication entre les cellules et la matrice [83, 110] ;
- Les nutriments [67] ;
- Les facteurs génétiques [15, 67] ;
- Les agents chimiques (comme les médicaments) [111].

Dans le cadre de cette étude, nous étudierons un mécanisme biologique régulant le fonctionnement de la plaque de croissance, soit la formation/dégradation de la matrice extracellulaire de la plaque, puisque la formation contrôlée de la matrice extracellulaire et son renouvellement sont des mécanismes essentiels dans le processus de croissance longitudinale comme il l'a déjà été montré plus haut. Différents mécanismes biologiques

participent à la régulation de la production de la matrice extracellulaire. Par exemple, certains facteurs biologiques influencent la production des différents constituants de la matrice, au moins *in vitro* (Tableaux 1.2 et 1.3). En effet, il a été montré qu'**IGF-I** stimule l'expression du collagène de type II [112, 113], tout comme **TGF- β 1** [114-116] et **GH** [117]. Par contre, le collagène de type II est inhibé par **bFGF (basic FGF)** [112, 113]. IGF-I stimule aussi la production du collagène de type X, tout comme le fait IGF-II (insulin-like growth factor II) [118]. Ils stimulent aussi la production de protéoglycanes [118], en particulier d'aggrécane au moins dans le cartilage articulaire [119], contrairement au bFGF qui l'inhibe [113]. L'**acide rétinolique** inhibe aussi les protéoglycanes, ainsi que le collagène de type II mais il stimule la production du collagène de type X [120, 121]. Par contre, TGF- β 1 inhibe l'expression du collagène de type X [115], tout comme **PTHrP** [122].

Tableau 1. 2 : Agents de régulation de la production des différents constituants de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance.

Constituant de la matrice :	Stimulé par :	Inhibé par :
Collagène de type II	IGF-I, TGF- β 1, GH	bFGF, acide rétinolique
Collagène de type X	IGF-I, IGF-II, acide rétinolique	TGF- β 1, PTHrP
Protéoglycanes	IGF-I, IGF-II	bFGF, acide rétinolique

De plus, la section 1.1.2.3 a déjà présenté le phénomène de dégradation de la matrice liée au MMPs et aux ADAMTS (récapitulatif dans le tableau 1.3). La concentration de ces métalloprotéinases est régulée biologiquement par l'**hormone parathyroïdienne** (PTH) et son **peptide lié PTHrP** ; leur présence a pour conséquence d'augmenter l'expression des métalloprotéinases [123].

Tableau 1. 3 : Molécules régulatrices de la synthèse/dégradation de la matrice extracellulaire, classées selon leur localisation dans la plaque de croissance chez le rat.

Molécule	Type	Localisation	Rôle
TIMP-1	Enzyme	Toute la plaque de croissance [52]	Inhibe les MMPs [64, 65]
IGF-I (somatomedin-C)	Facteur de croissance	Toute la plaque de croissance [124], surtout les zones proliférative et préhypertrophique [46] OU surtout la zone hypertrophique [125]	<i>In vitro</i> : stimule les collagène de type II et X et les protéoglycanes [112, 113, 118]
IGF-II	Facteur de croissance	Surtout en zones de réserve et proliférative, mais expression diminue quand la croissance ralentit [126]	<i>In vitro</i> : Stimule le collagène de type X et les protéoglycanes [118]
TIMP-2	Enzyme	Zones proliférative et préhypertrophique [52]	Inhibe les MMPs [64, 65]
ADAMTS-4 et 5	Enzymes remodelant la matrice	Zones préhypertrophique et hypertrophique [37]	Dégrade l'aggrécane [37]
MMP-3 ou stromelysin 1	Enzyme remodelant la matrice	Zone préhypertrophique principalement et zone hypertrophique [86]	Dégrade les collagènes de type II, IX, X et XI [51], Active les collagénases [57, 58], Dégraderait les protéoglycanes [59].
MMP-13 ou collagénase 3	Enzyme remodelant la matrice	Surtout en zones préhypertrophique et hypertrophique avant le collagène type X [1, 39], Plus faible en zone proliférative [1] OU seulement à la jonction osseochondrale [127]	Dégrade les collagènes de types II et X [51, 53-55] et l'aggrécane [56]
PTHrP	Régulateur de la croissance	Zones préhypertrophique et hypertrophique [18]	<i>In vitro</i> : stimule les MMPs [123] et inhibe le collagène de type X [122]
TIMP-3	Enzyme	Zone hypertrophique [52]	Inhibe les MMPs [64, 65] et surtout les aggrécases [66].

1.2.3.3. Influence de l'environnement sur la croissance

En plus de facteurs régulateurs déjà cités comme les hormones, les facteurs de croissance, les intégrines, les nutriments et les facteurs génétiques, l'environnement mécanique influe sur le comportement de la plaque de croissance.

La vascularisation de la plaque de croissance est un facteur non négligeable de la régulation de la croissance [128]. Il est généralement accepté que la plaque n'est vascularisée que pendant le début de l'enfance même si cette théorie ne fait pas consensus [129, 130]. Dans la suite de la croissance, les éléments régulateurs de la plaque de croissance comme les facteurs de croissance et les hormones systémiques proviendraient donc de trois systèmes de vascularisation : celui de la jonction métaphysaire, celui de la jonction épiphysaire, ainsi que celui du périchondre [128, 130, 131]. Le transport des molécules depuis les deux jonctions (épiphysaire et métaphysaire) se fait en partie par diffusion et en partie par convection [131]. Une différence de pression est donc nécessaire entre l'os et le cartilage pour permettre la convection, c'est pourquoi le chargement mécanique de la plaque de croissance pourrait perturber ce transport. Une perturbation du premier système semble induire un épaissement des zones proliférative et hypertrophique de la plaque de croissance, une ossification endochondrale anormale [132] ainsi qu'une perturbation de la différenciation terminale des chondrocytes qui s'accumulent au lieu de disparaître [128]. Une perturbation du deuxième système vasculaire semble induire une grande désorganisation cellulaire et perturber la prolifération des chondrocytes [128, 132, 133].

Enfin, l'environnement mécanique constitue un facteur d'influence très important sur le fonctionnement de la plaque de croissance et son rôle lors de la croissance n'est pas encore clairement défini [2-5, 8, 9, 134, 135]. En particulier, ni les changements biologiques dus au chargement mécanique, ni la voie de communication commandant ces changements ne sont clairement définis à ce jour. L'effet connu des charges mécaniques sur le processus de croissance est présenté en détails à la section suivante.

1.3. Mécanobiologie des plaques de croissance

La **mécanobiologie** est, comme son nom l'indique, une science interdisciplinaire qui relie la mécanique et la biologie. C'est un domaine de la biomécanique, qui s'intéresse aux relations entre les propriétés mécaniques d'un tissu, comme sa structure, et ses fonctions biologiques [13, 87, 90]. Cette discipline exige donc des connaissances en mécanique pour pouvoir résoudre des problèmes de façon théorique et modéliser les comportements mécaniques mais aussi en biologies moléculaire et cellulaire, et en génomique [136].

1.3.1. Effet d'un chargement mécanique sur le taux de croissance

1.3.1.1. Technique de mesure du taux de croissance

L'oxytétracycline est utilisée pour mesurer le taux de croissance des os [5, 68, 70, 79, 93, 137, 138]. On peut aussi utiliser des fluorochromes liés à la calcéine [1, 2, 15, 139] ou à l'Orange de Xylénol [139] qui se lient spécifiquement à la matrice en cours de minéralisation [15, 140] et permettent donc de mesurer la croissance [15, 140].

Le produit est injecté de façon systémique, en général par voie intrapéritonéale, puis l'animal est euthanasié au moins 24h plus tard (Tableau 1.4). Les tissus sont enrobés dans le plastique et coupés pour être observés au microscope. Il est alors possible de faire une mesure soit entre deux marquages (Δx , Figure 1.11), faits par deux injections séparées par un intervalle de temps donné, soit entre le marquage et le front osseux.

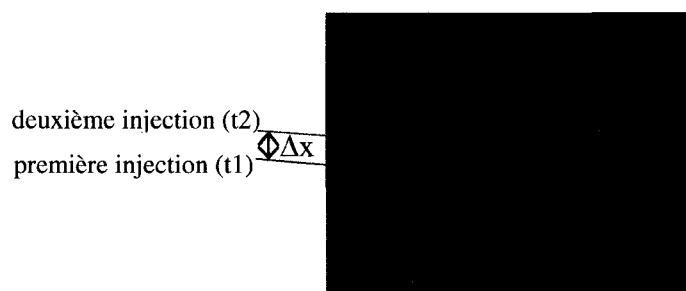


Figure 1. 11 : Marquage de croissance d'une vertèbre de rat : deux injections de calcéine à 6 jours d'intervalle. Taux de croissance = $\Delta x / (t_2 - t_1)$.

Tableau 1. 4 : Marquage de croissance pour des rats.

Article	Marqueur	Dose (mg/kg)	Intervalle entre injection et sacrifice (jours)
Alvarez [1]	Calcéine	15	4
Hunziker [15]	Calcéine	15	5
Stokes [2]	Calcéine	15	1
Stokes [Stokes, 2006 #107; Stokes, 2007 #109]	Calcéine Orange de xylénol	15 90	2 et 1
Hansson [138]	Oxytétracycline	10	4, 2 et 1
Breur [70, 93]	Oxytétracycline	1-2	2 et 1
Farnum [5]	Oxytétracycline	5	1
Wilsman [68]	Oxytétracycline	1	3 et 1
Wilsman [79]	Oxytétracycline	1	3

1.3.1.2. Relations expérimentales

Un chargement mécanique peut ralentir ou accélérer la croissance [134, 141, 142, 143, 144], même si le délai nécessaire entre le stimulus et la modification de croissance comme telle n'est pas encore exactement caractérisé [134].

Selon la **loi de Hueter-Volkmann** qui date du milieu des années 1800, la croissance dépend de l'intensité de la compression de la plaque de croissance : elle est retardée si la compression est plus forte que la compression physiologique et accélérée si la compression est plus faible [5, 8, 134, 145-148]. Cette relation a été observée pour la première fois par Delpech en 1829 avant même d'être décrite par Hueter et Volkmann [147]. Depuis la découverte de cette loi, de nombreuses études ont été menées *in vivo* sur des modèles animaux pour essayer de la caractériser et de la quantifier. Les premières études semblent démontrer que même une petite augmentation de la compression physiologique ralentirait la croissance, il n'y aurait donc pas vraiment de valeur seuil qui déclenche le phénomène, ce serait plutôt une relation continue [5, 144-147, 149].

Dernièrement, il a été conclu que la relation entre la charge en contraintes et la modulation de croissance était linéaire, l'étude ayant été menée sur deux types d'os et pour trois modèles animaux différents (Figure 1.12, [3]).

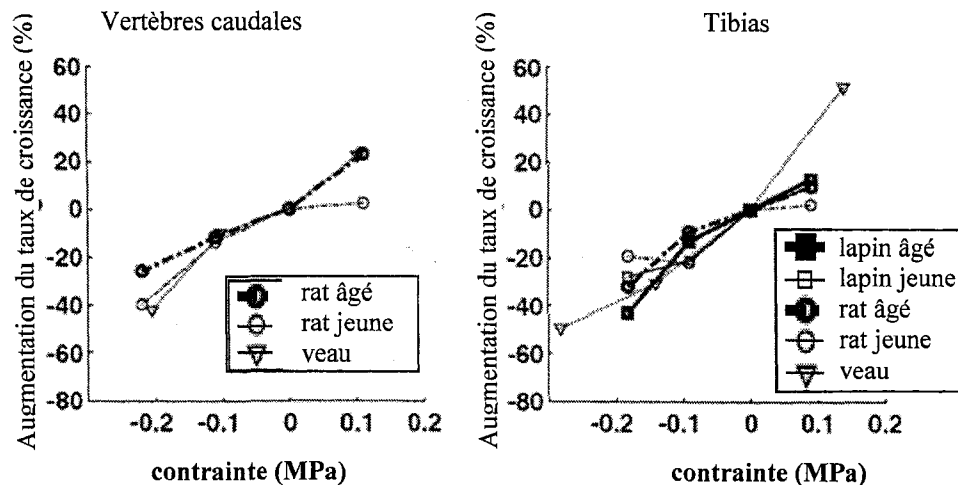


Figure 1. 12 : Vérification par Stokes de la loi de Hueter-Volkmann ([3]).

Cette loi a des applications cliniques diverses :

- la croissance peut être augmentée par une force de distraction et ainsi corriger une différence de longueur entre deux jambes en croissance [150, 151] ;
- différents traitements orthopédiques infantiles et adolescents pour le système musculosquelettique ont été développés ;
- des déformations musculosquelettiques progressives peuvent être contrôlées, comme celles qu'on voit dans la scoliose, dans les déformations des jambes en varum ou valgum au niveau des genoux, dans les déformations équivalentes au niveau des chevilles et dans les maladies neuromusculaires.

La progression de la scoliose idiopathique adolescente constitue un bel exemple de déformations musculoquelettiques progressives [152, 153]. C'est un phénomène de cercle vicieux : la colonne se déforme de plus en plus avec l'asymétrie de la répartition des contraintes mécaniques. En effet, de par la posture du corps due à la courbure, un côté de la vertèbre est davantage comprimé et l'autre l'est moins, donc, d'après la loi de Hueter-Volkmann, le premier côté grandit moins et le second davantage. Ainsi, la vertèbre se cunéiformise davantage, et donc la courbure s'accroît [134]. D'ailleurs, les

plus grands facteurs de risques pour la scoliose sont l'amplitude de la courbure et l'immaturation squelettique [2, 134, 139, 145, 146].

1.3.1.3. Paramètres de modulation de croissance

Il existe 4 types de réponses de la croissance longitudinale lorsqu'elle est soumise à un chargement : soit elle est accélérée, soit elle est ralentie, soit elle est déviée par un cisaillement, soit elle se transforme en croissance en torsion [2-5, 8, 12, 134, 145-147, 148, 154].

L'**intensité du chargement** est un paramètre important [3, 4, 8, 9, 12, 134, 155]. En effet, une compression minimum semble nécessaire pour que le cartilage soit transformé en os [137, 156], mais un chargement trop important peut arrêter la croissance longitudinale [157, 158]. En résumé, plus l'intensité du chargement est grande et plus la modulation de la croissance est importante.

La **durée de chargement** est un autre facteur qui affecte le taux de croissance [2, 9, 143, 149, 155]. Plus le chargement est maintenu longtemps, plus la modulation de croissance est importante.

Le **type de chargement** (statique ou dynamique) est également important car il semblerait qu'un chargement statique influence davantage les mécanismes de croissance alors qu'un chargement dynamique influence ceux du remodelage [141]. Cette hypothèse est cependant controversée par l'étude d'Ohashi et al. [9], qui concluent que le chargement dynamique retarde la croissance en longueur. Par ailleurs, il est possible que la force de gravitation soit suffisante pour affecter la croissance épiphysaire [147].

De plus, l'effet d'un chargement est proportionnel à la **vitesse de croissance** lors de son application. Le moindre chargement appliqué même pour une courte période durant la croissance rapide peut engendrer une déformation permanente de l'os [159].

Il est intéressant de noter qu'un chargement mécanique a peu d'influence sur le taux de prolifération. Le chargement doit donc influencer sur d'autres facteurs de croissance de la plaque qui seraient dans la zone hypertrophique. La modulation mécanique de la croissance est d'ailleurs corrélée à l'hypertrophie des chondrocytes, même si ce n'est pas le seul paramètre à considérer [4].

1.3.2. Effet d'un chargement mécanique sur la biologie de la plaque de croissance

1.3.2.1. Effet sur l'histomorphométrie

Morphologie de la plaque de croissance

A ce jour, il a été montré qu'avec une compression les cellules perdaient leur alignement colonnaire [5, 149] et étaient globalement moins nombreuses [149]. Plus précisément, les chondrocytes sont moins nombreux dans la zone proliférative [4, 5] et ceux de la zone hypertrophique sont moins nombreux, moins grands dans le sens longitudinal et moins volumineux [4, 5, 137, 149].

Hauteur de la plaque et des zones

Des mesures de la hauteur de la plaque de croissance ou des zones proliférative et/ou hypertrophique [2, 5, 9, 15, 79, 134, 149] ont été complétées à partir de coupes de plaques de croissance au microscope [5, 134, 149]. Pour délimiter la zone proliférative, il est possible de faciliter l'identification des extrémités de cette zone en utilisant conjointement un marquage au BromoDioxyUridine (BrdU) ou à la thymidine radioactive [2, 15, 79].

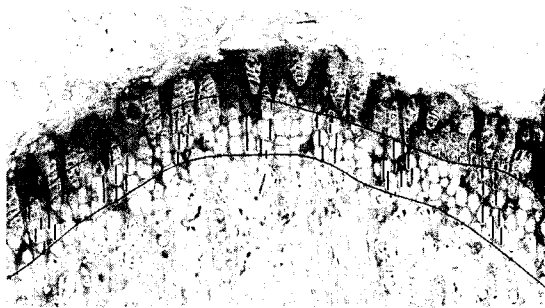


Figure 1. 13 : Mesures de la hauteur de la zone hypertrophique (Stokes et al. 2002, [134]).

Hansson et al. [138] pensaient en 1972 que ces mesures de hauteur de la plaque mesuraient la croissance, mais on sait maintenant que c'est faux, puisque le taux de croissance varie avec des périodes développementales précises, alors que l'épaisseur de la plaque diminue progressivement avec l'âge [15, 86].

A ce jour, bien qu'une étude de Trueta et Trias ait observé qu'une compression augmentait la hauteur de la plaque de croissance [128], d'autres études ont montré

qu'une compression statique diminuait la hauteur globale de la plaque de croissance [4, 6, 149], en diminuant non seulement la hauteur de la zone proliférative [4, 149] mais aussi la hauteur de la zone hypertrophique [4, 5, 134, 137, 149].

1.3.2.2. Effet sur la prolifération cellulaire

La cinétique de la prolifération cellulaire a été mesurée en marquant au BrdU [2, 5, 71, 137, 149] ou à la thymidine radioactive [15, 21, 71, 137, 160]. Ces deux techniques marquent les noyaux des cellules en phase S du cycle cellulaire [5, 137, 149]. Le marquage au BrdU présente certains avantages sur la thymidine : meilleure sensibilité, temps d'expérimentation plus court et aucune radioactivité [5, 149]. Lors d'une compression, on a observé une diminution des divisions cellulaires dans la zone proliférative [137, 149] mais les cellules restent tout de même en prolifération active [5]. Une étude récente n'observe cependant pas de corrélation entre l'index de prolifération, c'est-à-dire dans la proportion de cellules en division dans la zone proliférative, et le chargement [4].

1.3.2.3. Effet sur le message cellulaire

Les méthodes sur l'ARNm (Northern blot, RT-PCR), qui n'est présent que lorsque la cellule cherche à produire la molécule pour laquelle code le gène, permettent de vérifier si une molécule d'intérêt est en production ou non à un moment particulier. Les méthodes présentées ci-dessous constituent habituellement la première étape de tri, préalablement à l'utilisation de techniques plus coûteuses en ressources temporelles et financières, comme l'hybridation in situ et les microarrays [161, 162].

Méthodes de détection de l'ARN messenger

Méthode de Northern (ou Northern blot) : La méthode de Northern est la plus couramment utilisée pour analyser l'ARN. Les résultats sont semi-quantitatifs. Il est possible de visualiser un ARN spécifique avec une sonde d'une vingtaine de bases.

Protocole : Faire une électrophorèse de l'ARNm d'intérêt d'un témoin avec des fragments de tailles connues (pour déduire la taille des ARN testés) en présence d'un agent dénaturant qui fractionne l'ARNm (Figure 1.14A). La répliquer sur un filtre (Figure 1.14B). Ensuite incuber avec des sondes marquées pour permettre leur

hybridation (Figure 1.14C). Faire une autoradiographie ou utiliser des méthodes chimiques (Figure 1.14D) pour lire le résultat.

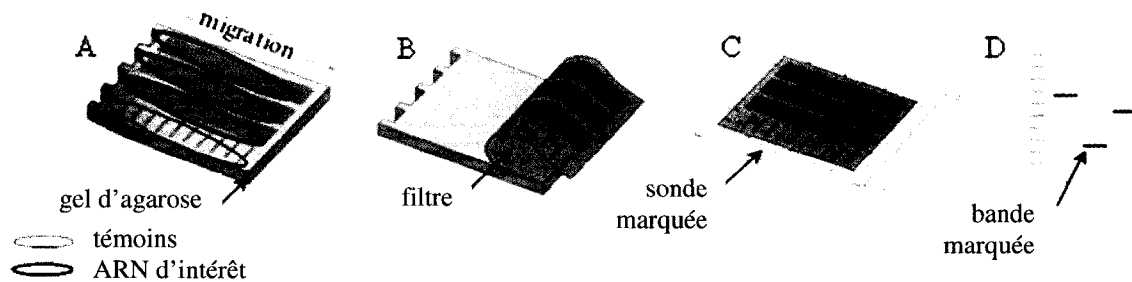


Figure 1.14 : Déroulement d'un Northern blot (adapté de Alberts et al. 2002, [161]).

RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) : Cette technique permet d'amplifier des gènes in vitro. C'est un procédé exponentiel : 2^N copies en N cycles et qualitatif ou semi-quantitatif.

Protocole : Transformer l'ARN en ADN à l'aide d'enzymes spécifiques. Puis ajouter les deux amorces (1 sens et 1 anti-sens) et chauffer à 95°C pour dénaturer l'ADN, ce qui permet aux amorces de se placer devant leur complémentaires. Abaisser la température une température spécifique à la paire d'amorces pour lancer l'hybridation. Ayant aussi ajouté une polymérase, remonter la température à 72°C pour permettre l'extension des amorces. Ainsi l'ADN d'intérêt est synthétisé. Révéler le résultat par électrophorèse.

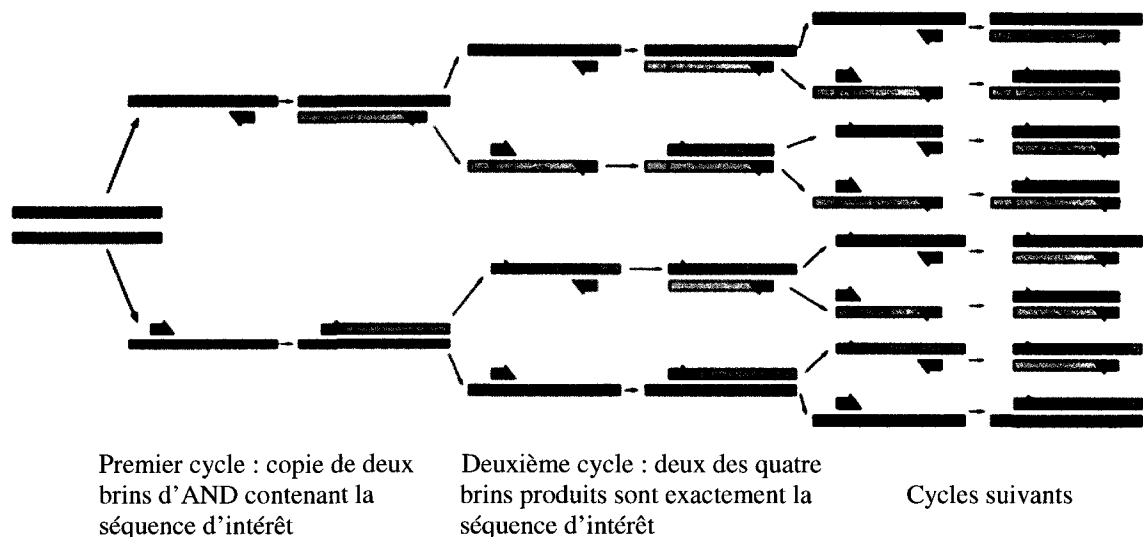


Figure 1.15 : Déroulement d'une PCR (adapté d'Alberts et al. 2002, [161]).

Variante : la RT-PCR quantitative (qRT-PCR) est une technique fondée sur le même principe mais qui permet de détecter à quel cycle la quantité de copies du gène dépasse une valeur critique, ce cycle est désigné par l'abréviation CT (signifiant « threshold cycle »). Il est alors possible d'estimer la différence de quantité d'ARN présente au départ entre deux gènes ou pour le même gène entre deux groupes d'étude, à l'aide de la méthode de ΔCT . En effet CT permet de calculer $\Delta CT = CT_{\text{du gène cible}} - CT_{\text{du contrôle endogène}}$. Puis on peut calculer $\Delta\Delta CT$ de la manière suivante : $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{de l'échantillon}} - \Delta CT_{\text{du calibrateur}}$. Le calibrateur est utilisé comme référence pour l'expression du gène étudié. La quantité relative du gène (RQ) peut alors en être déduite : $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$, puisque c'est la loi d'amplification du gène. Par la suite, le rapport d'expression ou « fold change » peut être calculé en faisant le rapport des RQ du même gène dans deux groupes d'étude par exemple.

Tableau 1. 5 : Comparaison des techniques de détection de l'ARNm.

	Avantages	Inconvénients
Northern	- pas besoin d'enzymes de restriction	- grande sensibilité : il faut donc travailler dans des conditions très stériles - grande quantité d'ARN nécessaire au départ
RT-PCR	- très simple à réaliser : tout se fait automatiquement, par variations thermiques - très rapide ($\times 10^5$ en quelques heures) - moins délicat que le Northern - nécessite peu d'ARNm au départ	- connaissance requise de la séquence à amplifier ou au moins une partie de la séquence pour développer des amorces - rendement trop faible pour des fragments de plus de 3 kb
qRT-PCR	- résultat quantitatif - très rapide ($\times 10^5$ en quelques heures) - nécessite peu d'ARNm au départ	- les mêmes que RT-PCR et en plus : - plus coûteuse (nécessite un équipement spécialisé) - interprétation plus difficile (pas encore de méthode d'analyse standardisée dans la littérature).

Effets du chargement sur les ARNm

Peu d'études ont été menées à ce jour pour lier ce paramètre au chargement mécanique de la plaque de croissance. Il a tout de même été observé *in vitro*, par hybridation *in situ*, qu'un chargement statique de 24h sur des explants de plaque de croissance de rats diminuait l'expression du collagène de type II de façon significative et aussi du collagène de type X, deux principaux composants de la matrice extracellulaire [6]. Cette étude n'a cependant révélé aucun changement dans l'expression des récepteurs de PTHrP. Une étude menée *in vivo* sur des poulets n'a pas observé de changement significatif dans les collagènes de type II et de type X de la plaque de croissance, que ce soit par Northern blot ou hybridation *in situ* [7]. Cependant, le chargement était peu contrôlé, sachant qu'il consistait à attacher un sac de sable pesant 10% de leur poids sur le dos des animaux, et le taux de croissance n'était pas mesuré non plus, donc la preuve n'est pas faite qu'il y ait réellement eu modulation de croissance. Une autre étude menée *in vivo* sur des rats chargés de façon dynamique et intermittente au niveau de la plaque de croissance à la base du crâne n'a pas remarqué de changement dans l'expression de différents constituants de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance : biglycane, versicane, collagènes de types II et X [163]. Par contre, le chargement a fait apparaître un nouveau protéoglycane : la décorine, qui n'était pas détecté dans les rats contrôles. Les mesures ont été faites par RT-PCR.

1.3.2.4. Effet sur les protéines

Au lieu d'analyser l'ARNm, la protéine produite peut être investiguée directement. Trois techniques permettant d'analyser les protéines produites sont présentées ci-dessous [161, 162, 164].

Méthodes d'évaluation de la protéine

« *Western blot* » : Cette technique permet de détecter une multitude de protéines, même peu abondantes. La procédure est puissante et importante pour l'immunodétection de protéines post-électrophorèse.

Protocole : Faire une électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (sodium dodecyl sulfate). Transférer les protéines du gel sur une membrane (Figure 1.20A). Exposer à un

anticorps primaire : la sonde d'intérêt, (Figure 1.20B), puis à un anticorps secondaire couplé à un isotope radioactif, un colorant fluorescent, une enzyme ou un métal (Figure 1.20C). Faire une autoradiographie ou regarder en fluorescence ou utiliser des méthodes chimiques (Figure 1.20D) pour lire le résultat.

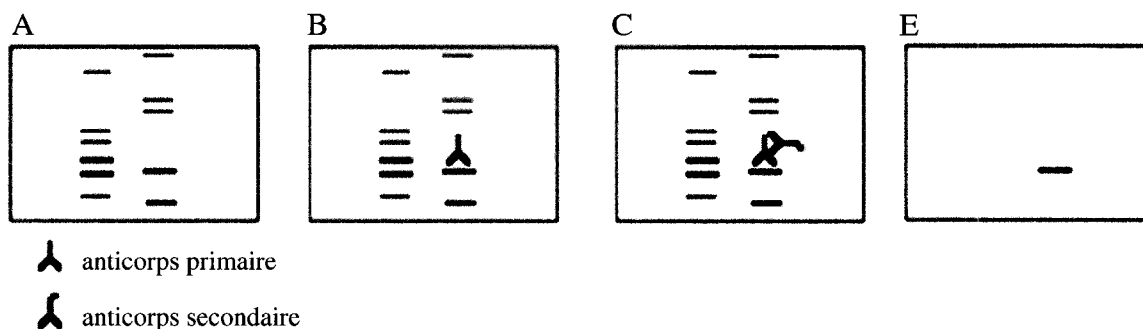


Figure 1. 16 : Déroulement d'un « Western blot » (adapté de Kurien et Scofield, 2006, [164]).

Marquage par isotopes radioactifs : Cette technique permet de détecter une molécule spécifique dans un mélange complexe avec une grande sensibilité et la localiser dans la cellule, voire de la suivre au cours du temps. Les radio-isotopes sont faciles à produire. Il est possible de localiser la molécule dans la cellule et même de la suivre (autoradiographie et pulse-chase).

Protocole : Bombarder le tissu d'un isotope radioactif puis lire le résultat par autoradiographie.

Marquage par anticorps (immunohistochimie) : Cette technique permet de détecter et isoler des molécules spécifiques dans le tissu. Le marquage par anticorps est qualitatif. La sensibilité peut être augmentée en amplifiant le signal (par deux voire trois couches d'anticorps) et en utilisant une enzyme comme marqueur.

Protocole : Déposer des anticorps spécifiques à la protéine d'intérêt sur le tissu, couplés à une molécule détectable (diaminobenzidine (DAB), fluorochromes, molécules denses aux électrons). Regarder le résultat au microscope.

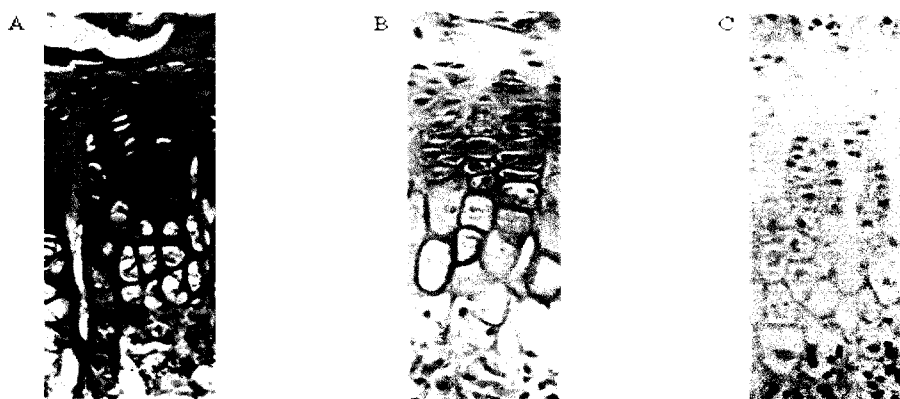


Figure 1. 17 : Trois exemples d'essais d'immunohistochimies pour le collagène de type X avec différentes concentrations d'anticorps : 1/200 pour A, 1/2500 pour B, 1/3000 pour C.

Tableau 1. 6 : Comparaison des techniques de détection de protéines.

	Avantages	Inconvénients
« Western blot »	- efficace, simple et rapide - utilisable pour toutes protéines - peu de réactifs nécessaires - gel utilisable pour plusieurs répliques - les protéines transférées se conservent longtemps - réplique réutilisable	- couplage à une enzyme ne permet pas de quantifier, - peu de contraste donc pas facile de faire de belles photos
Marquage radioactif	- très sensible : détecte la présence de moins de 1000 molécules - fournit la localisation des protéines	- danger : manipulation de produits radioactifs
Immunohistochimie	- méthode puissante car la spécificité antigénique est précise - fournit la localisation des protéines	- les antisérums hétérogènes limitent la spécificité. Il est donc recommandé de produire des anticorps monoclonaux.

Effets du chargement sur les protéines

Peu d'études ont été menées pour lier ce paramètre à la modulation mécanique de croissance. Des études *in vivo* menées sur des rats chargés dynamiquement ont tout de même observé par immunohistochimie que l'expression du collagène de type II [8] et celle du collagène de type X [9, 163] n'était pas modifiée par le chargement.

CHAPITRE 2 : Rationnelle du projet et cadre méthodologique

Différents éléments clés de la revue de littérature, pertinents au projet de recherche, sont résumés ci-dessous :

- La croissance longitudinale des os s'effectue au droit de la plaque de croissance ;
- La matrice extracellulaire de la plaque de croissance est composée principalement de collagènes de type II et X ainsi que de protéoglycanes ;
- Les trois paramètres participant le plus à la croissance et à sa régulation sont, par ordre d'importance, l'hypertrophie des chondrocytes, la synthèse de la matrice extracellulaire et la prolifération cellulaire ;
- Le remodelage de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance est nécessaire pour permettre la division cellulaire intense dans la zone proliférative et l'augmentation volumique cellulaire dans la zone hypertrophique ;
- La plaque de croissance est sensible à l'environnement mécanique, comme l'explique la loi de Hueter-Volkmann, et l'augmentation/réduction de pression sur la plaque peut ralentir/accélérer le taux de croissance ;
- Plusieurs essais biologiques permettent d'évaluer qualitativement ou quantitativement la présence de protéines ou d'ARN messagers.

L'analyse de ces éléments clés a conduit à l'hypothèse de recherche suivante :

Un chargement statique en compression de la plaque de croissance ralentit la croissance longitudinale à travers des changements dans la matrice extracellulaire de la plaque de croissance et, plus précisément, la réduction de la synthèse des composants de cette matrice.

Pour tester cette hypothèse, plusieurs objectifs ont été assignés au projet de recherche. L'objectif principal de l'étude est :

Étudier in vivo un modèle animal de rat soumis à un chargement statique constant et contrôlé avec précision, puis quantifier la modulation mécanique de la croissance osseuse et déterminer le rôle de la matrice extracellulaire (sa synthèse et/ou sa dégradation) dans ce processus de modulation.

Cet objectif principal peut être atteint à travers trois objectifs plus spécifiques :

- 1) Déterminer et mettre au point les essais biologiques permettant d'observer et, si possible, de quantifier les composants clés de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance et ses enzymes dégradatrices.
- 2) Charger mécaniquement des plaques de croissance à un niveau permettant la croissance et à un stade de croissance déterminé, puis quantifier la modulation mécanique résultante.
- 3) Définir l'effet *in vivo* du chargement sur la matrice extracellulaire par rapport à la croissance du contrôle « normal » à l'aide des essais biologiques déterminés en (1).

L'analyse des essais biologiques présentés dans la revue de littérature a permis de répondre au premier objectif. La réalisation des deux autres objectifs est présentée par l'entremise d'un article dans le chapitre suivant. Des résultats complémentaires sont également présentés dans le chapitre 4.

CHAPITRE 3 : Article

Les deuxième et troisième objectifs de ce projet sont intégrés dans un article. Des résultats complémentaires à ceux présentés dans l'article sont présentés au chapitre suivant.

3.1. Présentation de l'article

L'article porte sur l'étude de la modulation mécanique *in vivo* en compression statique, constante et précisément contrôlée de 0,2MPa, d'une vertèbre caudale de rats mâles et en croissance. D'une part le taux de croissance est quantifié à l'aide d'injections de calcéine préalables au sacrifice de l'animal. De plus, la composition de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance est investiguée. Les trois composants principaux (collagène de type II, collagène de X et aggrecan) sont étudiés tant au niveau de la protéine à l'aide d'immunohistochimies et d'une coloration à la safranine-O, qu'au niveau du gène au moyen de la qRT-PCR. Les enzymes protéolytiques dégradeurs clés de la matrice (MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4 et ADAMTS-5) sont aussi investiguées au niveau du gène par qRT-PCR.

La contribution du premier auteur à la rédaction de l'article est d'environ 85%. L'article a été soumis pour publication à la revue scientifique « Journal of Bone and Mineral Research » au mois de mars 2008.

3.2. Article : EFFECTS OF *IN VIVO* STATIC COMPRESSIVE LOADING ON AGGRECAN AND TYPE II AND X COLLAGENS IN THE RAT GROWTH PLATE EXTRACELLULAR MATRIX

Mathilde Cancel^{1,2}, Guy Grimard², Delphine Thuillard Crisinel², Florina Moldovan^{2,3}, Isabelle Villemure^{1,2}

*1- Dept. of Mechanical Engineering, Ecole Polytechnique of Montreal
P.O. Box 6079, Station "Centre-Ville"
Montréal, Québec, H3C 3A7, Canada*

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

*3-Faculty of Dentistry-Stomatology
Université de Montréal
Montreal, Quebec, H3T 1J4, Canada*

Authors' email addresses: Mathilde Cancel: mathilde.cancel@polymtl.ca, Guy Grimard: Guy_Grimard@SSSS.gouv.qc.ca, Delphine Thuillard Crisinel : delphine.thuillard@urbanet.ch, Florina Moldovan: florina.moldovan@umontreal.ca,

Address for notification, correspondence and reprints:

Isabelle Villemure, P.Eng., Ph.D.
Assistant Professor
Ecole Polytechnique of Montreal, Department of Mechanical Engineering
P.O. Box 6079, Station "Centre-Ville", Montreal (Quebec), H3C 3A7 CANADA
Phone: 1 (514) 340-4711 ext 4900; FAX: 1 (514) 340-4176
E-mail: isabelle.villemure@polymtl.ca

Number of word in abstract: 265 words.

Number of word in manuscript: estimated 8700 words.

Number of figures in color : 2

Number of figures in black/white : 4

3.2.1. Abstract

Mechanical loads are essential to normal bone growth, but excessive loads can lead to progressive deformities. In addition, growth plate extracellular matrix remodeling is essential to regulate the normal longitudinal bone growth process and to ensure bone mineralization. To investigate the effects of static compression on growth plate extracellular matrix using an *in vivo* animal model, a loading device was developed to precisely apply a compressive stress of 0.2 MPa for two weeks on the seventh caudal vertebra (Cd7) of rats (male, operated at 28 days-old). Control, sham and loaded groups were studied. Growth modulation was quantified based on calcein labeling and three matrix components (type II and X collagens, and aggrecan) were assessed using immunohistochemistry/safranin-O staining. Extracellular matrix components were also studied by qRT-PCR as well as degradative enzymes (MMP-3 and -13, ADAMTS-4 and -5). Loading reduced Cd7 growth by 29% ($p<0.05$) and 15% ($p=0.07$) when compared to controls and shams respectively. Type X and II collagen protein expressions were greatly reduced in 50% and 83% of the loaded rats respectively. No significant change could be observed in the mRNA expressions of collagens and the proteolytic enzyme MMP-13, but MMP-3 was significantly more expressed in the loaded than in the control group ($p<0.05$). No change was observed in aggrecan and ADAMTS-4 and -5 expression. In conclusion, *in vivo* static compression involves remodeling of the matrix, which could lead to changes in surrounding cellular activities and then reduce bone growth rate. An increase in the understanding of growth plate mechanobiology is necessary to provide a more scientific basis for the medical treatment of progressive skeletal deformities.

KEY WORDS: growth plate, matrix proteins, static loading, rodent animal model, *in vivo*.

3.2.2. Introduction

The process of longitudinal bone growth has important implications in pediatric orthopaedics. Several factors, such as systemic hormones, local growth factors, nutrients, genetics and drugs⁽¹⁻⁴⁾, regulate normal longitudinal bone growth. This process is also governed by its neighboring mechanical environment⁽⁴⁻⁹⁾. Clinical evidence demonstrates that loads are essential to normal bone growth, yet if too elevated, these loads can result in skeletal deformities or progressive pathological conditions of the musculoskeletal system (adolescent idiopathic scoliosis, congenital dislocation of the hip, genu varum or valgum, etc)^(4,8,10,11). This phenomenon of mechanical modulation of bone growth was first explained by the Hueter Volkman law, where a greater compression reduces growth and a reduced compression accelerates growth^(5,6,11).

Longitudinal bone growth occurs within the growth plates of long bones and vertebrae. The growth plate is composed of chondrocytes within an extracellular matrix and is composed of three zones along its longitudinal axis: the reserve zone close to the epiphysis, the proliferative zone, and the hypertrophic zone on the metaphyseal side. The reserve zone is a pool of chondrocytes, acting like stem cells. In the proliferative zone, chondrocytes undergo rapid cell divisions; they are flat and arranged into longitudinal columns. In the hypertrophic zone, the chondrocytes stop dividing, undergo substantial volume enlargement, and begin their terminal differentiation. The matrix then mineralizes to produce bone⁽¹⁻³⁾. These events are in a large measure determined by the extracellular matrix synthesized by the chondrocytes^(7,12-17). This matrix is composed of different proteins, mainly collagens and hydrated proteoglycans. The detailed structure of the matrix is very complex and varies from one growth plate zone to another. The two main characteristic components of the matrix are type II collagen and aggrecan, however type IX and XI collagens linked to type II collagen and two smaller proteoglycans: decorin and biglycan, are also present. Another collagen, the type X collagen, appears mainly in the matrix of the hypertrophic zone. These components are specifically degraded by proteolytic enzymes.

Among them, collagenase 3, also known as MMP-13 is known to degrade type II collagen, type X collagen and proteoglycans, particularly aggrecan⁽¹⁸⁻²²⁾. Not only type II and X, but also type IX and XI collagens are also degraded by another MMP, MMP-3⁽²²⁾. Furthermore, MMP-3 is a collagenase activator⁽²³⁻²⁴⁾ and is able to degrade proteoglycans⁽²⁵⁾. Aggrecan is also degraded by aggrecanases: ADAMTS-4 and -5^(26,27). These four enzymes have been previously detected in the rat growth plate^(13,28,29). The controlled synthesis and degradation of the growth plate extracellular matrix is essential to ensure cartilage enlargement and bone mineralization during endochondral ossification^(7,12-17). Consequently, matrix remodeling represents an important mechanism in longitudinal bone growth and regulation.

Mechanical loading applied on growing animal bone has been shown to affect the longitudinal growth rate, in accordance with the Hueter Volkman law^(5-7,9,30). Experimental studies from Stokes et al. indicated a linear relationship between applied stress and growth modulation⁽⁶⁾. As well growth retardation with compression was mainly due to reduced hypertrophic cell enlargement and, to a lesser extent, to a decreased number of proliferative cells⁽⁵⁾. Similarly in normal longitudinal bone growth, matrix remodeling might be important in modulating growth response to sustained mechanical loading. There is *in vitro* evidence that static loading narrowed the distribution expression of type II and X collagens in growth plates⁽³¹⁾. Reich et al. found no significant alteration of type II and X collagens in growth plates under compression in a chicken animal model⁽³²⁾. However, in this study the loading parameters were not well controlled and growth rates not measured. No change was observed in the type II and X collagens in rat growth plates under *in vivo* intermittent dynamic loading^(30,33). Hence, there is a need to study the effect of a well characterized and controlled *in vivo* static loading in compression on the composition of the extracellular matrix in order to gain insights on the mechanobiological processes involved in loaded growth plates. We designed our study as an attempt to address this objective.

We hypothesized that static mechanical loading modulates longitudinal bone growth through changes in the extracellular matrix composition, which lead to further changes

in cellular activities. In order to test this hypothesis, we developed a well characterized mechanical loading device to precisely control applied stresses on an animal growth plates and quantified the resulting growth modulation by growth rate measures. Moreover, we studied the three main components of the growth plate extracellular matrix (aggrecan, type II collagen and type X collagen) at the gene and protein expression levels to detect if changes occurred in the synthesis of the matrix. As well, we studied matrix degradative enzymes (MMP-3 and -13, ADAMTS-4 and -5) at the gene expression level.

3.2.3. Material and methods

3.2.3.1. Animal model

With the approval of the Institutional Animal Care Committee, a total of 30 male Sprague-Dawley rats were used for this study. They were randomly assigned to one of the three following groups: loaded, sham or baseline control. In the loaded group, an original external apparatus, similar to an external fixator (EF), was installed on the sixth (Cd6) and eighth (Cd8) rat caudal vertebrae to compress the seventh caudal (Cd7) vertebra (Fig. 3.1A). In the sham group, the device was also fixed to the vertebrae, with the rods and springs, but no load was applied on Cd7. The loaded and control groups were composed of 12 rats each, while the sham group included six rats. In each group, half of the rats were used for histological studies (growth rate measures, immunohistochemistries and stainings), while the other half was used for quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analyses. Cd7 vertebrae were processed as well as Cd5 and Cd9 vertebrae, which were adjacent but external to the EF and served as intra-animal tissue controls. In order to ensure that the subgroups (histology/qRT-PCR) were comparable, an inter-animal control was done using growth rate measures on every Cd4 vertebra. The loaded and sham rats (79 ± 5 g) were operated at 28 ± 1 days old, after one week of acclimation, thus pertaining to study the growth spurt period occurring around 35 days of age. A stress (force over area) of 0.2 MPa was applied on Cd7 vertebra of the loaded rats, based on preliminary experiments indicating that this stress level was sufficient to

retard but not to cease growth of Cd7 vertebra (data not shown). The rats were euthanized at 43 days old by CO₂ asphyxiation, after two weeks of loading.

3.2.3.2. External fixator device

The loading device was basically composed of two circular rings, which included a set of pin holes ensuring that the 2 pins fixing each ring will be perpendicular in the axial plane of the vertebra. A concentricity system was also added to the apparatus to center the tail within the device during surgery. This system was made of rigid latex rings with an internal diameter slightly larger than the diameter of the 28-day old rat tail and was removed after fixation of the tail within the apparatus (Fig. 3.1B). Compression loading was generated by two identical springs with a constant of 0.223 N/mm. Prior to experiments, the device was mechanically calibrated with a thin hollow aluminum tube, acting as a rat tail model, which was instrumented with strain gages in order to establish the relationship between spring compression (in mm) and transferred loading (in N) (Fig. 3.2A). The translation of the compression load (N) in terms of applied stress (N/mm² or MPa) on Cd7 vertebra was done based on prior experimental characterization of Cd7 transverse area (mm²) in function of rat age (Fig. 3.2B). Applied stress was then maintained at a constant level during the experiment by controlling both the applied compression force and Cd7 transverse area.

3.2.3.3. Animal surgery and tissue collection

Prior to surgery, an antibiotic was injected to prevent infection. An analgesic was also injected preoperatively, and every operated rat was anesthetized with Isoflurane. To fix the EF, the tail was first straightened to align caudal vertebrae, which were subsequently located using fluoroscopy. The central part of Cd6 and Cd8 vertebrae were marked with a marker pen under the image intensifier to facilitate the positioning of the device in the central third on the vertebra. The device was then advanced up to Cd6 and the first ring was fixed percutaneously with two Kirschner-wires (0.6 mm diameter, MEDECO-CH Sàrl, Switzerland) which were inserted through the pin holes. Similarly two pins were placed through the Cd8 vertebra perpendicularly to the longitudinal axis of the vertebra (Fig. 3.1A). Correct wire orientation was ensured by the pin holes in the rings. Correct

tail position in the center of the device was ensured by the concentricity system. Post-mortem X-ray confirmed the correct insertion of the pins. The wires were bent at one end before insertion in the pin guides and at the other end after positioning, to remain in place. No tension was put on the Kirschner-wires after their placement. Caution was taken not to induce bending the wire inside the tail to avoid changing load direction in Cd7 vertebra. A topical analgesic was then sprayed on the tail and load was applied by compressing the two springs to the initial required length (18.69 mm) to obtain a stress of 0.2 MPa using a micrometer. Each surgery lasted approximately 20 minutes. A protective device was installed around the apparatus for the first 24 hours after the operation while the rats adapted to the loading device. As well, the rats were placed in individual cages with dry litter to avoid disturbance of the applied load and minimize infection. To compensate for lateral growth of the vertebra (Fig. 3.2B), springs were adjusted every four days. Despite all precautions, two surgeries were unsuccessful because the pins were placed erroneously; these loaded rats were excluded from subsequent experiments. All rats survived to the surgery.

All rats were injected with calcein (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), a fluorescent mineralizing bone label, five days and two days prior to sacrifice. Calcein was injected intraperitoneally at a dosage of 15 mg/kg. After sacrifice, all Cd4, Cd5, Cd7 and Cd9 vertebrae were harvested with a scalpel. Growth was measured on all the Cd4 vertebrae. The Cd5, Cd7 and Cd9 vertebrae intended for histological studies were divided into proximal and distal halves. One half was used to measure growth and the other half to perform immunohistochemistry and safranin-O stainings. The Cd5, Cd7 and Cd9 vertebrae intended for qRT-PCR were immediately frozen in liquid nitrogen then stored at -80°C.

3.2.3.4. Growth measurements

Vertebral halves of Cd5, Cd7 and Cd9 (for growth measurement) and all Cd4 vertebrae were fixed for two days in formol (Anachemia, Montréal, QC, Canada), dehydrated and embedded in methyl-methacrylate (J.T. Backer, Phillipsburg, NJ, USA). A total of five sections (12 µm-thick), cut longitudinally using an ultramicrotome (Heavy-duty sliding

microtome Leica SM 2500), were used to evaluate the growth rate. The measurements were made using a microscope (Leica DMR with a Retiga Qimaging Camera) equipped with Bioquant software (version 6.90). The growth rate was calculated as the interlabel width divided by three, for the three-day interval between the two calcein injections of the fluorochrome. The interlabel width was measured as the distance between the double fluorochrome labels in the growth plate metaphyseal junction (Δx on Fig. 3.3A) on 15 different locations in each section and then averaged. One control rat, which showed only one fluorochrome label, was discarded from the study, so the control group was reduced to $n=5$ for all the histological studies.

3.2.3.5. Immunohistochemistry and safranin-O staining

Tissues were processed for immunohistochemistry as previously described⁽³⁴⁾. Vertebral halves of Cd5, Cd7 and Cd9 vertebrae were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (5 μm) were deparaffinized with toluene, rehydrated, preincubated in chondroitinase ABC (0.25 U/mL in PBS) for 90 minutes at 37°C and then digested with hyaluronidase (3mg/ml) for 15 minutes at room temperature (both from Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). To inhibit endogenous peroxidase activity, sections were incubated in freshly prepared 2% H_2O_2 in methanol for 30 minutes. The sections were then incubated overnight at 4°C with mouse anti-type II collagen antibodies (Spring Bioscience, Fremont, CA, USA) or rabbit anti-type X collagen antibodies (dilution 1:1500; Cosmo Bio Ltd, Japan). The sections were then incubated with anti-mouse or anti-rabbit antibodies respectively (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 45 minutes at room temperature and stained using the avidin-biotin complex method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The color was developed using DAB (Dako Diagnostics Inc, Mississauga, ON, Canada) containing H_2O_2 (30 seconds for the anti-type II collagen and 1 minute 30 seconds for the anti-type X collagen). The sections were then counterstained with Harris modified hematoxylin (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). The staining specificity was evaluated by substituting the primary antibody with non-immune IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) following the same experimental protocol. For

each specimen, the experiment was run in triplicate, and on every section two microscopic fields were examined (X25 and X200; Leica DMR with a Retiga Qimaging Camera) and representative pictures taken.

For each specimen, safranin-O/fast green staining was done as previously described⁽³⁵⁾. It was performed in triplicate and observed in the same conditions as the immunohistochemistry.

3.2.3.6. Quantitative RT-PCR

Growth plates were harvested with a scalpel from the previously frozen Cd5, Cd7 and Cd9 vertebrae; this dissection procedure was done on ice to inhibit RNA degradation and then homogenized with a Polytron homogenizer for 20 seconds in 1ml TRI Reagent® Solution (Ambion, Austin, TX, USA). RNA was then extracted from growth plates (12,4±5,7 µg) following the TRI Reagent® Solution protocol (Ambion http://www.ambion.com/techlib/prot/bp_9738.pdf). The pellet was resuspended in 20 µl of sterile water. RNA concentration was determined using an UV-spectrophotometer (UV-1601PC, Mandel, Guelph, ON, Canada) and RNA integrity verified by a migration on MOPS gel. Reverse transcription was done with 1 µg of RNA and 50 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 10 mM Tris at pH=8.3, 3 mM DTT, 1.2 mM dNTPs, 3 µM hexamers, 20 units of RNase Out and 60 units of reverse transcriptase (all from Invitrogen, Burlington, ON, Canada) for each sample. The mixtures were incubated at 25°C for 10 minutes, then at 42°C for 15 minutes and at 99°C for 5 minutes, using a Thermocycler T PCR machine (Biometra, Goettingen, Germany). The gene expression level for the endogenous control 18S (ribosomal RNA) was determined using primer and probe sets from Applied Biosystems (ABI Gene Expression Assays, <http://www.appliedbiosystems.com/>). PCR reactions were performed using 2 µl of cDNA samples (20-50 ng), 5 µl of the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0.5 µl of the TaqMan® Gene Expression Assays (20X), and 2.5 µl of water. The other gene expression levels were determined using primer and probe sets from Universal ProbeLibrary (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp>, Table 1). PCR reactions were performed using 2 µl

of cDNA samples (50 ng), 5 µl of the TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 2 µM of each primer and 1 µM of the Universal TaqMan probe in a total volume of 10 µl.

The ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used to detect the amplification level and was programmed to an initial step of 10 minutes at 95°C for polymerase activity, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C (denaturation) and 1 minute at 60°C (annealing and extension). All reactions were run in triplicate and the average values were used for quantification.

The relative quantification of target genes of the extracellular matrix components and their degradative enzymes was determined using the $\Delta\Delta CT$ method. The ΔCT was first calculated for each target gene as $\Delta CT = Ct_{\text{target}} - Ct_{18S}$. ΔCT was then compared with the calibrator (Cd5 of a control rat for type II and X collagens and aggrecan, and Cd7 of the same rat for MMP-3 and -13 and ADAMTS-4 and -5) to yield $\Delta\Delta CT$, where $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{sample}} - \Delta CT_{\text{calibrator}}$. Then, relative expression (RQ) was calculated as $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ using the Sequence Detection System (SDS) 2.2.2 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The fold change (FD) was then quantified as a ratio of RQ values. For example, the fold change between loaded and control groups for Cd7 vertebra was evaluated as $FD = RQ_{\text{Cd7,loaded}}/RQ_{\text{Cd7,control}}$.

3.2.3.7. Statistical analysis

Results are presented as means $\pm$ SD. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to test for significant differences among the three experimental groups for growth rates measurements and for the different mRNA expressions quantified by ΔCT . When ANOVAs were significant, differences between two groups at a time were tested by 2-tail Student t-tests. The level of significance was established as $p < 0.05$.

3.2.4. Results

3.2.4.1. Static compressive loading significantly reduces growth rate

In the loaded group, mean growth rates reached 35.7 ± 2.5 , 35.3 ± 1.7 , 28.0 ± 3.8 and 35.4 ± 4.1 $\mu\text{m/day}$ respectively for Cd4, Cd5, Cd7 and Cd9 vertebrae (Fig. 3.3B). Significant decreases were observed for Cd7 growth rate when compared to the neighboring vertebrae Cd4 ($p < 0.05$), Cd5 ($p < 0.05$) and Cd9 ($p < 0.05$). In the sham group, mean growth rates reached 33.9 ± 3.1 , 35.4 ± 4.1 , 33.2 ± 3.0 and 33.6 ± 0.2 $\mu\text{m/day}$ for Cd4, Cd5, Cd7 and Cd9 respectively (Fig. 3.3B). No significant difference was observed in this group ($p = 0.84$). In the control group, normal growth rates significantly increased from the bigger vertebra Cd4 (34.2 ± 2.5) to the smaller vertebra Cd9 (38.8 ± 1.4). Mean Cd7 growth rates were 39.0 ± 1.6 , 33.2 ± 3.0 and 28.0 ± 3.8 $\mu\text{m/day}$ for the control, sham and loaded groups, respectively (Fig. 3.3C). The control group showed the highest value, the loaded group showed the lowest, and the sham group, a mid-value. A significant growth rate decrease was observed between the loaded Cd7 and the control Cd7 groups ($p < 0.05$). Similarly, a growth rate reduction, although not significant ($p = 0.07$), was obtained between the loaded Cd7 and the sham Cd7.

3.2.4.2. Static compressive loading reduces type II collagen and, to a lesser extent, type X collagen in the growth plate extracellular matrix

Immunohistochemistry for type II collagen is shown in Figure 3.4. In the Cd5 and Cd9 growth plates, type II collagen signalling was similar in the three groups (results not shown). In the control group, type II collagen was detected throughout the Cd7 growth plates (Fig. 3.4A,D). For Cd7 growth plates of the sham group, the signal did not appreciably differ from the controls neither in its intensity nor in its distribution (Fig. 3.4B,F). For Cd7 loaded growth plates, the signal was greatly reduced in intensity and distribution. No signal or only a very faint one was detected in the transition region between the proliferative and the hypertrophic zones for 83% of the loaded rats (Fig. 3.4C,H).

Immunohistochemistry for type X collagen is presented in Figure 3.4. Type X collagen was detected at similar levels in the Cd5 growth plates of the three groups, as well as in

the Cd9 growth plates (results not shown). In the Cd7 control growth plates, the signal was observed in the hypertrophic zone (Fig. 3.4J,M). In three rats, a weak non specific positive signal was also observed above the hypertrophic zone. For Cd7 growth plates of the sham group, type X collagen did not change in intensity, but its distribution was restricted to the hypertrophic zone (Fig. 3.4K,O). For the Cd7 loaded growth plates, type X collagen intensity was reduced in comparison with the sham group for three out of six rats (Fig. 3.4L,Q). As expected, negative controls showed no positive signal in both assays (Fig. 3.4E,G,I,N,P,R).

3.2.4.3. No effect of the static compressive loading was observed on the proteoglycans in the growth plate extracellular matrix

Safranin-O staining revealed a uniform presence of proteoglycans throughout the growth plates in the Cd7 controls (Fig. 3.4S,V) as well as in the Cd5 and Cd9 of every group. For Cd7 growth plates of the sham and loaded groups, the distribution of proteoglycans did not differ from the controls (Fig. 3.4T,U,W,X).

3.2.4.4. No significant effect of the static compressive loading was observed on the type II and type X collagens and aggrecan mRNAs production

Average Δ CT for type II collagen indicated 12.0 ± 2.1 , 10.7 ± 0.3 and 10.4 ± 0.7 , for the Cd7 growth plates of the control, sham and loaded groups respectively (Fig. 3.5A). The Cd7 fold changes were 1.25 (sham/control), 1.65 (loaded/control) and 1.32 (loaded/sham) (Fig. 3.5B), which showed that type II collagen mRNA was expressed the most in the loaded group and the least in the control group. There was no statistical difference in Δ CT between groups ($p=0.18$).

For type X collagen, average Δ CT was quantified as 13.3 ± 2.9 , 11.1 ± 1.2 and 11.9 ± 1.1 for the Cd7 control, sham and loaded groups respectively (Fig. 3.5A). The Cd7 fold changes indicated 1.79 (sham/control), 1.06 (loaded/control) and 0.59 (loaded/sham) (Fig. 3.5B). The results showed that type X collagen mRNA was expressed the most in the sham group and the least in the control group. There was no statistical difference in Δ CT between groups ($p=0.29$).

For aggrecan, the third studied component of the extracellular matrix, average ΔCT displayed 15.8 ± 2.9 , 14.1 ± 0.4 and 13.8 ± 0.8 for the Cd7 control, sham and loaded (Fig. 3.5A). The Cd7 fold changes rated 1.01 (sham/control), 1.45 (loaded/control) and 1.43 (loaded/sham) (Fig. 3.5B). The results indicated that aggrecan mRNA was the most expressed in the loaded group and the least in the control group. There was no statistical difference in ΔCT between groups ($p=0.21$). Furthermore, no statistical difference was observed in the Cd5 and Cd9 growth plates for the three genes studied, except for type II collagen between the Cd9 loaded and control groups ($p<0.05$). But there was an important standard deviation for Cd9 controls (16%) (data not shown).

3.2.4.5. Static compressive loading increases the expression of MMP-3 mRNA production

The average ΔCT for MMP-3 indicated 20.8 ± 1.2 , 19.6 ± 0.4 and 19.5 ± 0.3 for the Cd7 growth plates of the control, sham and loaded groups respectively (Fig. 3.6A). The Cd7 fold changes were 1.78 (sham/control), 1.88 (loaded/control) and 1.06 (loaded/sham) (Fig. 3.6B). The results showed that MMP-3 mRNA was most expressed in the loaded group and the least in the control group. There was a statistical difference in ΔCT between the loaded and control groups ($p<0.05$) but not with the sham group ($p=0.72$).

3.2.4.6. No significant effect of the static compressive loading was observed on MMP-13, ADAMTS-4 and ADAMTS-5 mRNAs production

The average ΔCT for MMP-13 were 14.4 ± 2.0 , 12.8 ± 0.4 and 12.6 ± 0.6 for the Cd7 control, sham and loaded groups respectively (Fig. 3.6A). The Cd7 fold changes indicated 1.68 (sham/control), 1.95 (loaded/control) and 1.16 (loaded/sham) (Fig. 3.6B), which showed that MMP-13 mRNA was most expressed in the loaded group and the least in the control group. There was no statistical difference in ΔCT between groups ($p=0.09$).

For the aggrecanases, average ΔCT for ADAMTS-4 indicated 23.0 ± 0.5 , 22.8 ± 0.5 and 22.7 ± 0.2 for the Cd7 control, sham and loaded respectively (Fig. 3.6A). The Cd7 fold changes rated 1.13 (sham/control), 1.17 (loaded/control) and 1.03 (loaded/sham) (Fig. 3.6B). This showed that ADAMTS-4 mRNA was expressed the same in the three

groups. There was no statistical difference in ΔCT between groups ($p=0.45$). Average ΔCT for ADAMTS-5 were 19.5 ± 0.9 , 19.1 ± 0.3 and 18.5 ± 0.3 for the Cd7 control, sham and loaded groups (Fig. 3.6A). The Cd7 fold changes indicated 1.16 (sham/control), 1.74 (loaded/control) and 1.50 (loaded/sham) (Fig. 3.6B). It shows that ADAMTS-5 was most expressed in the loaded group and the least in the control group. There was no statistical difference in ΔCT between groups ($p=0.06$).

3.2.5. Discussion

This study showed that a long-term static compressive stress applied on the Cd7 vertebrae of young rats significantly decreased their corresponding growth rates. This modulation occurred together with changes in the extracellular matrix composition of the growth plate, since static compressive loading reduced type II collagen and, to a lesser extent, type X collagen protein expressions. However, these changes were neither due to a down regulation of the respective collagens mRNAs, nor to the over expression of their specific degradative enzymes causing the collagens and/or aggrecan proteolytic cleavage (MMP-3 and -13 and ADAMTS-4 and -5).

Growth modulation observed in the loaded group verified the Hueter-Volkman law and was in accordance with other studies on growth plate static compression^(5-7,9). Resulting growth modulation magnitudes were very similar to those from Stokes et al.^(6,9), in which a decrease of about 15% and 40 % in growth rate, with respect to sham, was observed for a stress magnitude of 0.1 MPa and 0.2 MPa respectively for a very similar animal model. Our result of 15% growth rate reduction for a load of 0.2 MPa is then comparable to that from Stokes et al. with a load of 0.1 MPa for rats about the same age. These differences most probably come from the estimated vertebral diameter used to settle the load in terms of stress (force/area). Stokes et al. used an analytical equation to estimate the Cd7 area with respect to the mass of the rat, whereas this study used an equation based on experimental data on Cd7 to estimate its diameter as a function of the rat age. The comparison between the two equations using different sets of data (rat age and corresponding weight) indicated that the diameter calculated with our equation is

smaller than the one obtained with the equation from Stokes et al. The resulting Cd7 transverse area is then smaller in our case, and the corresponding stress greater.

The type II collagen signal was not detected in the proliferative and hypertrophic zones of the loaded growth plates, suggesting that long term static load could retard the growth, perhaps by altering proliferation and hypertrophy processes. This assumption is reinforced by the fact that matrix remodeling is known to allow cellular proliferation and shape changes⁽¹³⁾. Type II collagen is also supposed to inhibit matrix calcification⁽³⁶⁾. Based on this fact, the presence of type II collagen, even reduced, in the transition zone may be necessary to allow the cells to undergo their morphological changes to become hypertrophic, as these changes would not be possible if the matrix was calcified. Conversely, the fact that type II collagen was not detected in the hypertrophic zone suggests that an early calcification can occur in this zone.

The diminution of type X collagen in the hypertrophic zone may affect the growth rate by reducing cellular hypertrophy, which is the most efficient effector and regulator in longitudinal bone growth^(12,14). In addition, type X collagen is probably involved in the process of mineralization and endochondral ossification^(2,37,38). Consequently, the reduction of this collagen would suggest that mineralization of the matrix was altered. Physiologically, type II and X collagens normally have opposite effects, inhibition and activation respectively, on growth plate mineralization. Thus, as the expression of both collagens is reduced, it is difficult to draw conclusions on the net change (amplified or reduced) in growth plate mineralization. A previous *in vivo* rat study by Niehoff et al. indicated no change in type II collagen distribution and intensity in the growth plate⁽³³⁾. Another study by Ohashi et al. indicated no change in type X collagen⁽³⁰⁾. In this study, the applied load was equivalent to cycles with the average intensity in stress of about 0.2, 0.4 and 0.8 MPa. Although these stresses are in the same order of magnitude than the one of our study, they were applied only 10 minutes per day during 8 days. So, it could be hypothesized that the load effect was lower than the one involved in the present study. Moreover, the discrepancies of both the study from Ohashi et al. and the one from Niehoff et al. with our results could then be explained by the type of compressive

loading used. Dynamic and intermittent loading was used in the studies of Niehoff et al. and Ohashi et al., whereas static constant loading was used in our study. The different types of loading may induce different biomechanical pathways to modulate longitudinal growth.

Biomechanically, type II collagen is known to play a structural role^(13,38) and to confer elasticity and load resistance to the growth plate⁽³⁹⁾. In addition, Anderson proposes that type X collagen plays a structural role in growth plate matrix rather than promoting calcification⁽⁴⁰⁾. The reductions in collagens after two weeks of static loading could then be associated to a deficit in load resistance of the growth plate, further translated in retarded bone growth.

The qRT-PCR results revealed no difference in type II and X collagens, thus indicating that gene expression was not sensitive to the applied load and that another mechanism was involved in the reduction of the protein expression observed by immunohistochemistry. As well, another *in vivo* study by Reich et al. also showed no significant change in type II and X collagen mRNA expressions with the loading of growing chicks for 2 to 4 days⁽³²⁾. In a previous *in vitro* study, Villemure et al. observed decreases in type II and X collagen mRNAs due to a mechanical loading, although the reduction was not significant for type X collagen⁽³¹⁾. The *in vitro* context of the study by Villemure et al. did not allow for all the biological mechanisms to occur as opposed to our *in vivo* study. This could be partly explained by the short-term duration of the applied load (24 hours) that certainly differs from the long-term duration (a few days to two weeks) in our *in vivo* study and that of Reich et al.⁽³²⁾. It could be hypothesized that the mRNA production of the collagens was first reduced and then reached a new equilibrium under static loading to once more produce normal mRNA levels. This kind of adaptation has previously been observed in a study by Saxon et al. on the appositional growth of rat bones *in vivo*. It observed that a group loaded for 15 weeks showed no significant increase in bone formation compared to intra-animal control, contrary to a group loaded only for 5 weeks⁽⁴¹⁾. Yet, this study used a dynamic loading and time

period much longer, and did not address the same biological mechanism of bone formation.

The reductions in the protein expression of type II and X collagens could be due to an over-expression of MMP-3 mRNA expression, as a significant change was observed between the loaded and the control groups; since there was no significant change between the sham and the loaded group, over-expression may not be due to the loading. However, it is certain that this difference was not due to an over-expression of MMP-13, since MMP-13 mRNA expression did not significantly change. The study by Reich et al. obtained an increase of 50% in MMP-13 mRNA expression with loading as compared to control⁽³²⁾. In our study there are three possible explanations of the cause in the change observed in the protein level: (1) collagens mRNAs were not translated in proteins, (2) the lifetime of the mRNAs could be reduced and (3) the applied load could destroy mechanically the fibril of collagens. This last explanation is expected since mechanical damage in type II collagen was already observed in mechanically loaded articular cartilage^(42,43). Furthermore, the morphology of the growth plate was different in the Cd7 loaded vertebrae as compared to the Cd7 control and sham vertebrae (Fig. 3.4). The growth plate width was globally decreased along the longitudinal axis and the chondrocytes had lost their organized columnar arrangement (Fig. 3.4H,Q, X). This observation can be related with the growth plate strain following compressive loading. The sustained growth plate strain was estimated at about 25% using the applied stress of 0.2 MPa and a Young's modulus of 0.77 MPa⁽⁴⁴⁾. These histomorphological changes are supported by the results of several studies, which also quantified this type of damage^(5,7,31,45,46). A reduced number of proliferative and hypertrophic chondrocytes as well as a decreased enlargement of hypertrophic chondrocytes have also been reported with mechanical loading^(5,7,31,45,46). All these growth plate morphological alterations caused by mechanical loading could be intimately linked with a mechanical denaturation of collagen fibers composing the extracellular matrix of the growth plate.

The last part of our study pointed out that, like the collagens mRNAs, aggrecan mRNA and preteoglycans (detected by safranin-O staining) were not modulated by the static

loading. To our knowledge, ours is the first study to address this issue and complementary studies are needed to explain how the proteoglycans expression, particularly for aggrecan, is preserved in spite of the mechanical stress applied. These stainings could further be quantified using densitometry, as previously described by Nieminen et al. to verify the obtained results⁽⁴⁷⁾.

The limits of our study include aspects related to the loading procedure and to the biological analyses. A first limit resides in the intrinsic design of the study, which uses static load at one stress level only. Another study including the use of a greater stress level (not too important to stop growth) would confirm the observed findings of collagen reduction and growth reduction. *In vivo* dynamic loadings in the same range of magnitude could also provide relevant insights which could be compared with growth plate alterations caused by static loading. Secondly, the small sample size, especially in the sham group, induced important inter-animal variations. Thirdly, biological assays performed in this study were not confirmed with a second technique such as Western blots for protein expression or *in situ* hybridizations for mRNA production.

Our study is the first to investigate *in vivo* effects of long-term static mechanical loading on growth, as well as synthesis and degradation of the growth plate extracellular matrix. Our results clearly indicate that the long term static compressive stress applied in young rats decreased caudal vertebrae growth rates. This growth modulation occurred in concert with changes in the extracellular matrix composition of the growth plate, which was shown by both type II and X collagen protein reduction. This was investigated not only at the protein level but also at the gene level.

In conclusion, the present study gives new insights on the mechanobiological response of growth plates to *in vivo* long-term static loading in a mammalian animal model. Improved knowledge in this area is necessary to provide complementary understanding in the medical treatment of progressive skeletal deformities already using the Hueter-Volkman law. Such understanding would allow for improved “mechanical treatments” in infant and juvenile orthopaedics, such as applying a traction to accelerate

bone growth in limb length discrepancy or trunk bracing to control progressive scoliosis deformities.

3.2.6. Acknowledgments

The authors are deeply grateful to Giuseppe Pace for his work in the design and fabrication of the loading apparatus, to Daniel Theriault (École Polytechnique de Montréal) for his help in mechanical design, to Josée Dépôt for her technical assistance in histology and to Heather Yampolsky for her helpful comments and review of the manuscript. The qPCR were done with the expertise of Pierre Chagnon and Raphaëlle Lambert from IRIC genomic platform (Montreal, Quebec). This study was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canada Research Chair in Mechanobiology of the Pediatric Musculoskeletal System (I.V.)

3.2.7. Références

1. Farnum CE, Wilsman NJ 1998 Chapter 13: Growth plate cellular function Skeletal Growth and Development, pp 203-223.
2. Ballock RT, O'Keefe RJ 2003 The biology of the growth plate. The Journal of Bone & Joint Surgery **85-A(4)**:715-726.
3. Hunziker EB 1994 Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. Microscopy research and technique **28**:505-519.
4. LeVeau BF, Bernhardt DB 1984 Effect of forces on the growth, development, and maintenance of the human body. Physical Therapy **64(12)**:1874-1882.
5. Stokes IA, Clark KC, Farnum CE, Aronsson DD 2007 Alterations in the growth plate associated with growth modulation by sustained compression or distraction. Bone **41(2)**:197-205.
6. Stokes IA, Aronsson DD, Dimock AN, Cortright V, Beck S 2006 Endochondral growth in growth plates of three species at two anatomical locations modulated by mechanical compression and tension. J Orthop Res **24(6)**:1327-34.
7. Farnum CE, Nixon A, Lee AO, Kwan DT, Belanger L, Wilsman NJ 2000 Quantitative three-dimensional analysis of chondrocytic kinetic responses to short-term stapling of the rat proximal tibial growth plate. Cells Tissues Organs **167**:247-258.
8. Stokes IAF 2002 Mechanical effects on skeletal growth. J Musculoskel Neuron Interact **2(3)**:277-280.
9. Stokes IA, Gwadera J, Dimock A, Farnum CE, Aronsson DD 2005 Modulation of vertebral and tibial growth by compression loading: diurnal versus full-time loading. Journal of Orthopaedic Research **23**:188-195.
10. Cook SD, Lavernia CJ, Burke SW, Skinner HB, Haddad RJ, Jr. 1983 A biomechanical analysis of the etiology of tibia vara. J Pediatr Orthop **3(4)**:449-54.
11. Stokes IA, Aronsson DD, Urban JPG 1994 Biomechanical factors influencing progression of angular skeletal deformities during growth. Eur J Exp Musculoskel Res **3**:51-60.
12. Hunziker EB, Schenk RK 1989 Physiological mechanisms adopted by chondrocyte regulating longitudinal bone growth in rats. Journal of Physiology **414**:55-71.
13. Alvarez J, Balbin M, Santos F, Fernandez M, Ferrando S, Lopez JM 2000 Different bone growth rates are associated with changes in the expression pattern of types II and X collagens and collagenase 3 in proximal growth plates of the rat tibia. Journal of Bone and Mineral Research **15(1)**:82-94.
14. Wilsman NJ, Farnum CE, Leiferman EM, Fry M, C. B 1996 Differential growth by growth plates as a function of multiple parameters of chondrocytic kinetics. Journal of Orthopaedic Research **14**:927-936.

15. Greco F, Palma Ld, Specchia N, Mannarini M 1989 Growth-plate cartilage metabolic response to mechanical stress. *Journal of Pediatric Orthopaedics* **9**(5):520-524.
16. Breur GJ, VanEnkevort BA, Farnum CE, Wilsman NJ 1991 Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates. *Journal of Orthopaedic Research* **9**:348-359.
17. Breur GJ, Lapierre MD, Kazmierczak K, Stechuchak KM, McCabe GP 1997 The domain of hypertrophic chondrocytes in growth plates growing at different rates. *Calcified Tissue International* **61**:418-425.
18. Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, Geoghegan KF, Hambor JE 1996 Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* **97**(3):761-8.
19. Welgus HG, Fliszar CJ, Seltzer JL, Schmid TM, Jeffrey JJ 1990 Differential susceptibility of type X collagen to cleavage by two mammalian interstitial collagenases and 72-kDa type IV collagenase. *J Biol Chem* **265**(23):13521-7.
20. Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G 1996 Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* **271**(3):1544-50.
21. Fosang AJ, Last K, Knauper V, Murphy G, Neame PJ 1996 Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13). *FEBS Lett* **380**(1-2):17-20.
22. Keeling J, Herrera GA 2008 Human matrix metalloproteinases: Characteristics and pathologic role in altering mesangial homeostasis. *Microsc Res Tech*.
23. Murphy G, Nagase H, Brinckerhoff CE 1988 Relationship of procollagenase activator, stromelysin and matrix metalloproteinase 3. *Coll Relat Res* **8**(4):389-91.
24. Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H 1990 Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* **29**(44):10261-70.
25. Gunja-Smith Z, Nagase H, Woessner JF, Jr. 1989 Purification of the neutral proteoglycan-degrading metalloproteinase from human articular cartilage tissue and its identification as stromelysin matrix metalloproteinase-3. *Biochem J* **258**(1):115-9.
26. Abbaszade I, Liu RQ, Yang F, Rosenfeld SA, Ross OH, Link JR, Ellis DM, Tortorella MD, Pratta MA, Hollis JM, Wynn R, Duke JL, George HJ, Hillman MC, Jr., Murphy K, Wiswall BH, Copeland RA, Decicco CP, Bruckner R, Nagase H, Itoh Y, Newton RC, Magolda RL, Trzaskos JM, Burn TC, et al. 1999 Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family. *J Biol Chem* **274**(33):23443-50.
27. Tortorella M, Pratta M, Liu RQ, Abbaszade I, Ross H, Burn T, Arner E 2000 The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. *J Biol Chem* **275**(33):25791-7.
28. Mitani H, Takahashi I, Onodera K, Bae JW, Sato T, Takahashi N, Sasano Y, Igarashi K, Mitani H 2006 Comparison of age-dependent expression of aggrecan

- and ADAMTSs in mandibular condylar cartilage, tibial growth plate, and articular cartilage in rats. *Histochem Cell Biol* **126**(3):371-80.
29. Takahi K, Hashimoto J, Hayashida K, Shi K, Takano H, Tsuboi H, Matsui Y, Nakase T, Tomita T, Ochi T, Yoshikawa H 2002 Early closure of growth plate causes poor growth of long bones in collagen-induced arthritis rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **2**(4):344-51.
 30. Ohashi N, Robling AG, Burr DB, Turner CH 2002 The effects of dynamic axial loading on the rat growth plate. *Journal of Bone and Mineral Research* **17**(2):284-292.
 31. Villemure I, Chung MA, Seck CS, Kimm MH, Matyas JR, Duncan NA 2005 Static compressive loading reduces the mRNA expression of type II and X collagen in rat growth-plate chondrocytes during postnatal growth. *Connective Tissue Research* **46**:211-219.
 32. Reich A, Jaffe N, Tong A, Lavelin I, Genina O, Pines M, Sklan D, Nussinovitch A, Monsonego-Ornan E 2005 Weight loading young chicks inhibits bone elongation and promotes growth plate ossification and vascularization. *Journal of applied physiology* **98**(6):2381-2389.
 33. Niehoff A, Kersting UG, Zaucke F, Morlock MM, Brüggemann G-P 2004 Adaptation of mechanical, morphological, and biochemical properties of the rat growth plate to dose-dependant voluntary exercise. *Bone* **35**:899-908.
 34. Roy-Beaudry M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, M'Barek KN, Christgau S, Shipkolye F, Moldovan F 2003 Endothelin 1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via matrix metalloprotease 1 and matrix metalloprotease 13 induction. *Arthritis and rheumatism* **48**(10):2855-2864.
 35. Lillie RD, Fullmer HM 1976 *Histopathologic Techniques and Practical Histochemistry*, 4th ed. McGraw-Hill, New York, pp 129-132.
 36. Robertson WW, Jr. 1990 Newest knowledge of the growth plate. *Clin Orthop Relat Res* (253):270-8.
 37. Suttmüller M, Bruijn JA, de Heer E 1997 Collagen types VIII and X, two non-fibrillar, short-chain collagens. Structure homologies, functions and involvement in pathology. *Histol Histopathol* **12**(2):557-66.
 38. Sandell LJ, Sugai JV, Trippel SB 1994 Expression of collagens I, II, X and XI and aggrecan mRNAs by bovine growth plate chondrocytes in situ. *Journal of Orthopaedic Research* **12**:1-14.
 39. Radhakrishnan P, Lewis NT, Mao JJ 2004 Zone-specific micromechanical properties of the extracellular matrices of growth plate cartilage. *Annals of Biomedical Engineering* **32**(2):284-291.
 40. Anderson HC 1995 Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res* (314):266-80.
 41. Saxon LK, Robling AG, Alam I, Turner CH 2005 Mechanosensitivity of the rat skeleton decreases after a long period of loading, but is improved with time off. *Bone* **36**(3):454-64.
 42. Thibault M, Poole AR, Buschmann MD 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**(6):1265-73.
43. Wilson W, Burken Cv, Donkelaar Cv, Buma P, Rietbergen Bv, Huijskes R 2006 Causes of mechanically induced collagen damage in articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Research* **24**:220-228.
 44. Cohen B, Lai WM, Mow VC 1998 A transversely isotropic biphasic model for unconfined compression of growth plate and chondroepiphysis. *Journal of Biomechanical Engineering* **120**:491-496.
 45. Farnum CE 1998 Chapter 30: Effects of distraction and compression on growth plate function *Skeletal Growth and Development*, pp 517-531.
 46. Alberty A, Peltonen J, Ritsila V 1993 Effects of distraction and compression on proliferation of growth plate chondrocytes. A study in rabbits. *Acta Orthop Scand* **64**(4):449-55.
 47. Nieminen MT, Rieppo J, Silvennoinen J, Toyras J, Hakumaki JM, Hyttinen MM, Helminen HJ, Jurvelin JS 2002 Spatial assessment of articular cartilage proteoglycans with Gd-DTPA-enhanced T1 imaging. *Magn Reson Med* **48**(4):640-8.

3.2.8. Table

Table 3. 1: Primers used in qRT-PCR.

Name	Universal ProbeLibrary number	Sequences
Type II collagen	18	Forward: 5'-GAC CCC CAG GTT CTA ATG G-3' Reverse: 5'-GCA CCT TTG GGA CCA TCT T-3'
Type X collagen	4	Forward: 5'-CAC AGC CAT TTC GAG CTT TT-3' Reverse: 5'-TCT AAG TTG CCC CAG GTA CG-3'
Aggrecan	66	Forward: 5'-TGG CTG CAG GAC CAG ACT-3' Reverse: 5'-CGC CAT AGG TCC TGA CTC C-3'
MMP-3	89	Forward: 5'-GAG AAC TTT CCA GGC ATT GG-3' Reverse: 5'-CCG CTG AAG AAG TAA AGA AAC C-3'
MMP-13	89	Forward: 5'-GCC AGA ACT TCC CAA CCA T-3' Reverse: 5'-GGG CCC AGA ATT TTC TCC-3'
ADAMTS-4	6	Forward: 5'-CGG GCA CTG GGC TAC TAC TAT-3' Reverse: 5'-ACA GCC AGC GTG GAT ACA G-3'
ADAMTS-5	38	Forward: 5'-TTC AGC CAC GAT CAC AGA AT-3' Reverse: 5'-GGT CTG TCC TGG GAG TTC CT-3'

3.2.9. Figures

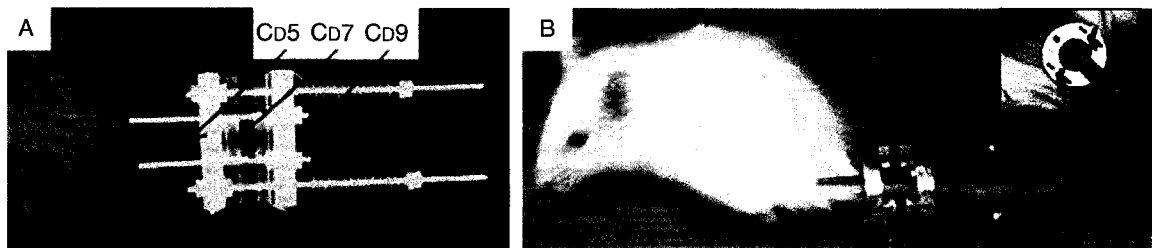


Figure 3. 1: Loading device installed on the rat tail. (A) Radiography of a loaded rat showing the apparatus loading Cd7 vertebra. (B) Photograph y of the loading apparatus installed on a rat tail and, in the top-right corner, a transversal view showing the tail centered using the concentricity system.

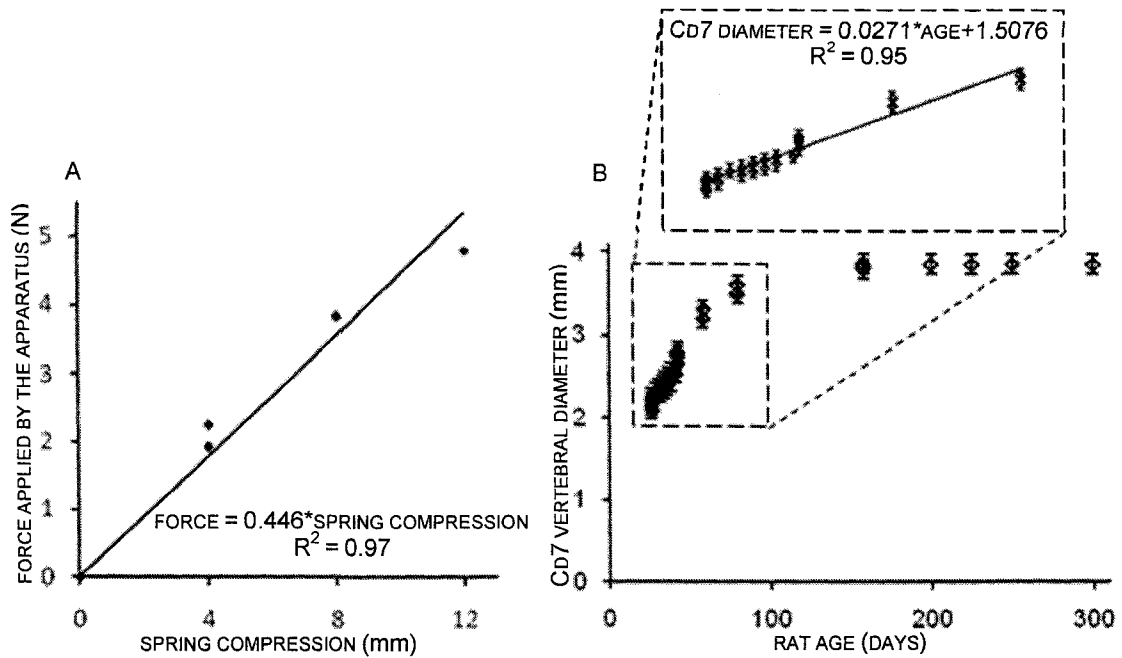


Figure 3. 2: Experimental relationships used to recalibrate the device every four days. (A) Relationship used to determine the spring compression needed to maintain an applied stress of 0.2 MPa over Cd7 vertebra. (B) Cd7 diameter evolution with rat age. The dash-lined square shows at a higher scale the corresponding linear relationship during the growth period from 26 to 80 days old. This relationship was used to estimate Cd7 diameter over the two-week loading phase, and to evaluate Cd7 transverse area as circular surface.

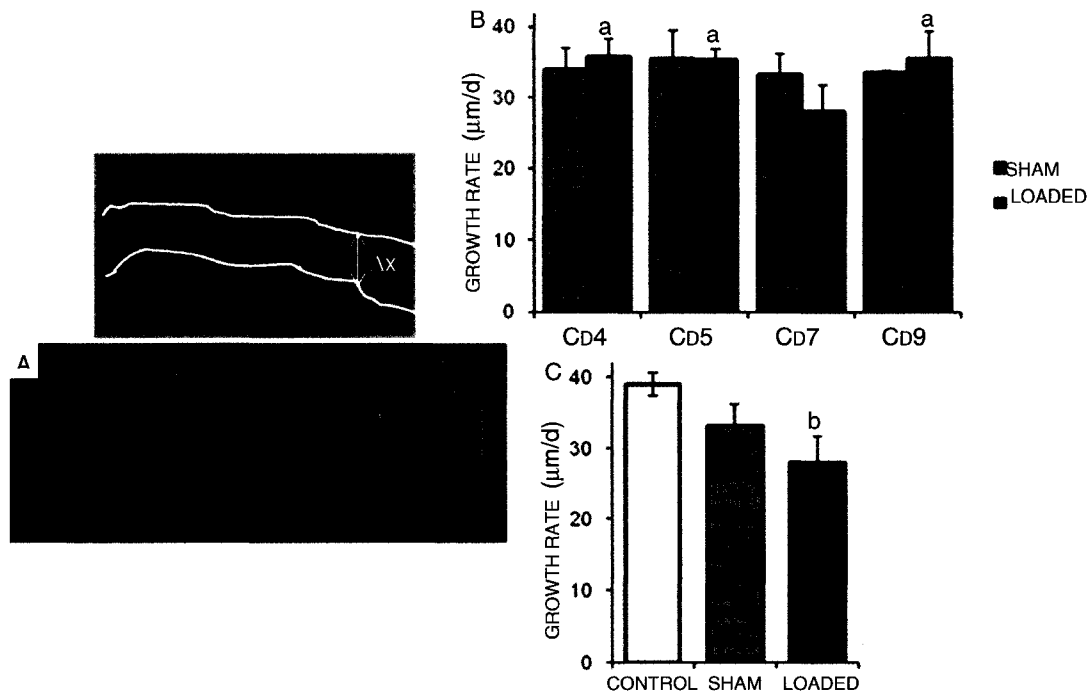


Figure 3. 3: Measurement of growth modulation. (A) Labeling of growth with calcein. The gray square is displayed at higher magnification and the growth labels are marked by the two white lines. Growth rate is the measurement of the distance Δx between the two lines divided by the time between the two injections $\Delta t = 3$ days. **(B) Growth rate variation along the rat tail for the sham and loaded groups for Cd4 (sham, n=5; loaded, n=10), Cd5 (sham, n=3; loaded, n=6), Cd7 (sham, n=3; loaded, n=6) and Cd9 (sham, n=2; loaded, n=6) (mean value $\pm$ SD). a: $p < 0.05$ compared to loaded Cd7. (C) Cd7 growth rate for the control (n=5), sham (n=3) and loaded (n=6) groups (mean value $\pm$ SD). b: $p < 0.05$ compared to control.**

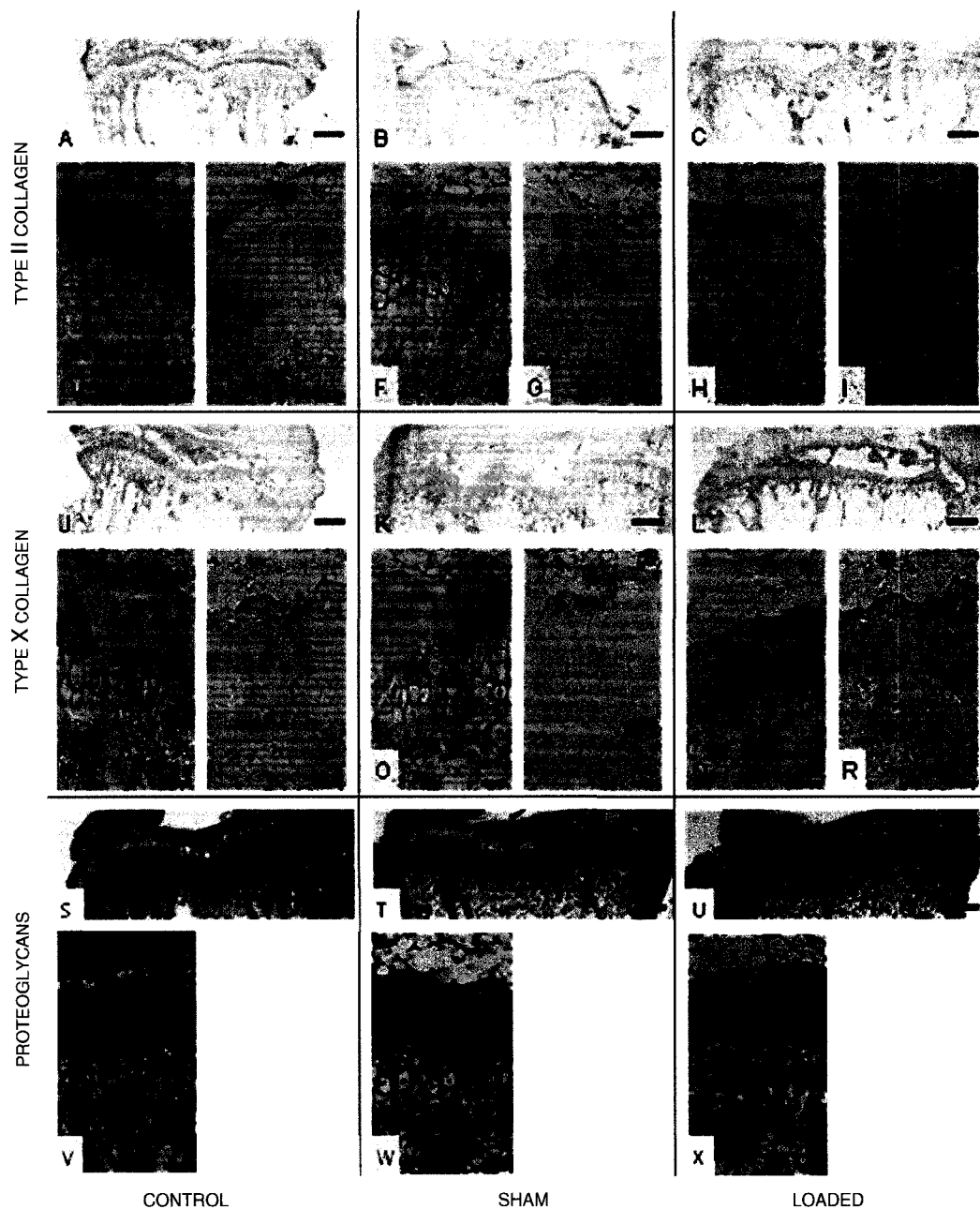


Figure 3. 4: Immunohistochemistries and safranin-O on the growth plate of the Cd7 vertebra of 43-day-old rats. The pictures display type II collagen staining (A to I), type X collagen staining (J to R) and safranin-O staining (S to X). Three groups are studied: the control group (left), the sham group (middle) and the loaded group (right). Panels E, G, I, N, P, R are negative controls of their respective group. Bars represent 1 mm in lower magnifications and 100 μ m in higher magnifications.

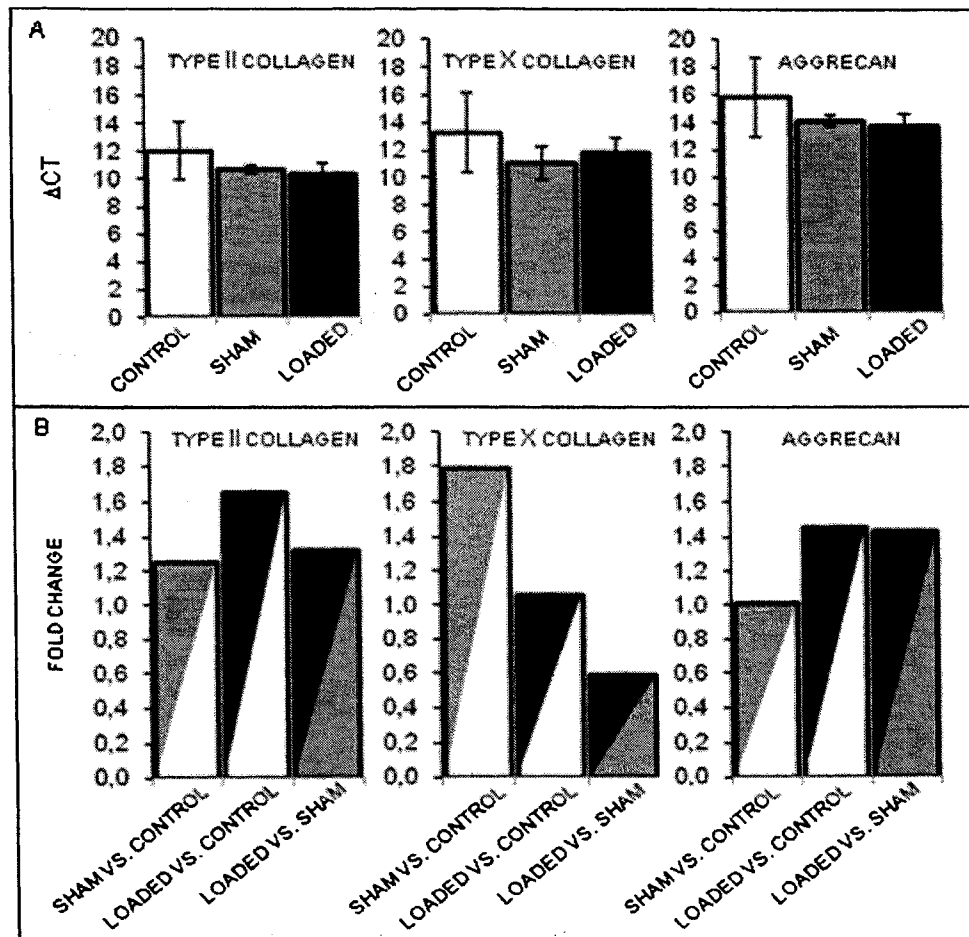


Figure 3. 5: Evaluation by qRT-PCR of selected gene expression in the growth plates of the Cd7 vertebrae of control (n=6), sham (n=3) and loaded (n=6) rats. (A) Δ CT (mean $\pm$ SD) values for type II collagen, type X collagen and aggrecan, with 18S used as the endogenous control gene. The gene-targeted mRNA expression is decreased when Δ CT increases. (B) Fold change (FD) in gene expression for type II collagen, type X collagen and aggrecan in the growth plates of the Cd7 vertebrae between groups. Values represent the ratio of relative quantity (RQ) means between two groups at a time. FD>1 means that the gene targeted mRNA is more expressed in the first group than in the second one.

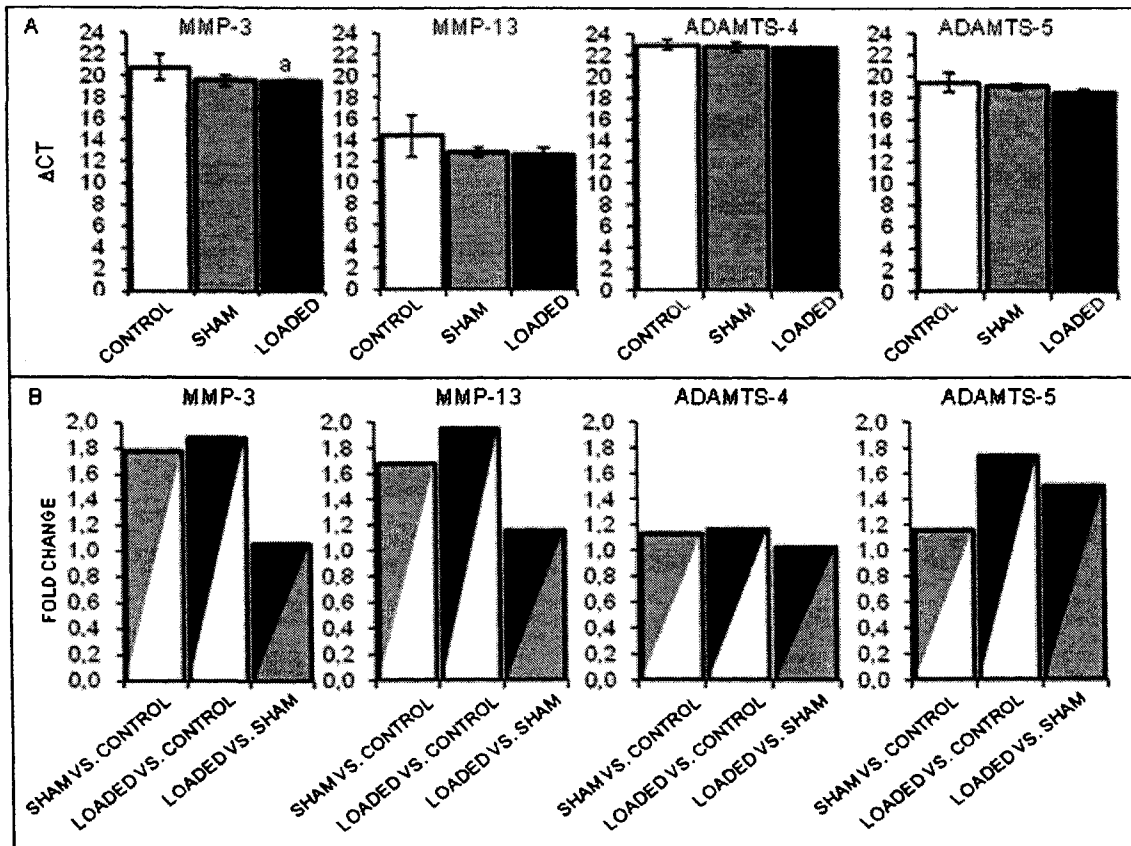


Figure 3. 6: Evaluation by qRT-PCR of selected gene expression in the growth plates of the Cd7 vertebrae of control (n=6), sham (n=3) and loaded (n=6) rats. (A) Δ CT (mean $\pm$ SD) values for MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4 and ADAMTS-5, with 18S used as the endogenous control gene. The gene-targeted mRNA expression is decreased when Δ CT increases. a: $p < 0.05$ compared to control. (B) Fold change (FD) in gene expression for MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4 and ADMTS-5 in the growth plates of the Cd7 vertebrae between groups. Values represent the ratio of relative quantity (RQ) means between two groups at a time. FD>1 means that the gene targeted mRNA is more expressed in the first group than in the second one.

CHAPITRE 4 : Résultats complémentaires

Ce chapitre présente des résultats complémentaires à ceux de l'article qui constitue le chapitre précédent. La première section résume les différents tests préliminaires ayant permis de choisir le niveau de chargement le plus adapté pour la suite du projet et de mettre au point les différents essais biologiques. Les analyses comparatives des mesures de croissance sur les vertèbres Cd4, Cd5 et Cd9 sont présentées dans la section suivante. Les immunohistochimies et la coloration à la safranine-O, ainsi que les analyses qRT-PCR sont ensuite présentées pour les contrôles internes (vertèbres caudales Cd5 et Cd9). Une cinquième section présente la méthodologie et les résultats d'analyses histomorphométriques des vertèbres caudales Cd7. Finalement, ce chapitre présente les essais menés par immunohistochimie sur les néofragments de collagène de type II clivés par la MMP-1 et la MMP-13. À moins d'indication contraire, les tests statistiques utilisés dans les différentes analyses comparatives sont les mêmes que pour l'article, soit un test ANOVA réalisé pour l'ensemble des groupes étudiés, suivi d'un test-t de Student réalisé pour seulement deux groupes à la fois dans les cas significatifs. Le niveau de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

4.1. Études préliminaires

4.1.1. Tests de trois niveaux de chargement

Six rats ont servi à cette étape préliminaire : un rat a servi de contrôle, deux rats ont été chargés à 0,1 MPa, deux rats ont été chargés à 0,2 MPa et un rat a été chargé à 0,4 MPa. Pour ces six chirurgies, le protocole chirurgical était en développement et n'était donc pas exactement la même que celui décrit dans l'article. L'appareil de fluoroscopie utilisé dans un premier temps était d'une moins bonne résolution et, par conséquent, notre technique de repérage des vertèbres caudales fut moins précise. Ainsi, un des rats chargés à 0,1 MPa n'eut aucune vertèbre complète en chargement (deux vertèbres voisines ont été instrumentées). Le second rat de 0,1 MPa fut chargé sur la vertèbre Cd8 et non la Cd7. Ce fut aussi le cas pour un des rats chargés à 0,2 MPa. De plus, le rat chargé à 0,4 MPa s'infecta au niveau d'une des vertèbres opérées. Le premier rat chargé

à 0,1 MPa et le rat chargé à 0,4 MPa furent donc écartés de l'étude. De plus, le rat contrôle n'avait pas de marquage de croissance visible, il ne put donc pas être utilisé.

Il ne restait alors que trois rats disponibles pour les mesures de croissance, un chargé à 0,1 MPa et deux chargés à 0,2 MPa. Comme les mesures démontrèrent que la croissance n'avait pas été stoppée par le chargement pour le groupe à 0,2 MPa, il fut décidé que ce niveau de chargement serait utilisé dans notre étude.

4.1.2. Technique de marquage de croissance

Le même groupe de rats a permis de tester la technique de marquage de croissance. La première injection fut faite à la calcéine (15 mg/kg) et la deuxième à la tétracycline (15 mg/kg). La dose de la tétracycline fut probablement insuffisante car la marque n'était pas visible lors des mesures de croissance effectuées au microscope. Il fut donc décidé que seule la calcéine serait utilisée pour la suite des essais.

4.1.3. Technique d'immunohistochimie pour le collagène de type II

Différents protocoles ont été testés pour l'immunohistochimie pour le collagène de type II. Les lames furent incubées dans la hyaluronidase (3mg/ml) pendant 15 minutes ou 30 minutes à température ambiante ou 15 minutes à 37°C (Figure 4.1). Le traitement pendant 15 minutes à température ambiante fut retenu car il donnait un meilleur résultat que sans l'incubation et un contrôle négatif comparable.

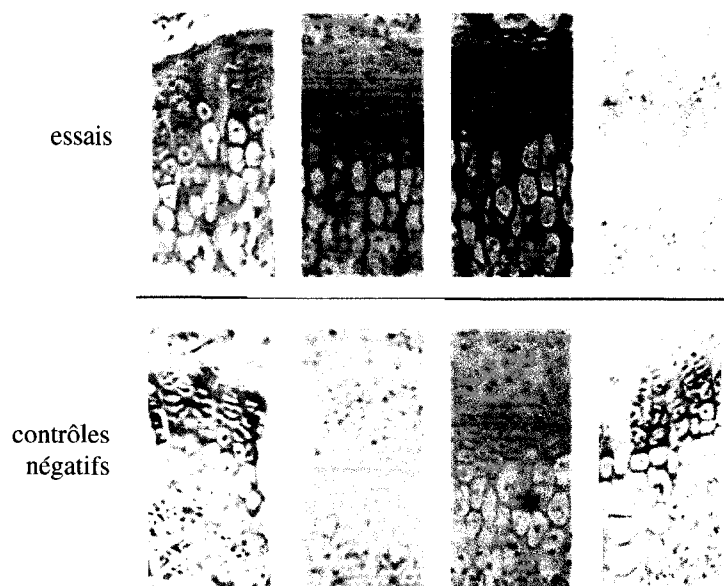


Figure 4. 1 : Essais d'optimisation du protocole d'immunohistochimie pour le collagène de type II, avec de gauche à droite : sans hyaluronidase, avec hyaluronidase pendant 15 minutes à température ambiante, avec hyaluronidase pendant 30 minutes à température ambiante et avec hyaluronidase pendant 15 minutes à 37°C.

4.1.4. Technique d'immunohistochimie pour le collagène de type X

Une première série d'essais fut menée pour déterminer la concentration de l'anticorps à utiliser. Il fut testé aux dilutions suivantes : 1/200, 1/500, 1/1000, 1/1500, 1/2000, 1/2500 et 1/3000 (Figure 4.2). Finalement, la dilution de 1/1500 fut retenue, car le signal se situait principalement en zone hypertrophique et était suffisamment visible.



Figure 4. 2 : Essai de dilutions de l'anticorps de collagène de type X, de gauche à droite du plus concentré 1/200 au plus dilué 1/3000.

Puis, le temps de pose de la DAB fut testé à 1 minute, 1 minute 30 secondes, 2 minutes, 2 minutes 30 secondes et 3 minutes (Figure 4.3). Le temps de pose ne semblant pas avoir beaucoup d'influence, la pose de 1 minute 30 secondes fut choisie car ce temps semblait présenter un peu moins de marquage dans la zone proliférative que pour les temps plus longs.

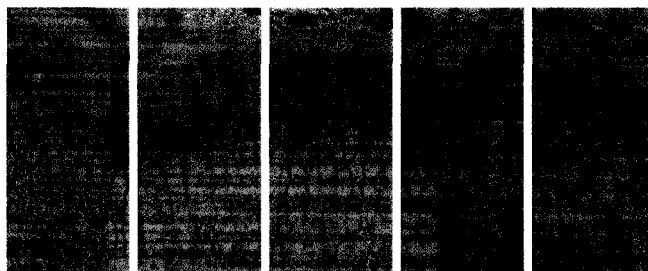


Figure 4. 3 : Essais d'optimisation du temps de pose de la DAB pour l'immunohistochimies pour le collagène de type X, de gauche à droite du plus court (1 minute) au plus long (3 minutes).

Le signal détecté étant plutôt faible, le traitement à la hyaluronidase (3mg/ml, 15 minutes à température ambiante) utilisé pour le collagène de type II fut ajouté et il donna plus d'intensité au signal (Figure 4.4).

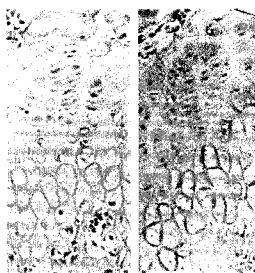


Figure 4. 4 : Essai en ajoutant la hyaluronidase (à droite) pour l'immunohistochimie pour le collagène de type X.

Malgré cette mise au point, le signal fut par la suite parfois détecté dans toute la plaque de croissance alors qu'il aurait dû se situer seulement dans la zone hypertrophique. Des tests furent donc menés pour essayer de trouver un protocole plus optimal. Les incubations dans la chondroïtinase, le tampon citrate et la hyaluronidase furent remplacées par des incubations dans la trypsine (0,1%, 15 minutes, à température ambiante) ou dans la hyaluronidase seule (3mg/ml, 15 minutes à température ambiante puis 45 minutes à 37°C). Les lames traitées à la hyaluronidase seulement montrèrent des distributions comparables à celles obtenues avec le protocole habituel et celles traitées à la trypsine révélèrent un signal absent de la zone hypertrophique de la plaque de croissance (Figure 4.5).

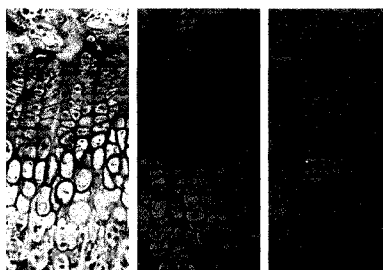


Figure 4. 5 : Comparaison de trois protocoles pour l'immunohistochimie pour le collagène de type X, à gauche : protocole habituel, au milieu : hyaluronidase seulement, à droite : trypsine seulement.

Un dernier test fut mené en modifiant l'étape de blocage de l'anticorps : au lieu d'incuber pendant 1 heure avec le sérum normal, les sections furent incubées pendant 30 minutes avec du lait et pendant 30 minutes avec le sérum normal. Le résultat ne fut pas différent (Figure 4.6).

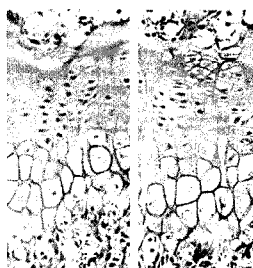


Figure 4. 6 : Comparaison de deux protocoles pour l'immunohistochimie pour le collagène de type X, à gauche : protocole habituel, à droite : blocage avec du lait.

4.2. Mesures de croissance

4.2.1. Groupe contrôle

Les taux de croissance des vertèbres Cd4, Cd5, Cd7 et Cd9 du groupe contrôle sont présentés à la Figure 4.7. Le taux de croissance a augmenté dans ce groupe de la vertèbre Cd4 vers la vertèbre Cd9. Des différences significatives ont été obtenues entre les vertèbres deux à deux, excepté entre les vertèbres Cd4 et Cd5 et entre les vertèbres Cd7 et Cd9.

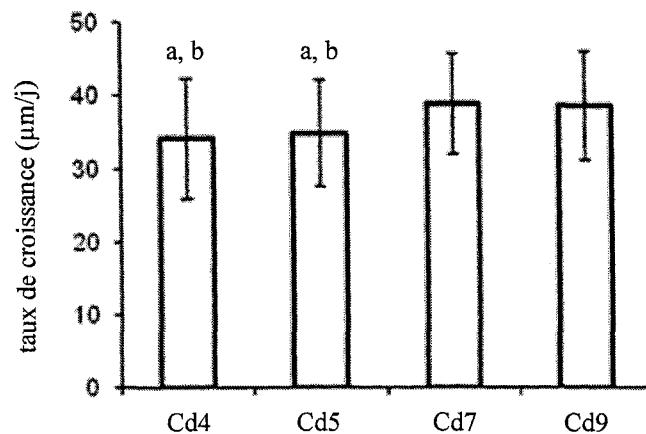


Figure 4. 7 : Mesures de croissance pour les vertèbres du groupe contrôle. a : $p < 0,05$ par rapport à Cd7, b : $p < 0,05$ par rapport à Cd9.

4.2.2. Vertèbres caudales Cd4

Le taux de croissance moyen pour les vertèbres Cd4 a atteint $34,2 \pm 2,5$, $33,9 \pm 3,2$ et $35,7 \pm 2,5$ µm/j pour les groupes contrôle ($n=8$), « sham » ($n=5$) et chargé ($n=10$) respectivement, comme le montre la figure 4.8. La croissance n'a pas été modifiée pour les vertèbres Cd4 d'un groupe à l'autre. Aucune différence significative n'a été observée pour ces vertèbres entre les trois groupes.

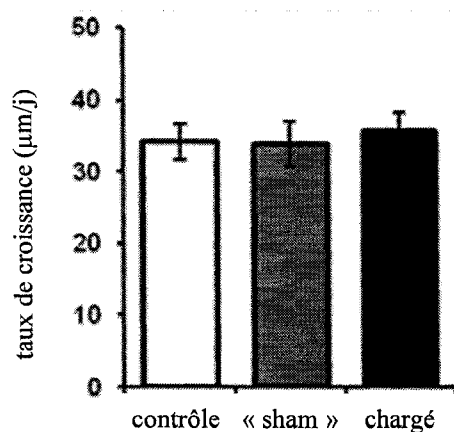


Figure 4. 8 : Taux de croissance des vertèbres Cd4.

Les vertèbres Cd4 ont été utilisées comme contrôle inter-animal pour comparer les taux de croissance des rats destinés aux mesures de croissance/histologie et des rats destinés à la qRT-PCR. La figure 4.9 montre les mesures obtenues dans chaque sous-groupe : A représente le sous-groupe des rats destinés aux mesures de croissance/histologie et B représente le sous-groupe destiné à la qRT-PCR. Les différences se sont avérées non-significatives.

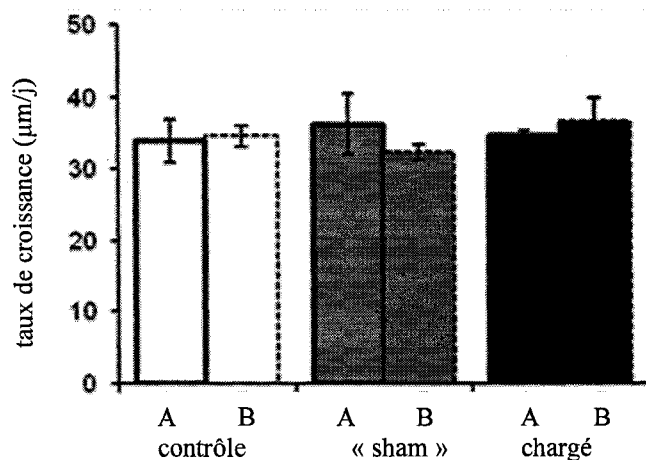


Figure 4. 9 : Taux de croissance des vertèbres Cd4 par sous-groupe.

4.2.3. Vertèbres caudales Cd5

Des taux de croissance moyens de $34,9 \pm 2,1$, $35,4 \pm 4,1$ et $35,3 \pm 1,7$ $\mu\text{m/j}$ ont été obtenus pour les vertèbres Cd5 des groupes contrôle (n=5), « sham » (n=3) et chargé (n=6) respectivement, comme le montre la figure 4.10. La croissance n'a pas été modifiée pour les vertèbres Cd5 d'un groupe à l'autre, ce résultat est basé sur l'absence de différence significative entre les trois groupes pour les vertèbres Cd5.

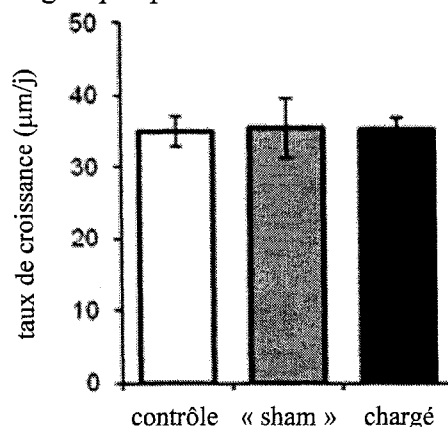


Figure 4. 10 : Taux de croissance des vertèbres Cd5.

4.2.4. Vertèbres caudales Cd9

Le taux de croissance moyen pour les vertèbres Cd9 a atteint $38,8 \pm 1,4$, $33,6 \pm 0,2$ et $35,4 \pm 4,1$ $\mu\text{m/j}$ pour les groupes contrôle (n=4), « sham » (n=2) et chargé (n=6) respectivement, comme le montre la figure 4.11. La croissance n'a pas été modifiée pour les vertèbres Cd9 d'un groupe à l'autre et aucune différence significative n'a été obtenue entre les trois groupes pour ces vertèbres.

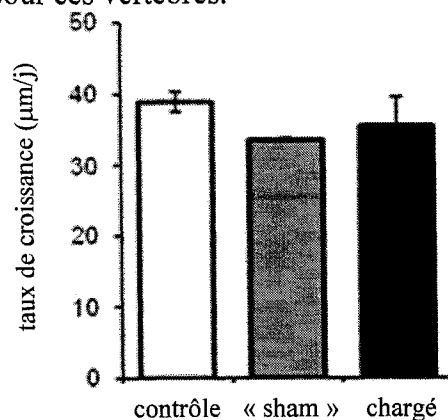


Figure 4. 11 : Taux de croissance des vertèbres Cd9.

4.3. Immunohistochimies et coloration à la safranine-O

La méthodologie utilisée est la même que celle décrite dans l'article ; les essais ont aussi été faits en triplicat.

4.3.1. Vertèbres caudales Cd5

4.3.1.1. Immunohistochimie pour le collagène de type II

La partie supérieure de la figure 4.12 présente les résultats des immunohistochimies pour le collagène de type II pour les vertèbres Cd5 des groupes contrôle (A, D), « sham » (B, E) et chargé (C, F). Les vertèbres sont présentées par une vue globale (A, B, C, où la barre représente 1 mm) et une vue à un grossissement plus important (D, E, F, G, où la barre représente 100 μ m). Le marquage (intensité et distribution) est resté le même dans tous les groupes. Un contrôle négatif n'a montré aucun marquage, tel qu'attendu (G).

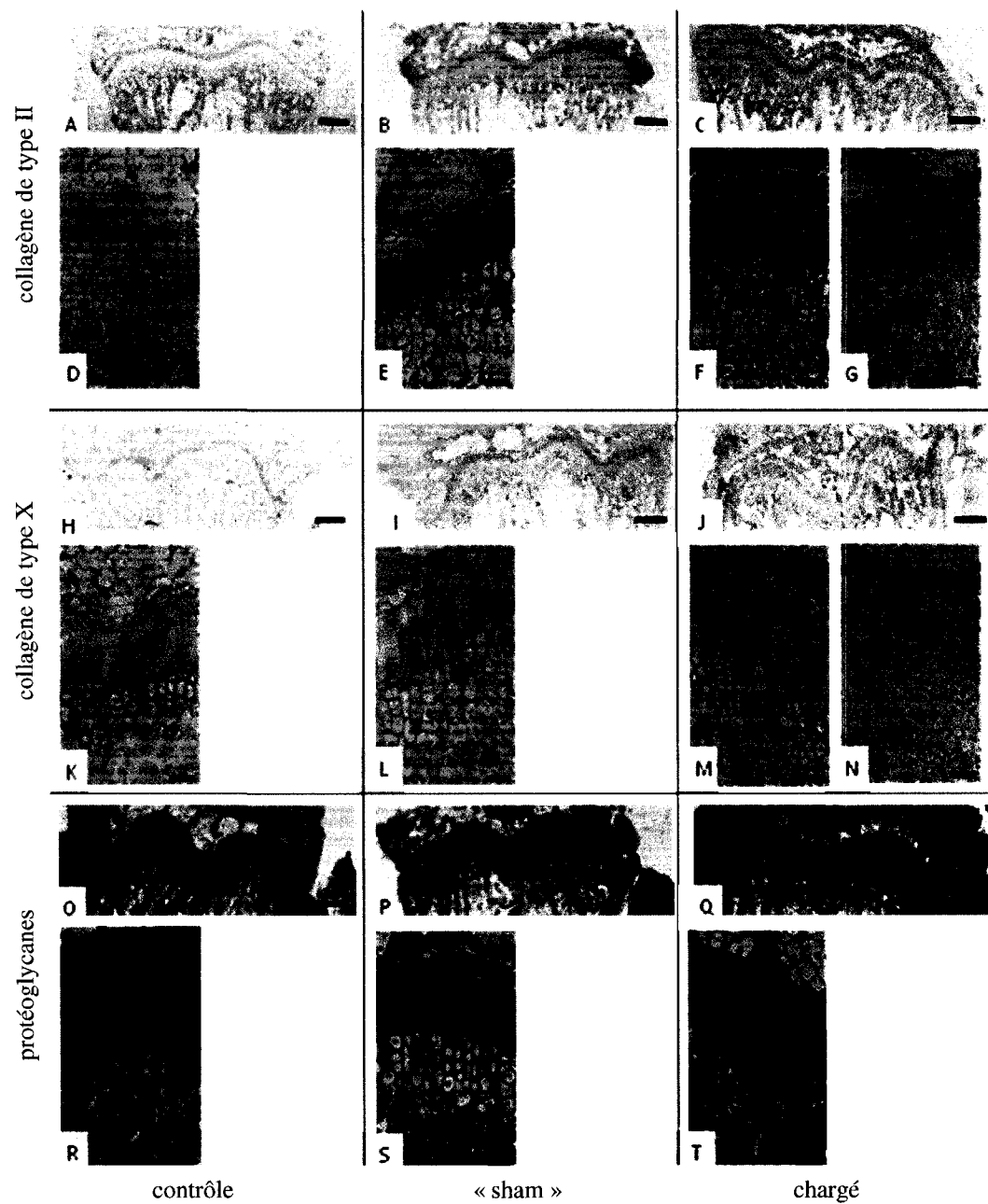


Figure 4. 12 : Immunohistochimies et coloration à la safranine-O pour les vertèbres Cd5.

4.3.1.2. Immunohistochimie pour le collagène de type X

La partie centrale la figure 4.12 présente les résultats pour le collagène de type X pour les vertèbres Cd5 des groupes contrôle (H, K), « sham » (I, L) et chargé (J, M). Les grossissements sont les mêmes que pour les essais pour le collagène de type II. Le marquage est un peu plus faible dans le groupe « sham » que dans les deux autres groupes. Un contrôle négatif n'a indiqué aucun marquage (N).

4.3.1.3. Coloration à la safranine-O pour les protéoglycanes

La partie inférieure de la figure 4.12 présente les résultats de la coloration à la safranine-O pour les vertèbres Cd5 des groupes contrôle (O, R), « sham » (P, S) et chargé (Q, T). Les vertèbres sont présentées aux mêmes grossissements que précédemment. Le marquage est demeuré le même dans tous les groupes.

4.3.2. Vertèbres caudales Cd9

4.3.2.1. Immunohistochimie pour le collagène de type II

La partie supérieure de la figure 4.13 présente les résultats pour le collagène de type II pour les vertèbres Cd9 des groupes contrôle (A, D), « sham » (B, E) et chargé (C, F). Les vertèbres sont présentées aux mêmes grossissements que pour la figure 4.12. Le marquage est demeuré inchangé pour les trois groupes. Un contrôle négatif a montré qu'il n'y avait aucun marquage (G).

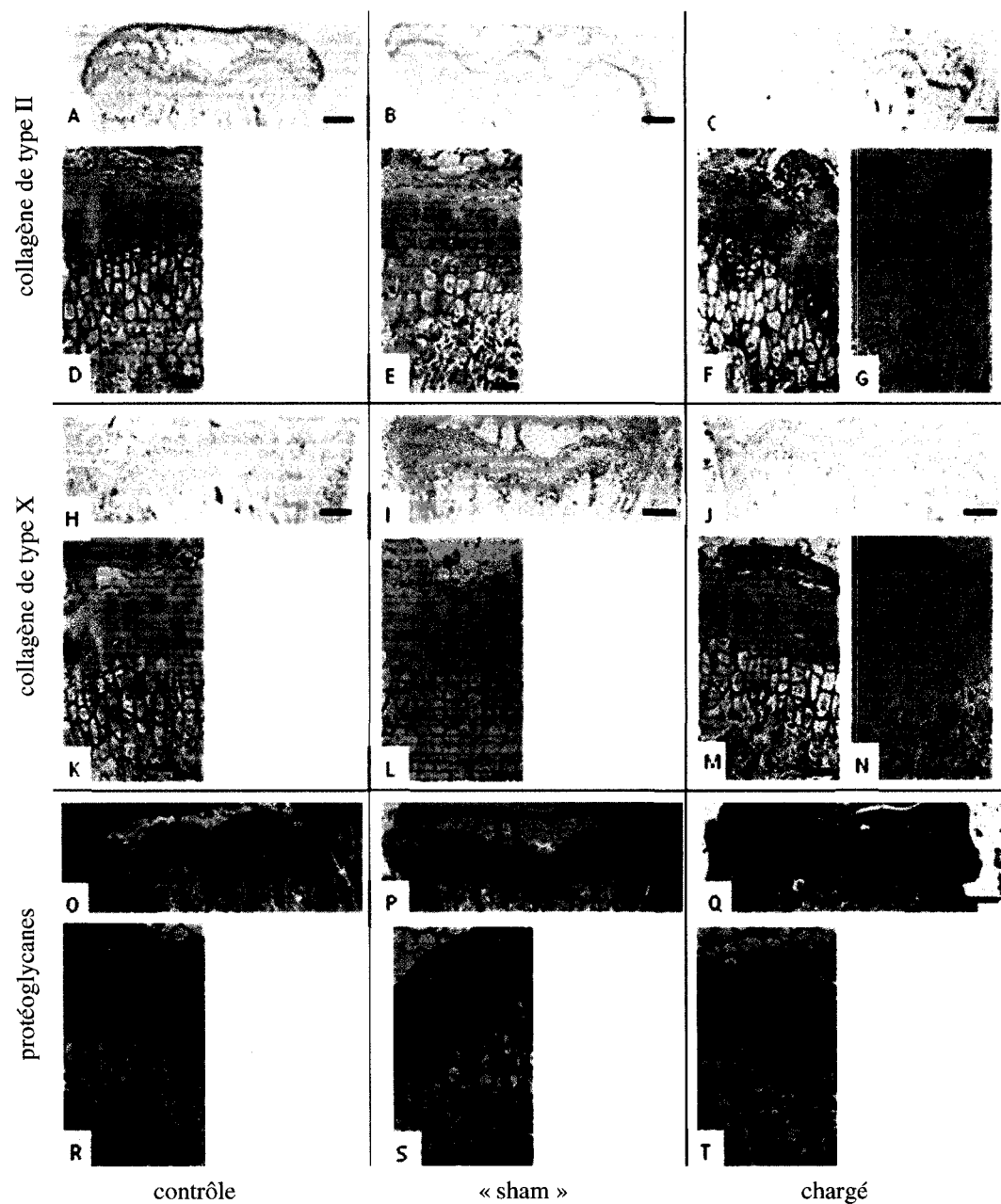


Figure 4. 13 : Immunohistochimies et coloration à la safranine-O pour les vertèbres Cd9.

4.3.2.2. Immunohistochimie pour le collagène de type X

La partie centrale de la figure 4.13 présente les résultats pour le collagène de type X pour les vertèbres Cd9 des groupes contrôle (H, K), « sham » (I, L) et chargé (J, M). Les spécimens vertébraux sont présentés aux mêmes grossissements que pour la figure 4.12. Le marquage est plus faible dans le groupe « sham » que pour les deux autres groupes. Un contrôle négatif n'a montré aucun marquage (N).

4.3.2.3. Coloration à la safranine-O pour les protéoglycanes

La partie inférieure de la figure 4.13 présente les résultats de la coloration à la safranine-O pour les vertèbres Cd9 des groupes contrôle (O, R), « sham » (P, S) et chargé (Q, T). Les vertèbres sont présentées aux mêmes grossissements que pour la figure 4.12. Aucun changement n'a été observé entre les trois groupes.

4.4. Analyses qRT-PCR

4.4.1. Vertèbres caudales Cd5

La figure 4.14 présente les résultats des qRT-PCR pour les vertèbres Cd5 pour les trois composants de la matrice extracellulaire investigués, dans l'ordre de gauche à droite : collagène de type II, collagène de type X et aggrécane. La figure 4.14A montre les résultats pour ΔCT , sachant que plus ΔCT est grand, moins le gène est exprimé. Les valeurs sont demeurées semblables dans les trois groupes pour les trois gènes ; aucune différence significative n'a été observée. La figure 4.14B montre le « fold change » entre deux groupes, c'est-à-dire les rapports des expressions d'un groupe par rapport à l'autre. Ainsi, le collagène de type II a été le plus exprimé dans le groupe chargé et le moins exprimé dans le groupe contrôle. La même tendance a été observée pour le collagène de type X et pour l'aggrécane.

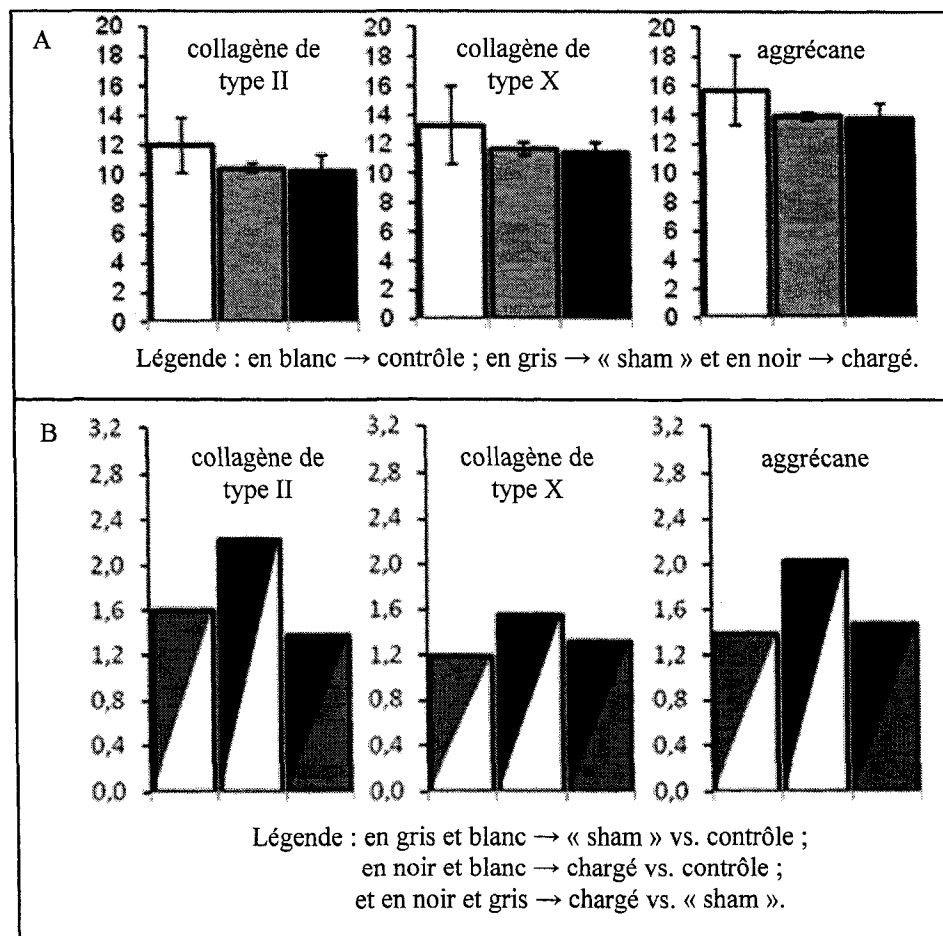


Figure 4. 14 : Résultats de qRT-PCR pour les composants de la matrice pour les vertèbres Cd5.

4.4.2. Vertèbres caudales Cd9

La figure 4.15 présente les résultats des qRT-PCR pour les vertèbres Cd9, pour les trois composants de la matrice extracellulaire investigués, dans l'ordre de gauche à droite : collagène de type II, collagène de type X et aggrécane. La figure 4.15A montre que les résultats pour ΔCT sont restés semblables dans les trois groupes pour le collagène de type X et l'aggrécane, et aucune différence significative n'a été obtenue. Par contre, pour le collagène de type II, une différence significative a été identifiée entre les groupes contrôle et chargé ($p < 0,05$ pour le test-t de Student). La figure 4.15B montre au moyen du « fold change » que le collagène de type II a été le plus exprimé dans le groupe chargé et le moins exprimé dans le groupe contrôle. Une tendance similaire a été

obtenue pour l'aggrécane. En ce qui concerne le collagène de type X, il a été autant exprimé dans les groupes chargé et « sham », et moins exprimé dans le groupe contrôle.

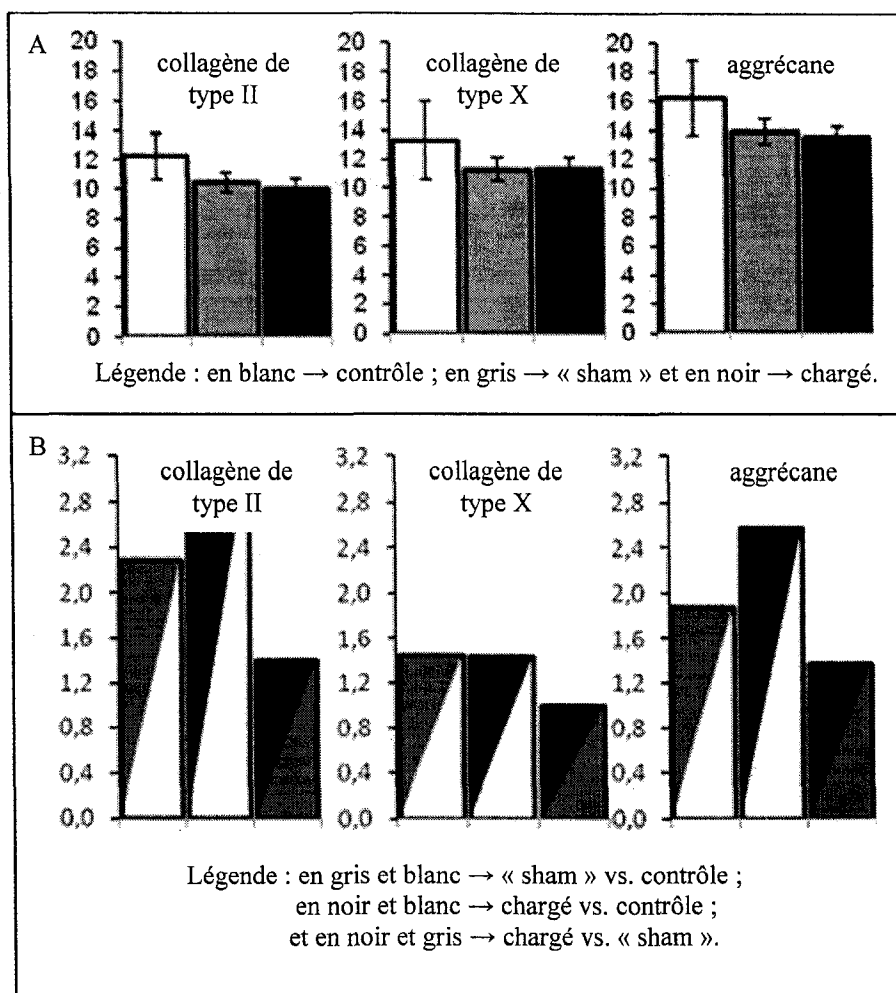


Figure 4. 15 : Résultats de qRT-PCR pour les composants de la matrice pour les vertèbres Cd9.

4.5. Mesures d'histomorphométrie sur la vertèbre caudale

4.5.1. Méthodologie

Quelques sections de vertèbres Cd7 des groupes contrôle (n=4) et chargé (n=5) enrobées dans le méthyl-métacrylate ont été utilisées pour des analyses histomorphométriques préliminaires à partir de colorations de Goldner-Masson. Les sections ont été déplastifiées en 1 heure, réhydratées dans l'alcool 100%, puis 95% et enfin 70%, pendant 2 minutes à chaque fois puis lavées dans de l'eau distillée pendant 1 minute. Les noyaux ont été colorés à l'hématoxyline de Weigert (ACP chemicals Inc., Montreal, QC, Canada) pendant 20 minutes et lavés dans l'eau distillée pendant 2 minutes. Ensuite, les sections ont été colorées au Fushine-ponceau (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) pendant 36 minutes et rincées dans de l'eau contenant de l'acide acétique glacial (1%). Puis, elles ont été plongées dans une solution d'Orange G (2% ; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) pendant 10 minutes, suivi d'un rinçage dans un autre bain d'eau contenant de l'acide acétique glacial (1%). Une contre-coloration a été effectuée au vert lumière (0,2% ; ACP chemicals Inc., Montreal, QC, Canada) pendant 45 minutes, suivie d'un rinçage dans de l'eau contenant de l'acide acétique glacial (1%).

Différents paramètres ont été mesurés sur les sections ainsi colorées, d'une part des paramètres caractérisant l'os cortical (aire totale du cortex, longueur du cortex, aire osseuse dans le cortex, aire des trous dans le cortex, nombre de trous) et d'autre part des paramètres caractérisant l'os trabéculaire (aire totale de l'os trabéculaire, aire des trabécules, épaisseur des trabécules, nombre de trabécules). Les spécimens ont été mesurés sur le champ visible au microscope à partir de 2000 μm après la zone hypertrophique de la plaque de croissance. Les mesures ont été effectuées par histomorphométrie grâce au logiciel Bioquant (version 6.90) aux grossissements x400 ou x100 suivant les paramètres. Elles ont permis de comparer la morphologie des tissus osseux vertébraux entre les groupes contrôle et chargé. Des photos représentatives de chaque groupe ont été prises.

4.5.2. Résultats

Le tableau 4.1 regroupe les résultats (moyenne $\pm$ SD) des mesures histomorphométriques effectuées et des paramètres calculés grâce à ces mesures. Les paramètres calculés à partir des mesures sont indiqués en gras dans le tableau.

L'aire individuelle des trous dans le cortex a augmenté dans le groupe chargé par rapport au groupe contrôle, de concert avec une augmentation du nombre de trous. Ainsi, la proportion de trous dans le cortex des vertèbres Cd7 du groupe chargé a augmenté par rapport au groupe contrôle. Pourtant, la quantité d'os dans le cortex est restée à peu près la même, ce qui est traduit par l'augmentation de l'épaisseur globale du cortex pour le groupe chargé par rapport au groupe contrôle. Ces observations sont visibles sur la figure 4.16.

Tableau 4. 1 : Mesures histomorphométriques pour les vertèbres Cd7 des groupes contrôle et chargé (moyenne $\pm$ SD).

Groupe	Contrôle	Chargé
N	4	5
Aire totale du cortex (mm ²)	0,67 $\pm$ 0,08	0,77 $\pm$ 0,11
Longueur du cortex (mm)	4301 $\pm$ 98	4405 $\pm$ 108
Aire osseuse dans le cortex (mm ²)	0,62 $\pm$ 0,08	0,67 $\pm$ 0,10
Aire des trous dans le cortex (mm ²)	0,05 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,03
Nombre de trous	27 $\pm$ 6	46 $\pm$ 15
Épaisseur du cortex (mm)	155$\pm$16	175$\pm$26
Aire des trous/ Nombre de trous (µm²)	1940$\pm$788	2238$\pm$795
Densité des trous dans le cortex (mm⁻²)	41$\pm$12	60$\pm$16
Proportion d'os dans le cortex (%)	92,6$\pm$1,3	87,5$\pm$3,0
Proportion de trous dans le cortex (%)	7,4$\pm$1,3	12,5$\pm$3,0
Aire totale de l'os trabéculaire (mm ²)	5,86 $\pm$ 0,33	5,60 $\pm$ 0,28
Aire des trabécules (mm ²)	0,96 $\pm$ 0,31	0,66 $\pm$ 0,16
Épaisseur des trabécules (µm)	43 $\pm$ 8	41 $\pm$ 5
Nombre de trabécules	3,7 $\pm$ 0,9	2,8 $\pm$ 0,5
Proportion des trabécules dans l'os trabéculaire (%)	16,6$\pm$6,0	11,7$\pm$2,6

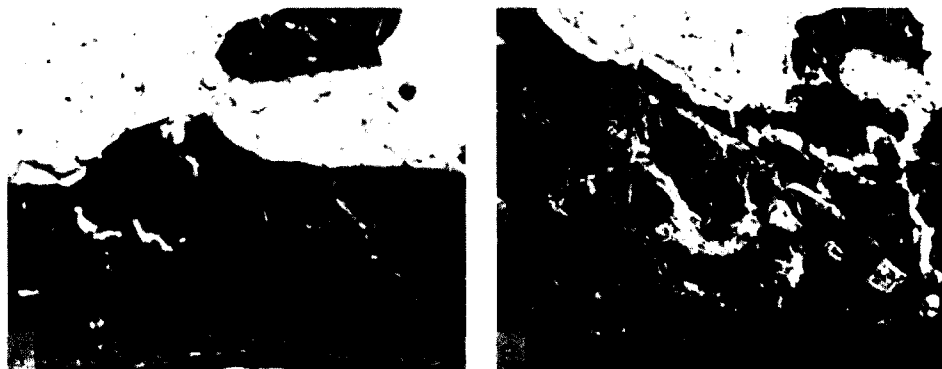


Figure 4. 16 : Coloration au Goldner-Masson de vertèbres Cd7 des groupes contrôle (A) et chargé (B).

4.6. Localisation des néofragments de collagène de type II

4.6.1. Méthodologie

Suite aux résultats obtenus, un troisième anticorps a été testé en immunohistochimie sur les plaques de croissance de vertèbres Cd7 des trois groupes, afin de localiser les néoépitopes du collagène de type II suite au clivage par la MMP-1 et la MMP-13. Le protocole n'est pas tout à fait le même que celui utilisé pour les collagènes de type II et X. Après avoir été déparaffinées, les lames sont déperoxydées par incubation dans du H_2O_2 (0.1% dans du PBS) pendant 30 minutes. Puis, elles sont incubées dans la trypsine (0.1% dans du PBS) pendant 12 minutes à température ambiante. Elles sont lavées dans de l'eau distillée pendant 5 minutes, puis dans du PBS pendant 5 minutes. Ensuite, les lames sont incubées dans du Triton (0,3% dans du PBS) pendant 30 minutes et lavées dans du PBS à l'aide de trois bains de 5 minutes chacun. Les lames sont alors incubées avec le sérum normal pendant 1 heure, puis avec l'anticorps (2 μ g/ml ; MabF46, Nordic Bioscience) à 4°C pendant la nuit. Le lendemain, les lames sont lavées dans trois bains de PBS de 5 minutes chacun, puis elles sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-souris (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) pendant 45 minutes à température ambiante. Puis les lames sont lavées dans trois bains de PBS de 5 minutes chacun avant d'être colorés par la méthode du complexe « avidin-biotin » (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) pendant 45 minutes, lavées encore trois

fois dans le PBS, une fois dans l'eau distillée et incubées avec la DAB (Dako Diagnostics Inc, Mississauga, ON, Canada) pendant 15 minutes. La suite est la même que pour les autres essais d'immunohistochimie.

4.6.2. Résultats

Les résultats obtenus pour le collagène de type II clivé sont présentés par la figure 4.17. Dans le groupe contrôle, le signal est localisé dans la zone proliférative de la plaque de croissance. Il est d'intensité beaucoup plus importante dans la zone minéralisée à la jonction métaphysaire de la plaque de croissance. Dans le groupe « sham », le signal est beaucoup diminué. Il est absent de la plaque de croissance et faiblement détecté dans la zone minéralisée. Dans le groupe chargé, le signal est inexistant.

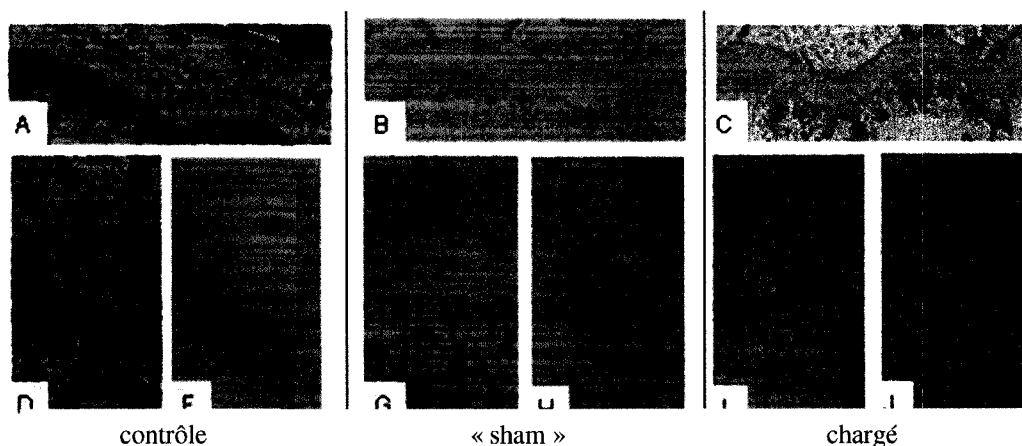


Figure 4. 17 : Immunohistochimie pour le collagène de type II clivé par la MMP-1 et la MMP-13 pour les vertèbres Cd7.

CHAPITRE 5 : Discussion générale

Dans le cadre de ce projet de maîtrise, il a été montré que :

- un chargement statique en compression de 0.2 MPa appliqué sur la vertèbre Cd7 de jeunes rats pendant 15 jours, ralentissait significativement leur croissance ;
- l'expression du collagène de type II dans la matrice extracellulaire a été diminuée dans 83% des rats chargés et celle du collagène de type X dans 50% des rats chargés ;
- la production de leurs ARNm respectifs n'a pas été diminuée ;
- l'expression des ARNm des métalloprotéinases, enzymes connues comme dégradants spécifiquement les collagènes par clivage protéolytique (MMP-3, MMP-13), n'a pas augmenté significativement ;
- le collagène de type II clivé par la MMP-1 et la MMP-13, localisé par immunohistochimie, n'existe plus dans les plaques de croissance des rats chargés contrairement à celles des rats contrôles ;
- aucun changement n'a été détecté pour l'aggrécane à quelque niveau que ce soit ni pour elle ni pour ses enzymes dégradatrices (ADAMTS-4 et -5) ;
- le chargement mécanique a aussi modifié la morphologie osseuse de la vertèbre Cd7, en plus de son impact sur la plaque de croissance.

Les mesures de croissance effectuées sur les vertèbres des rats contrôles ont montré l'importance de ce groupe. En effet, les taux de croissances mesurés se sont avérés significativement différents pour les vertèbres Cd5 et Cd7 mais pas pour les vertèbres Cd7 et Cd9. Cet essai a permis de constater que le taux de croissance normale des vertèbres caudales du rat augmente distalement mais de façon non-linéaire. Les taux de croissance mesurés pour les vertèbres Cd4 dans chaque sous-groupe de rats ont prouvé qu'on pouvait bien comparer les rats d'un même groupe destiné à des essais biologiques différents. En effet, le taux de croissance s'est avéré le même dans les deux sous-groupes de chaque groupe. Considérant que les rats ont été manipulés de la même façon dans les différents groupes avant leur sacrifice, il a été conclu qu'il était adéquat de considérer que les modifications observées pour les rats d'un sous-groupe étaient encore

vraies pour les autres rats du même groupe. Les taux de croissance mesurés pour les vertèbres Cd5 et Cd9 ont montré que l'appareil de chargement n'avait pas eu d'effet sur eux. En effet, les taux de croissance mesurés pour ces vertèbres sont similaires dans les trois groupes. Ces contrôles internes confirment donc que les différences observées pour les taux de croissance mesurés pour la vertèbre Cd7 sont bien dues à l'appareil et surtout au chargement induit par l'appareil.

Les résultats des immunohistochimies et de la coloration à la safranine-O pour les vertèbres Cd5 et Cd9 ont confirmé que les diminutions observées pour les collagènes dans les vertèbres Cd7 du groupe chargé par rapport aux autres groupes étaient liées au chargement mécanique. En effet, les résultats obtenus pour les vertèbres Cd5 pour le collagène de type II par immunohistochimie ont bien confirmé que les rats avaient une distribution comparable de cette protéine dans la matrice extracellulaire de la plaque de croissance lors de leur croissance normale. Par contre, dans les essais pour le collagène de type X, une diminution du signal a été observée dans le groupe « sham ». Cette observation pourrait être associée à une variabilité inter-animale liée au petit nombre de rats étudiés dans le groupe « sham ». Les colorations à la safranine-O ont montré quant à elles que les rats étaient bien comparables dans la distribution des protéoglycanes dans la matrice extracellulaire lors de leur croissance normale. Les mêmes conclusions peuvent être tirées pour les vertèbres Cd9 pour les trois essais.

Les résultats des qRT-PCR des trois composants principaux de la matrice pour les vertèbres Cd5 ont montré que les trois groupes étaient comparables en ce qui concerne leur croissance normale, ce qui confirme les résultats obtenus pour Cd7, c'est-à-dire que le chargement n'avait aucune influence sur l'expression des gènes des composants principaux de la matrice. Ce ne fut pas tout à fait le cas pour les vertèbres Cd9, puisque dans le cas du collagène de type II, une différence significative a été observée entre les groupes contrôle et chargé. Cette différence devrait cependant être mise en perspective car une grande variabilité a été obtenue dans les valeurs pour le groupe contrôle.

L'étude histomorphométrique, bien que préliminaire, semble indiquer que le chargement a eu un impact sur la morphologie et l'histologie de la vertèbre en plus d'en modifier sa croissance par le biais de la plaque de croissance. C'est probablement parce que l'étude portait sur un chargement à long terme (2 semaines) que les changements ont pu être visibles. Ces modifications morphologiques sont vraisemblablement dues à un changement dans le remodelage osseux. En effet, l'os mature, tant compact que trabéculaire, est en permanence soumis à ce processus qui lui permet de s'adapter quand les charges mécaniques sont modifiées. Dans le cas présent, l'os a perdu en densité puisqu'il contient plus de trous, ce qui pourrait avoir pour conséquence de le fragiliser.

L'étude du collagène de type II clivé par la MMP-1 et la MMP-13 a montré que ce processus de clivage n'avait plus lieu ni dans les plaques de croissance, ni dans la zone minéralisée à la jonction avec la zone hypertrophiques, pour les vertèbres Cd7 des rats chargés contrairement à celles des rats contrôles. L'effet principal semble cependant être intervenu lors de la pose de l'appareil et non en réponse au chargement statique induit, puisque le signal avait déjà beaucoup diminué dans le groupe « sham ». La localisation observée pour le signal dans le groupe contrôle est en accord avec une étude de Nagai et al. qui montre que la MMP-13 est détectée à la jonction osséochondrale avec la métaphyse dans des vertèbres de rats [127]. Ces résultats confirment que la réduction du collagène de type II dans la matrice extracellulaire de la plaque de croissance ne peut être expliquée par l'action des enzymes protéolytiques le dégradant. Par ailleurs, le signal pour le collagène de type II clivé par la MMP-1 et la MMP-13 ayant disparu dans la plaque de croissance et dans la zone de minéralisation proche de la zone hypertrophique des rats chargés, on s'attendrait à ce que ce soit dû à une diminution de la production des enzymes protéolytiques (MMP-1 et MMP-13) produisant ces fragments de collagène de type II. Or, ce n'est pas ce qui est observé, au moins dans le cas de la production des ARNm de MMP-13, celle-ci étant restée sensiblement la même dans les trois groupes. Il se peut donc que l'ARNm de cette enzyme ne soit pas traduit normalement du fait du chargement.

D'autres limites doivent être prises en compte dans cette étude en plus de celles détaillées dans l'article. Tout d'abord, le nombre de spécimens observés était restreint. En particulier, parmi les études complémentaires, les deux études préliminaires (soit celle de localisation du collagène de type II clivé par la MMP-1 et la MMP-13 par immunohistochimie et celle d'histomorphométrie) ont été menées sur un nombre plus limité de sections que les autres études. Le collagène de type II clivé n'a été étudié qu'en duplicat et seulement sur les vertèbres Cd7, et les études histomorphométriques n'ont été menées que sur 4 sections de vertèbres Cd7 de rats contrôles et 5 sections de vertèbres Cd7 de rats chargés. Ainsi, les contrôles internes (Cd5 et Cd9) n'ont pas été investigués, ni même le groupe « sham » en ce qui concerne l'étude histomorphométrique. Il serait donc important de faire les contrôles complémentaires et pour l'histomorphométrie d'investiguer le groupe « sham » afin de vérifier que le changement de morphologie est bien dû au chargement de l'appareil et non à la seule pose de l'appareil sur la queue du rat (du fait du poids de l'appareil et/ou de la réduction de mobilité des vertèbres caudales instrumentées).

Par ailleurs, différentes limites techniques rencontrées dans le protocole chirurgical et de chargement du rat ont pu causer des variations dans les résultats des différents essais. En ce qui concerne la charge appliquée, sa précision était limitée par la méthode de mesure des longueurs des ressorts effectuée tous les quatre jours lors de leur recalibration, la mesure étant faite à l'aide d'un micromètre à l'œil nu. La recalibration ne pouvait pas être faite plus souvent que tous les quatre jours, parce que pour un délai plus court, le changement de longueur des ressorts, nécessaire pour compenser la croissance transverse de la vertèbre caudale Cd7, n'était alors pas discernable à l'œil nu. De plus, l'aire de la vertèbre a été approximée comme étant circulaire, ce qui peut aussi induire une erreur dans l'estimation exacte de la longueur nécessaire du ressort pour maintenir une contrainte de 0,2 MPa. En outre, si les tiges ne sont pas en tension lors de leur installation pour lier l'appareil aux vertèbres, une partie du chargement est perdu car il sert seulement à la mise en tension de la tige nécessaire pour ensuite transmettre la force de compression due au chargement. Par ailleurs, l'orientation du chargement a peut-être

aussi été modifiée lors de l'installation de l'appareil. D'abord, si la tige n'est pas installée parfaitement perpendiculairement à l'axe longitudinal de l'os, cela modifie le moment des forces appliquées et leur nature (ce n'est plus de la compression pure). Ensuite, le pliage des tiges à leur extrémité libre une fois en place dans la vertèbre aurait pu induire une flexion de la broche et ainsi en dévier la direction. Enfin, le poids de l'appareil (21 g) ajoutait une force transversale parasite sur la vertèbre. Le rat pesant en moyenne 79 g lors de la chirurgie, la queue devait supporter un poids supplémentaire non négligeable, qui a pu avoir des effets sur la croissance non seulement de la vertèbre Cd7 mais aussi des vertèbres proximales à l'appareil. C'est pourquoi il était important de faire un groupe « sham ». Ce groupe a d'ailleurs aussi permis de prendre en compte la réduction de mobilité entre les vertèbres caudales instrumentées induite par l'installation de l'appareil, ce qui aurait aussi pu ralentir la croissance.

Le modèle étudié, i.e le rat, a le désavantage de ne pas toujours permettre l'étude des différentes protéines à l'aide d'anticorps. Ces derniers ne sont pas toujours spécifiques pour le rat du fait de la structure légèrement différente de certains gènes. Par ailleurs, lors du partage des vertèbres en deux durant la dissection, certaines se sont brisées et sont donc devenues inutilisables pour les essais histologiques auxquelles elles étaient destinées. Par la suite, le prélèvement a été fait de façon à appliquer une force de cisaillement avec le scalpel et non par compression directe comme cela avait été le cas auparavant. De plus, lors de l'isolation des plaques de croissance destinées à la qRT-PCR, la taille des plaques de croissance limitait la précision de la procédure réalisée à l'œil nu. En effet une vertèbre caudale de rat a un diamètre inférieur au centimètre, sans mentionner l'épaisseur de la plaque de croissance. Ces problèmes d'échelle ont diminué la répétabilité de cette méthode. Dans des études ultérieures, l'emploi de loupes serait souhaitable. En outre, non seulement différents phénotypes cellulaires ont été regroupés puisqu'on extrait les chondrocytes des différentes zones, mais il est aussi possible que d'autres types cellulaires aient été extraits, en particulier des cellules osseuses, car la plaque a une structure ondulée dans l'os et il est difficile, voire impossible, d'en avoir suivi les contours avec précision à l'œil nu. Dans ce cas, un changement qui aurait eu

lieu seulement dans les chondrocytes n'a peut-être pas été détecté, en particulier s'il a eu lieu seulement dans une seule des zones de la plaque de croissance, puisque les différentes zones n'ont pue être étudiées séparément. Une autre limitation se situe au niveau de la quantité d'ARN que nous avons pu obtenir. En effet, la plaque de croissance récupérée est constituée de cartilage. Ce dernier étant constitué de matrice dans laquelle les chondrocytes baignent, la quantité d'ARN est donc limitée (maximum 24,5 µg).

Au niveau des techniques biologiques, il n'a pas été possible de faire toutes les mesures de croissance prévues. En effet, les injections de calcéine n'ont pas toujours été faites en voie intrapéritonéale comme le protocole le requérait (par manque d'expertise dans l'anatomie du rat), et la calcéine n'a donc pas pu atteindre les sites en minéralisation active dans les os. Dans ces cas, il n'y avait alors qu'une marque de croissance visible au lieu de deux, ce qui n'a pas permis pas de mesurer la croissance.

Une autre limite de l'étude concerne la méthodologie pour la détection du collagène de type X par immunohistochimie, car un signal non spécifique dans la zone proliférative de la plaque de croissance a été détecté à plusieurs reprises. Des essais complémentaires utilisant d'autres protocoles ont été menés, mais aucun n'a donné de meilleurs résultats à ce jour. Il se pourrait que le problème vienne de l'anticorps lui-même qui se lierait à un autre composant que le collagène de type X par ce qu'on appelle une réaction croisée.

Lors de ce projet de maîtrise, différents types de contrôles ont été utilisés que ce soit des contrôles inter-animaux ou intra-animaux, ce qui a permis d'identifier avec plus de certitude l'effet du chargement mécanique sur la plaque de croissance et de s'assurer que les différences observées pouvaient être considérées significatives. Dans l'ensemble, on a observé une bonne répétabilité de la méthode de mesures de croissance. De plus, les mesures faites sur les contrôles internes Cd4 ont permis de s'assurer que les rats des différents sous-groupes étaient comparables. Le modèle animal du rat a été choisi pour sa commodité d'hébergement de par sa petite taille, tout en étant déjà assez grand pour rendre possible la réalisation des différents essais biologiques. En effet, il aurait été

impossible d'isoler la plaque de croissance pour la qRT-PCR sur une vertèbre caudale de souris. De plus, ces animaux ont l'avantage d'avoir des vertèbres caudales, comparables aux os longs humains, et d'être en plus faciles d'accès. Au niveau des essais biologiques, l'utilisation des techniques d'immunohistochimie et de coloration à la safranine-O ont fourni l'avantage de montrer la distribution du signal dans la plaque de croissance alors que la technique de qRT-PCR a eu l'avantage de donner une mesure quantifiée de la production des ARNm. La coloration de Goldner-Masson, qui a été utilisée pour l'histomorphométrie, est une méthode de choix, d'autant plus qu'elle permet de compléter l'investigation du remodelage osseux par des marquages biochimiques.

CHAPITRE 6 : Conclusion et recommandations

Ce projet de maîtrise consistait dans un premier temps à mettre au point des essais biologiques permettant de caractériser les composants principaux et les molécules clés connues pour leur propriété de dégradation de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance. Le second objectif visait à solliciter mécaniquement *in vivo* des plaques de croissance d'un modèle animal pour un niveau de chargement et un stade de croissance. Finalement, il s'agissait de quantifier la modulation mécanique résultante et de définir l'effet *in vivo* du chargement sur la matrice extracellulaire par rapport à la croissance du contrôle « normal » à l'aide d'essais biologiques.

Les résultats de ce projet ont montré qu'un chargement statique en compression de 0.2 MPa appliqué sur la vertèbre Cd7 de jeunes rats pendant 15 jours, ralentissait significativement la croissance de cette vertèbre, ce qui est en accord avec la loi de Hueter-Volkmann. Cette modulation mécanique a été observée en parallèle avec des changements dans la composition de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance. La diminution d'expression des collagènes de type II et X peut signifier que les processus de prolifération et d'hypertrophie ont été altérés car le processus normal de remodelage de la matrice est nécessaire pour permettre le bon déroulement de ces mécanismes de croissance cellulaire. De plus le collagène de type II, mais aussi probablement le collagène de type X, ayant un rôle structural dans la plaque de croissance, une réduction de leur expression peut signifier que la capacité de la plaque de croissance à supporter un chargement mécanique est diminuée.

Cependant, ces changements n'ont pu être associés ni à une diminution de la production de leurs ARNm respectifs ni à une surexpression de la MMP-13, une enzyme de la famille des métalloprotéines conduisant à un clivage protéolytique spécifique du collagène de type II. Par ailleurs, le collagène de type II clivé par la MMP-1 et la MMP-13, localisé par immunohistochimie, n'a pas été localisé dans les plaques de croissance des rats chargés contrairement aux rats contrôles. Il est donc probable que les fibres de collagènes aient été détruites mécaniquement du fait du chargement en compression, ce

mécanisme ayant déjà été observé pour le collagène de type II dans le cartilage articulaire. L'aggrécane a aussi été investiguée mais aucun changement n'a été détecté à quelque niveau que ce soit ni pour elle ni pour ses enzymes dégradatrices (ADAMTS-4 et -5). Par ailleurs, en plus d'avoir perturbé l'arrangement colonnaire des chondrocytes et d'avoir visiblement diminué l'épaisseur de la plaque de croissance, le chargement mécanique a aussi modifié la morphologie osseuse de la vertèbre Cd7. En effet, les vertèbres chargées ont un cortex plus épais mais aussi plus poreux que les contrôles.

L'hypothèse de recherche, selon laquelle un chargement statique en compression ralentit la croissance longitudinale à travers des changements dans la matrice extracellulaire de la plaque de croissance et, plus précisément, la réduction de la synthèse des composants de cette matrice, est donc partiellement confirmée. En effet, la croissance a été ralentie et la composition de la matrice modifiée mais vraisemblablement pas par une réduction de la synthèse des composants puisque la production d'ARNm n'a pas changé.

Les principales limites du projet résident dans le nombre limité de rats étudiés particulièrement en ce qui concerne le groupe « sham », la technique d'isolation des plaques de croissance pour la qRT-PCR, le protocole d'immunohistochimie pour le collagène de type X, et enfin le fait qu'une seule technique ait été utilisée pour chaque type de résultats d'essai biologique.

En contrepartie, cette étude est la première à compléter à la fois des mesures de taux de croissance et à étudier la composition de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance, tant au niveau protéique que génique, pour voir l'influence d'un chargement mécanique statique sur la croissance longitudinale. Elle a aussi l'avantage d'avoir permis un contrôle précis de la contrainte exercée en contrôlant la force exercée sur la vertèbre et en estimant l'évolution du diamètre vertébral en fonction de l'âge du rat. Enfin, cette étude a l'avantage d'avoir utilisé plusieurs types de contrôles pour s'assurer que les résultats observés sont bien dus au chargement en compression.

Les connaissances découlant de cette étude, tout comme d'autres études mécanobiologiques de la plaque de croissance, permettront de mieux comprendre le processus de modulation mécanique de croissance et de fournir une base plus scientifique au traitement médical des déformations squelettiques progressives. Elles pourraient à long terme avoir un impact sur le développement des nouvelles stratégies de traitements orthopédiques. Les connaissances des mécanismes de contrainte par l'environnement des os en croissance sont essentielles pour l'amélioration des interventions invasives et le développement de nouvelles techniques non-invasives.

Les quelques recommandations suivantes pourront être utiles pour la suite du projet. Dans un premier temps, des études complémentaires pourraient être menées pour :

- vérifier les résultats obtenus en utilisant d'autres techniques biologiques complémentaires pour confirmer les résultats présents. Par exemple, les résultats au niveau de la diminution de l'expression des protéines de collagène de type II et X pourraient être vérifiés par un « western blot », ou encore les ARNm des collagènes pourrait être localisés dans les différentes zones de la plaque de croissance par hybridation *in situ*, et ainsi confirmer si l'expression est restée la même entre les 3 groupes ;
- optimiser la techniques d'immunohistochimie pour le collagène de type X en modifiant d'autres paramètres que ceux déjà testés du protocole actuel, pour éliminer le signal non spécifique dans la zone proliférative ;
- confirmer les résultats présents sur un plus grand nombre de rats, en particulier pour le groupe « sham » ;
- investiguer les causes du changement observé pour les deux collagènes. En particulier, il serait pertinent de tester l'hypothèse d'une dénaturation mécanique des protéines de collagène. Par exemple, l'anticorps « AC col2 3/4M » pourrait être testé en comparant le résultat obtenu avec celui dû à l'anticorps « AC col2 3/4C short » pour détecter si et où le collagène de type II est dégradé du fait de l'action mécanique comme l'ont fait Wilson et al. dans une étude sur le cartilage articulaire [165].

Par la suite, le projet pourrait être développé sur de nombreux aspects. Par exemple, de nouvelles études pourraient avoir pour objectif de :

- modifier l'appareil de chargement afin qu'il permette la compensation de la croissance longitudinale qui a lieu au cours du chargement ;
- compléter les expériences pour un stade de chargement plus élevé, mais n'interrompant pas la croissance, afin de confirmer les diminutions observées dans cette étude ;
- étudier d'autres stades de croissance du rat pour vérifier si les résultats sont les mêmes quand le taux de croissance est plus faible ;
- modifier la durée de chargement pour mesurer plus précisément l'influence de ce paramètre ;
- investiguer un autre modèle animal pour vérifier si les observations restent les mêmes pour des animaux de plus grande taille et donc plus près de l'homme, comme le modèle animal du chien ;
- investiguer d'autres os du même animal pour caractériser la modulation de croissance dans des situations de chargement naturel différentes. Par exemple, le tibia du rat est soumis en permanence au poids de l'animal, ce qui le met dans une situation de chargement naturel plus élevé que la vertèbre caudale ;
- étudier d'autres composants ou d'autres régulateurs du fonctionnement de la plaque de croissance comme la boucle de rétroaction IHH/PTHrP. En effet, cette boucle est essentielle à la régulation de la croissance pour équilibrer la prolifération et l'hypertrophie dans la plaque de croissance, en particulier lors du développement prénatal, mais probablement aussi lors du développement postnatal.

Enfin pour mieux comprendre la mécanobiologie de la plaque de croissance, des études mécanobiologiques pourraient être réalisées en investigant d'autres types de chargements mécaniques, en particulier le chargement dynamique, pour en déterminer l'influence sur la croissance longitudinale et/ou le remodelage osseux.

Bibliographie

- [1] J. Alvarez, M. Balbin, F. Santos, M. Fernandez, S. Ferrando, and J. M. Lopez, "Different bone growth rates are associated with changes in the expression pattern of types II and X collagens and collagenase 3 in proximal growth plates of the rat tibia," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 15, pp. 82-94, 2000.
- [2] I. A. Stokes, J. Gwadera, A. Dimock, C. E. Farnum, and D. D. Aronsson, "Modulation of vertebral and tibial growth by compression loading: diurnal versus full-time loading," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 23, pp. 188-195, 2005.
- [3] I. A. Stokes, D. D. Aronsson, A. N. Dimock, V. Cortright, and S. Beck, "Endochondral growth in growth plates of three species at two anatomical locations modulated by mechanical compression and tension," *J Orthop Res*, vol. 24, pp. 1327-34, 2006.
- [4] I. A. Stokes, K. C. Clark, C. E. Farnum, and D. D. Aronsson, "Alterations in the growth plate associated with growth modulation by sustained compression or distraction," *Bone*, vol. 41, pp. 197-205, 2007.
- [5] C. E. Farnum, A. Nixon, A. O. Lee, D. T. Kwan, L. Belanger, and N. J. Wilsman, "Quantitative three-dimensional analysis of chondrocytic kinetic responses to short-term stapling of the rat proximal tibial growth plate," *Cells Tissues Organs*, vol. 167, pp. 247-258, 2000.
- [6] I. Villemure, M. A. Chung, C. S. Seck, M. H. Kimm, J. R. Matyas, and N. A. Duncan, "Static compressive loading reduces the mRNA expression of type II and X collagen in rat growth-plate chondrocytes during postnatal growth," *Connective Tissue Research*, vol. 46, pp. 211-219, 2005.
- [7] A. Reich, N. Jaffe, A. Tong, I. Lavelin, O. Genina, M. Pines, D. Sklan, A. Nussinovitch, and E. Monsonego-Ornan, "Weight loading young chicks inhibits bone elongation and promotes growth plate ossification and vascularization," *J Appl Physiol*, vol. 98, pp. 2381-9, 2005.
- [8] A. Niehoff, U. G. Kersting, F. Zaucke, M. M. Morlock, and G.-P. Brüggemann, "Adaptation of mechanical, morphological, and biochemical properties of the rat growth plate to dose-dependant voluntary exercise," *Bone*, vol. 35, pp. 899-908, 2004.
- [9] N. Ohashi, A. G. Robling, D. B. Burr, and C. H. Turner, "The effects of dynamic axial loading on the rat growth plate," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 17, pp. 284-292, 2002.
- [10] M.-A. Pépin, "Première partie : Structure et physiologie des tissus de soutien, Chapitre 2 : Le système osseux," in *Systèmes osseux et musculaires*, E. Vivantes, Ed., 1981, pp. 13-33.
- [11] E. N. Marieb, *Anatomie et physiologie humaines*, vol. 1, 3ème ed. Saint-Laurent: ERPI, 2005.

- [12] B. F. LeVeau and D. B. Bernhardt, "Effect of forces on the growth, development, and maintenance of the human body," *Physical Therapy*, vol. 64, pp. 1874-1882, 1984.
- [13] J.-F. Stoltz and X. Wang, "From biomechanics to mechanobiology," *Biorheology*, vol. 39, pp. 5-10, 2002.
- [14] E. B. Hunziker, R. K. Schenk, and L. M. Cruz-Orive, "Quantitation of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth," *J Bone Joint Surg Am*, vol. 69, pp. 162-73, 1987.
- [15] E. B. Hunziker and R. K. Schenk, "Physiological mechanisms adopted by chondrocyte regulating longitudinal bone growth in rats," *Journal of Physiology*, vol. 414, pp. 55-71, 1989.
- [16] L. J. Sandell, J. V. Sugai, and S. B. Trippel, "Expression of collagens I, II, X and XI and aggrecan mRNAs by bovine growth plate chondrocytes in situ," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 12, pp. 1-14, 1994.
- [17] H. I. Roach and N. M. P. Clarke, "Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis," *The Journal of Bone & Joint Surgery*, vol. 82-B, pp. 601-613, 2000.
- [18] B. C. J. Van der Eerden, M. Karperien, E. F. Gevers, C. W. G. M. Löwik, and J. M. Wit, "Expression of Indian hedgehog, parathyroid hormone-related protein, and their receptors in the postnatal growth plate of the rat: evidence for a locally acting growth restraining feedback loop after birth," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 15, pp. 1045-1055, 2000.
- [19] J. Weisser, S. Riemer, M. Schmidl, L. J. Suva, E. Pöschl, R. Bräuer, and K. von der Mark, "Four distinct chondrocyte populations in the fetal bovine growth plate: highest expression levels of PTH/PTHrP receptor, Indian hedgehog, and MMP-13 in hypertrophic chondrocytes and their suppression by PTH (1-34) and PTHrP (1-40)," *Experimental Cell Research*, vol. 279, pp. 1-13, 2002.
- [20] C. E. Farnum and N. J. Wilsman, "Determination of proliferative characteristics of growth plate chondrocytes by labeling with bromodeoxyuridine," *Calcified tissue international*, vol. 52, pp. 110-119, 1993.
- [21] F. Greco, L. d. Palma, N. Specchia, and M. Mannarini, "Growth-plate cartilage metabolic response to mechanical stress," *Journal of Pediatric Orthopaedics*, vol. 9, pp. 520-524, 1989.
- [22] A. R. Poole, Y. Matsui, A. Hinek, and E. R. Lee, "Cartilage macromolecules and the calcification of cartilage matrix," *Anat Rec*, vol. 224, pp. 167-79, 1989.
- [23] N. Balmain, D. Leguellec, A. Elkak, G. Nars, R. Toury, and D. Schoevaert, "Zonal variations of types II, IX and XI collagen mRNAs in rat epiphyseal cartilage chondrocytes: quantitative evaluation of in situ hybridization by image analysis of radioautography," *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, vol. 41, pp. 197-212, 1995.
- [24] M. Suttmüller, J. A. Bruijn, and E. de Heer, "Collagen types VIII and X, two non-fibrillar, short-chain collagens. Structure homologies, functions and involvement in pathology," *Histol Histopathol*, vol. 12, pp. 557-66, 1997.

- [25] D. R. Eyre and J. J. Wu, *Structure and function of collagen types*, Mayne, R. and Burgeson, R.E. ed. London: Academic Press, 1987.
- [26] W. W. Robertson, Jr., "Newest knowledge of the growth plate," *Clin Orthop Relat Res*, pp. 270-8, 1990.
- [27] P. Bruckner, L. Vaughan, and K. H. Winterhalter, "Type IX collagen from sternal cartilage of chicken embryo contains covalently bound glycosaminoglycans," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 82, pp. 2608-12, 1985.
- [28] M. van der Rest and R. Mayne, "Type IX collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross-linked to type II collagen," *J Biol Chem*, vol. 263, pp. 1615-8, 1988.
- [29] D. R. Eyre, S. Apon, J. J. Wu, L. H. Ericsson, and K. A. Walsh, "Collagen type IX: evidence for covalent linkages to type II collagen in cartilage," *FEBS Lett*, vol. 220, pp. 337-41, 1987.
- [30] M. Diab, J. J. Wu, and D. R. Eyre, "Collagen type IX from human cartilage: a structural profile of intermolecular cross-linking sites," *Biochem J*, vol. 314 (Pt 1), pp. 327-32, 1996.
- [31] F. Ruggiero, B. Petit, M. C. Ronziere, J. Farjanel, D. J. Hartmann, and D. Hergbage, "Composition and organization of the collagen network produced by fetal bovine chondrocytes cultured at high density," *J Histochem Cytochem*, vol. 41, pp. 867-75, 1993.
- [32] R. T. Ballock and R. J. O'Keefe, "The biology of the growth plate," *The Journal of Bone & Joint Surgery*, vol. 85-A, pp. 715-726, 2003.
- [33] C. A. Francomano, "Key role for a minor collagen," *Nat Genet*, vol. 9, pp. 6-8, 1995.
- [34] T. Pihlajamaa, M. Perala, M. M. Vuoristo, M. Nokelainen, M. Bodo, T. Schulthess, E. Vuorio, R. Timpl, J. Engel, and L. Ala-Kokko, "Characterization of recombinant human type IX collagen. Association of alpha chains into homotrimeric and heterotrimeric molecules," *J Biol Chem*, vol. 274, pp. 22464-8, 1999.
- [35] T. Kirsch, G. Harrison, E. E. Golub, and H. D. Nah, "The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage," *J Biol Chem*, vol. 275, pp. 35577-83, 2000.
- [36] H. C. Anderson, "Molecular biology of matrix vesicles," *Clin Orthop Relat Res*, pp. 266-80, 1995.
- [37] H. Mitani, I. Takahashi, K. Onodera, J. W. Bae, T. Sato, N. Takahashi, Y. Sasano, K. Igarashi, and H. Mitani, "Comparison of age-dependent expression of aggrecan and ADAMTSs in mandibular condylar cartilage, tibial growth plate, and articular cartilage in rats," *Histochem Cell Biol*, vol. 126, pp. 371-80, 2006.
- [38] H. J. Hausser, M. A. Ruegg, R. E. Brenner, and I. Ksiazek, "Agrin is highly expressed by chondrocytes and is required for normal growth," *Histochem Cell Biol*, vol. 127, pp. 363-74, 2007.
- [39] Y. Wang, F. Middleton, J. A. Horton, L. Reichel, C. E. Farnum, and T. A. Damron, "Microarray analysis of proliferative and hypertrophic growth plate

- zones identifies differentiation markers and signal pathways," *Bone*, vol. 35, pp. 1273-93, 2004.
- [40] K. G. Vogel and T. J. Koob, "Structural specialization in tendons under compression," *Int Rev Cytol*, vol. 115, pp. 267-93, 1989.
 - [41] A. R. Poole, C. Webber, I. Pidoux, H. Choi, and L. C. Rosenberg, "Localization of a dermatan sulfate proteoglycan (DS-PGII) in cartilage and the presence of an immunologically related species in other tissues," *J Histochem Cytochem*, vol. 34, pp. 619-25, 1986.
 - [42] S. Ekman, D. Heinegard, O. Johnell, and H. Rodriguez-Martinez, "Immunohistochemical localization of proteoglycans and non-collagenous matrix proteins in normal and osteochondrotic porcine articular-epiphyseal cartilage complex," *Matrix*, vol. 10, pp. 402-11, 1990.
 - [43] S. Ekman and D. Heinegard, "Immunohistochemical localization of matrix proteins in the femoral joint cartilage of growing commercial pigs," *Vet Pathol*, vol. 29, pp. 514-20, 1992.
 - [44] D. Heinegard, T. Larsson, Y. Sommarin, A. Franzen, M. Paulsson, and E. Hedbom, "Two novel matrix proteins isolated from articular cartilage show wide distributions among connective tissues," *J Biol Chem*, vol. 261, pp. 13866-72, 1986.
 - [45] P. Radhakrishnan, N. T. Lewis, and J. J. Mao, "Zone-specific micromechanical properties of the extracellular matrices of growth plate cartilage," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 32, pp. 284-291, 2004.
 - [46] B. C. J. Van der Eerden, M. Karperien, and J. M. Wit, "Systemic and local regulation of the growth plate," *Endocrine reviews*, vol. 24, pp. 782-801, 2003.
 - [47] I. Villemure, L. Cloutier, J. R. Matyas, and N. A. Duncan, "Non-uniform strain distribution within rat cartilaginous growth plate under uniaxial compression," *Journal of Biomechanics*, vol. 40, pp. 149-156, 2007.
 - [48] J. F. Woessner, "The matrix metalloproteinases family," in *Matrix Metalloproteinases*, M. R. Parks WC, Ed. San Diego: Academic Press, 1998, pp. 1-14.
 - [49] I. Abbaszade, R. Q. Liu, F. Yang, S. A. Rosenfeld, O. H. Ross, J. R. Link, D. M. Ellis, M. D. Tortorella, M. A. Pratta, J. M. Hollis, R. Wynn, J. L. Duke, H. J. George, M. C. Hillman, Jr., K. Murphy, B. H. Wiswall, R. A. Copeland, C. P. Decicco, R. Bruckner, H. Nagase, Y. Itoh, R. C. Newton, R. L. Magolda, J. M. Trzaskos, T. C. Burn, and et al., "Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family," *J Biol Chem*, vol. 274, pp. 23443-50, 1999.
 - [50] M. D. Tortorella, T. C. Burn, M. A. Pratta, I. Abbaszade, J. M. Hollis, R. Liu, S. A. Rosenfeld, R. A. Copeland, C. P. Decicco, R. Wynn, A. Rockwell, F. Yang, J. L. Duke, K. Solomon, H. George, R. Bruckner, H. Nagase, Y. Itoh, D. M. Ellis, H. Ross, B. H. Wiswall, K. Murphy, M. C. Hillman, Jr., G. F. Hollis, R. C. Newton, R. L. Magolda, J. M. Trzaskos, and E. C. Arner, "Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins," *Science*, vol. 284, pp. 1664-6, 1999.

- [51] J. Keeling and G. A. Herrera, "Human matrix metalloproteinases: Characteristics and pathologic role in altering mesangial homeostasis," *Microsc Res Tech*, 2008.
- [52] I. Takahashi, K. Onodera, J. W. Bae, H. Mitani, Y. Sasano, and H. Mitani, "Age-related changes in the expression of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in mandibular condylar, growth plate, and articular cartilage in rats," *J Mol Histol*, vol. 36, pp. 355-66, 2005.
- [53] V. Knauper, C. Lopez-Otin, B. Smith, G. Knight, and G. Murphy, "Biochemical characterization of human collagenase-3," *J Biol Chem*, vol. 271, pp. 1544-50, 1996.
- [54] P. G. Mitchell, H. A. Magna, L. M. Reeves, L. L. Lopresti-Morrow, S. A. Yocum, P. J. Rosner, K. F. Geoghegan, and J. E. Hambor, "Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage," *J Clin Invest*, vol. 97, pp. 761-8, 1996.
- [55] H. G. Welgus, C. J. Fliszar, J. L. Seltzer, T. M. Schmid, and J. J. Jeffrey, "Differential susceptibility of type X collagen to cleavage by two mammalian interstitial collagenases and 72-kDa type IV collagenase," *J Biol Chem*, vol. 265, pp. 13521-7, 1990.
- [56] A. J. Fosang, K. Last, V. Knauper, G. Murphy, and P. J. Neame, "Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13)," *FEBS Lett*, vol. 380, pp. 17-20, 1996.
- [57] G. Murphy, H. Nagase, and C. E. Brinckerhoff, "Relationship of procollagenase activator, stromelysin and matrix metalloproteinase 3," *Coll Relat Res*, vol. 8, pp. 389-91, 1988.
- [58] K. Suzuki, J. J. Enghild, T. Morodomi, G. Salvesen, and H. Nagase, "Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin)," *Biochemistry*, vol. 29, pp. 10261-70, 1990.
- [59] Z. Gunja-Smith, H. Nagase, and J. F. Woessner, Jr., "Purification of the neutral proteoglycan-degrading metalloproteinase from human articular cartilage tissue and its identification as stromelysin matrix metalloproteinase-3," *Biochem J*, vol. 258, pp. 115-9, 1989.
- [60] M. L. Patterson, S. J. Atkinson, V. Knauper, and G. Murphy, "Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain," *FEBS Lett*, vol. 503, pp. 158-62, 2001.
- [61] G. Haeusler, I. Walter, M. Helmreich, and M. Egerbacher, "Localization of matrix metalloproteinases, (MMPs) their tissue inhibitors, and vascular endothelial growth factor (VEGF) in growth plates of children and adolescents indicates a role for MMPs in human postnatal growth and skeletal maturation," *Calcif Tissue Int*, vol. 76, pp. 326-35, 2005.
- [62] M. Tortorella, M. Pratta, R. Q. Liu, I. Abbaszade, H. Ross, T. Burn, and E. Arner, "The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage," *J Biol Chem*, vol. 275, pp. 25791-7, 2000.
- [63] E. C. Arner, "Aggrecanase-mediated cartilage degradation," *Curr Opin Pharmacol*, vol. 2, pp. 322-9, 2002.

- [64] D. E. Gomez, D. F. Alonso, H. Yoshiji, and U. P. Thorgeirsson, "Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions," *Eur J Cell Biol*, vol. 74, pp. 111-22, 1997.
- [65] K. Brew, D. Dinakarpandian, and H. Nagase, "Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1477, pp. 267-83, 2000.
- [66] M. Kashiwagi, M. Tortorella, H. Nagase, and K. Brew, "TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5)," *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 12501-4, 2001.
- [67] E. B. Hunziker, "Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes," *Microscopy research and technique*, vol. 28, pp. 505-519, 1994.
- [68] N. J. Wilsman, C. E. Farnum, E. M. Green, E. M. Lieferman, and M. K. Clayton, "Cell cycle analysis of proliferative zone chondrocytes in growth plates elongating at different rates," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 14, pp. 562-572, 1996.
- [69] J. A. Buckwalter, D. Mower, J. Schafer, R. Ungar, B. Ginsberg, and K. Moore, "Growth-plate-chondrocyte profiles and their orientation," *The Journal of Bone & Joint Surgery*, vol. 67A, pp. 942-955, 1985.
- [70] G. J. Breur, B. A. VanEnkevort, C. E. Farnum, and N. J. Wilsman, "Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 9, pp. 348-359, 1991.
- [71] C. E. Farnum and N. J. Wilsman, "Chapter 13: Growth plate cellular function," in *Skeletal Growth and Development*, 1998, pp. 203-223.
- [72] A. Bailon-Plaza, A. O. Lee, E. C. Veson, C. E. Farnum, and M. C. H. V. d. Meulen, "BMP-5 deficiency alters chondrocytic activity in the mouse proximal tibial growth plate," *Bone*, vol. 24, pp. 211-216, 1999.
- [73] J. A. Buckwalter, D. Mower, R. Ungar, J. Shaeffer, and B. Ginsberg, "Morphometric analysis of chondrocyte hypertrophy," *The Journal of Bone & Joint Surgery*, vol. 68A, pp. 243-255, 1986.
- [74] C. T. Brighton and R. B. Heppenstall, "Oxygen tension in zones of the epiphyseal plate, the metaphysis and diaphysis. An in vitro and in vivo study in rats and rabbits," *J Bone Joint Surg Am*, vol. 53, pp. 719-28, 1971.
- [75] V. Abad, J. L. Meyers, M. Weise, R. I. Gafni, K. M. Barnes, O. Nilsson, J. D. Bacher, and J. Baron, "The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis," *Endocrinology*, vol. 143, pp. 1851-7, 2002.
- [76] W. A. Horton and M. M. Machado, "Extracellular matrix alterations during endochondral ossification in humans," *J Orthop Res*, vol. 6, pp. 793-803, 1988.
- [77] S. Soeta, H. Shimoura, N. Hatakeyama, T. Kodaka, H. Amasaki, S. Yamano, K. Taniguchi, and Y. Naito, "Immunohistochemical examination of epiphyseal growth plates of Japanese Brown cattle with chondrodysplasia," *J Comp Pathol*, vol. 136, pp. 145-55, 2007.

- [78] T. Fujii, S. Takai, Y. Arai, W. Kim, D. Amiel, and Y. Hirasawa, "Microstructural properties of the distal growth plate of the rabbit radius and ulna: biomechanical, biochemical, and morphological studies," *J Orthop Res*, vol. 18, pp. 87-93, 2000.
- [79] N. J. Wilsman, C. E. Farnum, E. M. Leiferman, M. Fry, and B. C., "Differential growth by growth plates as a function of multiple parameters of chondrocytic kinetics," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 14, pp. 927-936, 1996.
- [80] H. R. Cowell, E. B. Hunziker, and L. Rosenberg, "The role of hypertrophic chondrocytes in endochondral ossification and in the development of secondary centers of ossification," *The Journal of Bone & Joint Surgery*, vol. 69A, pp. 159-161, 1987.
- [81] C. T. Brighton, Y. Sugioka, and R. M. Hunt, "Cytoplasmic structures of epiphyseal plate chondrocytes. Quantitative evaluation using electron micrographs of rat costochondral junctions with special reference to the fate of hypertrophic cells," *J Bone Joint Surg Am*, vol. 55, pp. 771-84, 1973.
- [82] K. J. Noonan, E. B. Hunziker, J. Nessler, and J. A. Buckwalter, "Changes in cell, matrix compartment, and fibrillar collagen volumes between growth-plate zones," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 16, pp. 500-508, 1998.
- [83] G. Hausler, M. Helmreich, S. Marlovits, and M. Egerbacher, "Integrins and extracellular matrix proteins in the human childhood and adolescent growth plate," *Calcif Tissue Int*, vol. 71, pp. 212-8, 2002.
- [84] S. V. Webster, C. Farquharson, D. Jefferies, and A. P. Kwan, "Expression of type X collagen, Indian hedgehog and parathyroid hormone related-protein in normal and tibial dyschondroplastic chick growth plates," *Avian Pathol*, vol. 32, pp. 69-80, 2003.
- [85] C. W. Wu, E. V. Tchetina, F. Mwale, K. Hasty, I. Pidoux, A. Reiner, J. Chen, H. E. Van Wart, and A. R. Poole, "Proteolysis involving matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) is required for chondrocyte differentiation that is associated with matrix mineralization," *J Bone Miner Res*, vol. 17, pp. 639-51, 2002.
- [86] K. Takahi, J. Hashimoto, K. Hayashida, K. Shi, H. Takano, H. Tsuboi, Y. Matsui, T. Nakase, T. Tomita, T. Ochi, and H. Yoshikawa, "Early closure of growth plate causes poor growth of long bones in collagen-induced arthritis rats," *J Musculoskelet Neuronal Interact*, vol. 2, pp. 344-51, 2002.
- [87] J. H.-C. Wang, "Mechanobiology of tendon," *Journal of Biomechanics*, 2006.
- [88] A. Shimazu, H. D. Nah, T. Kirsch, E. Koyama, J. L. Leatherman, E. B. Golden, R. A. Kosher, and M. Pacifici, "Syndecan-3 and the control of chondrocyte proliferation during endochondral ossification," *Exp Cell Res*, vol. 229, pp. 126-36, 1996.
- [89] J. L. Kuhn, J. H. DeLacey, and E. E. Leenellet, "Relationship between bone growth rate and hypertrophic chondrocyte volume in New Zealand white rabbits of varying ages," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 14, pp. 706-711, 1996.
- [90] M. C. H. Van der Meulen and R. Huiskes, "Why mechanobiology?," *Journal of Biomechanics*, vol. 35, pp. 401-414, 2002.
- [91] A. Vortkamp, S. Pathi, G. M. Peretti, E. M. Caruso, D. J. Zaleske, and C. J. Tabin, "Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during

- postnatal growth and in fracture repair," *Mechanism of Development*, vol. 71, pp. 65-76, 1998.
- [92] R. A. Dickson and P. Deacon, "Spinal growth," *The Journal of Bone & Joint Surgery*, vol. 69B, pp. 690-692, 1987.
 - [93] G. J. Breur, M. D. Lapierre, K. Kazmierczak, K. M. Stechuchak, and G. P. McCabe, "The domain of hypertrophic chondrocytes in growth plates growing at different rates," *Calcified Tissue International*, vol. 61, pp. 418-425, 1997.
 - [94] P. Vanky, U. Brockstedt, A. Hjerpe, and B. Wikstrom, "Kinetic studies on epiphyseal growth cartilage in the normal mouse," *Bone*, vol. 22, pp. 331-9, 1998.
 - [95] J. M. Wit, G. A. Kamp, and B. Rikken, "Spontaneous growth and response to growth hormone treatment in children with growth hormone deficiency and idiopathic short stature," *Pediatr Res*, vol. 39, pp. 295-302, 1996.
 - [96] O. G. Isaksson, J. O. Jansson, and I. A. Gause, "Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly," *Science*, vol. 216, pp. 1237-9, 1982.
 - [97] S. M. Russell and E. M. Spencer, "Local injections of human or rat growth hormone or of purified human somatomedin-C stimulate unilateral tibial epiphyseal growth in hypophysectomized rats," *Endocrinology*, vol. 116, pp. 2563-7, 1985.
 - [98] K. G. Thorngren and L. I. Hansson, "Bioassay of growth hormone, I, Determination of longitudinal bone growth with tetracycline in hypophysectomized rats," *Acta Endocrinol (Copenh)*, vol. 75, pp. 653-68, 1974.
 - [99] E. Schoenle, J. Zapf, R. E. Humbel, and E. R. Froesch, "Insulin-like growth factor I stimulates growth in hypophysectomized rats," *Nature*, vol. 296, pp. 252-3, 1982.
 - [100] J. Baker, J. P. Liu, E. J. Robertson, and A. Efstratiadis, "Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth," *Cell*, vol. 75, pp. 73-82, 1993.
 - [101] J. H. Bassett, R. Swinhoe, O. Chassande, J. Samarut, and G. R. Williams, "Thyroid hormone regulates heparan sulfate proteoglycan expression in the growth plate," *Endocrinology*, vol. 147, pp. 295-305, 2006.
 - [102] J. Leger and P. Czernichow, "Congenital hypothyroidism: decreased growth velocity in the first weeks of life," *Biol Neonate*, vol. 55, pp. 218-23, 1989.
 - [103] F. G. Cassorla, M. C. Skerda, I. M. Valk, W. Hung, G. B. Cutler, Jr., and D. L. Loriaux, "The effects of sex steroids on ulnar growth during adolescence," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 58, pp. 717-20, 1984.
 - [104] V. Coxam, B. M. Bowman, M. Mecham, C. M. Roth, M. A. Miller, and S. C. Miller, "Effects of dihydrotestosterone alone and combined with estrogen on bone mineral density, bone growth, and formation rates in ovariectomized rats," *Bone*, vol. 19, pp. 107-14, 1996.
 - [105] A. Zung, M. Phillip, S. A. Chalew, T. Palese, A. A. Kowarski, and Z. Zadik, "Testosterone effect on growth and growth mediators of the GH-IGF-I axis in the liver and epiphyseal growth plate of juvenile rats," *J Mol Endocrinol*, vol. 23, pp. 209-21, 1999.

- [106] H. Takano, T. Aizawa, T. Irie, S. Kokubun, and E. Itoi, "Estrogen deficiency leads to decrease in chondrocyte numbers in the rabbit growth plate," *J Orthop Sci*, vol. 12, pp. 366-74, 2007.
- [107] G. B. Cutler, Jr., "The role of estrogen in bone growth and maturation during childhood and adolescence," *J Steroid Biochem Mol Biol*, vol. 61, pp. 141-4, 1997.
- [108] F. Rauch, "Bone growth in length and width: the Yin and Yang of bone stability," *J Musculoskelet Neuronal Interact*, vol. 5, pp. 194-201, 2005.
- [109] H. Kalirai, M. Phillip, L. Savendahl, and J. Wit, "The Fifth European Growth Plate Working Group Symposium. 21st September 2005, Lyon, France.," *J Pediatr Endocrinol Metab.*, vol. 19, pp. 183-190, 2006.
- [110] M. Egerbacher and G. Haeusler, "Integrins in growth plate cartilage," *Pediatric Endocrinology Reviews*, vol. 1, pp. 2-8, 2003.
- [111] O. Alvarez-Garcia, E. Carbajo-Perez, E. Garcia, H. Gil, I. Molinos, J. Rodriguez, F. A. Ordonez, and F. Santos, "Rapamycin retards growth and causes marked alterations in the growth plate of young rats," *Pediatr Nephrol*, vol. 22, pp. 954-61, 2007.
- [112] J. Wroblewski and C. Edwall-Arvidsson, "Inhibitory effects of basic fibroblast growth factor on chondrocyte differentiation," *J Bone Miner Res*, vol. 10, pp. 735-42, 1995.
- [113] D. Demarquay, M. F. Dumontier, L. Tsagris, J. Bourguignon, V. Nataf, and M. T. Corvol, "In vitro insulin-like growth factor I interaction with cartilage cells derived from postnatal animals," *Horm Res*, vol. 33, pp. 111-4; discussion 115, 1990.
- [114] L. J. Sandell, E. J. Dudek, B. Bielaga, and T. N. Wight, "Regulation of cartilage collagen and proteoglycan synthesis by transforming growth factor-beta," *Trans Orthop Res Soc*, vol. 14, pp. 280, 1989.
- [115] R. T. Ballock, A. Heydemann, L. M. Wakefield, K. C. Flanders, A. B. Roberts, and M. B. Sporn, "TGF-beta 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases," *Dev Biol*, vol. 158, pp. 414-29, 1993.
- [116] B. H. Thorp, I. Anderson, and S. B. Jakowlew, "Transforming growth factor-beta 1, -beta 2 and -beta 3 in cartilage and bone cells during endochondral ossification in the chick," *Development*, vol. 114, pp. 907-11, 1992.
- [117] E. Monsonego, O. Halevy, A. Gertler, S. Hurwitz, and M. Pines, "Growth hormone inhibits differentiation of avian epiphyseal growth-plate chondrocytes," *Mol Cell Endocrinol*, vol. 114, pp. 35-42, 1995.
- [118] R. M. Leach, Jr., M. P. Richards, C. A. Praul, B. C. Ford, and J. P. McMurtry, "Investigation of the insulin-like growth factor system in the avian epiphyseal growth plate," *Domest Anim Endocrinol*, vol. 33, pp. 143-53, 2007.
- [119] L. J. Bonassar, A. J. Grodzinsky, E. H. Frank, S. G. Davila, N. R. Bhaktav, and S. B. Trippel, "The effect of dynamic compression on the response of articular cartilage to insulin-like growth factor-I," *J Orthop Res*, vol. 19, pp. 11-7, 2001.

- [120] H. F. Oettinger and M. Pacifici, "Type X collagen gene expression is transiently up-regulated by retinoic acid treatment in chick chondrocyte cultures," *Exp Cell Res*, vol. 191, pp. 292-8, 1990.
- [121] E. Yoshida, M. Noshiro, T. Kawamoto, S. Tsutsumi, Y. Kuruta, and Y. Kato, "Direct inhibition of Indian hedgehog expression by parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide and up-regulation by retinoic acid in growth plate chondrocyte cultures," *Exp Cell Res*, vol. 265, pp. 64-72, 2001.
- [122] R. J. O'Keefe, L. S. Loveys, D. G. Hicks, P. R. Reynolds, I. D. Crabb, J. E. Puzas, and R. N. Rosier, "Differential regulation of type-II and type-X collagen synthesis by parathyroid hormone-related protein in chick growth-plate chondrocytes," *J Orthop Res*, vol. 15, pp. 162-74, 1997.
- [123] Y. Kawashima-Ohya, H. Satakeda, Y. Kuruta, T. Kawamoto, W. Yan, Y. Akagawa, T. Hayakawa, M. Noshiro, Y. Okada, S. Nakamura, and Y. Kato, "Effects of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide on expressions of matrix metalloproteinase-2, -3, and -9 in growth plate chondrocyte cultures," *Endocrinology*, vol. 139, pp. 2120-7, 1998.
- [124] C. M. Reijnders, N. Bravenboer, A. M. Tromp, M. A. Blankenstein, and P. Lips, "Effect of mechanical loading on insulin-like growth factor-I gene expression in rat tibia," *J Endocrinol*, vol. 192, pp. 131-40, 2007.
- [125] D. A. Lazowski, L. J. Fraher, A. Hodsman, B. Steer, D. Modrowski, and V. K. Han, "Regional variation of insulin-like growth factor-I gene expression in mature rat bone and cartilage," *Bone*, vol. 15, pp. 563-76, 1994.
- [126] E. A. Parker, A. Hegde, M. Buckley, K. M. Barnes, J. Baron, and O. Nilsson, "Spatial and temporal regulation of GH-IGF-related gene expression in growth plate cartilage," *J Endocrinol*, vol. 194, pp. 31-40, 2007.
- [127] H. Nagai and M. Aoki, "Inhibition of growth plate angiogenesis and endochondral ossification with diminished expression of MMP-13 in hypertrophic chondrocytes in FGF-2-treated rats," *J Bone Miner Metab*, vol. 20, pp. 142-7, 2002.
- [128] J. Trueta and A. Trias, "The vascular contribution to osteogenesis. IV. The effect of pressure upon the epiphysial cartilage of the rabbit," *J Bone Joint Surg Br*, vol. 43-B, pp. 800-13, 1961.
- [129] D. Jaramillo, O. L. Villegas-Medina, D. K. Doty, R. Rivas, K. Strife, J. R. Dwek, R. V. Mulkern, and F. Shapiro, "Age-related vascular changes in the epiphysis, physis, and metaphysis: normal findings on gadolinium-enhanced MRI of piglets," *AJR Am J Roentgenol*, vol. 182, pp. 353-60, 2004.
- [130] T. Wirth, M. M. Syed Ali, C. Rauer, D. Suss, P. Griss, and S. Syed Ali, "The blood supply of the growth plate and the epiphysis: a comparative scanning electron microscopy and histological experimental study in growing sheep," *Calcif Tissue Int*, vol. 70, pp. 312-9, 2002.
- [131] R. M. Williams, W. R. Zipfel, M. L. Tinsley, and C. E. Farnum, "Solute transport in growth plate cartilage: in vitro and in vivo," *Biophys J*, vol. 93, pp. 1039-50, 2007.

- [132] J. Trueta and K. Little, "The vascular contribution to osteogenesis. II. Studies with the electron microscope," *J Bone Joint Surg Br*, vol. 42-B, pp. 367-76, 1960.
- [133] H. R. Brashear, Jr., "Epiphyseal Avascular Necrosis and Its Relation to Longitudinal Bone Growth," *J Bone Joint Surg Am*, vol. 45, pp. 1423-38, 1963.
- [134] I. A. F. Stokes, "Mechanical effects on skeletal growth," *J Musculoskel Neuron Interact*, vol. 2, pp. 277-280, 2002.
- [135] F. Arriola, F. Forriol, and J. Cañadell, "Histomorphometric study of growth plate subjected to different mechanical conditions (compression, tension and neutralization): An experimental study in lambs- Mechanical growth plate behavior," *Journal of Pediatric Orthopaedics Part B*, vol. 10, pp. 334-338, 2001.
- [136] P. J. Prendergast, "Chapter II: Mechanobiology: experiment and computation," in *Topics in bio-mechanical engineering*, vol. 1: Trinity Centre for Bioengineering & National Centre for Biomechanical Engineering Science, 2004, pp. 41-57.
- [137] C. E. Farnum, "Chapter 30: Effects of distraction and compression on growth plate function," in *Skeletal Growth and Development*, 1998, pp. 517-531.
- [138] L. I. Hansson, K. Menander-Sellman, A. Stenström, and K.-G. Thorngren, "Rate of normal longitudinal bone growth in the rat," *Calcified Tissue Research*, vol. 10, pp. 238-251, 1972.
- [139] I. A. F. Stokes, "How vicious is the "vicious cycle" ?," in *Pathogenesis*, 2004, pp. 331-334.
- [140] L. I. Hansson, "Daily growth in length of diaphysis measured by oxytetracycline in rabbit normally and after medullary plugging," *Acta Orthop Scand*, pp. Suppl 101:1+, 1967.
- [141] K. P. Mankin and D. J. Zaleske, "Response of physeal cartilage to low-level compression and tension in organ culture," *Journal of Pediatric Orthopaedics*, vol. 18, pp. 145-148, 1998.
- [142] B. Cohen, W. M. Lai, and V. C. Mow, "A transversely isotropic biphasic model for unconfined compression of growth plate and chondroepiphysis," *Journal of Biomechanical Engineering*, vol. 120, pp. 491-496, 1998.
- [143] H. M. Frost, "Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU) : 3. The hyalin cartilage modeling problem," *The anatomical record*, vol. 226, pp. 423-432, 1990.
- [144] J. Wilson-MacDonald, G. R. Houghton, J. Bradley, and E. Morscher, "The relationship between periosteal division and compression or distraction of the growth plate-An experimental study in the rabbit," *The Journal of Bone & Joint Surgery*, vol. 72-B, pp. 303-308, 1990.
- [145] I. A. Stokes, H. Spence, D. D. Aronsson, and N. Kilmer, "Mechanical modulation of vertebral body growth. Implications for scoliosis progression," *Spine*, vol. 21, pp. 1162-1167, 1996.
- [146] D. D. Aronsson, I. A. F. Stokes, J. Rosovsky, and H. Spence, "Mechanical modulation of calf tail vertebral growth: implications for scoliosis progression," *Journal of Spinal Disorders*, vol. 12, pp. 141-146, 1999.

- [147] A. M. Arkin and J. F. Katz, "The effects of pressure on epiphyseal growth; the mechanism of plasticity of growing bone," *J Bone Joint Surg Am*, vol. 38-A, pp. 1056-76, 1956.
- [148] E. Storey and S. A. Feik, "Remodelling of bone and bones: effects of altered mechanical stress on caudal vertebrae," *J Anat*, vol. 140 (Pt 1), pp. 37-48, 1985.
- [149] A. Alberty, J. Peltonen, and V. Ritsila, "Effects of distraction and compression on proliferation of growth plate chondrocytes. A study in rabbits," *Acta Othopaedica Scandinavica*, vol. 64, pp. 449-455, 1993.
- [150] G. De Bastiani, R. Aldegheri, L. Renzi Brivio, and G. Trivella, "Chondrodiastasis-controlled symmetrical distraction of the epiphyseal plate. Limb lengthening in children," *J Bone Joint Surg Br*, vol. 68, pp. 550-6, 1986.
- [151] J. Canadell and J. de Pablos, "Correction of angular deformities by physeal distraction," *Clin Orthop Relat Res*, pp. 98-105, 1992.
- [152] R. G. Burwell, A. A. Cole, T. A. Cook, T. B. Grivas, A. W. Kiel, A. Moulton, A. S. Thirlwall, S. S. Upadhyay, J. K. Webb, S. A. Wemyss-Holden, and et al., "Pathogenesis of idiopathic scoliosis. The Nottingham concept," *Acta Orthop Belg*, vol. 58 Suppl 1, pp. 33-58, 1992.
- [153] I. A. Stokes, D. D. Aronsson, and J. P. G. Urban, "Biomechanical factors influencing progression of angular skeletal deformities during growth," *Eur J Exp Musculoskel Res*, vol. 3, pp. 51-60, 1994.
- [154] H. M. Frost, "A chondral modeling theory," *Calcif Tissue Int*, vol. 28, pp. 181-200, 1979.
- [155] J. H. Scott, "The mechanical basis of bone formation," *J Bone Joint Surg Br*, vol. 39-B, pp. 134-44, 1957.
- [156] R. L. Duncan and C. H. Turner, "Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain," *Calcified Tissue International*, vol. 57, pp. 344-358, 1995.
- [157] S. Sijbrandij, "Inhibition of Tibial Growth by Means of Compression of Its Proximal Epiphysial Disc in the Rabbit," *Acta Anat (Basel)*, vol. 55, pp. 278-85, 1963.
- [158] R. S. Siffert, "The effect of staples and longitudinal wires on epiphyseal growth; an experimental study," *J Bone Joint Surg Am*, vol. 38-A, pp. 1077-88, 1956.
- [159] E. Storey, "Growth and remodeling of bone and bones. Role of genetics and function," *Dent Clin North Am*, vol. 19, pp. 443-55, 1975.
- [160] N. Amizuka, A. C. Karaplis, J. E. Henderson, H. Warshawsky, M. L. Lipman, Y. Matsuki, S. Ejiri, M. Tanaka, N. Izumi, H. Ozawa, and D. Goltzman, "Haploinsufficiency of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) results in abnormal postnatal bone development," *Developmental Biology*, vol. 175, pp. 166-176, 1996.
- [161] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular biology of THE CELL*, vol. 1, fourth edition ed: Garland Science, 2002.
- [162] J.-C. Kaplan and M. Delpech, *Biologie moléculaire et médecine*, vol. 1, 1ère édition ed. Paris: Médecines-Sciences Flammarion, 1989.

- [163] M. Tang and J. J. Mao, "Matrix and gene expression in the rat cranial base growth plate," *Cell Tissue Res*, vol. 324, pp. 467-74, 2006.
- [164] B. T. Kurien and R. H. Scofield, "Western blotting," *Methods*, vol. 38, pp. 283-293, 2006.
- [165] W. Wilson, C. v. Burken, C. v. Donkelaar, P. Buma, B. v. Rietbergen, and R. Huiskes, "Causes of mechanically induced collagen damage in articular cartilage," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 24, pp. 220-228, 2006.