UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

LE RÔLE DU CYTOSQUELETTE DANS LA MÉCANIQUE DES CELLULES DU CARTILAGE, LES CHONDROCYTES

ÈVE LANGELIER
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph.D.)
(GÉNIE BIOMÉDICAL)
DÉCEMBRE 2000

© Eve Langelier, 2000.

National Library of Canada
Bibliothèque nationale du Canada

Acquisitions and Bibliographic Services
Acquisitions et services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

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

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

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

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

0-612-60939-1

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

LE RÔLE DU CYTOSQUELETTE DANS LA MÉCANIQUE DES CELLULES DU CARTILAGE, LES CHONDROCYTES

présentée par : LANGELIER Ève
en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor
a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. SHIRAZI Saeed, Ph.D., président
M. BUSCHMANN Michael, Ph.D., membre et directeur de recherche
M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre
M. ALINI Mauro, Ph.D., membre

À Jean-Luc et Olivier

REMERCIEMENTS

Je désire remercier toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet de doctorat. Je remercie sincèrement mon directeur de recherche, le Professeur Michael Buschmann, qui a su m'apporter l'encadrement, les connaissances, les ressources et l'encouragement nécessaires à la réalisation de mes travaux. Travailler sous sa supervision fut très enrichissant et très apprécié.

Je remercie aussi Ueli Aebi et Rosmarie Suetterlin, de l'*Institut M.E. Mueller pour la biologie structurale* de Bâle en Suisse, pour leur précieuse expertise ainsi que pour leur participation active dans l'étude du cytosquelette.

Ma reconnaissance va également à l'équipe de chercheurs et d'étudiants entourant Michael. Merci à Caroline pour son aide inestimable, sa bonne humeur et son attention particulière à ma bedaine de femme enceinte. Merci à Jean pour les longues journées d'isolation ainsi que pour toutes ses réponses à mes milliers de questions. Merci à Martin pour la résolution de mes bogues de programmation. Merci à Manuel pour mes transferts d'images ainsi que pour tous mes petits et gros troubles informatiques. Merci à Anik, Nic et Marc pour l'ambiance agréable au lab'. Et un merci tout particulier à Anne pour mes signatures de formulaires à distance, et surtout pour son amitié.

Je remercie les membres formant le jury d'examen de ma thèse, soit les Professeurs Mario Jolicoeur, Mauro Alini et particulièrement le Professeur Saeed Shirazi qui en a accepté la présidence.

Enfin, je remercie Jean-Luc, mes parents ainsi que Charlotte et Denis pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de ces études.

RÉSUMÉ

Le cytosquelette des chondrocytes est un réseau tridimensionnel composé de trois types de filaments protéiques (les microfilaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires) impliqué dans multiples fonctions cellulaires. Ses études descriptives étant incomplètes et peu nombreuses, de nouveaux travaux sont requis afin d'approfondir notre connaissance de l'organisation du cytosquelette des chondrocytes *in situ*.

L'hypothèse à la base de cette étude est que la structure et la composition du cytosquelette *in situ* varient selon la position en profondeur des chondrocytes dans le cartilage articulaire mature. Ainsi, le premier objectif consistait à examiner l'organisation tridimensionnelle des trois réseaux du cytosquelette des chondrocytes *in situ*. Tel qu'observés au microscope confocal à fluorescence, les trois réseaux de filaments qui forment le cytosquelette possèdent des structures distinctes, mettant ainsi en lumière certains rôles fonctionnels respectifs à chacun de ces réseaux dans les chondrocytes du cartilage articulaire. Le marquage d'actine se situe sous la membrane cellulaire, où il est dense et ponctuel, tandis que les microtubules et les filaments de vimentine forment un treillis s'étendant de la membrane nucléaire à la membrane plasmique, le treillis de vimentine étant plus fin et plus serré que celui de microtubules.

Le second objectif de cette étude consistait à examiner la distribution des trois réseaux du cytosquelette des chondrocytes selon leur position dans le cartilage articulaire. Le contenu hétérogène des composantes du cytosquelette dans les différentes zones du cartilage, tel qu'observé par microscopie à épifluorescence et SDS-PAGE, suggère un contrôle microenvironnemental de l'expression du cytosquelette. La distribution de microfilaments d'actine est plutôt uniforme, alors que les distributions de microtubules et de filaments intermédiaires suivent un gradient dont l'intensité de marquage est

maximale dans la zone superficielle. L'analyse par SDS-PAGE des extraits RIPA et GuCl appuie ces résultats et suggère (1) que le pool d'actine globulaire est plus important dans la zone superficielle que dans les régions profondes, et (2) qu'il existe un pool de vimentine soluble qui est extrait lors de la perméabilisation des coupes pour la microscopie à fluorescence.

Suite à ces observations, deux hypothèses ont été proposées relativement au rôles mécaniques du cytosquelette des chondrocytes:

- Le réseau de vimentine pourrait être impliqué dans la mécanotransduction en transformant par un lien mécanique la déformation cellulaire en déformation nucléaire.
- Le réseau formant le cytosquelette pourrait être plus robuste chez les chondrocytes de la zone superficielle afin de remplir des fonctions structurales.

De nouvelles expérimentations étant essentielles afin d'approfondir l'étude des fonctions mécaniques du cytosquelette, des travaux complémentaires ont été entrepris afin d'examiner l'hypothèse voulant que des changements d'organisation du cytosquelette surviennent en réponse à des stimuli mécaniques. Plus spécifiquement, le but était d'obtenir des images préliminaires du cytosquelette ainsi que de la phosphorylation des filaments de vimentine des chondrocytes *in situ* suite à l'application de compressions. Il a été observé que la compression dynamique haute vitesse affecte l'organisation du cytosquelette, notamment en diffusant le marquage d'actine habituellement ponctuel. Ces essais ont également permis de noter que le patron de phosphorylation du site Ser82 de la vimentine se modifie différemment selon type de compression appliquée.

Ces observations mènent aux hypothèse suivantes :

- Le démantèlement du réseau d'actine pourrait constituer une protection contre les déformation excessives du noyau.

- La phosphorylation du site Ser82 pourrait assouplir le cytosquelette de vimentine et en faciliter la réorganisation, alors que la déphosphorylation du même site pourrait le rigidifier.

Parallèlement à ces études biochimiques, il importe de réaliser des études mécaniques pour comprendre la nature de la réponse du cartilage aux compressions. La corrélation des phénomènes physiques avec les réponses biologiques est nécessaire à la dissection des processus responsables des changements d'organisation et de phosphorylation du cytosquelette. Ainsi, le volet mécanique de cette thèse caractérise le comportement mécanique du cartilage articulaire pour des conditions de chargement similaires à celles utilisées pour l'étude biologique. Cette section du projet avait pour premier objectif de vérifier, si telle que proposé, la réponse mécanique du cartilage articulaire à un essai de relaxation de contrainte peut être linéaire ou non linéaire selon l'amplitude et le taux de déformation. Il a été conclu que la réponse transitoire du cartilage articulaire adulte est non linéaire, s'affaiblissant initialement puis se rigidifiant significativement lorsque l'amplitude de la déformation augmente. Elle démontre aussi une grande sensibilité au taux de déformation, son renforcement étant plus important pour une vitesse élevée de compression. La réponse à l'équilibre, elle, peut être linéaire ou non selon le taux de déformation utilisé. Les modules à l'équilibre augmentent avec l'amplitude de la déformation à basse vitesse, sont constants à vitesse moyenne haute vitesse. Des compressions réalisées sur des échantillons congelés ont démontré que ces derniers présentent moins de résistances aux compressions, leurs modules normalisés, transitoires et à l'équilibre, étant inférieurs à ceux des échantillons frais.

Le protocole conçu pour évaluer l'étendue de la linéarité requiert l'application d'une série de compressions d'amplitudes croissantes allant jusqu'à ~ 26,5 % de déformation. Il a été supposé que pour ces niveaux de déformation, des endommagements peuvent être causés à la matrice extracellulaire affectant la mesure de linéarité, d'où le second objectif, celui d'examiner les altérations dans le comportement du cartilage articulaire

causées par le chargement mécanique en compression non confinée. Un affaiblissement de la matrice extracellulaire a été noté suite à des compressions d'aussi faible amplitude que 25-50 μm.

Suite à ces travaux, des hypothèses ont été proposées expliquant les comportements observés du cartilage articulaire :

- La dépendance de la réponse à l'équilibre envers la vitesse de compression pourrait reposer sur la dégradation de la matrice extracellulaire.
- L'affaiblissement initial du module transitoire pourrait s'expliquer partiellement par un temps plus long de compression à basse vitesse permettant ainsi l'exsudation du fluide et donc une relaxation partielle de la contrainte pendant l'application de la rampe. Une hypothèse alternative serait un changement structural de la matrice extracellulaire pendant la compression qui aurait pour effet de modifier sa rigidité.
- Plusieurs possibilités peuvent expliquer le renforcement observé dans les modules transitoires, par exemples : le compactage des protéoglycannes causant un renforcement de la matrice extracellulaire et une diminution de sa perméabilité ou l'expansion latérale augmentant de façon non linéaire la rigidité des fibrilles de collagène. L'hétérogénéité du tissu en fonction de la profondeur pourrait aussi expliquer ce phénomène.
- La dépendance du renforcement observé pour les modules transitoire envers le taux de déformation pourrait être le résultat d'une expansion latérale causant une augmentation de la rigidité des fibrilles de collagène. De plus, à haute vitesse, il y a moins de temps pour le glissement structural entre les phases de collagène et de protéoglycanne ainsi que pour la relaxation de contrainte durant l'application de la rampe.
- Il est possible que la congélation/décongélation endommage la matrice extracellulaire.

Cette thèse nous a permis d'acquérir de nouvelles connaissances concernant le cytosquelette des chondrocytes *in situ* et le comportement du cartilage articulaire mature en compression confinée. Plus précisément, l'étude du cytosquelette dévoile l'organisation et la distribution des trois protéines du cytosquelette et présente les changements d'organisation du cytosquelette en réponse à des stimuli mécaniques variés. L'examen des changements de phosphorylation de la vimentine, quant à lui, constitue la première étude de ce genre. En ce qui concerne l'analyse mécanique, il s'agit de la seule étude portant sur la linéarité/non-linéarité de la réponse du cartilage articulaire à des déformations finies appliquées en géométrie non confinée. Elle a aussi l'exclusivité d'examiner la dépendance de la linéarité envers la vitesse de déformation. De plus, le protocole de compression conçu pour l'expérimentation est unique étant donné qu'il permet de déterminer le niveau de déformation critique où débute la dégradation des propriétés mécaniques du matériau. Toutes ces nouvelles informations sont essentielles à la compréhension du fonctionnement physiologique du cartilage articulaire ainsi qu'au développement et à l'évolution de l'ostéoarthrite.

ABSTRACT

The chondrocyte cytoskeleton is a three-dimensionnal network composed of three types of protein filaments (actin microfilaments, microtubules and intermediate filaments) involved in multiple cellular functions. Since there are limited studies of the chondrocyte cytoskeleton, additional investigation is required in order to increase our knowledge of the chondrocyte cytoskeleton organisation *in situ*.

This study is based on the hypothesis that *in situ* cytoskeleton structure and composition vary with depth in mature articular cartilage. Thus, the first objective consisted of the examination of the three-dimensionnal organisation of the chondrocyte cytoskeleton networks *in situ*. As observed by confocal fluorescence microscopy, the three filament networks forming the cytoskeleton possess distinct structures, highlighting certain functional roles of these systems in chondrocytes of articular cartilage. Actin labelling localizes beneath the cellular membrane, where it is dense and punctual, whereas microtubules and vimentin filaments form a basket-like mesh spanning from the plasma membrane to the nuclear membrane, vimentin's mesh being thinner and tighter than microtubule's.

The second objectif of this study consisted of the examination of the distribution of the three cytoskeletal networks as a function of depth in mature articular cartilage. The heterogeneous content of cytoskeleton components in the different cartilage zones, as observed by epifluorescence microscopy and SDS-PAGE, suggested a microenvironnemental regulation of cytoskeleton expression. Actin microfilament distribution is mostly uniform, whereas microtubule and vimentin filament distributions follows a gradient with maximal labelling intensity in the superficial zone. SDS-PAGE analysis of RIPA and GuCl extracts supported these results and suggested (1) that the

globular actin pool is larger in the superficial compared to the deeper regions, and (2) that there exists a soluble vimentin pool which is extracted during slice permeabilisation for fluorescence microscopy.

Following these observations, two hypothesis were proposed concerning the chondrocyte cytoskeleton mechanical functions:

- The vimentin network could be involved in mechanotransduction, mechanically transforming cellular deformation to nuclear deformation.
- The cytoskeletal network could be more highly developed in chondrocytes from the superficial zone in order to accomplish structural functions.

Since further experimentation is essential to deepen the study of mechanical functions of the cytoskeleton, complementary work was undertaken to examine the hypothesis that organisation changes occur in response to mechanical stimulations. More specifically, the goal was to obtain preliminary images of the cytoskeleton as well as of the phosphorylation state of vimentin filaments of chondrocytes *in situ* following mechanical compression. We observed that high speed dynamic compression affected the cytoskeleton organisation, notably by transforming a normally punctuated actin labelling into a more diffuse one. These tests also allowed us to note that vimentin Ser82 phosphorylation pattern was modified differentially according to the applied compression type.

These observation lead to the following hypothesis:

- Actin network dismantling could represent a protection against nucleus excessive deformation.
- Ser82 phosphorylation could soften vimentin cytoskeleton and facilitate its reorganisation, whereas dephosphorylation of Ser82 could stiffen it.

Together with these biochemical studies, it is important to perform mechanical studies in order to understand the character of cartilage response to compressions. Correlation of physical phenomenon with biological responses is necessary to the dissection of organisation and phosphorylation changes process. Thus, the mechanical aspect of this thesis focused on the characterisation of the mechanical behaviour of articular cartilage for loading conditions similar to those used in the biological study. This section of the project had as a first hypothesis that articular cartilage mechanical response to a stress relaxation tests can be linear or non-linear according to deformation amplitude and rate. The transient response of adult articular cartilage was found to be non-linear, initially weakening and then significantly stiffening with increasing deformation. It also showed sensitivity to strain rate, its stiffening being more significant at high than at low compression speed. Equilibrium response can be linear or not according to the strain rate used. At low strain rate, equilibrium response nonlinearly stiffens with increasing compression amplitude while it is constant at intermediate and high strain rate. Compression applied to frozen/thawed specimens showed the latter to offer less resistance to compressions since their normalised peak and equilibrium moduli are lower than those of fresh non-forzen specimens.

The protocol conceived to evaluate the extent of linearity required the application of a compression series of increasing amplitude up to ~ 26,5 % deformation. It was hypothesised that, for these deformation levels, damage to the extracellular matrix can occur. Hence, the second objective consisted of examining alterations of the articular cartilage behavior caused by mechanical loading in unconfined compression. We noticed a weakening of the extracellular matrix following compressions of amplitude as low as 25-50 μm.

From this work, hypotheses were proposed to explain observed behavior of articular cartilage:

- The change in equilibrium response with compression speed likely reflects altered extracellular matrix structure or degradation.
- Peak modulus initial weakening could be partially explained by a longer compression time at low strain rate allowing for fluid exsudation and thus partial stress relaxation during the ramp. One alternative hypothesis would be structural changes leading to weakening of the extracellular matrix.
- Several possible sources can explain the observed stiffening of transient moduli, for example: axial compaction of the proteoglycan phase, thereby increasing its compressive stiffness and reducing its hydraulic permeability, or lateral expansion resulting in non-linearly increasing fibrillar network stiffness. Depth-dependent heterogeneity could also explain this phenomenon.
- The strain rate-dependence of this stiffening phenomenon is of particular interest and could be the result of less time for fluid flow at higher strain rates producing increasing lateral expansion and increasing fibrillar network stiffness, under lateral extension, during the transient phase. Structural slippage between collagen and proteoglycan phases could also be involved in the strain rate dependence of the transient response since low strain rates allow longer times for slippage and relaxation during the ramp due to this fluid-flow independent mechanism.
- Freezing/thawing could damage the extracellular matrix.

This thesis allowed us to deepen our knowledge of *in situ* chondrocyte cytoskeleton and mechanical behaviour of mature articular cartilage under unconfined compression. More precisely, the cytoskeleton study revealed the organisation and distribution of the three cytoskeletal proteins and presented cytoskeleton organisation changes in response to various mechanical stimuli. The examination of vimentin phosphorylation changes, for its part, constitutes the first study of this type. Concerning the mechanical analysis, this is the only study focussing on the linearity/nonlinearity of the articular cartilage response to finite deformation applied in unconfined compression, and the only one to examine the dependence of linearity on strain rate. Furthermore, the testing protocol

designed for this experiment is unique since it allows for determination of a critical deformation level where material mechanical property degradation begins. All of this new information is essential for the comprehension of articular cartilage mechanics and function in physiological situations as well as in the comprehension of osteoarthritis etiology and pathogenesis.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE iv
REMERCIEMENTS v
RÉSUMÉ vi
ABSTRACT xi
TABLE DES MATIÈRES xvi
LISTE DES TABLEAUX xxii
LISTE DES FIGURES xxiii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS xxxi
LISTE DES ANNEXES xxxiii

CHAPITRE I : INTRODUCTION 1
1.1 Le cartilage articulaire 1
1.1.1 La composition du cartilage articulaire 2
1.1.2 La structure du cartilage articulaire 7
1.2 L'arthrite 10
1.3 Présentation de la thèse 11

CHAPITRE II : INTRODUCTION – ÉTUDE DU CYTOSQUELETTE DES CHONDROCYTES *IN SITU* 12
2.1 Le cytosquelette 12
2.1.1 La structure moléculaire des microfilaments d'actine 12
2.1.2 La polymérisation des microfilaments d'actine 14
2.1.3 L'association des microfilaments d'actine avec d'autres composantes cellulaires 15
2.1.4 La structure moléculaire des microtubules 18

2.1.5 La polymérisation des microtubules 19
2.1.6 L'association des microtubules avec d'autres composantes cellulaires 19
2.1.7 Les différents types de filaments intermédiaires 20
2.1.8 La structure moléculaire des filaments intermédiaires 21
2.1.9 La phosphorylation des filaments intermédiaires 25
2.1.10 L'association des filaments intermédiaires avec d'autres composantes cellulaires 29
2.2 Problématique 31
2.3 Revue de littérature 32
2.4 Objectifs du projet 37
2.5 Présentation des chapitres suivants 38

CHAPITRE III : SYNTHÈSE – ÉTUDE DU CYTOSQUELETTE DES CHONDROCYTES *IN SITU* 39
3.1 La structure du cytosquelette des chondrocytes dans le cartilage articulaire mature 40
3.2 La distribution du cytosquelette des chondrocytes dans le cartilage articulaire mature 41

CHAPITRE IV : CONSIDÉRATIONS TECHNIQUES ET EXPÉRIMENTALES – ÉTUDE DU CYTOSQUELETTE DES CHONDROCYTES *IN SITU* 43
4.1 Isolation et culture des explants 43
4.1.1 L'explant 45
4.1.2 L'irrigation 46
4.1.3 Les lavages 46
4.1.4 Le milieu de culture 47
4.1.5 La température 47

4.1.6 La viabilité 47
4.2 Techniques microscopiques utilisées 48
4.3 Préparation des échantillons pour la microscopie à fluorescence 53
4.3.1 Le tampon 54
4.3.2 La coupe 55
4.3.3 La perméabilisation 57
4.3.4 La fixation 57
4.3.5 Le blocage de l'autofluorescence 59
4.3.6 La digestion 59
4.3.7 Le marquage 60
4.3.8 La préparation des lames 62
4.4 Électrophorèse et transfert de Western 63
4.5 Préparation des échantillons pour l'électrophorèse 64
4.5.1 La coupe 65
4.5.2 L'extraction au RIPA 66
4.5.3 L'extraction au GuCl 67
4.5.4 Les inhibiteurs de protéases 67

CHAPITRE V : ARTICLE 1 – THE CHONDROCYTE CYTOSKELETON IN MATURE ARTICULAR CARTILAGE : STRUCTURE AND DISTRIBUTION OF ACTIN, TUBULIN AND VIMENTIN FILAMENTS 71
5.1 Présentation de l'article 71
5.2 Abstract 74
5.3 Introduction 74
5.4 Materials and Methods 77
5.4.1 Tissue Explant Isolation and Culture 77
5.4.2 Cell Viability 78
5.4.3 Tissue Preparation for Fluorescent Microscopy 78

5.4.4 Protein Extraction and Western Blot Analysis 81
5.4.5 Time Lapse Imaging 82
5.5 Results 83
5.6 Discussion 94
5.7 Acknowledgments 98
5.8 Conclusion 98

CHAPITRE VI : AUTRES RÉSULTATS – ÉTUDE DU CYTOSQUELETTE 100
6.1 Problématique 100
6.2 Revue de littérature 102
6.2.1 Le rôle du cytosquelette des chondrocytes dans la mécanotransduction 102
6.2.2 Le rôle mécanique du cytosquelette des chondrocytes 107
6.3 Objectifs 108
6.4 Méthodes 108
6.5 Résultats et conclusions 109
6.6 Discussion 110
6.7 Travaux futurs 116

CHAPITRE VII : INTRODUCTION – ÉTUDE DU COMPORTEMENT MÉCANIQUE DU CARTILAGE ARTICULAIRE 120
7.1 L'évaluation des propriétés mécaniques du cartilage 120
7.1.1 La géométrie des essais de compression 121
7.1.2 Les types d'essais de compression 123
7.1.3 L'analyse de la compression non confinée du cartilage articulaire. 126
7.1.4 Les propriétés mécaniques du cartilage articulaire 129
7.2 Problématique 130
7.3 Revue de littérature 132

7.3.1 Comportement linéaire et non linéaire du cartilage articulaire *in vitro* 132
7.3.2 Dégradation mécanique du cartilage articulaire *in vitro* 136
7.4 Objectifs 144
7.5 Présentation des chapitres suivants 144

CHAPITRE VIII : SYNTHÈSE – ÉTUDE DU COMPORTEMENT MÉCANIQUE DU CARTILAGE ARTICULAIRE EN COMPRESSION NON CONFINÉE 146
8.1 Le comportement non linéaire du cartilage articulaire 147
8.2 La dégradation des propriétés mécaniques du cartilage articulaire comprimé 148

CHAPITRE IX : CONSIDÉRATIONS TECHNIQUES ET EXPÉRIMENTALES - ÉTUDE DU COMPORTEMENT MÉCANIQUE DU CARTILAGE ARTICULAIRE 149
9.1 Isolation et conservation des explants 149
9.1.1 Les lavages 149
9.1.2 La conservation à 4 °C 150
9.1.3 La congélation 151
9.2 Les compressions mécaniques 152
9.2.1 Le chargement initial 152
9.2.2 Le protocole de compression 153
9.3 L'analyse des résultats 155
9.3.1 L'analyse de la linéarité 155
9.3.2 La détection de la dégradation 157
9.3.3 Les analyses statistiques 157

CHAPITRE X : ARTICLE 2 – SRAIN-AMPLITUDE AND STRAIN RATE DEPENDENT NONLINEAR BEHAVIOR AND INTRINSIC PROPERTY ALTERATIONS OF ARTICULAR CARTILAGE IN UNCONFINED COMPRESSION 159

10.1 Présentation de l'article 159

10.2 Abstract 162

10.3 Introduction 162

10.4 Materials and Methods 165

10.4.1 Tissue Explant Isolation 165

10.4.2 Mechanical Testing 166

10.4.3 Cartilage Thickness Measurement 167

10.4.4 Statistical Analysis 168

10.5 Results 169

10.6 Discussion 177

10.7 Acknowledgment 181

10.8 Conclusion 181

10.9 Travaux ultérieurs 183

CHAPITRE XI : CONCLUSION 185

11.1 Les études portant sur le cytosquelette des chondrocytes 185

11.2 L'étude du comportement mécanique du cartilage articulaire 187

11.3 Contribution 189

RÉFÉRENCES 191

ANNEXES 215

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4.1 Composition des tampons HBSS et HBSSm 55

Tableau 4.2 Spécificité des inhibiteurs utilisés lors de l'extraction des protéines 70

Tableau 9.1 Spécificité des inhibiteurs utilisés lors des lavages et des compressions 150

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Structure des articulations synoviales. (A) Photographie d'une articulation d'un doigt d'enfant montrant en pâle d'importantes zones de cartilage. Chez l'adulte, comme le montre le schéma (B), ces zones sont bien moindres. (Arms et Camp, 1989) 2

Figure 1.2 Représentation schématique de l'organisation des fibrilles de collagène dans le cartilage. Il est à noter que les différentes espèces ne sont pas dessinées à l'échelle. (Bruckner et van der Rest, 1994). 4

Figure 1.3 Schéma d'un agrégat géant de protéoglycannes. (Alberts *et al.*, 1990)..... 5

Figure 1.4 Représentation schématique des modèles macroscopique de Donnan et microcontinuum de Poisson-Boltzmann. Le modèle de Donnan assume un potentiel électrostatique,Φ, constant dans le tissu alors que le modèle de Poisson-Boltzmann tient compte des variations spatiales de potentiel entre les GAGs adjacentes. Adaptation de Buschmann et Grodzinsky (1995).... 7

Figure 1.5 Micrographie du cartilage articulaire d'un lapin de huit mois. Le tissu est organisé en quatre zones : (S) zone superficielle; (T) zone transitionnelle; (P) zone profonde et (C) zone de cartilage calcifié. Barre = 50 μm. (Buckwalter, 1997)..... 8

Figure 2.1 Représentation schématique des hélices d'actine décrivant l'arrangement géométrique des sous-unités dans les microfilaments d'actine. Adaptation de Aebi *et al.* (1986)..... 13

Figure 2.2 Fonctions des protéines de liaison de l'actine. Les monomères d'actine sont représentés par des triangles et les microfilaments par des flèches indiquant la polarité. Les protéines de liaison de l'actine sont représentées par des symboles pleins. Les abréviations Cc_+ et Cc_- sont utilisées pour *concentrations critiques* des extrémités *plus* et *moins* respectivement. (A) Recouvrement des extrémités et donc contrôle de la polymérisation; (B) rétention des monomères d'actine; (C) dépolymérisation des microfilaments; (D) fragmentation des microfilaments et recouvrement des extrémités; (E) liaison entre microfilaments; (F) auto-association des microfilaments; (G) nucléation et (H) ancrage et donc contrôle de la polymérisation. (Sheterline et Sparrow, 1994)..... 16

Figure 2.3 Structure moléculaire des microtubules. Adaptation de Alberts *et al.* (1994)..... 18

Figure 2.4 Structure consensus d'un monomère de filament intermédiaire. (Quinlan *et al.*, 1994)..... 22

Figure 2.5 Enroulement de deux hélices α. Adaptation de Alberts *et al.* (1994)..... 23

Figure 2.6 Formation des filaments intermédiaire. Deux monomères identiques (A) s'assemble pour former un dimère en

s'enroulant en torsade (B). Des dimères s'assemblent ensuite de façon antiparallèle pour former un tétramère (C) Finalement, les tétramères s'alignent le long de l'axe du filament (D) et s'entassent pour former les filaments de 10 nm de diamètre (E). Adaptation de Alberts *et al.* (1994) 24

Figure 4.1 Extraction d'un cylindre cartilage/os à l'aide d'une mèche à biopsie 44

Figure 4.2 Coupe de l'os superflu à l'aide d'une scie dentaire 44

Figure 4.3 Réduction du diamètre d'un disque de cartilage à l'aide d'un poinçon 45

Figure 4.4 Géométrie du microscope photonique. Adaptation de Aebi *et al.* (1996) 49

Figure 4.5 Microscope à épifluorescence. Adaptation de Foster (1997).... 51

Figure 4.6 Microscope confocale. Adaptation de Alberts et al. (1994)..... 52

Figure 4.7 Sectionnement optique et reconstruction tridimensionnelle d'un ellipsoïde. Adaptation de Dürrenberger et Sütterlin (1996) 52

Figure 4.8 Microscope à contraste d'interférence différentielle. Adaptation de Foster (1997)..... 53

Figure 4.9 Coupe rectangulaire incluant les quatre zones du cartilage

obtenue d'un explant 56

Figure 4.10 L'immunofluorescence directe. Adaptation de Alberts *et al.* (1994) 60

Figure 4.11 L'immunofluorescence indirecte. Adaptation de Alberts *et al.* (1994) 61

Figure 4.12 Coupe circulaire obtenue à partir d'un disque de cartilage 65

Figure 5.1 Low magnification epifluorescent images of cartilage sections labelled for actin microfilaments (A, D), β-tubulin (B, E) and vimentin (C, F). Sections were obtained from disks situated in the load-bearing contact region, some with more central (A-C) and some with more peripheral (D-F) locations. The division of the cartilage into three zones, tangential at the articular surface followed by the transitional and finally the deep radial zone is shown by the dotted lines. Scale bar = 250 μm 84

Figure 5.2 Western blot analysis of the three different zones (tangential, transitional and radial) performed on disks situated in the load-bearing contact region, with more central (left) or more peripheral locations (right). Disks were chosen adjacent to the disks used for low magnification epifluorescent images (Figure 5.1). Equal proportions of RIPA extracts and GuCl extracts of RIPA-insoluble proteins were subjected to SDS-PAGE and immunoblot transfer. Membranes were immunoblotted for actin, β-tubulin and vimentin 86

Figure 5.3 3D reconstructions from confocal laser scanning microscopy (CLSM) of cartilage sections labelled for actin microfilaments (A, D, G), β-tubulin (B, E, H) and vimentin (C, F, I) from the different depth zones: tangential (A-C), transitional (D-F) and radial (G, H, I). Scale bar = 10 μm 88

Figure 5.4 Optical CLSM (A-C) sections and 3D (D) reconstructions of chondrocytes from the transitional zone labelled for actin microfilaments. Scale bar = 10 μm 89

Figure 5.5 Optical CLSM (A-C) sections and 3D (D) reconstructions of chondrocytes from the transitional zone labelled for β-tubulin. Scale bar = 10 μm 90

Figure 5.6 Optical CLSM (A-C) sections and 3D (D) reconstructions of chondrocytes from the transitional zone labelled for vimentin. Scale bar = 10μm 91

Figure 5.7 Epifluorescence (A) and differential interference contrast (DIC) (B) images of vimentin-labelled chondrocytes. Regions which are devoid of any label (A - arrows), including double labelled specimens, were often recognised and coincided with vacuoles (B - arrows), perhaps due to lipid or glycogen particles, seen in DIC. Scale bar = 10 μm 92

Figure 5.8 DIC images of cartilage sections. Vacuolar structures (arrows) were visible on freshly isolated disks (A) and on cultured disks (B). Also, as observed by time lapse imaging, cell

morphology, including vacuole and nuclear size and shape, was maintained throughout the permeabilisation (C & D) and fixation (E & F) processing procedures. Scale bar = 10 µm..... 93

Figure 6.1 Position sur la surface articulaire des disques utilisés pour la réalisation des images à faible grossissement démontrant la distribution des microfilaments d'actine, des filaments intermédiaire de vimentine et des microtubules. Les disques ont été prélevés de deux articulations différentes (cercles blancs vs cercles gris) près du centre (C) ou en périphérie (P) de la région *load bearing* 115

Figure 6.2 Position sur la surface articulaire des disques utilisés pour l'observation des filaments de vimentine phosphorylés au site Ser82 à la suite des différents protocoles de compression (R : échantillons références; CS , CDB et CDH : contrôles statique, dynamique basse vitesse et dynamique haute vitesse; ES, EDB, EDH : expérimentaux statique, dynamique basse vitesse et dynamique haute vitesse). Les disques ont été prélevés dans la région *load bearing* de deux articulations différentes (cercles blancs vs cercles gris)..... 116

Figure 7.1 Représentation schématique de la géométrie d'indentation *in vitro* 121

Figure 7.2 Représentation schématique de la géométrie confinée 122

Figure 7.3 Représentation schématique de la géométrie non confinée 123

Figure 7.4 Représentation schématique de l'essai de fluage où une contrainte mécanique contrôlée est appliquée et la déformation enregistrée 124

Figure 7.5 Représentation schématique de l'essai de relaxation de contrainte où une déformation contrôlée est appliquée et la contrainte mécanique enregistrée 125

Figure 7.6 Représentation schématique d'un essai dynamique où une déformation sinusoïdale est appliquée et la contrainte mécanique enregistrée 126

Figure 10.1 The compressed specimen consists of an articular cartilage disk attached to a thin layer of subchondral bone (A). It is transferred to a uniaxial unconfined compression chamber containing HBSS with protease inhibitors (B) and subjected to the compression protocol sequence (C) where: test ramps are performed at 12.5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 and 300 μm using 1 of 3 speeds: 0.5, 5 or 50 μm/sec. Witness ramps for determining load-induced changes in intrinsic properties have 12.5 μm amplitude and 5 μm/sec velocity. Contact ramps used to ascertain full reswelling of samples after ramp-hold loading have 10 μm amplitude and 5 μm/sec velocity 168

Figure 10.2 Thickness of cartilage disks was evaluated at three points on the digital micrographs, being careful to measure perpendicularly to the articular surface 169

Figure 10.3 Example of stress relaxation profiles for the test ramps

performed at 5 μm/sec (A), with magnification showing the form of the stress rise during the ramp (B) 172

Figure 10.4 Peak moduli for the test ramps performed at 0.5, 5 and 50 μm/sec. Moduli were calculated from the test ramps by dividing forces by original area and by displacement amplitude normalized to original cartilage thickness. Peak moduli were normalized for each disk to the equilibrium modulus of the first test ramp (12.5 μm)..... 173

Figure 10.5 Equilibrium moduli for the test ramps performed at 0.5, 5 and 50 μm/sec. Moduli were calculated from the test ramps by dividing forces by original area and by displacement amplitude normalized to original cartilage thickness. Equilibrium moduli were normalized for each disk to the equilibrium modulus of the first test ramp (12.5 μm)..... 174

Figure 10.6 Example of stress relaxation profiles for witness ramps performed at different times during the compression protocol (A) and for witness ramps alone (performed in the absence of test ramps) over a 12 hour period (B) 175

Figure 10.7 Peak and equilibrium moduli for the witness ramps performed at different times during the compression protocol (A, B, C) and for the witness ramps alone (performed in the absence of test ramps) over a 12 hours period (D) normalized to the equilibrium modulus obtained with the first witness ramp..... 176

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ANOVA :	*Analysis of variance*
DMB :	*Dimethylmethylene Blue*
DIC :	*differential interference contrast*
EthD-1 :	*ethidium homodimer*
GAG :	glycasaminoglycanne
HBSS :	*Hank's balanced salt solution*
IF :	*intermediate filament*
IFAPs :	*intermediate filament-associated proteins*
MAPs :	*microtubule-associated proteins*
MF :	*microfilament*
mHBSS :	*modified HBSS*
MT :	*microtubule*
NF-H :	Neurofilament *high-molecular-weight*
NF-L :	Neurofilament *low -molecular-weight*
NF-M :	Neurofilament *middle-molecular-weight*
RIPA :	*Radio-immuno precipitation assay*
SDS :	sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE :	électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS

Δt	=	temps de décalage entre la déformation et la contrainte lors d'essai de déformation sinusoïdale
E_z	=	module de compression non confinée
ε	=	déformation
ε_0	=	amplitude d'une déformation sinusoïdale
f	=	fréquence

$G(t)$	=	module de relaxation
$G(j\omega)$	=	rigidité dynamique
G_0	=	module de relaxation pointe
$G_{\acute{e}}$	=	module de relaxation à l'équilibre
H_a	=	module axial de compression confinée
$J(t)$	=	compliance de fluage
φ	=	phase de la rigidité dynamique
k	=	perméabilité hydraulique
λ	=	module radial de compression confinée
ν	=	coefficient de Poisson
σ	=	contrainte
$\sigma_{\acute{e}}$	=	contrainte à l'équilibre
σ_0	=	amplitude d'une contrainte sinusoïdale
t	=	temps

LISTE DES ANNEXES

Annexe I — Amélioration des techniques microscopiques utilisées – Étude du cytosquelette 215

Annexe 2 — Autres résultats – Étude de cytosquelette 234

Annexe 3 — Le montage expérimental 245

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Ce projet de doctorat porte sur le cartilage articulaire, sujet introduit dans le présent chapitre. Nous y abordons le rôle, la composition et la structure du cartilage articulaire. Également, nous y traiterons de l'arthrite, la deuxième maladie la plus coûteuse au Canada après les maladies cardio-vasculaires (la Société d'arthrite, 1999a). Nous présenterons finalement la structure de la thèse en fin de chapitre.

1.1 Le cartilage articulaire

L'information contenue dans cette section est tirée principalement de l'article récent de Buckwalter (1997), un auteur reconnu. Lorsque la source d'information diffère, la référence est citée.

Chez les embryons des vertébrés, ce qui devient le squelette osseux est d'abord du cartilage. Des minéraux se déposent, des vaisseaux sanguins apparaissent, et le cartilage devient os. Toutefois, chez l'adulte, le cartilage n'est présent que dans certaines régions, dont les articulations synoviales, où il recouvre l'extrémité des os (figure 1.1). (Arms et Camp, 1989)

Le cartilage est la surface articulaire qui supporte les charges dans les joints animaux. Sa fonction primaire est d'ordre mécanique. Il fournit une surface articulaire ayant un coefficient de friction très bas, laquelle transmet et distribue les pressions à l'os sous-jacent.

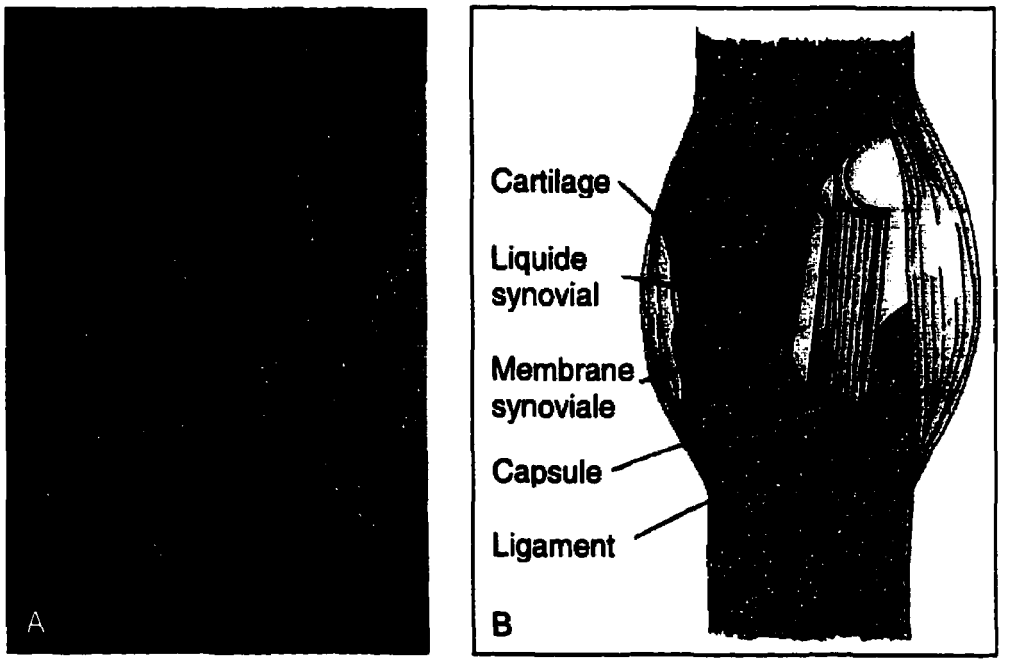

Figure 1.1 : Structure des articulations synoviales. (A) Photographie d'une articulation d'un doigt d'enfant montrant en pâle d'importantes zones de cartilage. Chez l'adulte (B), ces zones sont bien moindres. (Arms et Camp, 1989)

1.1.1 La composition du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif. Il se compose de cellules nommées chondrocytes ainsi que d'une matrice extracellulaire formée de macromolécules et de fluide interstitiel. Chez l'adulte, il ne comporte aucun vaisseau sanguin, aucun vaisseau lymphatique ni aucun nerf.

1.1.1.1 Les chondrocytes

Les chondrocytes n'occupent qu'un volume minoritaire du cartilage articulaire, soit environ 1 % chez l'homme adulte. (Chez les petits animaux, où le cartilage articulaire

est plus mince, la densité cellulaire est plus élevée.) À l'intérieur du cartilage articulaire, les chondrocytes s'entourent de matrice extracellulaire et n'ont aucun contact entre eux. Selon leur position en profondeur dans le cartilage mature, ils varient en taille, en forme et probablement en activité métabolique. Les chondrocytes sont caractérisés par i) leur forme sphéroïdale; ii) la synthèse de collagène de type II, d'agrégats géants de protéoglycannes et de protéines non collagéneuses spécifiques; et iii) l'agencement de ces molécules en matrice cartilagineuse.

Pendant la croissance squelettique, les chondrocytes se divisent et produisent du nouveau tissu. Toutefois, chez l'adulte, la majorité des chondrocytes ne se divisent pas mais continuent la synthèse pour le remplacement des macromolécules dégradées de la matrice, permettant ainsi le remaniement de celle-ci en réponse à des exigences fonctionnelles. Avec l'âge, la capacité des chondrocytes à synthétiser certaines protéoglycannes et leur réponse à certains stimuli diminuent. Le maintien de la matrice extracellulaire pourrait ainsi être limité, ce qui résulterait en la dégénérescence du cartilage articulaire.

1.1.1.2 Les collagènes

Soixante pour cent de la masse sèche du cartilage est constitué de collagènes. Ces molécules sont typiquement formées de trois chaînes polypeptidiques enroulées les unes sur les autres en superhélice. Il en existe au moins 15 types, et 5 sont présents dans le cartilage articulaire, soit les types II, VI, IX, et XI. Le collagène le plus abondant est celui de type II, qui compte pour 90 à 95 % du collagène total. Il s'agit d'un collagène fibrillaire, qui, une fois sécrété dans l'espace extracellulaire, s'assemble avec les collagènes de type IX et XI en un long et mince polymère ordonné nommé *fibrille de collagène* (figure 1.2). L'organisation de ces fibrilles en réseau serré s'étendant à travers le tissu fournit au cartilage articulaire sa force et sa rigidité en tension. De plus, en

retenant les protéoglycannes, ce réseau contribue à la cohésion du tissu. Il est à noter qu'une mésentente subsiste concernant le collagène de type X. Certains auteurs, comme Buckwalter (1997), croient que ce type de collagène est seulement présent chez l'adulte près des cellules formant le cartilage calcifié où il pourrait être impliqué dans la minéralisation du cartilage. D'autres auteurs, comme Boos *et al.* (1999), croient par contre que le collagène de type X est absent du cartilage adulte sain, mais qu'il se retrouve dans le cartilage articulaire atteint d'ostéoarthrite. (Alberts *et al.*, 1994; Buckwalter, 1997)

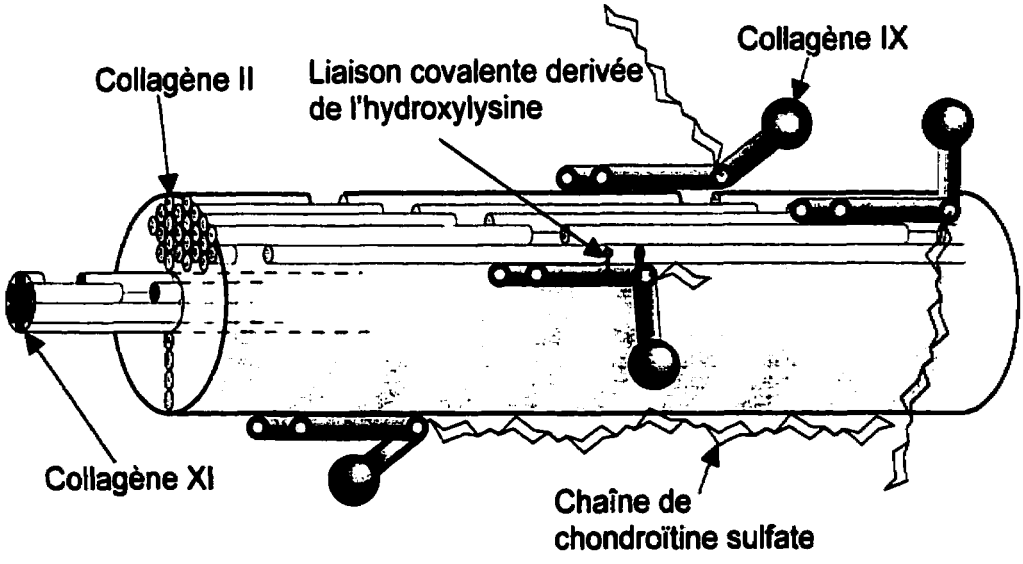

Figure 1.2 : Représentation schématique de l'organisation des fibrilles de collagène dans le cartilage. Il est à noter que les différentes espèces ne sont pas dessinées à l'échelle. (Bruckner et van der Rest, 1994)

1.1.1.3 Les protéoglycannes

Les protéoglycannes contribuent à 25 à 35 % de la masse sèche du cartilage. Ils consistent en un noyau protéique auquel se lient une ou plusieurs glycosaminoglycannes (GAGs) (longues chaînes de polysaccharides non branchées, composées d'une répétition

de disaccharides contenant chacun un glucide aminé). Les GAGs présents dans le cartilage articulaire sont l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate et le kératane sulfate. Dans le cartilage articulaire, on trouve deux classes principales de protéoglycannes : les petits protéoglycannes comme la décorine, la biglycanne et la fibromoduline, et les monomères d'agrégats géants de protéoglycannes, nommés agrécannes, formés de nombreuses chaînes de chondroïtine sulfate et de kératane sulfate rattachées à un noyau protéique. Ces agrécannes occupent pratiquement tout l'espace interfibrillaire et contribuent à environ 90 % de la masse totale des protéoglycannes. Liés par deux protéines de liaison à une chaîne d'acide hyaluronique, les agrécannes composent les agrégats géants de protéoglycannes (figure 1.3).

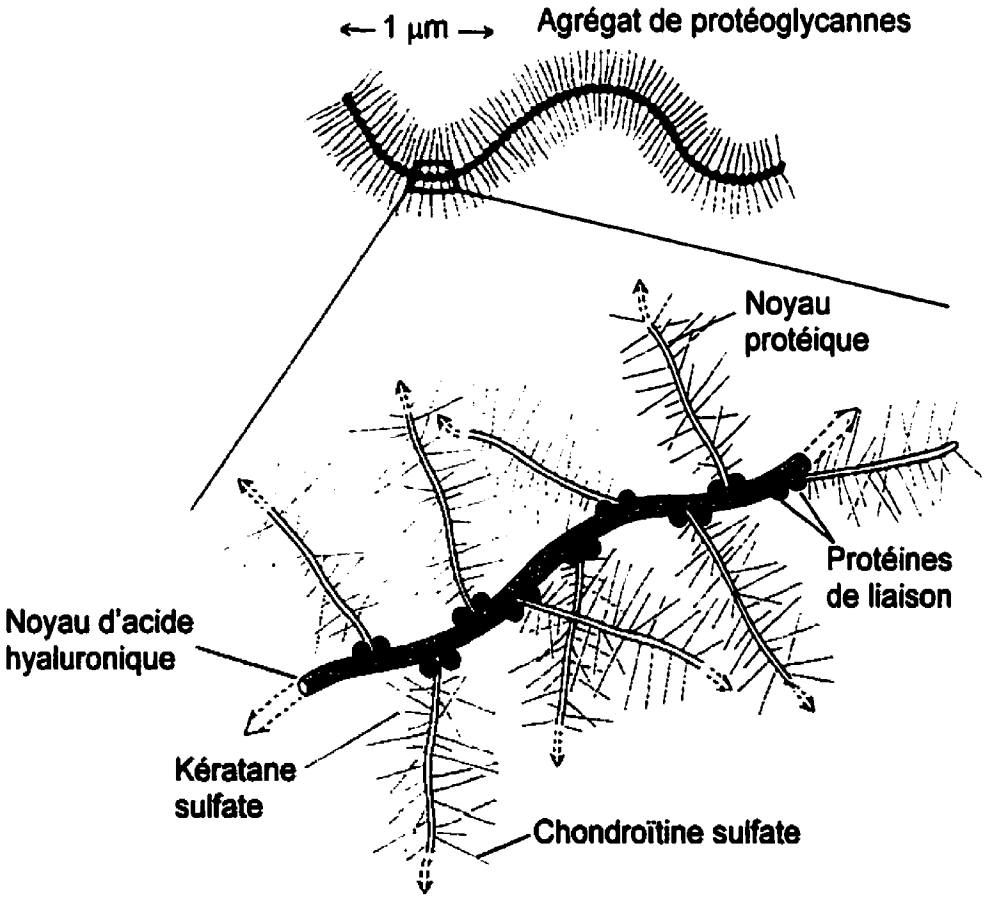

Figure 1.3 : Schéma d'un agrégat géant de protéoglycannes. (Alberts *et al.*, 1990)

Les agrécannes offrent au cartilage sa résistance en compression, ce qui s'explique par la haute concentration de charge anionique portée par les GAGs, les charges négatives se repoussant.

1.1.1.4 Le fluide interstitiel

L'eau peut représenter jusqu'à 80 % de la masse humide du cartilage articulaire. On y retrouve des gaz, de petites protéines, des métabolites et une haute concentration de cations balançant les charges négatives des protéoglycannes. La présence de ces ions crée une pression osmotique dans le tissu, qui est contrebalancée par le réseau de collagène. Cette pression osmotique peut être modélisée au niveau macromoléculaire en se basant sur l'équilibre de Donnan (Maroudas, 1979) ou au niveau moléculaire par l'équation de Poisson-Boltzmann (Buschmann et Grodzinsky, 1995). Une différence importante entre ces deux modèles est l'échelle du continuum (figure 1.4). L'approche de Donnan considère un volume contenant plusieurs macrocolécules où le potentiel électrostatique est assumé constant. De son côté, le modèle de Poisson-Boltzmann considère une GAG et son environnement immédiat d'ions mobiles. Cette approche tient compte des variations spatiales de potentiel électrostatique entre les GAGs adjacentes.

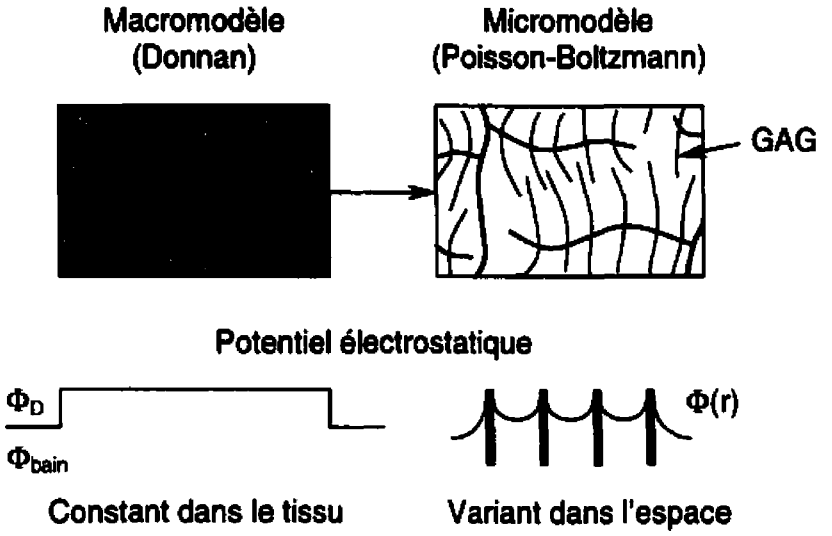

Figure 1.4 : Représentation schématique des modèles macroscopique de Donnan et microcontinuum de Poisson-Boltzmann. Le modèle de Donnan assume un potentiel électrostatique,Φ, constant dans le tissu alors que le modèle de Poisson-Boltzmann tient compte des variations spatiales de potentiel entre les GAGs adjacentes. Adaptation de Buschmann et Grodzinsky (1995)

1.1.2 La structure du cartilage articulaire

La composition, l'organisation et les propriétés mécaniques de la matrice, la morphologie cellulaire, et, probablement la fonction cellulaire varient selon la profondeur dans le cartilage articulaire. Quatre zones peuvent ainsi être identifiées dans le cartilage articulaire, soit la zone superficielle ou tangentielle, la zone transitionnelle, la zone radiale ou profonde et la zone de cartilage calcifié (figure 1.5).

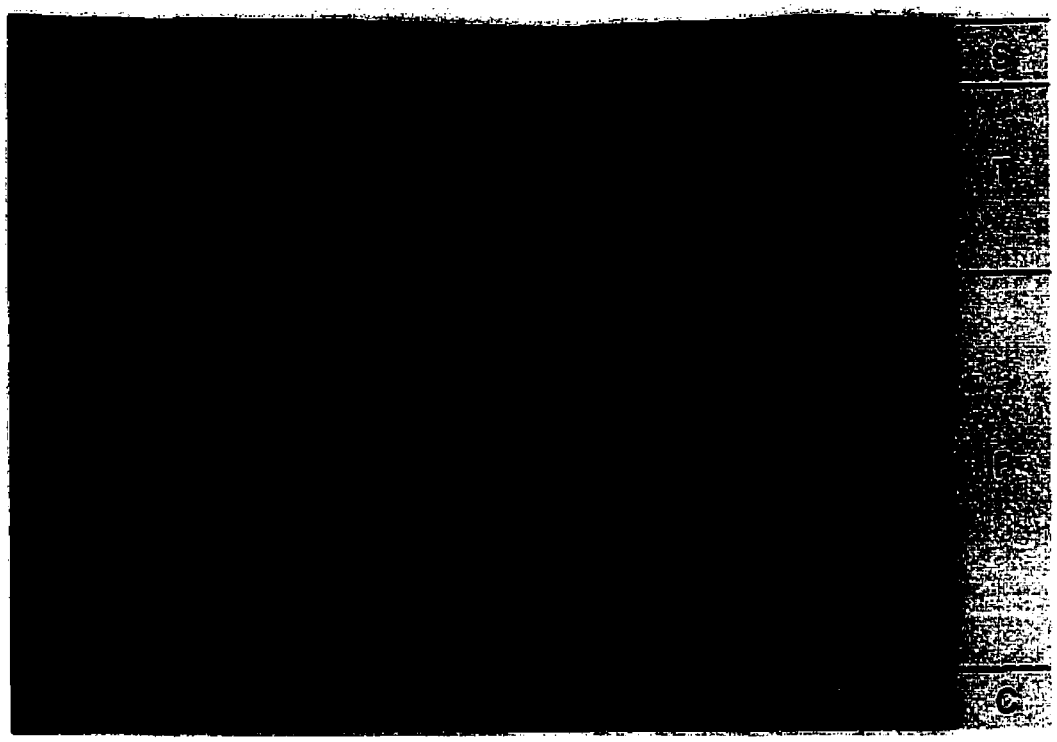

Figure 1.5 : Micrographie du cartilage articulaire d'un lapin de huit mois. Le tissu est organisé en quatre zones : (S) zone superficielle; (T) zone transitionnelle; (P) zone profonde et (C) zone de cartilage calcifié. Barre = 50 µm. (Buckwalter, 1997)

1.1.2.1 La zone superficielle

La zone superficielle se divise typiquement en deux couches : une première couche sans chondrocytes recouvrant la surface articulaire, et une seconde couche où des chondrocytes de forme ellipsoïde sont présents, avec leur axe principal parallèle à la surface articulaire. Les fibrilles de collagène aussi sont disposées parallèlement à la surface articulaire. Dans cette zone, relativement aux autres zones, la concentration des collagènes est élevée alors que celle des protéoglycannes est basse.

1.1.2.2 La zone transitionnelle

Dans la zone transitionnelle, les chondrocytes sont de forme sphéroïdale et possèdent une plus haute concentration d'organelles synthétiques, de réticulum endoplasmique et de membranes de Golgi que ceux de la zone superficielle. De leur côté, les fibrilles de collagène sont de plus gros diamètre mais sont présentes en moins haute concentration. Elles sont disposées de façon oblique par rapport à la surface articulaire. Finalement, la concentration de protéoglycannes est plus élevée dans cette zone que dans la zone superficielle.

1.1.2.3 La zone profonde

Les chondrocytes de la zone profonde possèdent également une forme sphéroïdale et ont tendance à s'aligner en colonne, perpendiculairement à la surface articulaire tout comme les fibrilles de collagène. C'est dans cette zone que les fibrilles sont les plus grosses, que la concentration de protéoglycannes est la plus haute et que la concentration en eau est la plus basse.

1.1.2.4 La zone de cartilage calcifié

Une zone mince de cartilage calcifié sépare la zone profonde de l'os sous-jacent. Dans cette région, les cellules sont de plus petite taille que celles de la zone profonde et ne contiennent que peu de réticulum endoplasmique et de membranes de Golgi.

1.1.2.5 Les régions du cartilage articulaire

La composition, l'organisation et la fonction de la matrice extracellulaire varient aussi selon la distance à partir de la cellule. Ainsi, trois régions peuvent être identifiées : la région péricellulaire (qui entoure chaque cellule), la région territoriale (qui entoure la région péricellulaire) et la région interterritoriale (qui occupe la majorité du volume du cartilage articulaire). Les fonctions des régions péricellulaire et territoriale seraient de relier les membranes cellulaires aux macromolécules de la matrice, de protéger les cellules durant le chargement et la déformation du tissu et, peut-être, de transmettre des signaux mécaniques aux chondrocytes. La région péricellulaire contient peu de fibrilles de collagène mais est très riche en protéoglycannes. De son côté, la région territoriale contient de minces fibrilles de collagène sous différents angles formant un genre de panier autour des cellules. Finalement, la région interterritoriale aurait comme fonction primaire de fournir les propriétés mécaniques au tissu. Elle a été expliquée précédemment dans la description des différentes zones.

1.2 L'arthrite

L'information présentée dans cette section a été recueillie sur le site Internet de la Société d'arthrite (1999b).

Le terme arthrite provient du grec, où « arth » signifie articulation et « itis », inflammation. Une centaine d'affections sont réunies sous le terme arthrite, de la tendinite au lupus. Elles touchent beaucoup de personnes âgées, mais aussi de jeunes enfants. Environ 3,5 millions de Canadiens en sont atteints, dont 2,7 millions souffriraient d'arthrose, la forme la plus courante d'arthrite.

L'arthrose est une dégradation qui cause dans le cartilage des trous et des fendillements. Il arrive souvent que le mouvement de l'articulation touchée soit gêné par la présence dans l'espace articulaire de débris de cartilage. La déformation de l'articulation et la détérioration de sa fonction s'ensuivent. Après plusieurs années, il peut y avoir frottement entre les os et formation d'excroissances osseuses.

Bien que la cause de l'arthrose ne soit pas encore identifiée, certains facteurs semblent augmenter la possibilité d'être touché par l'arthrose. Ces facteurs de risque sont l'hérédité, l'obésité, les blessures et les complications attribuables à une autre forme d'arthrite.

1.3 Présentation de la thèse

Le projet de doctorat faisant l'objet de cette thèse comporte trois sections principales. La première section porte sur la structure du cytosquelette des chondrocytes *in situ*. En complément à cette étude, la deuxième section présente des résultats préliminaires concernant la réponse du cytosquelette aux compressions mécaniques. Finalement, la dernière section examine la mécanique du chargement du cartilage, analyse essentielle à la compréhension des changements d'organisation du cytosquelette en réponse aux perturbations mécaniques.

Dans le chapitre actuel, nous avons présenté le cartilage articulaire et introduit la notion d'arthrite. Les chapitres II à VI se rapportent à l'étude du cytosquelette, alors que les chapitres VII à X concernent l'étude mécanique. Finalement, les points d'intérêt majeur de cette thèse sont présentés en conclusion au chapitre XI.

CHAPITRE II

INTRODUCTION – ÉTUDE DU CYTOSQUELETTE DES CHONDROCYTES *IN SITU*

Ce chapitre traite du cytosquelette, une structure hautement dynamique qui se réorganise continuellement lorsque la cellule change de forme, se divise ou répond à son environnement (Alberts *et al.*, 1994). Il s'agit d'un réseau tridimensionnel composé de trois types de filaments : les microfilaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires.

Dans la première section du chapitre, une description des microfilaments d'actine, des microtubules et des filaments intermédiaires sera présentée. Suivront dans les autres sections : la problématique, une revue de littérature sur le sujet et les objectifs de ce projet.

2.1 Le cytosquelette

L'information introduite dans cette section est tirée en très grande partie de l'ouvrage *Molecular Biology of the Cell* (Alberts *et al.*, 1994). Toutefois, dans les sections 2.1.7 et 2.1.8, elle provient majoritairement de *Actin* (Quinlan *et al.*, 1994). Lorsque la source d'information diffère, la référence est citée.

2.1.1 La structure moléculaire des microfilaments d'actine

Les microfilaments d'actine ont un diamètre d'environ 8 nm de diamètre et sont formés de molécules d'actine globulaire (figure 2.1). L'architecture moléculaire des

microfilaments peut être décrite par deux hélices à droite (*right-handed*) de long pas enroulées possédant 13 molécules d'actine par tour. Une description alternative est celle d'une simple hélice à gauche (*left-handed*) de faible pas nommée *hélice génétique*. Cette hélice compte 13 molécules d'actine par 6 tours. (Aebi *et al.*, 1986)

Les microfilaments d'actine sont des structures polaires. Ils possèdent des extrémités qui sont structurellement différentes – une extrémité *moins* relativement inerte à polymérisation lente ainsi qu'une extrémité *plus* à polymérisation rapide.

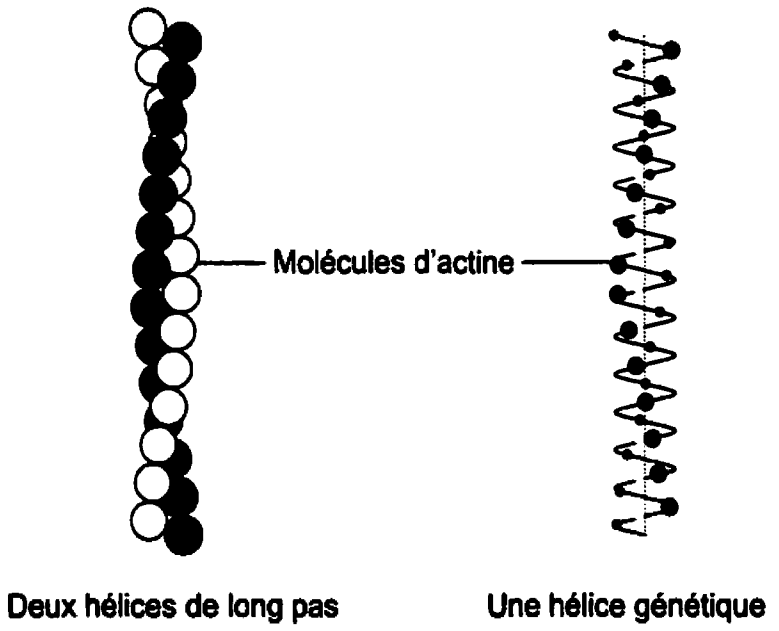

Figure 2.1 : Représentation schématique des hélices d'actine décrivant l'arrangement géométrique des sous-unités dans les microfilaments d'actine. Adaptation de Aebi *et al.* (1986)

L'actine se rencontre surtout dans le compartiment cytoplasmique des cellules, mais sa présence a aussi été rapportée dans le noyau (Sheterline et Sparrow, 1994). On trouve chez les mammifères au moins six isoformes d'actine qui sont regroupées en trois

classes selon leur point isoélectrique. Les actines α sont présentes dans plusieurs types de muscles, alors que les actines β et γ se retrouvent dans les cellules non musculaires. Toutefois, la séquence d'acide aminé a été hautement conservée dans l'évolution, et ces différentes classes d'actine forment toutes des filaments essentiellement identiques.

2.1.2 La polymérisation des microfilaments d'actine

La polymérisation d'actine pure *in vitro* requiert la présence d'ATP ainsi que de cations mono- et divalents qui sont habituellement K^+ et Mg^{++}. Lors de l'ajout de ces éléments aux monomères d'actine, il se produit initialement une phase latente où de nouveaux filaments sont nucléés, suivie d'une phase de polymérisation rapide où les petits filaments s'allongent par l'addition, une à une, de molécules d'actine. Peu de temps après la polymérisation, il y a hydrolyse de l'ATP lié aux molécules d'actine. Cette hydrolyse n'est pas requise pour la formation du filament. Elle sert plutôt à affaiblir les liaisons et ainsi à promouvoir la dépolymérisation du filament. Lorsque la concentration de molécules d'actine-ATP est grande, la polymérisation du microfilament est plus rapide que l'hydrolyse de l'ATP, et il y a formation d'un *capuchon ATP* à l'extrémité du microfilament. Ce capuchon favorise la croissance des microfilaments, car les molécules liées à l'ATP s'assemblent avec plus d'affinité que celles liées à l'ADP. Au contraire, lorsque la concentration de molécules d'actine-ATP est faible, le microfilament perd son capuchon et commence à raccourcir. Toutefois, les microfilaments d'actine ne semblent pas démontrer d'instabilité dynamique drastique *in vitro* comme c'est le cas pour les microtubules (voir section 2.1.5). Ils engagent plutôt un comportement dynamique de tapis roulant (*treadmilling*). Ceci se produit quand des molécules d'actine sont ajoutées de façon continue à l'extrémité *plus* et perdues également de façon continue à l'extrémité *moins*, et ce, sans changement notable dans la longueur du filament. Ce phénomène pourrait contribuer au renouvellement rapide des

microfilaments d'actine dans les cellules. (Alberts *et al.*, 1994; Bershadsky et Vasiliev, 1988)

La concentration critique, Cc, pour la polymérisation de l'actine (concentration de monomères d'actine libres à laquelle les microfilaments cessent de croître) est très faible. Cette dernière est très en deçà de la concentration d'actine non polymérisée dans une cellule. Ce sont de petites protéines qui se fixent aux monomères d'actine et contrôlent ainsi la polymérisation. La plus abondante de ces protéines est la thymosine. Elle pourrait bloquer de façon stérique la polymérisation de l'actine en couvrant le site de liaison des monomères, ou empêchant l'échange ADP-ATP, emprisonnant ainsi l'ADP sur le monomère d'actine en empêchant l'échange ADP-ATP.

2.1.3 L'association des microfilaments d'actine avec d'autres composantes cellulaires

Les microfilaments d'actine peuvent s'agencer de diverses façons pour former des faisceaux linéaires parallèles ou antiparallèles, des réseaux bidimensionnels ou des gels tridimensionnels. Les propriétés de ces structures (comme la longueur et la stabilité des filaments, le nombre et la géométrie des points d'attache) relèvent de l'association des microfilaments avec une variété de protéines (figure 2.2). Par exemple, la fimbrine serait responsable de l'association parallèle et étroite des microfilaments dans les spicules. De son côté, l'α-actinine présente dans les fibres toniques (*stress fiber*) formerait des liaisons plus lâches entre les microfilaments antiparallèles. Finalement, la filamine fixerait ensemble deux microfilaments croisés, favorisant ainsi la formation d'un réseau lâche et hautement visqueux.

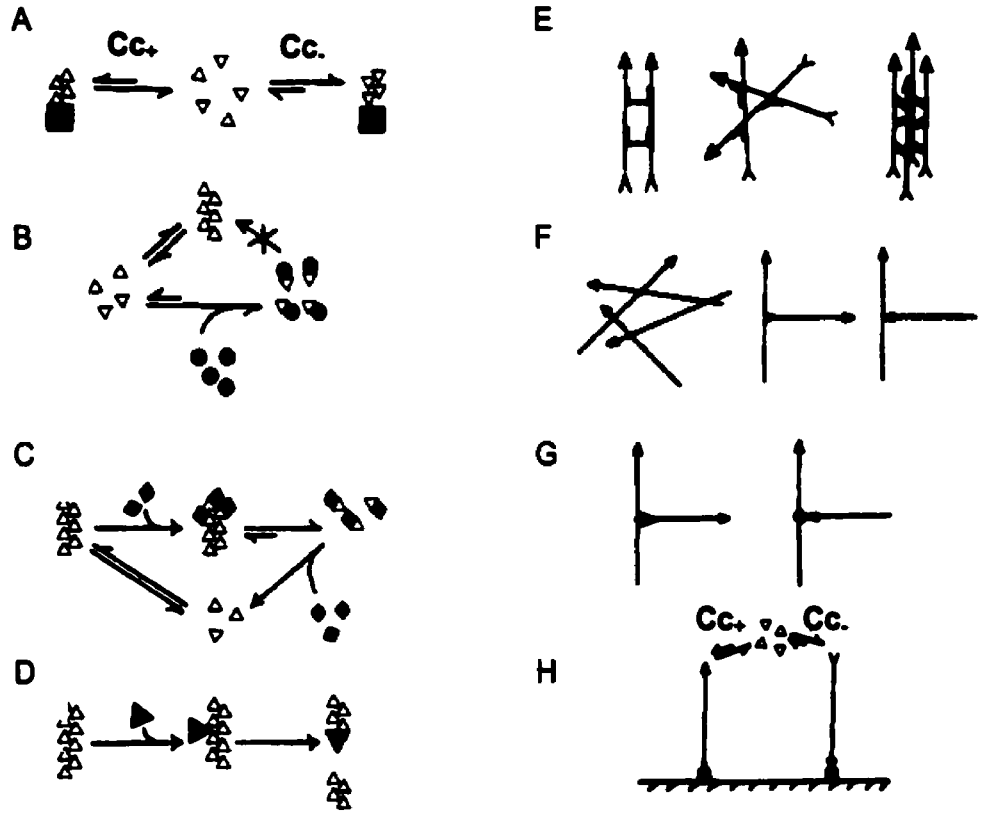

Figure 2.2 : Fonctions des protéines de liaison de l'actine. Les monomères d'actine sont représentés par des triangles et les microfilaments par des flèches indiquant la polarité. Les protéines de liaison de l'actine sont représentées par des symboles pleins. Les abréviations Cc_+ et Cc_- sont utilisées pour *concentrations critiques* des extrémités *plus* et *moins* respectivement. (A) Recouvrement des extrémités et donc contrôle de la polymérisation; (B) rétention des monomères d'actine; (C) dépolymérisation des microfilaments; (D) fragmentation des microfilaments et recouvrement des extrémités; (E) liaison entre microfilaments; (F) auto-association des microfilaments; (G) nucléation et (H) ancrage et donc contrôle de la polymérisation. (Sheterline et Sparrow, 1994)

Parmi les autres protéines qui se lient aux microfilaments d'actine, il y a la spectrine, une protéine longue, mince et flexible. Dans les globules rouges, la spectrine se lie aux

microfilaments pour former un réseau bidimensionnel fixé à la membrane plasmique en la supportant. La fodrine, qui est une proche parente de la spectrine, jouerait un rôle similaire dans d'autres types de cellules.

Il existe une autre catégorie de protéines (*severing proteins*) qui fluidifie le gel d'actine en présence de Ca^{++}. La gelsoline fait partie de ces protéines. Elle détruit le réseau d'actine en fragmentant les microfilaments et en coiffant l'extrémité *plus* nouvellement exposée.

Les protéines motrices utilisant l'ATP pour avancer le long des microfilaments d'actine sont les myosines. Il en existe deux classes : myosine-I et myosine-II. On retrouve la myosine-I dans les cellules non musculaires où elle peut, par exemple, faire glisser deux microfilaments l'un par rapport à l'autre, une vésicule par rapport à un microfilament ou un microfilament par rapport à une membrane. Le rôle de la myosine-II est de déplacer deux groupes de filaments d'actine orientés de façon opposée l'un par rapport à l'autre, comme c'est le cas dans la contraction musculaire. De plus, elle générerait la force dans l'anneau contractile et les fibres toniques.

Une autre catégorie de protéines se lie le long des microfilaments. La tropomyosine, par exemple, stabilise et rigidifie les microfilaments. Elle favorise aussi la liaison de la myosine-II, mais inhibe celle de la filamine.

La liste des protéines se liant à l'actine est longue, et ce ne sont que quelques exemples qui ont été présentés ci-dessus. Pour une liste exhaustive, le lecteur est invité à se référer à la revue de Sheterline et Sparrow (1994) sur l'actine.

L'ARNm de l'actine peut lui aussi être colocalisé avec le cytosquelette d'actine. Il semble commun que les ribosomes (à l'exception des ribosomes situés sur la membrane du réticulum endoplasmique) soient attachés au cytosquelette d'actine. Il n'est pas clair

si l'efficacité de la translation est améliorée ou si les fonctions des ribosomes liés sont contrôlées par des influences régulatrices additionnelles. (Sheterline et Sparrow, 1994)

2.1.4 La structure moléculaire des microtubules

Les microtubules sont de longs tubes de 25 nm de diamètre formés de tubuline, un hétérodimère composé de deux polypeptides globulaires, soit l'α-tubuline et la β-tubuline (figure 2.3). Chaque tube se compose de 13 protofilaments, chacun constitué de molécules de tubuline alignées bout à bout. Tout comme les microfilaments, les microtubules sont des structures polaires possédant une extrémité à croissance lente et une extrémité à croissance rapide.

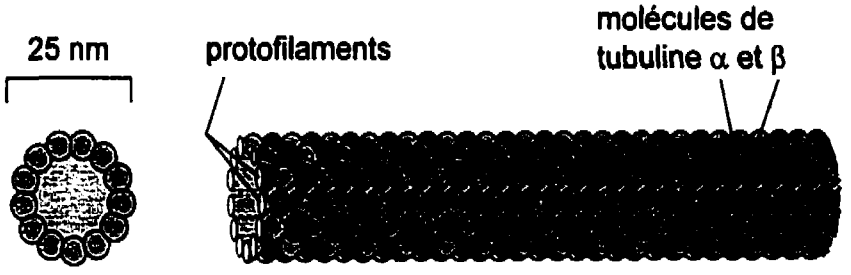

Figure 2.3 : Structure moléculaire des microtubules. Adaptation de Alberts *et al.* (1994)

Chez les mammifères, il existe au moins six formes d'α-tubuline et de β-tubuline. Toutefois, ces différentes formes de tubuline se ressemblent beaucoup et peuvent généralement copolymériser *in vitro*.

2.1.5 La polymérisation des microtubules

La polymérisation de tubuline pure *in vitro* requiert la présence de GTP et de Mg^{++}. Comme c'est le cas pour les microfilaments, la polymérisation des microtubules débute par une phase latente de nucléation et est suivie des phases de polymérisation rapide et d'équilibre. Dans les cellules, la croissance des microtubules s'effectue habituellement à partir d'un site spécifique de nucléation, souvent le centrosome.

Dans les fibroblastes en culture, la demi-vie des microtubules est d'environ 10 minutes alors que celle des molécules de tubuline est d'environ 20 heures. Ainsi, chaque molécule de tubuline participera à la formation et au démantèlement de plusieurs microtubules au cours de sa vie. En fait, les microtubules s'allongent et, soudainement, raccourcissent pour allonger de nouveau ou disparaître complètement. Ce phénomène, qu'on nomme *instabilité dynamique,* implique la polymérisation et la dépolymérisation de dizaines de milliers de molécules de tubuline sur des distances de plusieurs micromètres. Cette instabilité dynamique s'expliquerait par l'hydrolyse du GTP en GDP de manière similaire à l'hydrolyse de l'ATP en ADP chez les microfilaments. Elle peut être modifiée, par exemple, lorsque les cellules se différencient et adoptent une morphologie définitive. Souvent, c'est la liaison de protéines aux microtubules qui les stabilise contre la dépolymérisation.

2.1.6 L'association des microtubules avec d'autres composantes cellulaires

Les « MAPs », pour *microtubule-associated proteins*, se lient aux microtubules, les stabilisant ainsi contre le désassemblage et servant d'intermédiaires dans leur interaction avec d'autres constituants cellulaires. Certaines MAPs, en particulier la MAP-2s, relieraient les microfilaments aux microtubules (Sheterline et Sparrow, 1994). Les MAPs pourraient de plus aider à la compartimentation du cytoplasme.

Les dynéines cytoplasmiques et les kinésines constituent les deux classes de protéines motrices associées aux microtubules. Ces protéines utilisent l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour se déplacer de façon unidirectionnelle le long des microtubules tout en transportant une cargaison, par exemple des organelles. De manière générale, les kinésines déplacent leur cargaison vers l'extrémité *plus* tandis que les dynéines transportent leur cargaison vers l'extrémité *moins*.

2.1.7 Les différents types de filaments intermédiaires

Il existe au moins cinq classes de filaments intermédiaires : les kératines (types I-II), les protéines reliées à la vimentine (type III), les neurofilaments (type IV) et les lamines (type V). Les quatre premiers types sont des protéines cytoplasmiques tandis que les lamines sont des protéines nucléaires.

Les kératines sont presque exclusivement exprimées dans les épithéliums. En se basant sur leur séquence d'acides aminés, les kératines peuvent être subdivisées en deux types ; les kératines K9 à K20 sont de type I (acide) tandis que les kératines K1à K8 sont de type II (basique/neutre). Les filaments de kératine sont des hétéropolymères composés des types I et II ensemble. Ce sont les seules protéines de filament intermédiaire démontrant cette obligation de polymérisation hétérotypique. (De plus, chaque kératine de type I tend à être coexprimée avec une partenaire particulière du type II. Ainsi, en détectant une kératine particulière dans une cellule, on peut prédire la présence de sa partenaire.)

Les protéines constituant le type III sont la vimentine, la desmine, la protéine fibrillaire acide gliale et la périphérine. La vimentine est présente dans plusieurs cellules d'origine mésodermique. La desmine, elle, se trouve principalement dans les cellules musculaires. La protéine fibrillaire acide gliale est exprimée dans les astrocytes et certaines cellules

de Schwann. Finalement, les périphérines se situent dans certains neurones. La vimentine et les protéines reliées à la vimentine peuvent copolymériser entre elles. Toutefois, si elles sont coexprimées avec des kératines à l'intérieur d'une cellule, elles formeront des réseaux distincts de filaments.

Les filaments intermédiaires de type IV regroupent les protéines des neurofilaments NF-L, NF-M, NF-H (*low-*, *middle-* et *high-molecular-weight*) ainsi que l'α-internexine. On trouve ces protéines dans les cellules nerveuses. Il est à noter que les protéines NF-M et NF-H forment des filaments intermédiaires corrects en présence de NF-L seulement et que ces trois protéines sont généralement présentes dans chaque neurofilament.

Finalement, les lamines composent le type V. Ce sont des protéines du noyau qui forment une enveloppe immédiatement sous la membrane nucléaire. Il y a deux sous-types majeurs de lamines, celles de type A (A et C) et celles de type B (B1 et B2). Elles diffèrent des protéines des filaments intermédiaires cytoplasmiques, car elles ont un domaine central plus long, possèdent une séquence permettant de les localiser dans le noyau et s'assemblent en un treillis bidimensionnel.

2.1.8 La structure moléculaire des filaments intermédiaires

Contrairement au monomères d'actine, d'α- et de β-tubuline qui sont des protéines globulaires, les monomères de filament intermédiaire sont des protéines linéaires. Chaque monomère contient un domaine *bâtonnet* central délimité par un domaine *tête* N-terminal et un domaine *queue* C-terminal (figure 2.4). Le domaine central est une région hélice α. Elle est subdivisée en quatre sections hélicoïdales (1A, 1B, 2A et 2B) séparées par de courts domaines de liaison (L1, L12 et L2) qui, selon leur séquence, seraient non hélicoïdaux. Dans les différentes classes de filaments intermédiaires, les domaines hélicoïdaux et les domaines de liaison sont bien conservés, tant en taille qu'en

position. Il y a toutefois quelques exceptions comme les lamines et les périphérines, où l'hélice 1B diffère du patron consensus. Les domaines N-terminal et C-terminal ne sont pas hélicoïdaux. Ils varient beaucoup en taille et en séquence dans les différentes protéines des filaments intermédiaires. Ces domaines sont subdivisés en sections E1, V1 et H1 dans le domaine *tête* et E2, V2 et H2 dans le domaine *queue*. E1 et E2 sont les extrémités N-terminale et C-terminale respectivement. Elles pourraient jouer un rôle important dans l'assemblage des filaments intermédiaires. Les régions variables V1 et V2 seraient responsables de la majorité des différences de taille entre les filaments intermédiaires de la même classe. Elles contiennent un nombre variable de courtes répétitions approximativement similaires. Il semble que ces régions soient impliquées dans les interactions avec les protéines associées aux filaments intermédiaires. Les régions homologues H1 et H2 sont de présence variable. Elles montrent un certain degré de conservation dans leur séquence. On croit que ces régions sont importantes dans la polymérisation des filaments, car l'élimination expérimentale de ces sous-domaines produit des protéines qui ne polymérisent pas adéquatement. De plus, ces régions possèdent des sites potentiels de phosphorylation, surtout en H1.

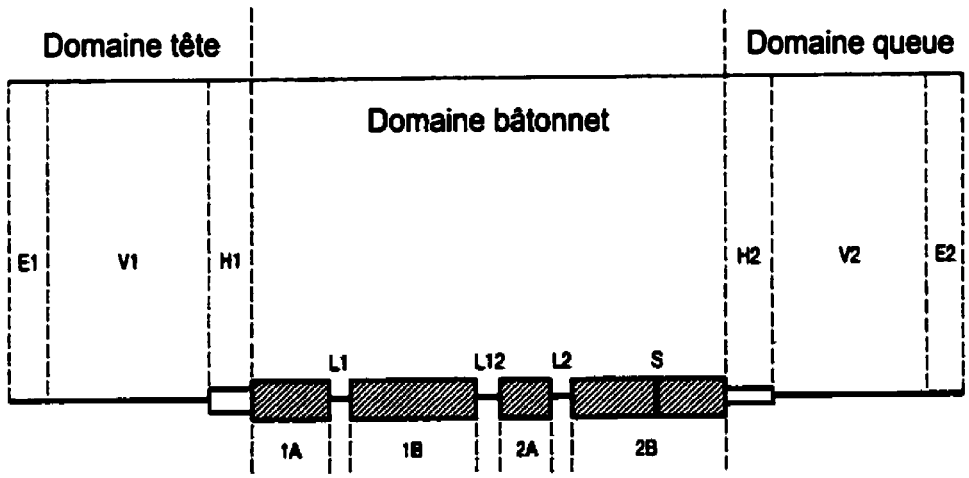

Figure 2.4 : Structure consensus d'un monomère de filament intermédiaire. (Quinlan *et al.*, 1994)

La formation d'un dimère entre deux monomères est favorisée par la répétition d'une séquence de sept acides aminés dans la région de l'hélice α. Les acides aminés 1 et 4 de la séquence se trouvent près l'un de l'autre à la surface de la protéine. Ces acides aminés forment ainsi une ligne hydrophobe tournant lentement autour de l'hélice α qui rend la molécule instable dans un environnement aqueux. En conséquence, deux hélices α s'enroulent en torsade où les radicaux hydrophobes d'une hélice interagissent avec les radicaux hydrophobes de l'autre hélice, et où les radicaux hydrophiles sont exposés à l'environnement aqueux (figure 2.5).

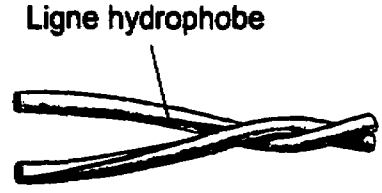

Figure 2.5 : Enroulement de deux hélices α. Adaptation de Alberts *et al.* (1994)

Par la suite, les dimères s'assemblent en tétramères de façon antiparallèle (figure 2.6). Ces derniers constitueraient la sous-unité fondamentale des filaments intermédiaires puisqu'on en trouve en petite quantité dans les cellules sous forme soluble. La structure antiparallèle des tétramères, et donc des filaments intermédiaires, les distingue des microfilaments d'actine ainsi que des microtubules qui sont polarisés et dont les fonctions dépendent de cette polarité.

La dernière étape de formation des filaments intermédiaires est moins bien caractérisée. Il semble toutefois que les tétramères s'alignent le long de l'axe du filament et s'entassent pour former un motif hélicoïdal (figure 2.5). Les filaments résultants ont un diamètre d'environ 10 nm.

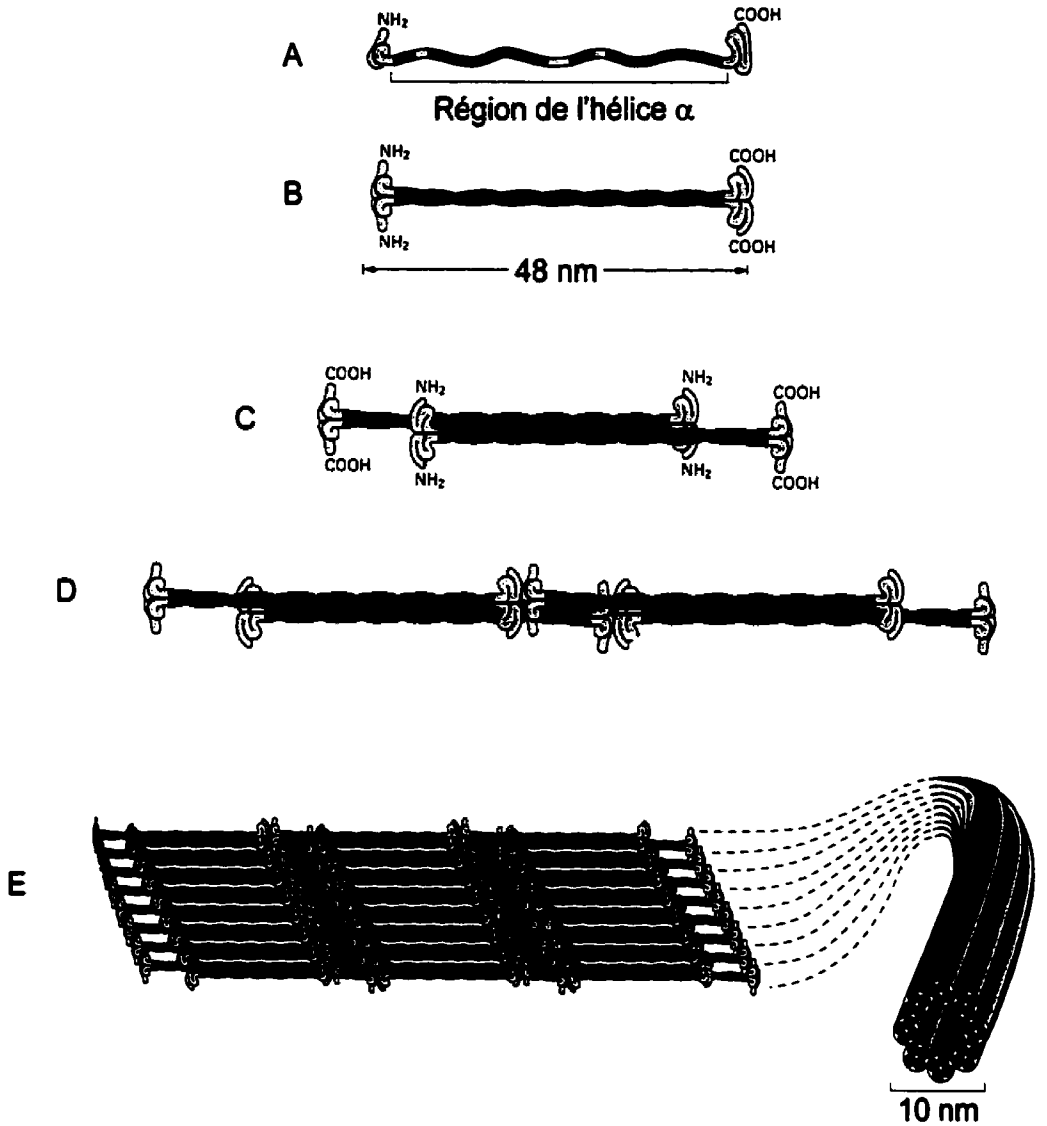

Figure 2.6 : Formation des filaments intermédiaires. Deux monomères identiques (A) s'assemblent pour former un dimère en s'enroulant en torsade (B). Des dimères s'assemblent ensuite de façon antiparallèle pour former un tétramère (C). Finalement, les tétramères s'alignent le long de l'axe du filament (D) et s'entassent pour former les filaments de 10 nm de diamètre (E). Adaptation de Alberts *et al.* (1994)

Les protéines NF-M et NF-H possèdent des extrémités C-terminales spécialement longues qui forment des ponts transversaux entre les protéines. Cet arrangement pourrait contribuer à l'espacement régulier des neurofilaments dans les axones et fournir à ces derniers une grande résistance à la tension.

À la suite d'études d'affinité, Georgatos *et al.* (1987a, b et c) décrivent hypothétiquement les réseaux de vimentine et de desmine. Les filaments de vimentine et de desmine interagiraient avec la lamina nucléaire à travers les pores nucléaires. Ces mêmes filaments traverseraient le cytoplasme pour s'associer à la membrane en périphérie de la cellule.

On l'a vu précédemment, les lamines ne forment pas des filaments mais plutôt un treillis bidimensionnel sous la membrane nucléaire. Cette enveloppe mesure typiquement entre 10 et 20 nm d'épaisseur et s'interrompt dans la région des pores nucléaires.

2.1.9 La phosphorylation des filaments intermédiaires

Chez les filaments intermédiaires, la phosphorylation s'effectue principalement, sinon exclusivement, dans les domaines tête et queue. De plus, seuls les résidus sérine et thréonine seraient phosphorylés. Une hypothèse qui semble se confirmer est que la phosphorylation peut survenir à des sites uniques propres à chaque type de filament ou a des sites conservés entre les types de filaments. Ainsi, les sites uniques propres à un type de filament pourraient remplir des fonctions spécifiques reliées à l'expression particulière de cette protéine dans un tissu. Au contraire, les sites de phosphorylation conservés chez plus d'un type de filament pourraient remplir des fonctions communes chez les filaments impliqués. Il est à noter cependant qu'un site de phosphorylation pourrait à la fois remplir des rôles spécifiques et communs. Basées sur les observations *in vivo* et *in vitro*, plusieurs fonctions ont été proposées pour la phosphorylation des

filaments intermédiaires cytoplasmiques : la réorganisation des filaments, la solubilité, la localisation, la régulation de l'association avec d'autres protéines cytoplasmiques, la protection possible contre les tensions physiologiques, la médiation de fonctions spécifiques au tissu. (Ku *et al.*, 1996a)

2.1.9.1 La réorganisation des filaments

L'étude de Chou *et al.* (1990) en est une qui appuie la fonction de réorganisation des filaments par la phosphorylation. Selon eux, la kinase $p34^{cdc2}$ pourrait contrôler les changements structuraux des filaments intermédiaires cytoplasmiques durant la mitose. Ils ont identifié la vimentine comme étant un substrat de cette kinase, et plus principalement son domaine N-terminal (données non publiées, citées par Chou *et al.*, 1990). Ils ont aussi démontré que la phosphorylation par la kinase $p34^{cdc2}$ de filaments de vimentine polymérisés *in vitro* cause leur désassemblage.

Toujours durant la mitose, le noyau se désassemble et la lamina nucléaire se dépolymérise. À la suite de l'étude réalisée *in vivo* sur des cellules d'ovaires de hamster chinois, Ottaviano et Gerace (1985) soutiennent l'hypothèse voulant que la phosphorylation soit impliquée dans ce processus. Ils ont observé que la phosphorylation des lamines est graduelle pendant toute l'interphase. De plus, selon leurs analyses, 50 % des lamines A et C sont phosphorylées en un seul site, alors qu'à la mitose toutes les lamines A et C possèdent deux ou trois molécules de phosphate. De façon similaire, toutes les lamines B en mitose sont mono- ou diphosphorylées. Ainsi, ils expliquent qu'un bas niveau de phosphorylation pendant l'interphase pourrait permettre l'insertion de nouvelles lamines et/ou le réarrangement des lamines déjà assemblées en diminuant localement l'affinité entre les polypeptides. Aussi, à la mitose, la phosphorylation de l'ensemble des lamines favoriserait la dépolymérisation générale de la lamina.

2.1.9.2 La solubilité des filaments

Comparativement aux microfilaments et aux microtubules, les filaments intermédiaires sont relativement insolubles. À l'intérieur des cellules, la faible fraction soluble se compose de tétramères tandis que la fraction insoluble est associée à la membrane ou au cytosquelette, ou encore est présente sous forme de filaments. Plusieurs études *in vitro*, dont celle de Streifel *et al.* (1996), ont démontré les effets de la phosphorylation sur la solubilité (Ku *et al.*, 1996a). Ces auteurs ont étudié l'effet de la phosphorylation par la protéine kinase AMPc-dépendante sur l'assemblage *in vitro* des protéines NF-L et NF-M. Les conclusions tirées de cette étude sont : 1) la phosphorylation de NF-L ou NF-M par la protéine kinase A inhibe tout assemblage en filaments; et 2) la phosphorylation ne bloque pas la formation d'hétéropolymères, mais bloque plutôt un stade ultérieur de l'assemblage en filaments.

2.1.9.3 La localisation

La localisation des protéines des filaments intermédiaires selon leur état de phosphorylation a été observée chez les neurofilaments *in situ*. En effet, Sternberger et Sternberger (1983) ont remarqué que les neurofilaments phosphorylés se situaient préférentiellement dans les axones plutôt que dans les corps cellulaires et les dendrites.

2.1.9.4 La régulation de l'association avec d'autres protéines cytoplasmiques

Foisner *et al.* (1991) ont réalisé une étude supportant l'idée que la phosphorylation peut réguler l'association des protéines des filaments intermédiaires avec d'autres protéines cytoplasmiques. Ils ont démontré, *in vitro*, que la phosphorylation de la plectine ou de la lamine B par les protéines kinases A et C diminuait leur interaction, alors que la

phosphorylation de la plectine par la protéine kinase A augmentait son interaction avec la vimentine.

2.1.9.5 La protection possible contre les tensions physiologiques

Plusieurs auteurs ont observé une forte corrélation entre l'hyperphosphorylation des kératines K8/K18 et la présence de tensions cellulaires. Liao *et al.* (1995b) ont noté une corrélation entre la génération de kératines K8 hyperphosphorylées et un « *heat stress* » ou une infection au rotavirus. Des résultats similaires ont été obtenus chez plusieurs lignées de cellules lors de l'arrêt forcée de la mitose, qui peut être considéré comme une forme de tension (Chou *et al.*, 1994; Liao *et al.*, 1995a). Certaines observations permettent de penser qu'un rôle de la phosphorylation des kératines est de protéger les cellules. Par exemple, Ku *et al.* (1996b) ont constaté que des souris transgéniques ayant une mutation au niveau de la kératine K18 étaient plus sensibles à une hépatotoxicité que les souris non transgéniques. Cette prédisposition serait associée à la rupture des filaments de kératine des hépatocytes. Ils ont aussi observé que la grisofulvine, une hépatotoxine, augmentait préférentiellement le niveau de phosphorylation des kératines normales. Ainsi, ces auteurs suggèrent que l'augmentation importante de la phosphorylation des kératines non mutantes représente un avantage de survie. La façon dont l'hyperphosphorylation protégerait la cellule contre les tensions n'est pas encore définie, mais Ku *et al.* (1996a) proposent deux hypothèses. Par exemple, la diminution rapide du pool d'ATP par l'hyperphosphorylation d'un groupe important de protéines pourrait permettre de conserver les phosphates pour une utilisation ultérieure et aider à ralentir les fonctions normales de la cellule jusqu'à l'arrêt de la tension, ou alors l'hyperphosphorylation pourrait faciliter d'autres signaux cellulaires non encore définis.

2.1.9.6 La médiation de fonctions spécifiques au tissu

L'expression des protéines de filaments intermédiaires est spécifique au tissu, ce qui suggère que les fonctions de ces protéines soient aussi spécifiques au tissu. Selon Ku *et al.* (1996a), certaines de ces fonctions des filaments intermédiaires pourraient être régulées par la phosphorylation. Ils citent en exemple l'entassement des neurofilaments et le diamètre des axones qui sont grandement déterminés par l'état de phosphorylation de la queue C-terminale des sous unités NF-H et NF-M (Nixon *et al.*, 1994). C'est que les protéines NF-M et NF-H possèdent des extrémités C-terminales spécialement longues qui forment des ponts transversaux entre les protéines (Alberts et *al.*, 1994).

2.1.10 L'association des filaments intermédiaires avec d'autres composantes cellulaires

Plusieurs protéines s'associant aux filaments intermédiaires ont été rapportées. Elles ont été nommées « IFAPs » pour *intermediate filament-associated proteins* en référence au terme « MAPs ». On en connaît peu sur la majorité de ces protéines (Quinlan *et al.*, 1994). La plectine fait partie des IFAPs. Elle lierait les filaments intermédiaires aux autres réseaux protéiques du cytosquelette ainsi qu'aux sites d'adhésion membranaires (Svitkina *et al.*, 1996).

D'autres protéines font partie de complexes structuraux comme les desmosomes. Les desmosomes sont des jonctions spécialisées reliant les cellules voisines entre elles. À l'intérieur de la cellule, ils sont constitués de plusieurs protéines d'attachement auxquelles les filaments intermédiaires se lient latéralement. Les types de filaments intermédiaires s'y rattachant dépendent du type cellulaire : ce sont, par exemple, les filaments de kératine dans la majorité des cellules épithéliales et les filaments de desmine dans les cellules musculaires cardiaques. Les hémidesmosomes, eux, sont des

jonctions reliant les cellules épithéliales à la lamina sous-jacente. Les protéines transmembranaires qui lient les filaments intermédiaires dans les hémidesmosomes sont les intégrines $\alpha 6\beta 4$.

Les ribosomes aussi interagissent avec les filaments intermédiaires. À cause de leur charge négative et de leur faible affinité avec les filaments intermédiaires, Bauer et Traub (1995) ont utilisé les ribosomes pour étudier le potentiel des filaments intermédiaires cytoplasmiques à distribuer et à transporter les particules polyanioniques du cytoplasme. Ils ont émis l'hypothèse que les filaments intermédiaires cytoplasmiques, grâce à la différence de charge entre les régions N-terminales et C-terminales voisines, sont capables d'attirer les particules polyanioniques. Ils ont démontré qu'effectivement une interaction existait, *in vitro*, entre les sous-unités ribosomiques 40S, 60S ainsi que 80S et les filaments intermédiaires cytoplasmiques (vimentine, desmine, protéine fibrillaire acide de la neurologie et cytokératines). Cette interaction serait principalement d'ordre électrostatique et impliquerait l'ARN des particules ribosomiques.

La lamina nucléaire, qui est constituée de filaments intermédiaires de type lamine, est ancrée aux pores ainsi qu'à la membrane nucléaires. Tout au long de la mitose, les lamines de type B restent associées aux fragments de membrane et pourraient aider à reformer le noyau. La lamina nucléaire interagirait aussi avec la chromatine fournissant un lien structural entre l'ADN et l'enveloppe nucléaire.

Georgatos et Blobel (1987a, b et c) ont démontré, *in vitro*, que des interactions existaient entre les filaments intermédiaires et les membranes plasmique et nucléaire. Plus précisément, les domaines N-terminaux de la vimentine et de la desmine se lieraient à une protéine de la membrane plasmique, la protéine ankyrine, tandis que les domaines C-terminaux se lieraient à la lamine B. Pour ces protéines cytoplasmiques, le seul accès concevable vers le noyau est le passage à travers les pores nucléaires.

2.2 Problématique

Le cytosquelette des chondrocytes remplit une multitude de fonctions cellulaires (pour plus de détails, le lecteur est invité à se référer à l'article 1, section 5.3). En plus d'exercer des fonctions mécaniques, il serait impliqué dans le contrôle du phénotype chondrogénique, l'adhésion, la signalisation cellulaire, le transport, la sécrétion et l'endocytose. Il a aussi été proposé que les filaments intermédiaires soient impliqués dans l'ostéoarthrite (Benjamin *et al.*, 1995). L'étude de cette maladie chez des souris de la lignée STR/ort, lignée qui développe naturellement et spontanément l'ostéoarthrite, a permis d'observer des changements dans l'expression des filaments intermédiaires des cellules du fibrocartilage avant toute altération dans la matrice extracellulaire ou tout signe histologique de dégénérescence.

Puisque le cytosquelette joue un rôle important dans le fonctionnement des chondrocytes et du cartilage, il importe de connaître son organisation et sa distribution physiologique. Ces informations essentielles à l'étude des fonctions du cytosquelette sont aussi nécessaires à la compréhension de son rôle dans l'évolution de l'ostéoarthrite.

Pour une description fidèle, le cytosquelette devrait être caractérisé à l'intérieur de son environnement naturel, c'est-à-dire *in situ*. En effet, les chondrocytes cultivés en monocouche s'aplatissent et n'expriment plus leur phénotype biosynthétique (Benya et Shaffer, 1982). En traitant ces chondrocytes avec de la cytochalasine D, on dépolymérise les filaments d'actine, à la suite de quoi, la cellule s'arrondit et reprend la synthèse du collagène de type II propre au cartilage (Zanetti et Solursh, 1984). Il a été suggéré que cette dédifférenciation provienne des changements dans l'organisation des microfilaments d'actine plutôt que dans la forme de la cellule (Brown et Benya, 1988). Mallein-Gerin *et al.* (1991) ont démontré que l'arrêt de synthèse du collagène de type II est relié à la présence de fibres toniques d'actine et est indépendant de la forme de la cellule. D'après ces observations, on comprend que les fibres toniques sont des artefacts induits par la culture en

monocouche et qu'il importe de maintenir les chondrocytes *in situ* pour l'étude du cytosquelette.

Seule une toute récente étude (Durrant *et al.*, 1999) rapporte l'organisation tridimensionnelle et la distribution des réseaux d'actine et de vimentine des chondrocytes *in situ* (voir section 2.3). La présente étude a pour objectif de décrire la structure et la distribution des trois réseaux protéiques du cytosquelette des chondrocytes *in situ*, soit les microfilaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires de vimentine. Elle est donc complémentaire à celle de Durrant *et al.* (1999) parce qu'elle traite du réseau de microtubules, mais aussi parce que les tissus étudiés sont d'origine, d'épaisseur et de conformation différentes (Durrant *et al.* (1999) : rat ~60 µm sans os; Langelier *et al.* (2000) : bœuf ~1200 µm avec os) et que les techniques de perméabilisation, de fixation et d'immunomarquage diffèrent.

2.3 Revue de littérature

La présence de filaments cytoplasmiques dans les chondrocytes articulaires est connue depuis les années 60, mais leurs fonctions, elles, sont encore méconnues. On sait qu'il existe des filaments d'actine, des microtubules et un troisième type de filaments de 10 nm de diamètre. (Stockwell et Meachim, 1979 – revue)

Godman et Porter (1960) ont observé, par microscopie électronique, la présence de filaments cytoplasmiques de 6 à 10 nm de diamètre dans les chondrocytes articulaires de rats embryonnaires et nouveau-nés. Ces filaments disposés parallèlement se situent principalement près de la membrane cellulaire. Une continuité entre les filaments cytoplasmiques et les fibrilles de la matrice extracellulaire semble parfois présente. À cette époque, les auteurs croient que des filaments peuvent se détacher des faisceaux et devenir les éléments originaux des fibrilles de la matrice, c'est-à-dire qu'ils sont des

précurseurs du collagène. Il est à noter que, vu la plage de diamètres rapportés (6 à 10 nm), les auteurs pourraient avoir observé deux types de filaments, soit les microfilaments d'actine et les filaments intermédiaires.

Des études similaires réalisées sur du cartilage articulaire de lapin (Barnett *et al.*, 1963; Palfrey et Davies, 1966), d'humain (Meachim et Roy, 1967) et sur des populations de cellules chondrogéniques (Ishikawa *et al.*, 1969) révèlent l'existence de filaments cytoplasmiques de 9 à 12 nm de diamètre. Ces filaments habituellement entassés, forment des faisceaux entre les organelles et autour de celles-ci (Palfrey et Davies, 1966) ou autour du noyau (Barnett *et al.*, 1963; Meachim et Roy, 1967). On a également noté qu'ils forment des masses spiralées autour de l'appareil de Golgi ou du noyau (Palfrey et Davies, 1966). Leur présence est plutôt périnucléaire que périphérique (Meachim et Roy, 1967).

Des études plus récentes, ont permis, à l'aide de micrographies électroniques de cartilage articulaire de lapin, de comparer la teneur cellulaire en filaments intermédiaires pour différentes régions du cartilage.

Selon Brighton *et al.* (1984), l'aire occupée par les filaments intermédiaires est minuscule dans la zone superficielle, augmente dramatiquement dans la zone transitionnelle, diminue dans la zone radiale et est nulle dans la zone calcifiée.

Paukkonen et Helminen (1987) ont déterminé le pourcentage de chondrocytes exhibant des masses de filaments intermédiaires. Les résultats sont de 8,5 % pour la zone superficielle, de 48,8 % pour la zone transitionnelle et de 53,5 % pour la zone radiale.

Eggli *et al.* (1988) ont examiné l'hétérogénéité dans les différentes zones du cartilage. Ainsi, ils ont noté que les zones transitionnelle et radiale se caractérisent par un volume cellulaire plus grand que les zones superficielle et calcifiée. De façon similaire, ils ont

comparé des régions de cartilage supportant des charges élevées et moins élevées. Les régions supportant des charges plus élevées se révèlent plus épaisses et contiennent des cellules de plus grande taille. Dans les deux cas, l'augmentation du volume cellulaire serait attribuable principalement à l'accumulation de filaments intermédiaires et de particules de glycogène.

L'utilisation de la microscopie à fluorescence a permis d'identifier les filaments intermédiaires présents dans les chondrocytes articulaires de lapin comme étant de la vimentine. Dans les chondrocytes en culture, ces filaments de vimentine entourent le noyau, où l'intensité du marquage est maximale, puis forment un réseau enchevêtré traversant la cellule jusqu'à la membrane cellulaire. (Lins *et al.*, 1986)

Toujours par microscopie à fluorescence, Brown et Benya (1988) présentent des images du cytosquelette de chondrocytes articulaires de lapin cultivés en monocouche. Les filaments de vimentine entourent le noyau et s'étendent dans le cytoplasme.

Plusieurs travaux réalisés au microscope électronique sur le cartilage articulaire rapportent l'existence de filaments intermédiaires (Durrant *et al.*, 1999). L'étude des microfilaments *in situ* est beaucoup plus sommaire, la majorité des travaux ayant été accomplis sur des cultures de chondrocytes.

Ishikawa *et al.* (1969) ont travaillé avec des populations de cellules chondrogéniques. Ils ont remarqué dans ces cellules souvent dédifférenciées, la présence de filaments de 6 à 7 nm de diamètre et d'apparence perlée. Des fibres toniques ont également été distinguées, particulièrement dans la région corticale et dans les pseudopodes. Ces deux structures forment des complexes avec la chaîne lourde de meromyosin analogue au complexe que forment les filaments d'actine avec cette molécule. Il s'agit probablement de la première identification de l'actine dans les chondrocytes.

Plus récemment, à l'aide de la microscopie à fluorescence, Brown et Benya (1988) ont observé, dans les chondrocytes articulaires de lapin cultivés en monocouche, que les microfilaments s'agencent en fibres toniques.

Mallein-Gerin *et al.* (1991) ont étudié, aussi par microscopie à fluorescence, la relation entre l'organisation de l'actine et l'expression du phénotype chondrogénique chez des chondrocytes embryonnaires. Ils ont démontré que les cellules exhibant des fibres toniques d'actine ne synthétisent plus de collagène de type II et de chondroïtine sulfate. Par contre, les cellules exhibant un marquage diffus contre l'actine traversant le cytoplasme expriment encore leur phénotype chondrogénique. La dédifférenciation des chondrocytes cultivés en monocouche à basse densité pourrait donc provenir de la réorganisation du réseau de microfilaments d'actine.

Toujours par microscopie à fluorescence, Wright *et al.* (1997) ont décrit l'organisation du cytosquelette d'actine de chondrocytes articulaires humains cultivés depuis 5 à 10 jours en monocouche. La localisation de l'actine est saillante autour du noyau, avec un marquage ponctuel et la formation de fibres courtes dans le cytoplasme. Toutefois, plus tard dans la culture, des fibres toniques sont clairement visibles (Wright *et al.*, observations non publiées).

Les études concernant les microtubules dans les cellules du cartilage sont très peu nombreuses. L'article de Palfrey et Davies (1966) est le premier qui, à ma connaissance, relate la présence de microtubules dans les chondrocytes. Cette étude de la structure du cartilage articulaire de jeunes lapins a été réalisée par microscopie électronique. Les microtubules de 25 nm de diamètre ont été observés dans quelques cellules seulement, plus particulièrement dans la zone transitionnelle. Ils sont positionnés dans les régions périnucléaires ou périphériques de façon plus ou moins parallèle à la membrane et ne forment pas de ramifications.

Selon les images de Brown et Benya (1988) prises au microscope à fluorescence, les microtubules des chondrocytes cultivés en monocouche semblent former de longs filaments irradiant d'un point unique près du noyau.

Dernièrement, un article sur l'organisation et la distribution du cytosquelette des chondrocytes *in situ* a paru. Durrant *et al.* (1999) y décrivent, par microscopie confocale à fluorescence, les réseaux d'actine et de vimentine dans le cartilage articulaire de rats adultes. Une grande importance est accordée à cet article puisqu'il s'agit de la première et unique étude examinant l'architecture tridimensionnelle du cytosquelette des chondrocytes *in situ*.

Le marquage des filaments de vimentine a été détecté dans les zones profonde et calcifiée du cartilage seulement. Dans les cellules de la zone profonde, les filaments de vimentine forment une cage autour du noyau se rattachant, via des filaments traversant le cytoplasme, à un autre réseau sous la surface cellulaire.

De leur côté, les filaments d'actine se trouvent dans toutes les zones du cartilage. Le marquage apparaît sous forme de points brillants à la surface cellulaire, lesquels sont rattachés à un réseau indistinct pénétrant à l'intérieur de la cellule vers le noyau. Un patron ponctuel à la surface cellulaire est également révélé pour la vinculine, et un double marquage a permis de visualiser la colocalisation de l'actine et de la vinculine à la surface cellulaire, suggérant la présence de contacts focaux.

Durrant *et al.* (1999) ont également étudié le comportement du cytosquelette lors du gonflement du cartilage en culture. Ces résultats apparaissent à la section 6.2.

Cette étude se distingue des précédentes, car elle caractérise l'organisation tridimensionnelle des réseaux d'actine et de vimentine *in situ*. Les études sur le cartilage articulaire réalisées par microscopie électronique ont permis de dévoiler la présence des

filaments du cytosquelette à l'intérieur des chondrocytes ainsi que leur emplacement préférentiel. Toutefois, la minceur des coupes imposée par cette technique microscopique ne permet de visualiser qu'une fine tranche des chondrocytes. Les études réalisées par microscopie à fluorescence ont toutes, pour leur part, examiné le cytosquelette de chondrocytes en culture, et non pas *in situ*.

Malgré la publication de ce nouvel article, d'autres études s'avèrent nécessaires pour caractériser l'organisation du réseau de microtubules. Il est de plus essentiel de recueillir d'autres données afin de pouvoir les comparer avec les résultats obtenus par Durrant *et al.* (1999). Ces nouveaux résultats pourraient, entre autres, nous éclairer sur la validité du protocole de préparation des échantillons utilisé par Durrant *et al.* (1999). Remarquez, par exemple, qu'aucune fixation n'est pratiquée sur les échantillons employés pour caractériser le cytosquelette. Ils ne sont que congelés, cryosectionnés, puis incubés dans la solution de marquage. Puisque les explants prélevés ne comptent pas d'os sous-chondral, il pourrait y avoir gonflement, et donc réorganisation ou détérioration du cytosquelette. La structure du cytosquelette pourrait aussi être affectée par l'étape de congélation.

2.4 Objectifs du projet

Dans le cartilage articulaire, la composition et l'organisation de la matrice extracellulaire ainsi que la forme des cellules varient de la surface articulaire jusqu'à l'os. De plus, lors d'un chargement, les différentes zones du cartilage répondent différemment tant en contrainte qu'en déformation. Il a donc été présumé que la structure et la composition du cytosquelette des chondrocytes aussi pourraient varier dans les différentes zones du cartilage articulaire.

Le but de ce projet est d'étudier cette hypothèse, et donc d'observer le cytosquelette des chondrocytes articulaires *in situ*. Plus spécifiquement, les objectifs sont de :

- décrire l'organisation tridimensionnelle des trois réseaux du cytosquelette des chondrocytes (microfilaments d'actine, microtubules et filaments intermédiaires de vimentine) dans le cartilage articulaire mature;
- décrire la distribution des trois réseaux du cytosquelette des chondrocytes selon leur position dans le cartilage articulaire mature (zones articulaire, intermédiaire ou profonde).

2.5 Présentation des chapitres suivants

La section de cette thèse portant sur le cytosquelette des chondrocytes comporte cinq chapitres. Le chapitre actuel a introduit la notion de cytosquelette, exposé la problématique et les objectifs du projet, ainsi que synthétisé les articles d'intérêt sur le sujet. Le chapitre III résume et analyse les résultats expérimentaux recueillis dans cette étude. Le chapitre IV expose les considérations techniques et expérimentales complémentaires à l'information contenue dans l'article ou nécessaires à sa compréhension. Le chapitre V présente l'article rédigé dans le cadre de cette étude. Finalement, le chapitre six résume les résultats préliminaires concernant l'effet des compressions mécaniques sur l'organisation du cytosquelette, résultats obtenus dans le cadre de cette étude mais n'ayant pas été inclus dans l'article.

CHAPITRE III

SYNTHÈSE – ÉTUDE DU CYTOSQUELETTE DES CHONDROCYTES *IN SITU*

Le cytosquelette des chondrocytes est un réseau tridimensionnel composé de trois types de filaments protéiques : les microfilaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Cette structure participerait à multiples fonctions, entre autres, au maintien du phénotype chondrogénique (Brown et Benya, 1988; Mallein-Gerin *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1999), à la régulation de l'hypertrophie (Farquharson *et al.*, 1999; Hirsch *et al.*, 1996; Hirsch *et al.*, 1997), à l'adhésion (Turner et Burridge, 1991), à l'assemblage de la matrice extracellulaire (Hayes *et al.*, 1999), à l'intégration mécanique de l'espace cellulaire (Lazarides, 1980), à la signalisation cellulaire (Juliano et Haskill, 1993; Traub, 1995), au transport (Glotzer et Ephrussi, 1996; Simon et Pon, 1996; Vale, 1987), à la sécrétion (Koukouritaki *et al.*, 1996; Sontag *et al.*, 1988) et à l'endocytose (Riezman *et al.*, 1996). De plus, il a été suggéré que les filaments intermédiaires soient impliqués dans l'ostéoarthrite (Benjamin *et al.* 1995).

Les études descriptives du cytosquelette sont peu nombreuses et incomplètes. Une connaissance plus approfondie de l'organisation du cytosquelette des chondrocytes *in situ* est essentielle à la compréhension de son rôle dans la physiologie et la pathologie du cartilage articulaire. L'hypothèse à la base de ce projet est que la structure et la composition du cytosquelette *in situ* varient selon la position en profondeur des chondrocytes dans le cartilage articulaire mature. Les observations découlant de l'étude de cette hypothèse pourraient appuyer certains rôles ainsi que certains mécanismes potentiels influant sur l'expression du cytosquelette des chondrocytes.

3.1 La structure du cytosquelette des chondrocytes dans le cartilage articulaire mature

Le premier objectif de ce projet était d'examiner l'organisation tridimensionnelle des trois réseaux du cytosquelette des chondrocytes *in situ*. Tels qu'ils ont été observés au microscope confocal à fluorescence, les trois réseaux de filaments qui forment le cytosquelette possèdent des structures distinctes, mettant ainsi en lumière certains rôles fonctionnels respectifs à chacun de ces réseaux dans les chondrocytes du cartilage articulaire.

Le marquage d'actine se situe sous la membrane cellulaire, où il est dense et ponctuel. Les fonctions de sécrétion, d'endocytose et de protection structurale attribuées à l'actine sont compatibles avec la distribution corticale des microfilaments. Cette distribution argumente toutefois contre l'hypothèse voulant que les déformations de la matrice extracellulaire soient transmises directement au noyau via les microfilaments d'actine, mais n'exclue pas la possibilité d'un lien indirect impliquant d'autre protéine du cytosquelette tel que proposé par Guilak. (1995). Les points focaux d'actine, eux, pourraient représenter des sites d'adhésion à la matrice extracellulaire. Finalement, l'absence de fibre tonique rappelle l'importance de la structure des microfilaments d'actine dans le contrôle du phénotype chondrogénique.

Les microtubules forment un treillis lâche s'étendant de la membrane nucléaire à la membrane plasmique. Les fonctions de transport intracytoplasmique, de résistance en compression et de stabilisation des autres composantes du cytosquelette (Janmey *et al.*, 1991; Maniotis *et al.*, 1997) sont compatibles avec cette organisation des microtubules.

Les filaments intermédiaires de vimentine forment aussi un treillis s'étendant de la membrane nucléaire à la membrane plasmique, mais un treillis plus fin et plus serré que celui de microtubules. Cette organisation est compatible avec les fonctions de transport

et de ciblage des ARNm ainsi qu'avec la notion d'intégrateur mécanique attribué par Lazarides (1980). Toujours en accord avec l'organisation observée, les filaments de vimentine pourraient convertir la déformation cellulaire en déformation nucléaire, et donc être impliqués dans la mécanotransduction.

3.2 La distribution du cytosquelette des chondrocytes dans le cartilage articulaire mature

Le second objectif de ce projet consistait à examiner la distribution des trois réseaux du cytosquelette des chondrocytes selon leur position dans le cartilage articulaire. Le contenu hétérogène des composantes du cytosquelette dans les différentes zones du cartilage, tel qu'il a été observé par microscopie à épifluorescence et SDS-PAGE, suggère un contrôle microenvironnemental de l'expression du cytosquelette.

L'observation des coupes au microscope à épifluorescence a dévoilé une intensité de marquage pour les filaments de vimentine et les microtubules plus haute dans les zones superficielles que profondes. Par contre, le marquage d'actine était plutôt uniforme. La comparaison de coupes provenant de disques situés au centre de l'aire de contact (*load-bearing region*) avec des disques situés en périphérie de l'aire de contact a démontré que les gradients de vimentine et de tubuline s'avéraient plus prononcés dans les disques périphériques.

L'analyse par SDS-PAGE des extraits RIPA a révélé un gradient biochimique de β-tubuline similaire au gradient immunohistochimique observé. Le gradient biochimique d'actine est semblable à celui de la β-tubuline et diffère donc du patron uniforme observé par microscopie. Cette différence s'explique par le fait que l'immunohistochimie ne détecte que l'actine sous forme de filaments, alors que l'immunotransfert détecte l'actine filamenteuse et globulaire. Ainsi, la quantité d'actine

globulaire serait supérieure dans la zone superficielle et moindre dans les régions plus profondes. Le gradient biochimique de vimentine extrait en RIPA, non plus, ne correspond pas exactement au gradient immunohistochimique. Toutefois, l'analyse des extraits GuCl du culot insoluble en RIPA a révélé une distribution concordante de la vimentine. Donc, comme c'est le cas pour l'actine et la β-tubuline, un pool soluble de vimentine pourrait être complètement ou partiellement enlevé durant l'étape de perméabilisation. Il est à noter que ni l'actine ni la β-tubuline n'ont été détectées dans les extraits GuCl du culot insoluble extrait en RIPA.

Les résultats précédents démontrent que l'intensité du marquage des filaments du cytosquelette varie selon la profondeur dans le cartilage articulaire. De plus, ils suggèrent que le cytosquelette soit plus développé dans les chondrocytes soumis aux hauts niveaux de déformation cellulaire produits dans la zone superficielle.

CHAPITRE IV

CONSIDÉRATIONS TECHNIQUES ET EXPÉRIMENTALES - ÉTUDE DU CYTOSQUELETTE DES CHONDROCYTES *IN SITU*

Ce chapitre expose les techniques utilisées dans l'étude du cytosquelette des chondrocytes. On y traite, dans un premier temps, de l'isolation et de la culture des explants. Dans un deuxième temps, on y examine les différentes techniques microscopiques. La section suivante détaille les étapes de préparation des échantillons pour la microscopie à fluorescence ainsi que les techniques d'électrophorèse et de transfert de Western. Finalement, une dernière section décrit la préparation des échantillons pour l'électrophorèse. Ceci ne constitue qu'une introduction aux techniques utilisées, les protocoles étant détaillés dans le premier article.

4.1 Isolation et culture des explants

Cette section introduit la procédure employée pour l'isolation et la culture des explants, méthode détaillée dans un article récent (Dumont *et al.* 1999).

Les échantillons utilisés sont des disques de cartilage articulaire d'environ 1,5 mm d'épaisseur et 3 mm de diamètre. Ils sont prélevés de têtes humérales bovines intactes, peu de temps après l'abattage. La première étape consiste à extraire, à l'aide d'une mèche à biopsie, des cylindres de 4 mm de diamètre et longs d'environ 5 mm (figure 4.1). Afin d'obtenir l'épaisseur désirée, une coupe est ensuite réalisée à travers l'os sous l'interface cartilage/os (figure 4.2). Une mince couche d'os est conservée pour éviter le gonflement et la distorsion du disque. Finalement, les disques sont poinçonnés afin de réduire leur diamètre à 3 mm (figure 4.3). Cette dernière étape permet, en outre,

d'uniformiser le contour des disques et d'éliminer les cellules périphériques pouvant avoir été affectées par la chaleur durant le perçage.

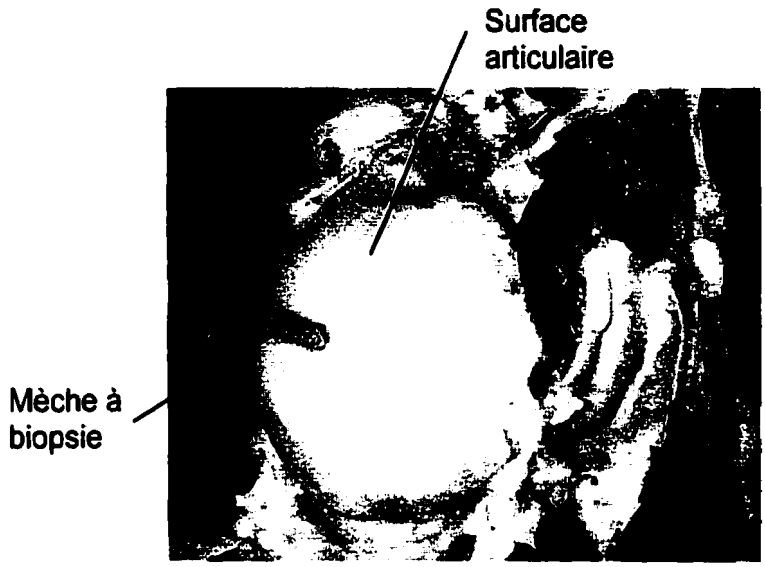

Figure 4.1 : Extraction d'un cylindre cartilage/os à l'aide d'une mèche à biopsie.

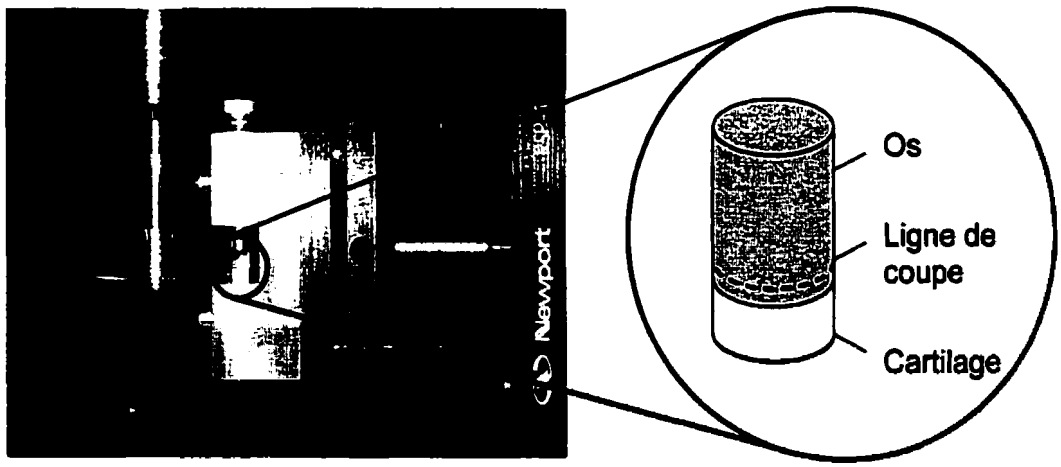

Figure 4.2 : Coupe de l'os superflu à l'aide d'une scie dentaire.

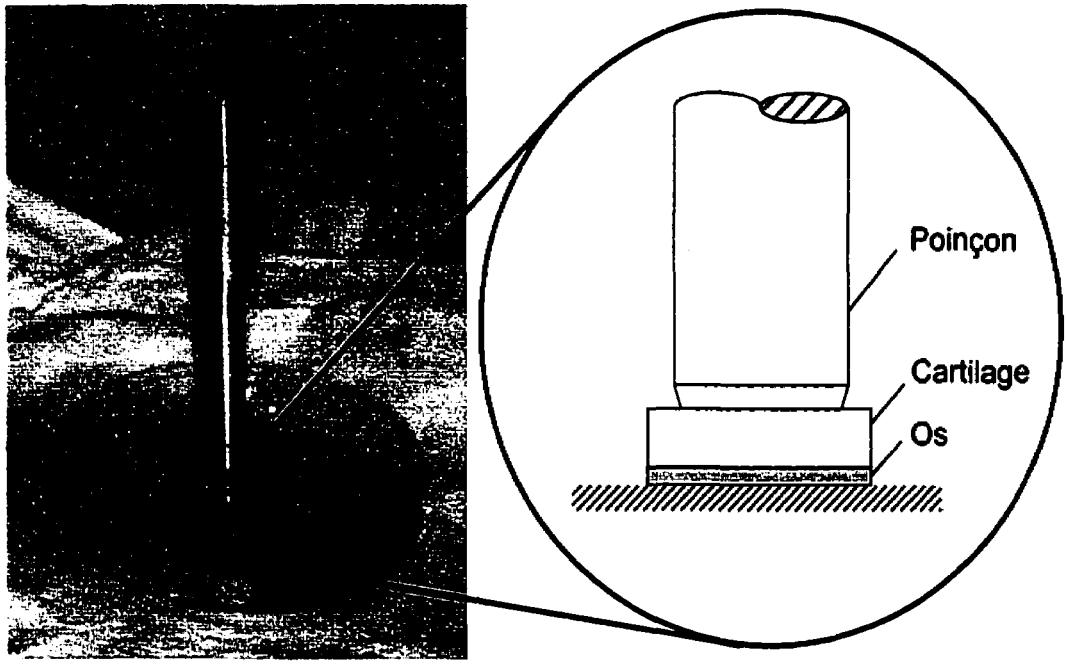

Figure 4.3 : Réduction du diamètre d'un disque de cartilage à l'aide d'un poinçon.

À la suite de l'isolation, les disques sont lavés cinq fois et sont maintenus en culture avec des changements de milieu quotidiens. Parallèlement, des disques sont soumis à un essai de viabilité.

Certains détails de ce protocole méritent une attention particulière. Ils sont exposés dans les sous-sections suivantes.

4.1.1 L'explant

Les disques de cartilage utilisés possèdent une surface articulaire intacte et sont rattachés à une mince couche d'os. Ainsi, la coupe du tissu et son gonflement en culture sont

minimisés. L'absence de gonflement est souhaité afin de limiter la perte de molécules matricielles et de faciliter le maintien de l'homéostasie. Dumont *et al.* (1999) ont démontré que, pour ces explants, la viabilité cellulaire ainsi que le contenu, la synthèse et la perte de collagène et de protéoglycannes sont stables sur une période de trois semaines en culture.

4.1.2 L'irrigation

Lors de l'isolation, il importe d'irriguer la surface articulaire afin de retenir la viabilité cellulaire, l'air ambiant pouvant assécher le cartilage et l'exposer à l'oxygène (Dumont *et al.* 1999). L'irrigation est aussi utilisée pour refroidir les outils de coupe, la chaleur excessive étant également néfaste pour les cellules.

On irrigue à l'aide de la solution saline « Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) » de Gibco BRL, qui se compose de sel inorganique et de glucose, et à laquelle des antibiotiques sont ajoutés. Cette solution est conçue pour maintenir les cellules vivantes sur une courte période de temps en gardant un pH physiologique et la pression osmotique.

4.1.3 Les lavages

L'étape des lavages élimine les particules non stériles adhérant aux disques. Elle s'effectue sous le flux laminaire avec une solution HBSS additionnée d'antibiotiques.

4.1.4 Le milieu de culture

Tel que revu dans l'article de Dumont *et al.* (1999), les milieux de culture contenant du sérum ont des effets indésirables sur les explants de cartilage comme l'induction d'une « surcroissance » cellulaire, une stimulation biosynthétique sélective des chondrocytes de la zone superficielle versus ceux de la zone profonde ainsi qu'un taux de synthèse réduit, une croissance réduite, et l'induction d'une instabilité phénotypique dans des modèles de tissus en développement. De plus, ils sont mal définis (Barnes et Sato, 1980). C'est pourquoi Dumont *et al.* (1999) ont étudié l'effet d'un milieu sans sérum (DME/F12, Sigma) additionné d'ascorbate sur les disques cartilage/os. Ils ont observé le maintien du métabolisme normal des explants sur une période de trois semaines. Il est à noter que l'ascorbate a un effet anabolique général sur les chondrocytes en culture (Wright *et al.*, 1988) et qu'une déficience en ascorbate peut causer une diminution de la synthèse en protéoglycannes et en collagènes (Bird *et al.*, 1986).

4.1.5 La température

À basse température, le métabolisme ralentit et, conséquemment, la dégradation des tissus aussi. C'est pourquoi, avant l'isolation, les épaules de bœuf sont réfrigérées et, pendant l'isolation, la solution HBSS irriguant les épaules ainsi que les plaques de 48 puits recevant les disques sont maintenues sur la glace.

4.1.6 La viabilité

Il est essentiel de réaliser un essai de viabilité après l'isolation des explants. En plus de nous informer sur la condition des disques extraits et donc des épaules, cet essai nous guide approximativement sur l'âge de l'animal. Chez les bœufs adultes, la morphologie

et l'organisation des chondrocytes dans le cartilage sont telles que l'on distingue trois zones, alors que, chez le veau, la distribution des chondrocytes est beaucoup plus homogène.

L'essai de viabilité est très simple à réaliser avec l'ensemble « LIVE/DEAD viability/Cytotoxicity Kit » de Molecular Probes. Il suffit d'incuber des coupes de cartilage (voir section 4.3.2) pendant une trentaine de minutes dans un tampon auquel on a ajouté les deux sondes : « calcein AM » et « ethidium homodimer (EthD-1) ». Les membranes cellulaires sont perméables à la sonde calcein AM. C'est l'action des estérases, omniprésentes dans les cellules vivantes, qui convertit la calcein AM non fluorescente en calcein intensément fluorescente. Cette calcein polyanionique, étant bien retenue à l'intérieur des cellules vivantes, produit une intense fluorescence verte à l'intérieur des cellules vivantes. La sonde EthD-1, quant à elle, est exclue des cellules vivantes, mais pénètre à l'intérieur des cellules mortes par les membranes endommagées. En se liant aux acides nucléiques, l'EthD-1 multiplie par 40 sa fluorescence et produit donc une brillante fluorescence rouge à l'intérieur des cellules mortes.

4.2 Techniques microscopiques utilisées

Cette section décrit succinctement les techniques microscopiques employées dans cette étude, soit la microscopie à fluorescence (épifluorescence et confocale) et la microscopie à contraste d'interférence différentielle. Le principe de fonctionnement du microscope photonique est présenté en introduction comme référence pour les techniques plus élaborées.

Le microscope photonique comporte deux lentilles principales dans le chemin optique : un objectif et un oculaire (figure 4.4). L'objectif, situé près de l'objet, produit une

image réelle, inversée et agrandie. Cette image est agrandie de nouveau par l'oculaire situé près de l'œil, produisant ainsi l'image virtuelle finale. Le facteur principal limitant la taille d'un objet observé est le pouvoir de résolution du microscope et non son pouvoir grossissant. La limite de résolution est la distance minimale à laquelle deux objets peuvent être vus comme distincts. Celle de l'œil humain est d'environ 0,1 mm tandis que celle d'un bon microscope utilisant la lumière blanche est d'environ 0,4 µm. Elle dépend, entre autres, de la longueur d'onde de la lumière utilisée, les faibles longueurs d'onde étant moins diffractées. (Aebi *et al.*, 1996; Arms et Camp, 1989)

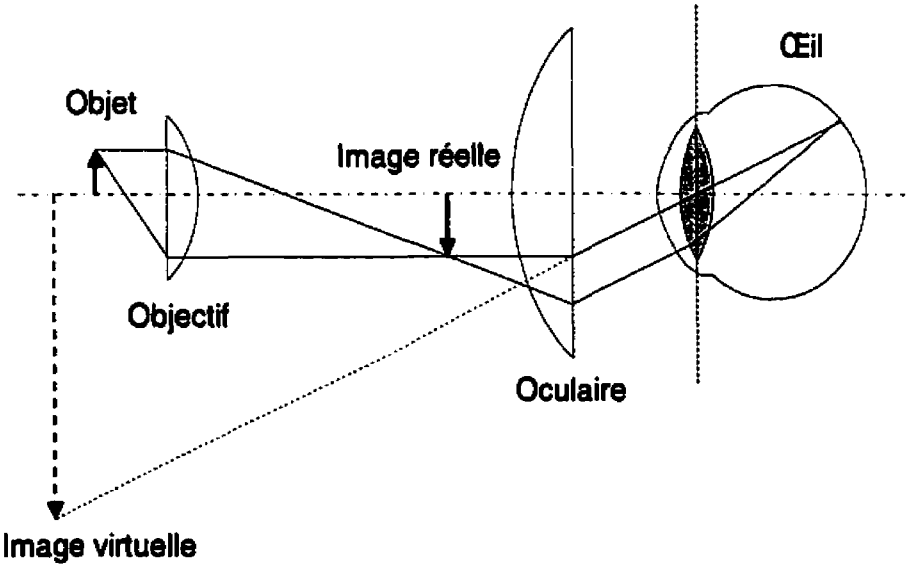

Figure 4.4 : Géométrie du microscope photonique. Adaptation de Aebi *et al.* (1996)

La préparation des tissus pour la microscopie photonique comporte généralement la fixation, la coupe et la coloration. La fixation immobilise, tue et préserve les tissus. Les traitements courants de fixation utilisent les aldéhydes (ex. : formaldéhyde et glutaraldéhyde) qui forment des liaisons covalentes entre les groupes amines libres des protéines. Quant à elle, la coupe permet d'amincir les échantillons qui sont souvent trop

épais pour être observés à haute résolution. L'épaisseur typique des sections est d'environ 1 à 10 μm. On notera qu'avant d'être sectionnés, les tissus mous et fragiles sont enrobés d'un milieu de support comme une cire ou une résine. Enfin, la coloration, en absorbant la lumière de façon différentielle, rend visibles les cellules qui sont normalement presque invisibles au microscope photonique ordinaire. Par exemple, l'hématoxyline est un colorant bleu qui a une affinité pour les structures alcalines comme les protéines attachées aux chromosomes. Il existe également des colorants fluorescents, ou fluorochromes. Ces derniers absorbent la lumière à une certaine longueur d'onde et en émettent à une longueur plus élevée. Une technique très répandue consiste à joindre le fluorochrome à un anticorps qui sert à reconnaître très spécifiquement une macromolécule cible. Dans le cas de ces colorants fluorescents, on utilise un microscope à fluorescence. (Alberts *et al.*, 1994; Arms et Camp, 1989)

Ce type de microscope diffère du microscope photonique ordinaire, entre autres par la présence de deux filtres et d'un miroir dichroïque (figure 4.5). Le premier filtre laisse traverser seulement la longueur d'onde d'excitation et le second, uniquement la longueur d'onde émise. Le miroir dichroïque, quant à lui, agit comme une barrière optique, réfléchissant la lumière de longueurs d'onde plus courtes et laissant passer celle de longueurs d'onde plus élevées. La figure 4.5 montre, dans un premier temps, la lumière de haute énergie et de faible longueur d'onde entrant dans le microscope et passant à travers le premier filtre où la longueur d'onde d'excitation est sélectionnée. Cette lumière est ensuite réfléchie par le miroir dichroïque pour se rendre finalement au spécimen où elle interagit avec le fluorochrome. Elle montre, dans un deuxième temps, le chemin parcouru par la lumière fluorescente émise. Cette lumière de longueur d'onde plus élevée passe à travers le miroir dichroïque puis à travers le second filtre pour se rendre à l'œil. (Foster, 1997)

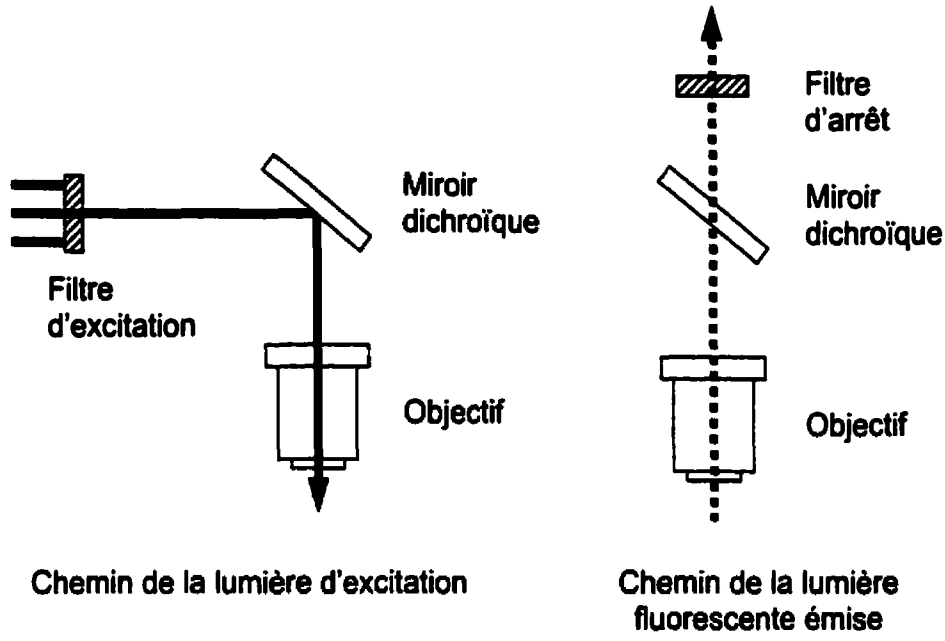

Figure 4.5 : Microscope à épifluorescence. Adaptation de Foster (1997)

La visualisation de spécimens épais ainsi que l'obtention d'images tridimensionnelles est possible grâce au microscope confocal (figure 4.6). Ce dernier est généralement utilisé en fluorescence, mais au lieu d'illuminer le spécimen en entier, le système focalise la lumière sur un plan précis de celui-ci. La lumière provenant des régions supérieures et inférieures au plan focal est rejetée. Le résultat est une mince section optique. Certains logiciels d'imagerie permettent la reconstruction tridimensionnelle à partir des sections optiques obtenues (figure 4.7). (Alberts *et al.*, 1994)

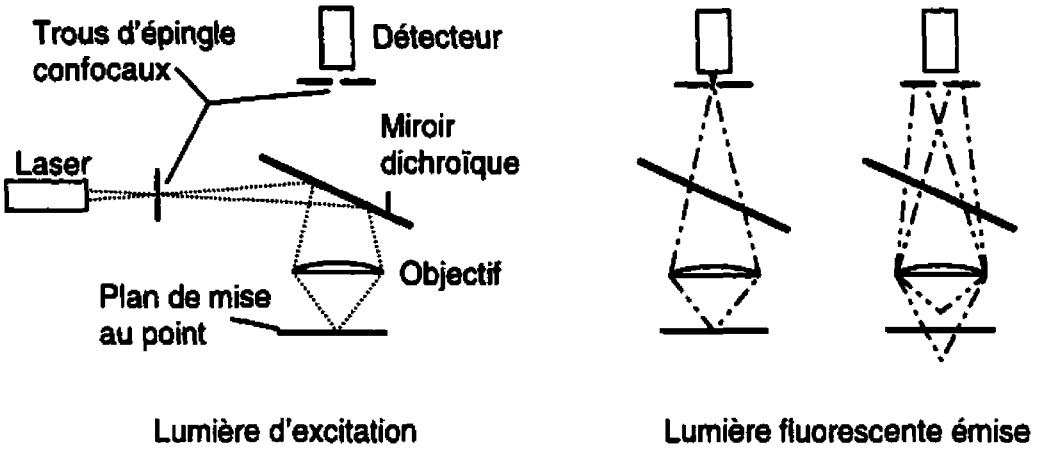

Figure 4.6 : Microscope confocal. Adaptation de Alberts *et al.* (1994)

Figure 4.7 : Sectionnement optique et reconstruction tridimensionnelle d'un ellipsoïde. Adaptation de Dürrenberger et Sütterlin (1996)

Le microscope à contraste d'interférence différentielle exploite la différence de phase existant entre deux ondes passant par des régions plus ou moins épaisses ou denses de la cellule. Il permet l'observation de cellules vivantes et évite ainsi les artefacts causés par la préparation des spécimens. En résumé (figure 4.8), le faisceau lumineux entrant dans le microscope est polarisé par le polariseur, puis cisaillé à l'aide d'un prisme. Le faisceau passant en deux points adjacents à travers le spécimen crée une différence de chemin interprétée comme un retard par l'analyseur. La visualisation de l'image dans les teintes de gris présente un effet hautement tridimensionnel. (Alberts *et al.*, 1994; Foster, 1997)

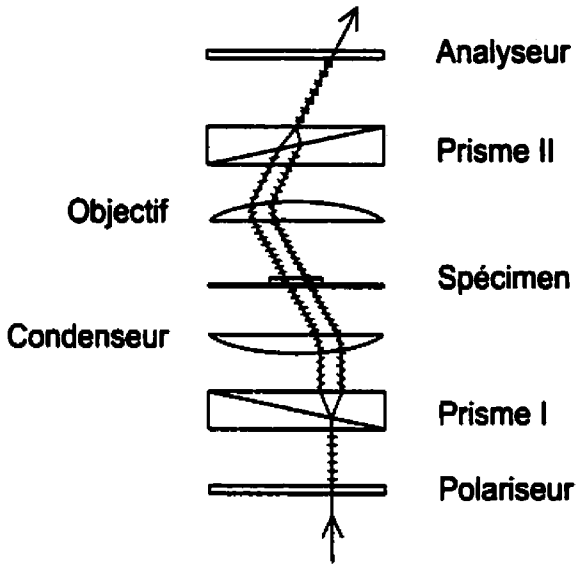

Figure 4.8 : Microscope à contraste d'interférence différentielle. Adaptation de Foster (1997)

4.3 Préparation des échantillons pour la microscopie à fluorescence

Cette étude est principalement basée sur la technique de microscopie à fluorescence. Pour visualiser le cytosquelette des chondrocytes, les échantillons de cartilage ont été soumis à un protocole comprenant les étapes suivantes : la coupe, la perméabilisation, la fixation, le blocage de l'autofluorescence, la digestion, le marquage et la préparation des lames, l'optimisation de ces différentes étapes étant résumée à l'annexe I. La présente section a pour objet d'expliquer le rôle de chacune de ces étapes mais, tout d'abord, il importe de discuter du choix du tampon.

4.3.1 Le tampon

Le tampon remplit trois rôles principaux : 1) il sert de solvant, entre autres pour le fixatif; 2) il aide à garder un pH spécifique; et 3) il maintient l'osmolarité. Ce dernier point est important lors de la fixation (ou de la perméabilisation, s'il y a lieu). Par la suite, les membranes cellulaires sont perméables et ne sont plus soumises aux potentiels osmotiques. (Dykstra, M. J., 1992)

Le tampon peut également accroître la stabilisation de certaines structures cellulaires. Par exemple, un pH bas, la chélation du calcium et la présence de magnésium aideraient à préserver les structures du cytosquelette, et ce, pour différents types de cellules (Bacallao *et al.* 1995). Une recette modifiée du HBSS (HBSSm) (tableau 4.1) est donc exploitée pour la microscopie (Baschong *et al.*, 1997).

Ce tampon est employé à partir du moment où l'échantillon est retiré du milieu de culture jusqu'au montage des lames, c'est-à-dire pour chacune des étapes mentionnées en introduction, à l'exception de la digestion. Le tampon est également utilisé comme solution de rinçage à la suite de la perméabilisation, de la fixation, du blocage de l'autofluorescence, de la digestion et du marquage.

Tableau 4.1 : Composition des tampons HBSS et HBSSm

Constituants	HBSS pH 7,4 (mM)	HBSSm pH 6,5 (mM)
$CaCL_2$	1,26	---
NaCl	136,9	136,9
KCl	5,36	5,36
KH_2PO_4	0,44	0,44
$MgCl_2$	0,49	2
$MgSO_4$	0,466	---
$NaHCO_3$	4,2	4
Na_2HPO_4	0,336	0,336
EGTA[1]	---	2
MES[2]	---	5
D-Glucose	5,55	5,55
Rouge de phénol	0,03	---

4.3.2 La coupe

La coupe des échantillons permet d'obtenir des tranches de l'épaisseur désirée. Le microscope confocal accepte des coupes de cartilage de 100 µm d'épaisseur. L'avantage des coupes épaisses est que celles-ci contiennent plusieurs couches de chondrocytes. Ainsi, les chondrocytes de surface endommagés par la coupe sont ignorés

---

[1] EGTA est un agent chélateur qui se lie fortement aux ions Ca^{++} les rendant ainsi inactifs.

[2] MES est un tampon organique efficace près d'un pH de 6,5.

lors de la prise d'image. Avec le microscope à épifluorescence, il est préférable d'utiliser des coupes plus minces, soit d'environ 25 µm d'épaisseur pour l'étude actuelle. Il résulte des coupes plus épaisses des images de moins bonne qualité parce que la mise au point est moins précise et que la lumière provenant des plans supérieurs et inférieurs au plan focal n'est pas rejetée.

Les disques de cartilage sont tranchés de la surface articulaire vers l'os de manière à obtenir des coupes rectangulaires comprenant les quatre zones du cartilage articulaire (figure 4.9). Les appareils utilisés pour l'obtention de ces coupes sont un Tissue Chopper (McTwain, Brinkmann) et un Vibratome (Vibratome™ 1000). Le premier coupe l'échantillon à la façon d'une guillotine tandis que le second coupe l'échantillon avec un mouvement vibratoire analogue à un mouvement de sciage. Le Vibratome travaille plus délicatement et offre de meilleurs résultats.

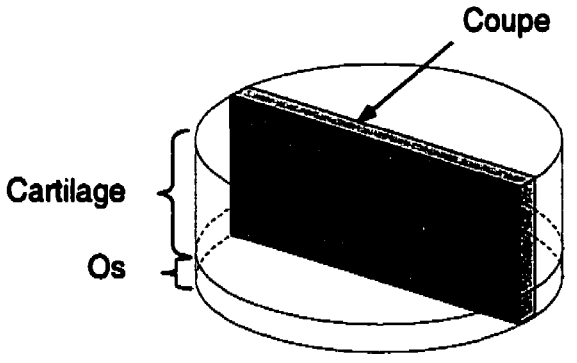

Figure 4.9 : Coupe rectangulaire incluant les quatre zones du cartilage obtenue d'un explant.

4.3.3 La perméabilisation

Dans cette étude, des anticorps auxquels sont associés des colorants fluorescents sont utilisés pour localiser les filaments intermédiaires et les microtubules. Toutefois, pour que les anticorps aient accès à l'intérieur de la cellule, il est essentiel de perméabiliser la membrane cellulaire. Pour ce faire, on utilise un détergent non ionique, en l'occurrence l'Octyl Poe (Garavito et Rosenbusch, 1986). Pour l'immunohistochimie, il est important d'éviter l'utilisation de détergents ioniques puisqu'ils affectent fortement la conformation des protéines, ce qui risque ainsi de détériorer leur antigénicité (Griffiths, 1993). Comparativement aux autres détergents non ioniques comme le Triton X-100, l'Octyl Poe est plus facile à enlever. Cet avantage majeur permet d'obtenir en des images du cytosquelette plus claires et de meilleur contraste (Buschmann, communication personnelle). Puisque le glutaraldéhyde diminue l'efficacité de solubilisation de la membrane (Bell *et al.*, 1988), on effectue l'étape de perméabilisation avant l'étape de fixation. Afin d'éviter que la perméabilisation de la membrane ne cause la dissolution et la perte des protéines du cytosquelette, une faible quantité de glutaraldéhyde est additionnée à la solution de perméabilisation.

4.3.4 La fixation

La fixation est une étape essentielle dont le but est de préserver le plus de molécules possible à l'intérieur de la cellule. Dans cette étude, c'est le glutaraldéhyde qui est utilisé comme fixatif. Il tend à former des liaisons plus stables que le formaldéhyde. En fait, le glutaraldéhyde crée un réseau tridimensionnel dense de liaisons ramifiées tandis que le formaldéhyde suscite des liaisons plutôt linéaires. En général, plus le niveau de liaison est haut, plus la perspective de réactions immunohistochimiques est faible. Cette diminution de l'immunoréactivité pourrait provenir d'une altération de la structure des épitopes ou d'un niveau trop élevé de liaisons gênant l'accès des anticorps aux

antigènes. Toutefois, il n'a pas été nécessaire de faire de compromis dans cette étude puisque, malgré un haut niveau de liaisons et de préservation des structures cellulaires, l'immunoréactivité était excellente, probablement grâce au traitement $NaBH_4$ (voir section 4.3.6). (Griffiths, 1993)

Le glutaraldéhyde réagit avec plusieurs groupements amines libres, faisant des protéines sa cible principale. À la différence des autres lipides, les phospholipides contenant des groupements amines libres sont également ciblés par le glutaraldéhyde. Les acides nucléiques, quant à eux, ne seraient pas fixés directement par le glutaraldéhyde, mais indirectement via leur association avec des protéines. Finalement, la majorité des glucides ne sont pas bien fixés par le glutaraldéhyde et sont perdus lors des lavages subséquents, le glycogène constituant l'exception majeure. Selon Hayat (1981), 40 à 65 % du glycogène total resterait à l'intérieur des tissus fixés. (Dykstra, 1992)

Lors de la fixation, les membranes se solubilisent partiellement, laissant ainsi fuir une variété d'enzymes hydrolytiques des lysosomes. Puisque de nombreux enzymes ne sont pas complètement inactivés par le glutaraldéhyde, plusieurs chercheurs préfèrent fixer sur la glace ou à 4 °C. Cependant, à ces températures, il y a dépolymérisation des microtubules. Il semble que la fixation à température ambiante donne des résultats adéquats tout en évitant cette dépolymérisation des microtubules. (Dykstra, 1992)

Concernant le temps de fixation, la règle du pouce dit que la plupart des fixatifs chimiques pénétreront d'au moins 0,5 mm en une heure. Au-delà d'une heure à température ambiante, la majorité des tissus démontrent des signes d'autolyse. Ainsi, si toutes les zones n'ont pas été exposées au fixatif après une heure à température ambiante, la région centrale du spécimen sera probablement pauvrement fixée. (Dykstra, 1992)

En terminant, les solutions typiques de fixation contiennent entre 1,5 et 4 % de glutaraldéhyde. Il est à noter qu'une haute concentration (37 %) cause une importante contraction du tissu, alors qu'une faible concentration peut occasionner une forte extraction des protéines. (Dykstra, 1992)

4.3.5 Le blocage de l'autofluorescence

Les tissus fixés au glutaraldéhyde sont autofluorescents lorsque excités sous une illumination intense. C'est la présence de bases de Schiff induites par le glutaraldéhyde qui serait à l'origine de cette autofluorescence (Willingham, 1983). L'utilisation d'un agent réducteur, soit le sodium borohydride ($NaBH_4$), diminuerait l'autofluorescence par la réduction des bases de Schiff (Willingham, 1983).

En diminuant l'autofluorescence, ce traitement au sodium borohydride abaisse le bruit de fond et augmente ainsi le contraste des images obtenues. Il faciliterait également l'accès des anticorps à l'intérieur du réseau de protéines fixées, et ce, sans détérioration de la préservation structurale (Willingham, 1983). Les protéines fixées seraient rendues plus flexibles par la réduction des liaisons doubles en liaisons simples des bases de Schiff (Willingham, 1983). Il est possible qu'ainsi les protéines fixées soient plus réactives avec les anticorps.

4.3.6 La digestion

La technique microscopique choisie utilise des anticorps auxquels sont associés des colorants fluorescents pour localiser les filaments intermédiaires et les microtubules. Mais comme la matrice extracellulaire du cartilage est dense, les anticorps ne peuvent pas atteindre les cellules. Pour permettre l'accès des anticorps aux cellules, on digère les

protéoglycannes de la matrice à l'aide d'enzymes. La chondroïtinase ABC catalyse l'enlèvement des chaînes de chondroïtine sulfate et de dermatane sulfate des protéoglycannes, tandis que la kératanase sectionne le kératane sulfate. Les disaccharides relâchés par ces digestions sont libres même si l'échantillon a été préalablement fixé. En effet, comme mentionné précédemment, le glutaraldéhyde forme des liaisons covalentes entre les groupes amines libres des protéines, mais ne fixe généralement pas les glucides.

4.3.7 Le marquage

Dans cette étude, les filaments intermédiaires de vimentine sont localisés par immunofluorescence *directe* (figure 4.10). Cette technique consiste à utiliser des anticorps auxquels sont associés des colorants fluorescents afin de détecter une molécule cible spécifique (Alberts *et al.*, 1994).

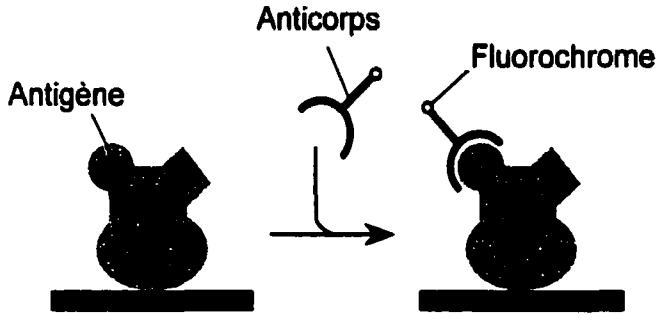

Figure 4.10 : L'immunofluorescence directe. Adaptation de Alberts *et al.* (1994)

Les anticorps sont produits par le système immunitaire des vertébrés comme défense contre les infections. Ils existent sous des milliards de formes, chacune d'elle ayant un

site de liaison reconnaissant une macromolécule spécifique. Ce sont des outils très puissants en microscopie à fluorescence vu la précision de leur spécificité antigénique. (Alberts *et al.*, 1994)

C'est l'immunofluorescence *indirecte* qui est utilisée dans cette étude pour localiser les microtubules (figure 4.11). Un anticorps primaire, auquel aucun colorant fluorescent n'est associé, est utilisé pour détecter la molécule cible. Un groupe d'anticorps secondaires, auxquels un colorant fluorescent est associé, est ensuite employé pour détecter l'anticorps primaire. Cette technique permet ainsi l'amplification du signal. (Alberts *et al.*, 1994)

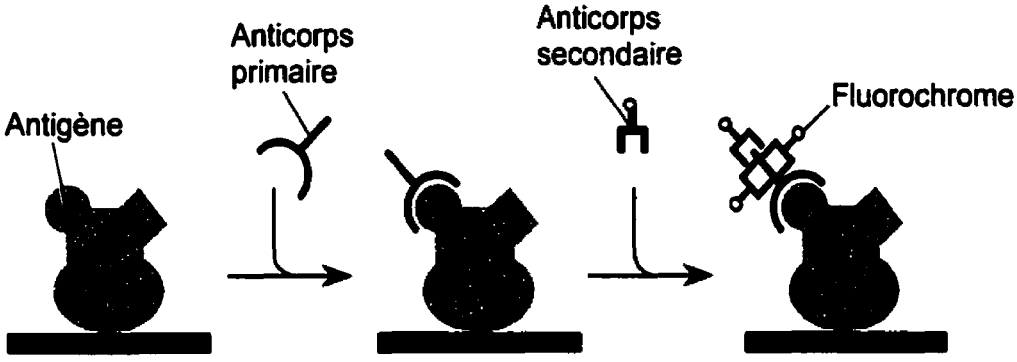

Figure 4.11 : L'immunofluorescence indirecte. Adaptation de Alberts *et al.* (1994)

Il est à noter que les anticorps utilisés pour localiser les FIs de vimentine et les MTs sont de type monoclonaux. Ce type d'anticorps est sécrété par des clones d'hybridomes dérivés d'un seul lymphocyte B. Contrairement aux antisérums classiques dont les anticorps peuvent reconnaître différents sites antigéniques sur une même macromolécule, les anticorps monoclonaux sont tous identiques et reconnaissent un site antigénique unique. (Alberts *et al.*, 1994)

Pour localiser les microfilaments d'actine, le colorant fluorescent est associé à la phalloïdine plutôt qu'à un anticorps. La phalloïdine est une toxine fongique qui se fixe le long des filaments d'actine, les stabilisant ainsi contre la dépolymérisation (Alberts *et al.*, 1994). Il est important de noter, toutefois, que la phalloïdine ne se lie pas à l'actine globulaire.

4.3.8 La préparation des lames

Lorsque les coupes sont exposées à la lumière d'excitation, il y a diminution de la fluorescence. Cette décoloration provient de la conversion du fluorochrome en un élément chimique non fluorescent. C'est un procédé qui requiert généralement lumière et oxygène (Lansing Taylor et Salmon, 1989). Le GOC est donc ajouté au HBSSm lors du rinçage des coupes avant le montage des lames pour éliminer l'oxygène (Kishino et Yanagida, 1988). Il se compose de glucose oxydase et de catalase, qui sont des enzymes, ainsi que de glucose. La glucose oxydase catalyse l'oxydation du β-D-glucose tandis que la catalase supprime le peroxyde d'hydrogène libéré, ce dernier étant aussi actif dans la décoloration des coupes. Elles agissent selon les réactions suivantes (International Union of Biochemistry, 1984):

Glucose oxydase → β-D-glucose + O_2 = D-glucono-1,5-lactone + H_2O_2

Catalase → $H_2O_2 + H_2O_2 = O_2 + 2\,H_2O$

Lors de la préparation des lames, du MOWIOL® et du n-propyl-gallate sont ajoutés au milieu de montage. Eux aussi ont pour effet de retarder la décoloration. Le MOWIOL® est en fait une marque déposée de Farbwerke Hoechst AG. Il s'agit d'un *poly(vinyl alcohol)* hydrolysé qui durcit et empêche ainsi l'accès de l'oxygène au fluorochrome. Le n-propyl-gallate, quant à lui, est un composé benzénique, aussi appelé acide n-propyl

ester 3,4,5-trihydroxybenzoique. Il agit comme antioxydant et ralentit donc le processus d'oxydation.

Une étude (Longin *et al.* 1993) réalisée sur les agents « anti-décolorants » démontre qu'en plus d'avoir cet effet « anti-décolorant », le MOWIOL® augmente l'intensité de la fluorescence initiale. Pour sa part, le n-propyl-gallat est plus efficace que le MOWIOL® pour retarder la décoloration, mais atténue significativement l'intensité de la fluorescence initiale. Une combinaison de ces deux médiums constitue un compromis intéressant si on désire un effet retardateur important sans l'atténuation marquée de la fluorescence initiale.

4.4 Électrophorèse et transfert de Western

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE) a également été utilisée dans cette étude comme complément à la microscopie. Cette méthode permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire sur un gel poreux. Le SDS (sodium dodécyl sulfate) est un détergent puissant chargé négativement qui se fixe aux protéines et cause leur déploiement. Sous l'application d'un champ électrique, les protéines de même taille migreront à la même vitesse, car : 1) elles ont toutes une forme allongée similaire; et 2) elles ont lié la même quantité de SDS et possèdent donc toutes la même charge négative. Les protéines du cytosquelette pourront donc être situées sur le gel par leur poids moléculaire : vimentine ≈ 55 kDa (Quinlan *et al.*, 1994); actine ≈ 43 kDa (Sheterline et Sparrow, 1994); α- et β-tubuline ≈ 55 kDa (Voet et Voet, 1995). Il est à noter que, souvent, un agent réducteur, tel le β-mercaptoéthanol, est ajouté afin de rompre les ponts disulfides des protéines et de permettre l'analyse des sous-unités protéiques. (Alberts *et al.*, 1994)

Pour détecter les protéines à la suite de l'électrophorèse, on utilise l'immunotransfert (transfert de Western), qui se décrit comme suit (Voet et Voet, 1995) : transfert des protéines du gel d'électrophorèse vers une membrane de nitrocellulose; blocage des sites de liaison inoccupés avec une solution de lait écrémé en poudre dans du PBS par exemple (Dunn, 1989); incubation de la membrane avec des anticorps primaires dirigés contre la protéine d'intérêt; rinçage pour l'enlèvement des anticorps non liés et incubation avec des anticorps secondaires conjugués à un marqueur et dirigés, cette fois, contre les anticorps primaires; rinçage pour l'enlèvement des anticorps non liés et visualisation de la protéine d'intérêt (par autoradiographie si le marqueur est un isotope radioactif ou par une réaction colorante si le marqueur est un enzyme). (Alberts et al, 1994)

Nous avons employé ici la technique ECL de Amersham, technique qui requiert que l'anticorps secondaire soit lié à l'enzyme peroxydase du raifort. En résumé, l'opération est celle-ci : une solution ECL est versée sur la membrane de nitrocellulose; la peroxydase catalyse l'oxydation du « luminol » occasionnant ainsi la chimioluminescence et la lumière résultante est finalement détectée sur un film.

4.5 Préparation des échantillons pour l'électrophorèse

Afin de comparer la quantité de protéines du cytosquelette dans les trois zones du cartilage articulaire (tangentielle, transitionnelle et radiale), on doit couper les échantillons et extraire les protéines avant de réaliser l'électrophorèse. Cette section commentera ces deux étapes. Il importe tout d'abord de mentionner qu'ici aussi, le HBSSm a été utilisé comme tampon.

4.5.1 La coupe

Cette étape a pour but de diviser le disque de cartilage en trois zones (tangentielle, transitionnelle et radiale). Comme chaque disque n'a pas la même épaisseur, il est difficile de prévoir l'épaisseur exacte de chacune des zones. En divisant chaque disque en tranches de 100 µm, on obtient entre 8 et 12 tranches. (Ici, les disques de cartilage sont tranchés parallèlement à la surface articulaire à l'aide du vibratome, de manière à obtenir des coupes circulaires telles qu'elles sont illustrées à la figure 4.12). Il est ensuite facile de séparer les tranches successives en trois groupes égaux représentant les trois zones. Souvent, la surface articulaire du disque n'est pas parfaitement parallèle à l'os. Dans ce cas, les deux premières tranches sont groupées et comptées comme une seule tranche, leur volume commun étant sensiblement équivalent au volume d'une seule tranche. Les groupes de tranches sont ensuite congelés par immersion de leur contenant dans l'azote liquide puis conservés à –80 °C.

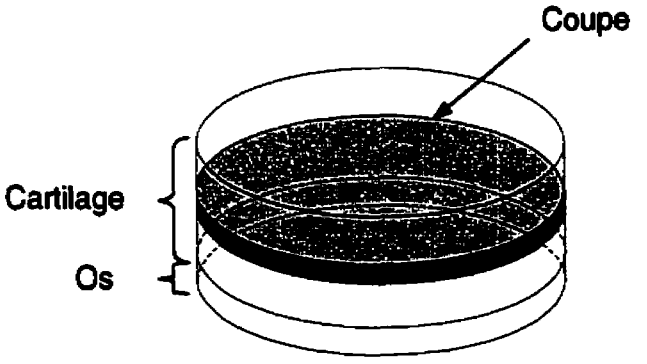

Figure 4.12 : Coupe circulaire obtenue à partir d'un disque de cartilage.

4.5.2 L'extraction au RIPA

Le cartilage est un tissu contenant beaucoup de matrice extracellulaire et un faible volume cellulaire (1 à 10 %), ce qui rend l'extraction des protéines du cytosquelette plus difficile. En pulvérisant les coupes congelées en une poudre fine, la matrice extracellulaire est broyée, ce qui facilite la libération des protéines cellulaires. Pour ce faire, on utilise un BioPulverizer (Biospec Products). Il s'agit simplement d'un ensemble de pilon et mortier fabriqués en acier inoxydable résistant aux basses températures.

En résumé, le BioPulverizer est refroidi à l'azote liquide. L'échantillon précongelé y est inséré puis est réduit en poudre à l'aide du pilon. On ajoute ensuite un tampon RIPA qui facilite la récupération de la poudre de cartilage. La solution récupérée est ensuite centrifugée et c'est le surnageant qui constitue l'échantillon à soumettre au SDS-PAGE. Le culot, quant à lui, est extrait au chlorure de guanidine (GuCl).

Le terme RIPA vient de « *Radio-Immuno Precipitation Assay* ». C'est le tampon de lyse de premier choix pour l'extraction de protéines cellulaires sans dénaturation excessive. De plus, il n'est pas nécessaire de dialyser les échantillons extraits au RIPA avant de les charger sur le gel pour l'électrophorèse. Lors de l'extraction, des inhibiteurs de protéases sont ajoutés au tampon RIPA (voir section 4.5.4).

Il est à noter qu'au départ une étape d'immunoprécipitation avait été envisagée. Toutefois, à la suite d'essais préliminaires, elle s'est avérée inutile puisque la concentration en protéines du cytosquelette était suffisamment élevée pour qu'un signal soit détecté.

4.5.3 L'extraction au GuCl

Comme mentionné plus haut, le culot résultant de l'extraction au RIPA est soumis à l'extraction au GuCl. Le but de cette seconde étape est d'extraire les protéines du cytosquelette insolubles dans le RIPA. Après l'extraction, les échantillons sont dialysés afin de remplacer le chlorure de guanidine par le tampon RIPA.

À la suite de son introduction en 1969 (Sajdera et Hascall, 1969), le chlorure de guanidine est rapidement devenu le solvant de premier choix pour l'extraction des macromolécules des tissus conjonctifs, à l'exception du collagène qui est fortement réticulé et qui requiert une extraction enzymatique. La concentration préférée est 4 M car, à cette concentration, la majorité des liaisons intermoléculaires non covalentes sont rompues. Les conditions dénaturantes de cette extraction représentent aussi un moyen efficace de minimiser l'activité des protéases. Néanmoins, l'extraction au chlorure de guanidine 4 M est normalement réalisée à des températures près de 0 °C, et des inhibiteurs de protéases sont souvent ajoutés. (Heinegard et Sommarin, 1987)

4.5.4 Les inhibiteurs de protéases

Les protéases sont des enzymes qui hydrolysent les protéines et les polypeptides. Nous avons constaté leur action lors d'essais préliminaires (extraction au RIPA) alors que plusieurs bandes protéiques interagissant avec l'anticorps dirigé contre la vimentine ont été observées. Les protéines dévoilées de poids moléculaire inférieur à celui de la vimentine étaient en fait des produits de la dégradation de la vimentine.

Les protéases sont classifiées en quatre familles : les protéases à sérines, les métallo-protéases, les aspartyl-protéases et les protéases à cystéines. Cette classification (tirée

de la revue de Powers et al., 1993), est basée sur les mécanismes de coupure et les résidus catalytiques des protéases.

En général, le site catalytique des enzymes se situe sur la surface de la molécule, à l'intérieur d'une cavité. La chaîne polypeptidique formant le substrat se lie au site actif de la cavité de façon à ce que sa liaison peptidique à être coupée soit adjacente aux résidus catalytiques.

Chez les protéases à sérines, une triade est formée d'une sérine, d'une histidine et d'une aspartate qui sont disposées de façon à ce que la liaison OH de la sérine soit très fortement polarisée. La chaîne polypeptidique formant le substrat est coupée, et son peptide C terminal est relâché tandis que le peptide N terminal acyle la sérine. Enfin, le second peptide est relâché suite à la coupure de la liaison acyle par l'eau, ce qui régénère et réactive l'enzyme. Lorsque classifiées selon la spécificité de leur substrat primaires, les protéases à sérine peuvent être divisées en 3 groupes principaux : les tryptases (*trypsin-like*), les chymases (*chymotrypsin-like*) et les élastases.

Les métallo-protéases, elles, contiennent un atome de zinc ainsi que quatre ligands disposés selon une géométrie tétraédrique. Le zinc polarise la liaison carbonyle du peptide à être coupé, et un résidu glutamique catalyse l'addition d'eau au substrat.

Chez les aspartyl-protéases, le site actif comporte deux résidus d'acide aspatique. Plusieurs mécanismes de coupure ont été proposés pour ces protéases incluant le mécanisme général acide-base.

Finalement, les protéases à cystéine contiennent un groupement cystéine sulfhydrique ainsi qu'un groupement histidine imidazole sur leur site actif. Le groupement sulfhydrique attaque le groupement carbonyle, ester ou amide, du substrat pour former un intermédiaire thioester et un premier produit de catalyse. Ensuite, le groupement

acyle du thioester est transféré à une molécule d'eau afin de relâcher la portion carboxylique du substrat et de réactiver l'enzyme.

Il existe aussi plusieurs type d'inhibiteurs qui sont classés selon leur type de réactions. Les inhibiteurs réversibles incluent les inhibiteurs simplement compétitif ainsi que les inhibiteurs à transition d'état (*transition-state*). Ils contiennent habituellement des similarités avec le substrat, et leur potentiel d'action dépend de leur interaction avec l'enzyme. Il y a également deux groupes d'inhibiteurs irréversibles. Le premier groupe, les inhibiteurs *active site directed*, ressemble au substrat et contient un groupement réactif qui peut réagir avec les résidus d'acide aminé situés sur le site actif de l'enzyme. Le second groupe, les inhibiteurs *mechanism-based*, suicide ou kamikaze, qui contient souvent un groupement réactif latent activé par la catalyse enzymatique. Les inhibiteurs irréversibles inactivent habituellement les protéases en formant d'abord un complexe enzyme-inhibiteur réversible, suivi de la formation de liaison covalentes. Le potentiel de ces inhibiteurs dépend de la force de la liaison réversible et/ou de la vitesse de l'étape d'inactivation.

Ainsi, pour pallier le problèmes de dégradation de la vimentine associé aux protéases, nous avons ajouter des inhibiteurs de protéases (tableau 4.2). L'extraction au RIPA en présence de Aprotinin, Iodoacetimide, Pepstatin, PMSF et TPCK a permis d'éliminer les traces de dégradation de la vimentine.

Tableau 4.2 : Spécificité des inhibiteurs utilisés lors de l'extraction des protéines

Inhibiteur	Spécificité de l'inhibiteur
Aprotinin	Inhibe des protéases à sérine, par exemple : trypsine, chymotrypsine, plasmine et kallikrein.
Iodoacétamide	Inhibe les peptidases thiol comme la pyroglutamate aminopeptidase.
Pepstatin A	Inhibe des aspartyl-protéases, par exemple : pepsine, renine, cathepsine D et chymosine. Inhibe également plusieurs protéases d'acide microbien.
PMSF (Phenylmethyl-sulfonyl fluoride)	Inhibe les protéases à sérine, par exemple : trypsine, chymotrypsine et thrombine. Inhibe aussi certaines protéases à cystéine comme la papaine.
TPCK (N-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone)	Inhibe la chymotrypsine de façon irréversible ainsi que d'autres protéases à sérine et à cystéine, par exemple : bromelaine, ficine et papaine.

CHAPITRE V

ARTICLE 1 - THE CHONDROCYTE CYTOSKELETON IN MATURE ARTICULAR CARTILAGE: STRUCTURE AND DISTRIBUTION OF ACTIN, TUBULIN AND VIMENTIN FILAMENTS

Ce chapitre présente le premier article rédigé dans le cadre de cette thèse.

5.1 Présentation de l'article

Seul un article récent traite de l'organisation tridimensionnelle du cytosquelette des chondrocytes articulaire *in situ* (Durrant *et al.*, 1999). Les résultats rapportés ont été observés chez le rat par microscopie confocale à fluorescence. On y décrit le cytosquelette d'actine comme étant constitué de points à la surface cellulaire rattachés à un réseau irrégulier pénétrant à l'intérieur de la cellule. Le cytosquelette de vimentine, lui, formerait une cage autour du noyau qui se rattacherait à un autre réseau sous la surface cellulaire.

L'article de Durrant *et al.* relate aussi la distribution des microfilaments d'actine et des filaments intermédiaires dans le cartilage articulaire. Les microfilaments d'actine seraient présents dans toutes les zones du cartilage, alors que les filaments de vimentine n'auraient été détectés que dans les zones profonde et calcifiée du cartilage.

L'article présenté dans ce chapitre (Langelier *et al.*) aborde aussi ce sujet. Toutefois, les trois composantes du cytosquelette y sont examinées (les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires de vimentine et les microtubules). De plus, cette étude fait appel à des techniques supplémentaires afin de corroborer les observations microscopiques. Finalement, le tissu étudié est le cartilage articulaire de bœuf.

Ainsi, dans cette étude, l'organisation des trois réseaux protéiques du cytosquelette des chondrocytes articulaires *in situ* est examinée par microscopie confocale à fluorescence. L'évolution de la morphologie des chondrocytes lors des étapes de perméabilisation et de fixation est également étudiée dans le but de vérifier si les altérations structurales amenées par ces procédés sont minimales. Pour ce faire, des images de sections de cartilage prises par intermittence au microscope à contraste d'interférence différentielle sont analysées. Des images prises sur des sections de cartilage frais et cultivé sont également comparées afin de voir l'effet de la culture sur la structure des chondrocytes.

Cet article rapporte aussi les distributions des trois composantes du cytosquelette dans les trois zones du cartilage articulaire (zones superficielle, transitionnelle et profonde) telles qu'elles ont été qualifiées par microscopie à épifluorescence. Afin de confirmer ces premières observations, une analyse complémentaire est réalisée où des extraits protéiques provenant de chacune des trois zones du cartilage sont soumis parallèlement à l'électrophorèse et à l'immunotransfert.

Avant de passer à l'article même, mentionnons la collaboration de *l'Institut M.E. Müller pour la biologie structurale* (Bâle, Suisse). Principalement, citons l'aide précieuse de Ueli Aebi et Rosmarie Suetterlin relativement à la microscopie à fluorescence.

The Chondrocyte Cytoskeleton in Mature Articular Cartilage: Structure and Distribution of Actin, Tubulin and Vimentin Filaments

Ève Langelier[1], Rosmarie Suetterlin[2], Caroline D. Hoemann[3], Ueli Aebi[2], Michael D. Buschmann[1]

[1]Biomedical and Chemical Engineering, École Polytechnique, Montréal, Québec, Canada.

[2]M.E. Müller Institute for Structural Biology, Biozentrum, University of Basel, Basel, Switzerland.

[3]BioSynTech Ltd., Scientific and Hi-Technology Park, Laval, Quebec, Canada.

Publié dans : *Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Vol 48 : 1307-1320, 2000.*

Key Words : actin, tubulin, vimentin, cytoskeleton, confocal microscopy, chondrocyte, cartilage.

Address correspondence and reprint requests to :

M. D. Buschmann, Biomedical Engineering Institute, École Polytechnique of Montreal, PO Box 6079 Station Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3A7

Fax: 514 340 4611, Tel: 514 340 4711 ext. 4931, E-mail: mike@grbb.polymtl.ca

5.2 Abstract

The structure of the chondrocyte cytoskeleton in intact tissue sections of mature bovine articular cartilage was investigated using confocal fluorescence microscopy complemented with protein extraction and immunoblot analysis. Actin microfilaments were found to be present inside the cell membrane as a predominantly cortical structure while both vimentin and tubulin spanned the cytoplasm from cell to nuclear membrane, the vimentin network appearing finer compared to tubulin. These cytoskeletal structures were present in chondrocytes from all depth zones of the articular cartilage however staining intensity varied from zone to zone, generally showing more intense staining for the filament systems at the articular surface compared to the deeper zones. These results obtained on fluorescently labelled sections were also corroborated by protein contents extracted and observed by immunoblotting. The observed cytoskeletal structures are compatible with some of the proposed cellular functions of these systems, and support possible micro-environmental regulation of the cytoskeleton, including that due to physical forces from load-bearing which are known to vary through the depth layers of articular cartilage.

5.3 Introduction

The chondrocyte cytoskeleton is a three-dimensional (3D) network composed of three types of protein networks: actin microfilaments, microtubules and intermediate filaments. Studies of the major components of the cytoskeleton in other cell types have shown that actin microfilaments play roles in a tremendous number of cellular events including : migration (Heath and Holifield, 1991), adhesion (Turner and Burridge, 1991), shape alteration (Sims *et al.*, 1992), cell signalling (Juliano and Haskill, 1993), organelle movements (Simon and Pon, 1996), endocytosis (Riezman *et al.*, 1996), secretion (Koukouritaki *et al.*, 1996; Sontag *et al.*, 1988), contractile ring formation

(Otto and Schroeder, 1990), myocyte contraction (Cooke, 1986), extracellular matrix assembly (Hayes *et al.*, 1999), and in the regulation of chondrocyte hypertrophy (Hirsch *et al.*, 1996; Hirsch *et al.*, 1997). Other studies have shown that constantly renewing microtubules contribute to intracytoplasmic transport (Vale, 1987), mitotic spindle formation (Mitchison *et al.*, 1986), ciliary movement (Gibbons, 1981), and can be upregulated in chondrocyte hypertrophy (Farquharson *et al.*, 1999). Finally, intermediate filaments, in their polymeric coiled-coil configuration, have been predominantly implicated in the mechanical integration of cellular space, and in the spatial co-ordination of mechanical events (Lazarides, 1980) as well as signal transduction (Traub, 1995). Furthermore, all three cytoskeletal systems are thought to participate in intracellular mRNA transport and targeting (Glotzer et Ephrussi, 1996).

Articular chondrocytes do not divide or migrate within healthy adult cartilage, even in response to growth factor stimulation. Therefore, the likely roles for microfilaments in chondrocytes are in cell-matrix interactions, cell signalling, differentiation, intracellular transport, control of secretion/endocytosis and in resiliency of cell shape. Microfilaments (MFs) have been clearly implicated in control of chondrocyte phenotype (Brown and Benya, 1988; Mallein-Gerin *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1999). In chondrocytes, a most likely function for microtubules (MTs) is intracytoplasmic transport, whereas intermediate filaments (IFs) of chondrocytes could be involved in mechanical as well as transport and signalling functions. Mechanical functions of IFs in chondrocytes are supported by previous observations of increased IFs in weight-bearing regions of articular cartilage (Eggli *et al.*, 1988) and in compression bearing regions in fibrocartilage (Ralphs *et al.* 1991, 1992). Importantly, a potential role of IFs in osteoarthritis was also suggested by the loss of IF expression in a mouse model of osteoarthritis, prior to any other detectable extracellular changes (Benjamin *et al.*, 1995).

Given the clear significance of cytoskeletal architecture in the physiology of chondrocytes and cartilage, it is important to develop techniques to assess the presence

and organisation of cytoskeletal components in chondrocytes *in situ*. Fluorescence confocal microscopy has been used after cryofixation to obtain confocal images of microfilaments and intermediate filaments, but not microtubules, in intact rat articular cartilage (Durrant *et al.*, 1999). There have been no previous studies reporting the maintenance and observation of all three cytoskeletal systems in chondrocytes in intact articular cartilage (for a review see Benjamin *et al.*, 1994). Therefore the purpose of this study was to describe the distribution and physiological three-dimensional organisation of chondrocyte cytoskeletal networks (MFs, MTs and vimentin IFs) *in situ*, which is essential knowledge for a better understanding of the roles of the cytoskeleton in cartilage physiology, mechanotransduction and disease such as osteoarthritis. Distinct cell and extracellular matrix (ECM) differences are known to exist between different depth zones of articular cartilage (Bayliss *et al.*, 1983; Eggli *et al.*, 1988; Muir *et al.*, 1970; Schenk *et al.*, 1986; Speer and Dahner, 1979; Wong *et al.*, 1996) as are depth-dependent patterns of the mechanical parameters of stress and strain (Guilak *et al.*, 1995; Jurvelin *et al.*, 1997; Kempson *et al.*, 1973; Kolmonen *et al.*, 1997; Roth and Mow, 1980; Schinagl *et al.*, 1996; Woo, 1976). Given these known cell, ECM and mechanical zonal dependencies we hypothesised that cytoskeletal structure and composition may also display zonal dependencies. We therefore required that the cytoskeleton be assessed in each of the classically defined noncalcified zones : superficial (or tangential), transitional, and radial (just prior to the calcified cartilage zone). Confocal immunofluorescence and epifluorescence techniques were used to characterise the morphology and zonal dependence of chondrocyte cytoskeletal components actin, tubulin and vimentin. The observed zonal distributions and morphology of the three cytoskeletal filament systems lend support to some of their potential functional roles in chondrocytes, and provide a reference point with which alterations may be compared.

5.4 Materials and Methods

5.4.1 Tissue Explant Isolation and Culture

A recently described (Dumont *et al.*, 1999) cartilage-bone tissue explant system was used in these studies. The unique features of this disk explant system compared to most previously used cartilage explant systems (Grodzinsky *et al.*, 1990) are the presence of an intact articular surface and a thin layer of subchondral bone, thus minimising tissue cutting and swelling in culture. The lack of swelling allows for easier maintenance of homeostasis by limiting diffusional loss of matrix molecules; we showed stable cell viability, collagen and proteoglycan content, synthesis and loss during three-week culture using defined serum-free medium. We used this cultured explant system in the current study to allow future studies involving application of mechanical loads in vitro and to provide a post-mortem stabilisation period of several days in culture. Briefly, cartilage/bone cores were isolated from the load bearing areas of the humeral heads of 1-2 years old steers using an orthopaedic coring bit (050.720, Straumann Canada, Toronto, Ontario) under constant cooling irrigation with HBSS (14060, Gibco BRL, Rockville, Maryland). The location of isolated explants within the load-bearing contact area was noted. In a grid of ~30 disks taken from one load-bearing region of the humeral head, in contact with the scapular articular cartilage, there were 18 disks circumscribing the periphery, and 12 disks clustered more centrally within the load-bearing region. The explants were cut just beneath the bone-cartilage interface with a specialised device in order to retain a thin layer of subchondral bone thus preserving the natural cartilage/bone interface. The resulting disks (4 mm dia., 1.5 mm thick) contained the entire thickness of articular cartilage (~1.2 mm thick) attached to a layer of subchondral bone (~0.3 mm thick). Disk diameter was reduced to 3 mm using a biopsy punch (Miltex 15-33-33, Apocom, Montreal, Quebec) cutting from the cartilage surface through the bone. Following isolation, the disks were washed 5 times with HBSS containing antibiotics, transferred to 96-well round-bottom microplates (5850-96, Corning Costar Corporation,

Cambridge, MA) and cultured in 250 μl/well of DME/F12 (pH = 7.4) (D8900) supplemented with 50 μg/ml gentamycin (G1272), 0.01 % BSA (A8412) and 20 μg/ml ascorbate (A4034, all from Sigma, St. Louis, Missouri) at 37 °C in a 95 % air, 5 % CO_2. Media was changed every 24 hours with ascorbate prepared fresh immediately prior to media exchange.

5.4.2 Cell Viability

Cell viability was determined as described previously (Dumont *et al.*, 1999). Cartilage sections (75 μm thick) obtained with a Tissue-Chopper (McTwain, Brinkmann, Westbury, New York) were submitted to an assay solution consisting of PBS with 1 μM calcein AM, and 1.2 μM ethidium homodimer-1 (L-3224 LIVE/DEAD viability/Cytotoxicity Kit, Molecular Probes, Eugene, OR) to detect green fluorescing live and red fluorescing dead cells, respectively. Samples were incubated for 30 minutes or longer at 37 °C, after which green (live) or red (dead) cells were visualised with a Zeiss inverted fluorescence microscope and documented using a digital camera and Northern Eclipse software from Empix Imaging (Mississauga, Ontario). Image manipulation and 3D reconstruction was achieved using Scion Image from Scion Corporation (Frederick, Maryland).

5.4.3 Tissue Preparation for Fluorescent Microscopy

The cytoskeletal stabilisation medium during processing was a modified Hanks Balanced Salt Solution (mHBSS): 136.9 mM NaCl ; 5.36 mM KCl; 2 mM $MgCl_2$; 0.336 mM Na_2HPO_4; 0.44 mM KH_2PO_4; 4 mM $NaHCO_3$; 2 mM EGTA; 5.55 mM D-Glucose; 0.11 % w/v 2-morphilino ethanesulfonic acid (MES); pH = 6.5 (Prepared from HBSS 10X (14185, Gibco BRL) by adding 2 mM $MgCl_2$ (M2393) + 4 mM $NaHCO_3$ (S7277) +

2 mM EGTA (E4378) + 0.11 % w/v 2-morphilino ethanesulfonic acid (MES) (M5287), all from Sigma) (Baschong *et al.*, 1997). The low pH, chelation of calcium and presence of magnesium has been found to aid in the preservation of cytoskeletal structures during processing for several cell types (Bacallao *et al.*, 1995). Samples were removed after 1-3 days of culture and placed on filter paper (bone layer down) on the stage of a Tissue Chopper with 4 % low melting temperature agarose (Seaplaque agarose, FMC, Rockland, ME) solubilised in mHBSS. (At contact, the agarose temperature is between 34 and 38 °C). 100 μm thick slices were taken slicing from the articular surface through the thin bone layer. The resulting slices were a rectangular cross-section containing the entire articular cartilage layer, the subtending calcified layer and bone. Slices were then permeabilised immediately after slicing in mHBSS containing 2 % Octyl Poe (P-1140, Bachem Bioscience, King of Prussia) (Garavito and Rosenbusch, 1986) and 0.125 % gluteraldehyde (1152, Mecalab Ltd, Montreal, Quebec) for 20 minutes, washed in mHBSS for 5 min, fixed in 1 % gluteraldehyde in mHBSS for 30 minutes, all at 37 °C, and finally washed 3X 5 min in mHBSS and stored in mHBSS at 4°C (Baschong *et al.*, 1997). An autofluorescence block (Weber *et al.*, 1978) is performed on the same day or on the day following the fixation using 5 mg/ml $NaBH_4$ (S9125, Sigma) in mHBSS on ice 2X 30 min followed by washing 4X 5 min in mHBSS and stored in mHBSS at 4°C. To allow antibody penetration, slices were digested for 17 hours at 37 °C with 200 mU/ml chondroitinase ABC (100332, Seikagaku, PDI BioScience, Aurora, Ontario) and 400 mU/ml keratanase (100810, Seikagaku) in Tris-buffered saline (TBS: 100mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (7732, Mallinckrodt, Paris, Kentucky), pH = 7.4) with 0.01 % BSA followed by washing in mHBSS. Actin MFs were directly labelled with TRITC-phalloidin (P1951, Sigma, diluted 1:1000 in mHBSS) in sealed containers for 4 hours. Vimentin IFs were also directly labelled with a monoclonal antibody anti-vim-Cy3 (C9080, Sigma, diluted 1:700) in sealed containers for 4 hours. For β-tubulin, slices were incubated with a primary monoclonal antibody (1 111 876, Boehringer Mannheim, Laval, Quebec, diluted 1:50) for 4 hours followed by secondary donkey anti-mouse coupled to Cy2 (PA42003, Amersham, Buckinghamshire, England, diluted 1:300) or

secondary goat anti-mouse coupled to Alexa 488 (A-11001, Molecular Probes, diluted 1:300). Slices were washed 4X over 5 minutes in mHBSS with agitation and immersed for 5 minutes in an anti-fading reagent : 0.18 mg/ml catalase (106 810, Boehringer Mannheim, Laval, Quebec) + 0.5 mg/ml glucose oxidase (646 431, Boehringer Mannheim) + 0.1 mg/ml glucose (G7520, Sigma). Individual slices were mounted with Mowiol (20 g Mowiol (475904, Calbiochem, San Diego, California) and 0.3 g n-propyl-gallat (P3130, Sigma) in 40ml glycerin (G6279, Sigma)) on slides with coverslips.

Confocal scanning microscopy was performed using Argon laser excitation on a Leica TCS 4-D CLSM (Leica AG, Heidelberg) equipped with PL Apo 100X and Apochromat 63X 1.4 NA oil immersion objectives. Optical sections at 0.5 μm increments were obtained throughout the 100 μm section, or were obtained for regions limited to particular cells and cell groups. Epifluorescence images were acquired using an inverted florescence Zeiss microscope equipped with a digital camera and image-acquisition software (as above under viability). To reduce background for epifluorescence, thinner 50 μm sections from the tissue chopper were used. Cartilage/bone core samples (before cutting off of the subchondral bone) were also sectioned using a vibratome (Vibratome™ 1000, Micle Lab Engineering Co., Gomshall, Surrey, England) since this sectioning procedure was seen to be gentler and to reduce cell-death due to sectioning. In that case, the long core sample was held in place by the bone core with a custom mini-vice installed on the stage of the vibratome. Slices, 25 and 50 μm thick, were taken slicing from the articular surface through a thin layer of bone. A razor blade was then used to detach the slices from the remaining bone core. During slicing with the vibratome, the sample was bathed in mHBSS at room temperature.

5.4.4 Protein Extraction and Western Blot Analysis

Western blot analysis on individual disks was performed in order to complement observed depth-dependent fluorescence labelling. Cultured disks were glued bone-surface down with cyanoacrylate on the stage of the vibratome and bathed in mHBSS at pH = 6.5 at room temperature. The disks were cut transversely into 100 μm circular serial sections, the first section representing the articular surface and the last the deep radial zone. Sections were placed in mHBSS at pH = 6.5 in individual wells of a 96-well plate at room temperature. Each disk yielded from 8 to 12 tangential sections, which were subsequently divided into three equal pools (top ≅ tangential, middle ≅ transitional, bottom ≅ radial) representing the three zones of articular cartilage. Pooled sections were weighed, and immediately flash-frozen with liquid Nitrogen. Each pool of sections was rendered into powder by pulverising (BioPulverizer, Biospec Products, Rijswijk, Netherlands) over liquid nitrogen, and the powder extracted with 100 μl RIPA buffer (0.1 % SDS (4095-02, JT Baker, Phillipsburg, NJ), 1.0 % desoxycholate (AC2849, Anachemia, Montreal, Quebec), 1% Triton X100 (161-0407, Bio-Rad, Hercules, California), 10 mM Tris (161-0716, Bio-Rad), pH = 7.4, 150 mM NaCl) with protease inhibitors aprotinin (Sigma A4529), PMSF (Sigma P7626), iodoacetimide (Sigma I6125), pepstatin (Sigma P5318), TPCK (Sigma T4376), at concentrations recommended by the manufacturer. Extracts were cleared at 15,800 G (13 krpm) at 4 °C for 10 minutes. Approximately equal volumes of RIPA-extracted supernatant (85 μl ±3 μl) were obtained from each group of layers of all disks analysed. Proportionally equal volumes of supernatant were loaded on three 10 % polyacrylamide SDS-PAGE gels, and transferred to Immobilon-P membrane (IPVH00010, Millipore, Bedford, MA). To generate protein-extracts of RIPA-insoluble proteins, the pellets from cleared RIPA extracts were extracted in 100 μl 4 M Guanidine-HCl (4078-01, JT Baker) with protease inhibitors for 60 hours at 4 °C, followed by centricon concentration with RIPA as the exchange buffer, and volumes were made to equal 100 μl with RIPA before subjecting equal proportions of each sample to SDS-PAGE and immunoblot transfer. In parallel, a

smaller volume of each extract was subjected to SDS-PAGE followed by Coomasie-Blue staining to control for total protein loaded from each extract. The resulting membranes were immunoblotted with one of three antisera, including anti-vimentin mouse monoclonal V9 (V6630, Sigma, 1:2500), anti-β-tubulin monoclonal (1 111 876, Boehringer, 1:350), or anti-actin monoclonal (A4700, Sigma, 1:500), followed by anti-mouse HRP-conjugated secondary (PI-2000,Vector, Burlingame, California, 1:2500) and ECL chemiluminescence (RPN 2106, Amersham).

5.4.5 Time Lapse Imaging

A custom-made microscopy chamber was used to observe chondrocyte morphology in permeabilisation and fixation solutions in order to ensure a minimum of structural alterations during these procedures. The microscopy chamber consisted of a stainless steel plate with the dimensions of a slide. The plate was pierced in the middle and two coverslips were used as transparent bottom and top for the chamber that could be used on an inverted microscope. 100 μm thick slices were taken from fresh and cultured (up to 3 days) disks using a Tissue Chopper as described above and placed in mHBSS in the microscopy chamber. Differential interference contrast (DIC) images were taken of the fresh and cultured sections using an inverted fluorescence Zeiss microscope equipped with a 100X oil immersion objective. DIC time-lapse images of cultured sections were taken during the 20 minute permeabilisation period (2 % Octyl Poe and 0.125 % gluteraldehyde in mHBSS) and the 30 minute fixation period (1 % gluteraldehyde in mHBSS) to observe potential alterations in chondrocyte morphology due to those procedures.

5.5 Results

Reported results for cell viability, low magnification epifluorescence microscopy, confocal microscopy and time lapse imaging represent common characteristics seen in groups containing from 4 to 8 samples.

Cell Viability

Chondrocytes were viable in all zones at the time of tissue isolation and throughout the culture period of 1-3 days, with the exception of a thin layer of cells at the articular surface and the cut radial edge of the disks (as seen previously in Fig. 3 of Dumont *et al.*, 1999). The occasional dead cells in zones other than the most superficial layer were found to be those cut by the tissue chopper during sectioning.

Labelling intensity and western blot analysis show heterogeneous content of cytoskeletal components in the different depth zones of articular cartilage.

Low magnification epifluorescence images of the immunostained cartilage sections displayed distinctive zonal dependencies of labelling intensity of the components of the chondrocyte cytoskeleton (Fig. 1). Vimentin IF and MT signal intensity was higher in the superficial zones compared to deeper zones while signal intensity for actin MFs was more uniform. Sharp vimentin and tubulin filament network gradients were observed in those disks situated near the periphery of the load-bearing region, whereas more centrally-located disks showed only slight depth-dependent expression gradients. These zonal characteristics were observed in both sections taken from disks using the Tissue Chopper as well as those prepared by the more gentle cutting of the vibratome on cartilage/bone cores containing long bone stems.

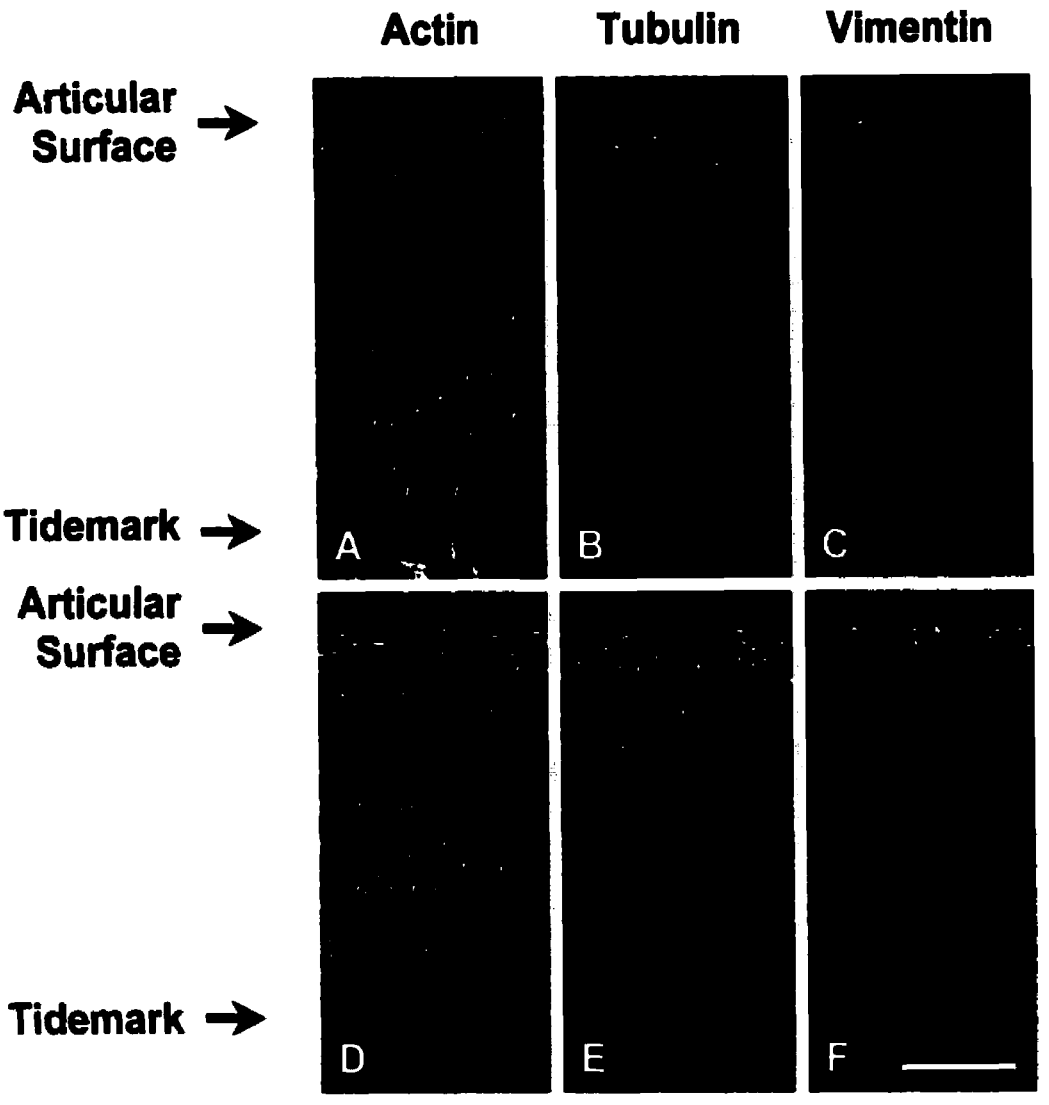

Figure 5.1: Low magnification epifluorescent images of cartilage sections labelled for actin microfilaments (A, D), β-tubulin (B, E) and vimentin (C, F). Sections were obtained from disks situated in the load-bearing contact region, some with more central (A-C) and some with more peripheral (D-F) locations. The division of the cartilage into three zones, tangential at the articular surface followed by the transitional and finally the deep radial zone is shown by the dotted lines. Scale bar = 250 μm.

Immunoblot analysis showed that, in general, RIPA-solubilised cytoskeletal subunit levels were elevated in the most superficial layer, relative to the middle and deep zones (Fig. 2). No major differences were observed between central and peripheral disks for the RIPA extracts. However, GuCl extracts from RIPA-insoluble pellets contained amounts of vimentin that appeared to match the histochemical vimentin gradients observed in adjacent disks. In the GuCl extracts of centrally located disks, vimentin levels were higher in the tangential and in the radial layers compared to the transitional region, similar to the immunohistochemical signals (Fig. 1). For peripherally located disks, there was a monotonic gradient in vimentin distribution which was also similar to the immunohistochemical signals (Fig. 1), with increasing levels of vimentin content from the radial to the tangential zones. Neither actin nor tubulin were detected in the GuCl-extracts. The SDS-PAGE stained with Coomasie-Blue showed protein loading to be globally equal for extracts from different layers (data not shown), where several bands appeared uniformly present in different depths, while others manifested gradients of either decreasing (as for cytoskeletal proteins) or increasing intensities with depth. An example of the latter was observed when blotting with an antibody specific for the C-propeptide of collagen type II (data not shown), confirming the efficiency of protein extraction and recovery from different layers and the presence of physiological gradients in protein concentrations *versus* depth from the articular surface.

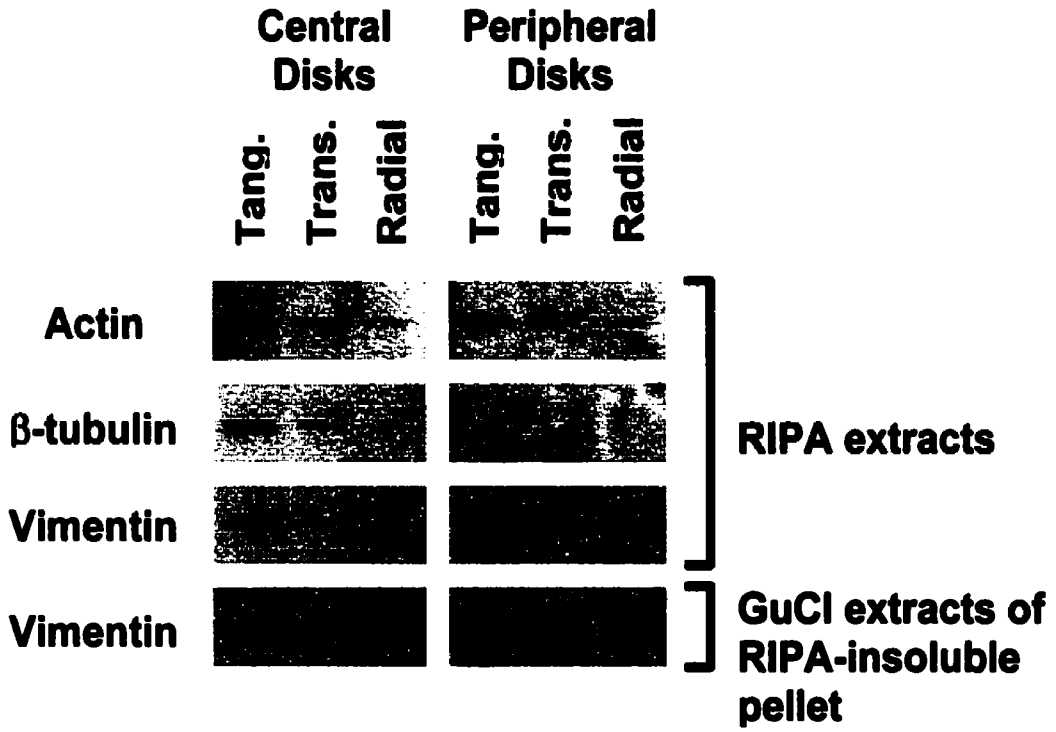

Figure 5.2: Western blot analysis of the three different zones (tangential, transitional and radial) performed on disks situated in the load-bearing contact region, with more central (left) or more peripheral locations (right). Disks were chosen adjacent to the disks used for low magnification epifluorescent images (Figure 5.1). Equal proportions of RIPA extracts and GuCl extracts of RIPA-insoluble proteins were subjected to SDS-PAGE and immunoblot transfer. Membranes were immunoblotted for actin, β-tubulin and vimentin.

Specific structural morphologies for actin, tubulin and vimentin filament systems in chondrocytes *in situ* were observed using confocal microscopy.

Cytoskeletal morphology within chondrocytes indicated specific structural characteristics for the three filament systems in all depth zones (Fig. 3). Actin labelling was dense, punctate and cortical, predominantly located just inside the cell membrane

(Fig. 4). MTs formed a loose basket-like mesh uniformly distributed in the cytoplasm (Fig. 5). Vimentin IFs displayed a tighter mesh that also traversed the cytoplasm from the plasma to the nuclear membrane (Fig. 6). Regions of cells which were devoid of any label (including double labelled specimens) were often recognised (Fig. 7). This absence of staining for cytoskeletal components colocalised with vacuolar structures seen using differential interference contrast (DIC) optics.

To verify that vacuolar structures were not artifactual, either induced by culture or by permeabilisation and fixation procedures, DIC images from sections of fresh and cultured disks, as well as time-lapse imaging of sections undergoing permeabilisation and fixation processes were obtained. Vacuolar structures were visible on freshly isolated and cultured disks (Fig. 8, A and B). Time-lapse imaging under DIC also revealed that cell morphology, including vacuolar inclusion size and shape, was maintained throughout the permeabilisation and fixation procedures (Fig. 8, C-F). These results confirm the absence of marked morphological changes due to culture, permeabilisation or fixation, suggesting the observed cytoskeletal structures to be representative of *in situ* structures. The observed vacuolar structures could be remnants of lipid droplets (Collins *et al.*, 1965; Eggli *et al.*, 1988; Stockwell, 1967) or glycogen particles (Eggli *et al.*, 1988; Stockwell, 1967).

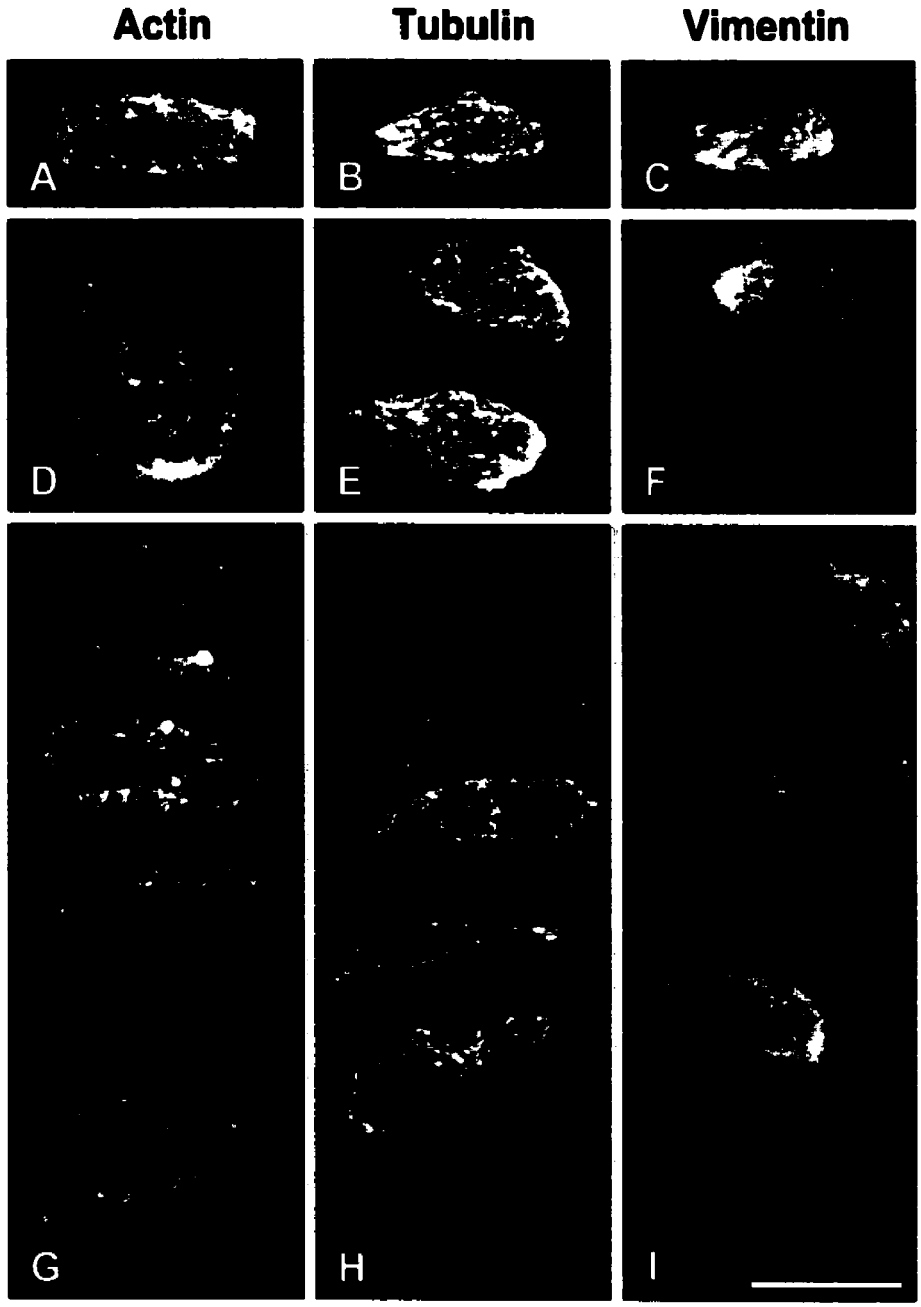

Figure 5.3: 3D reconstructions from confocal laser scanning microscopy (CLSM) of cartilage sections labelled for actin microfilaments (A, D, G), β-tubulin (B, E, H) and vimentin (C, F, I) from the different depth zones: tangential (A-C), transitional (D-F) and radial (G, H, I). Scale bar = 10 μm.

Actin

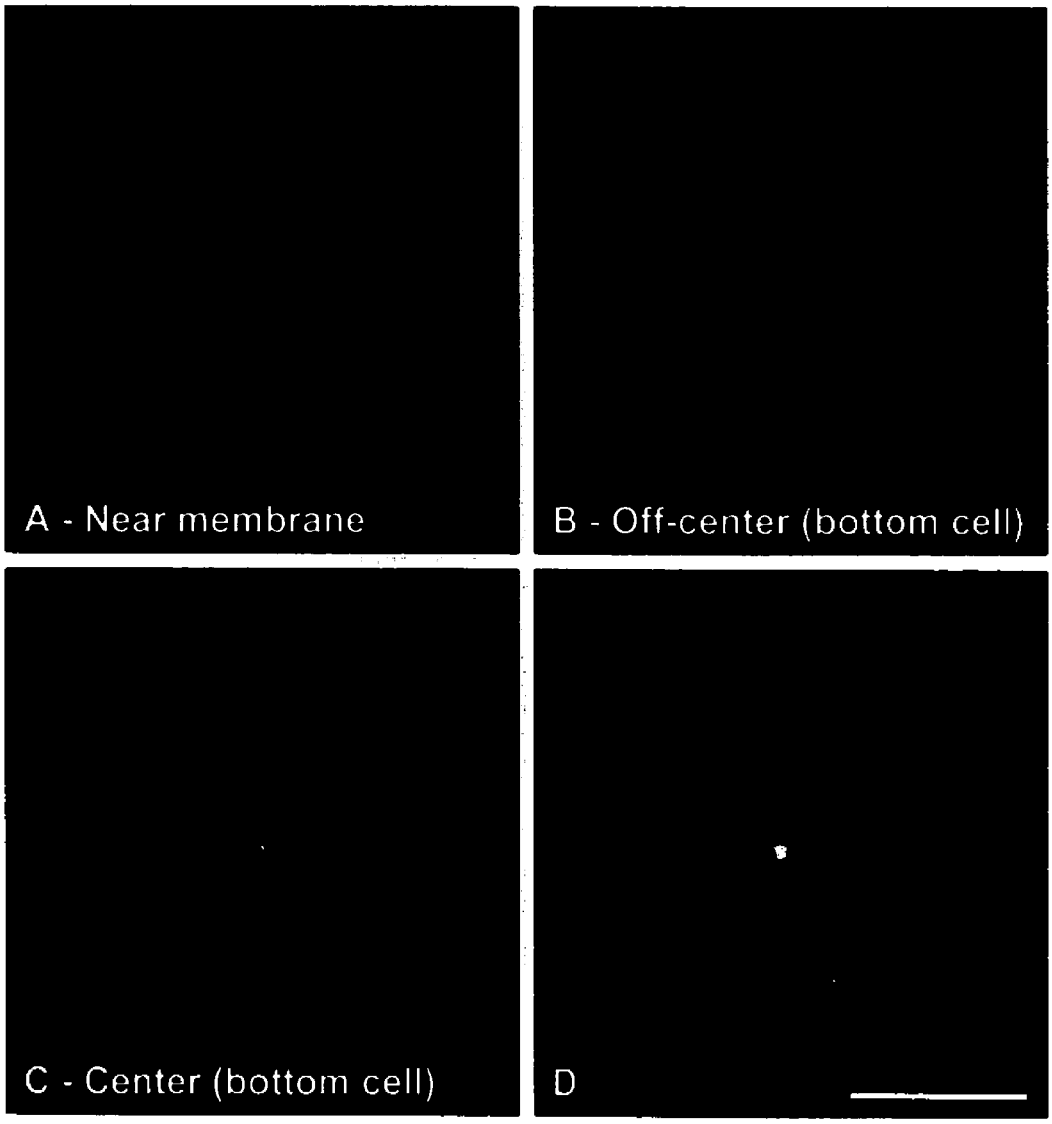

Figure 5.4: Optical CLSM (A-C) sections and 3D (D) reconstructions of chondrocytes from the transitional zone labelled for actin microfilaments. Scale bar = 10 μm.

Tubulin

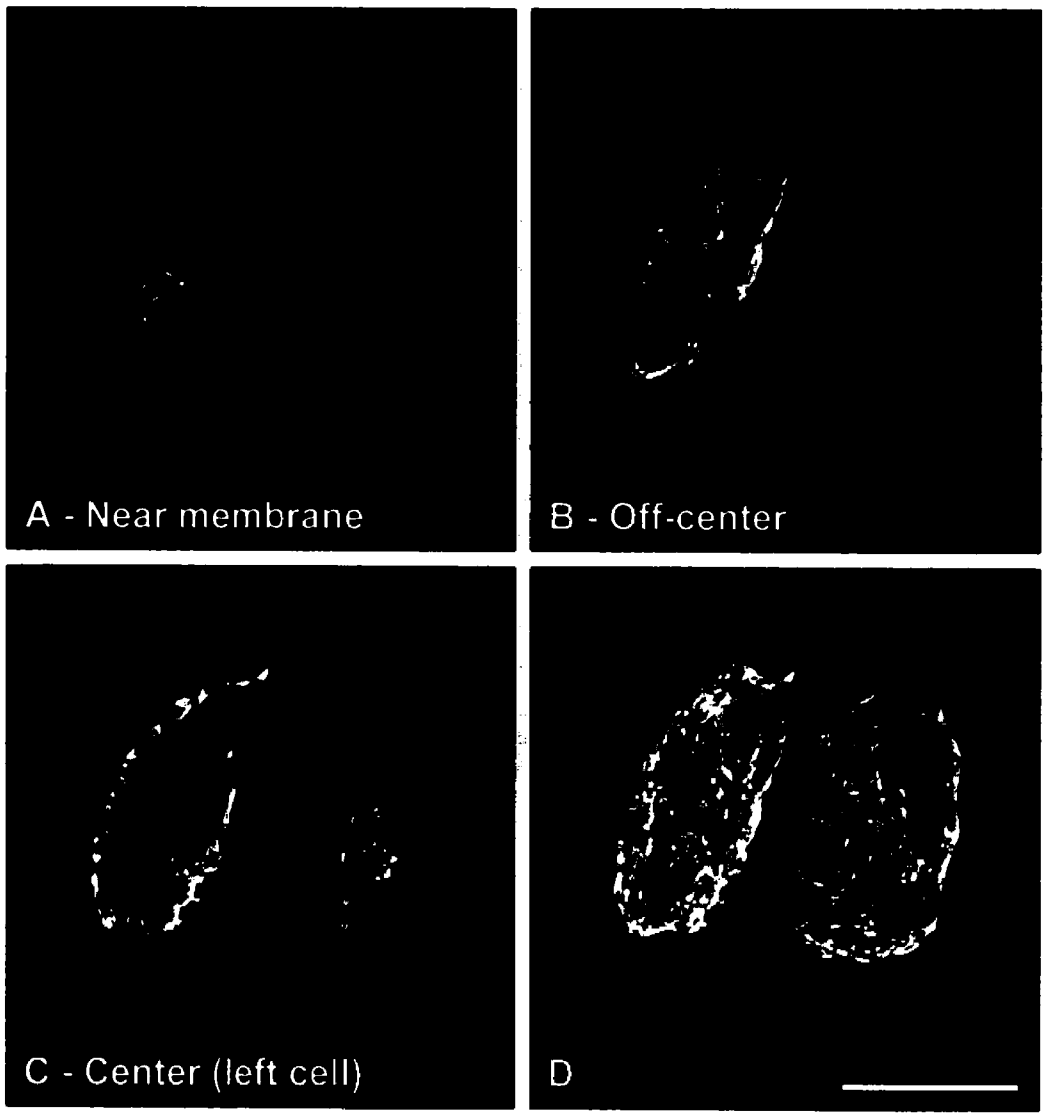

Figure 5.5: Optical CLSM (A-C) sections and 3D (D) reconstructions of chondrocytes from the transitional zone labelled for β-tubulin. Scale bar = 10 μm.

Vimentin

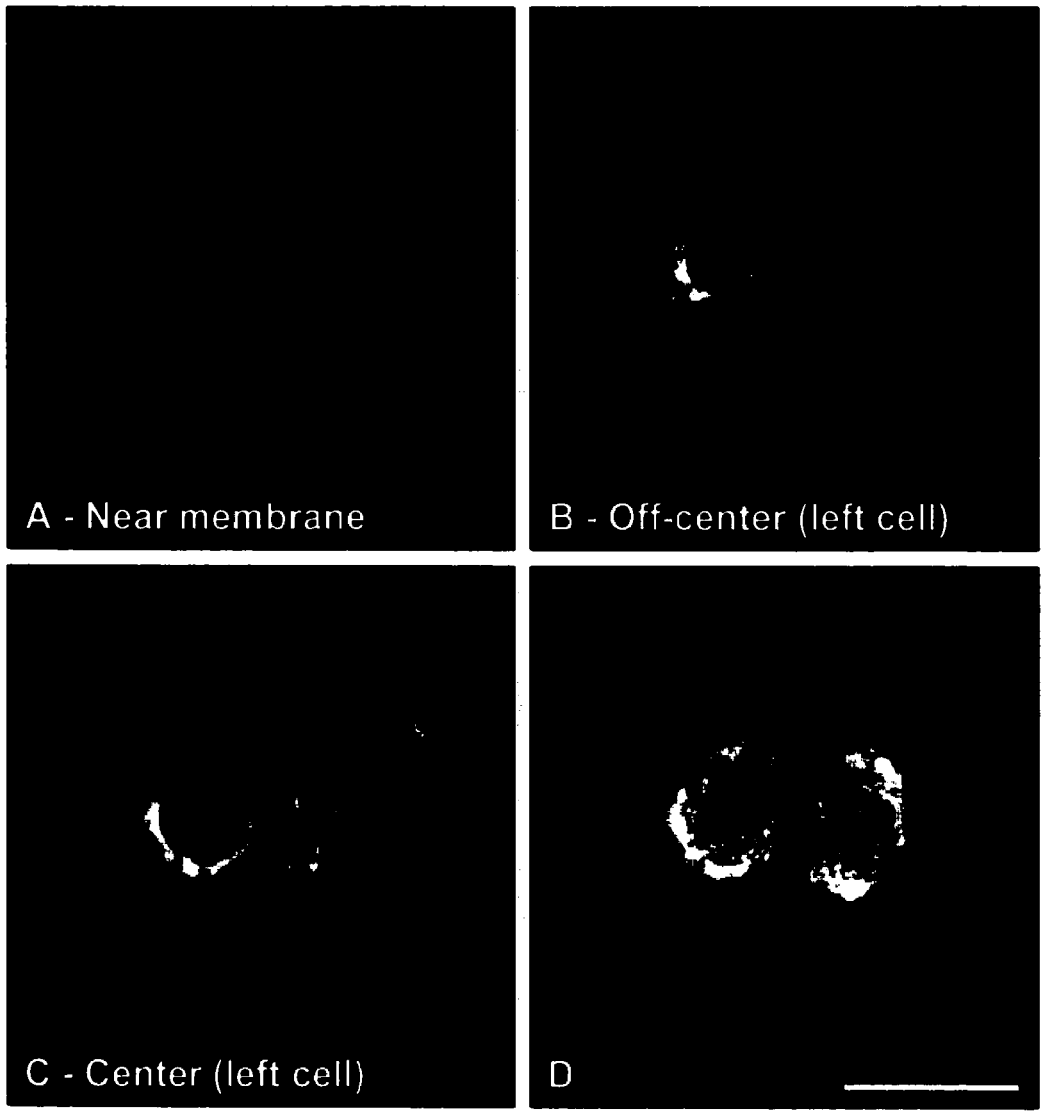

Figure 5.6: Optical CLSM (A-C) sections and 3D (D) reconstructions of chondrocytes from the transitional zone labelled for vimentin. Scale bar = 10μm.

Vimentin

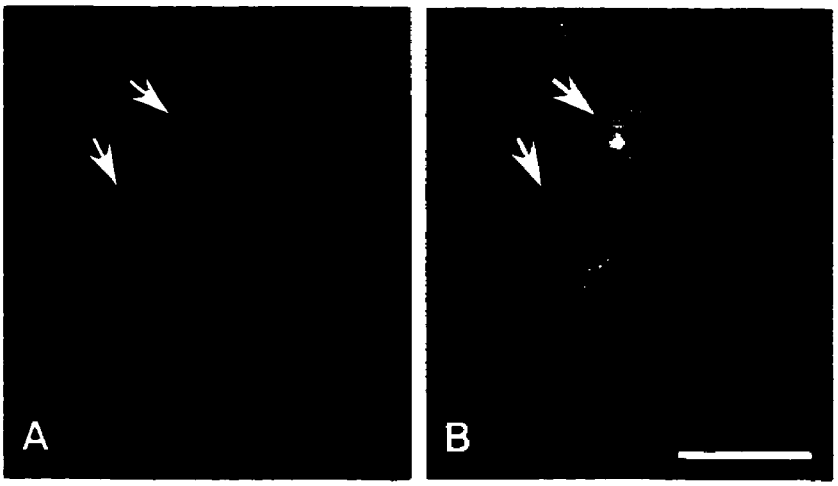

Figure 5.7: Epifluorescence (A) and differential interference contrast (DIC) (B) images of vimentin-labelled chondrocytes. Regions which are devoid of any label (A - arrows), including double labelled specimens, were often recognised and coincided with vacuoles (B - arrows), perhaps due to lipid or glycogen particles, seen in DIC. Scale bar = 10 μm.

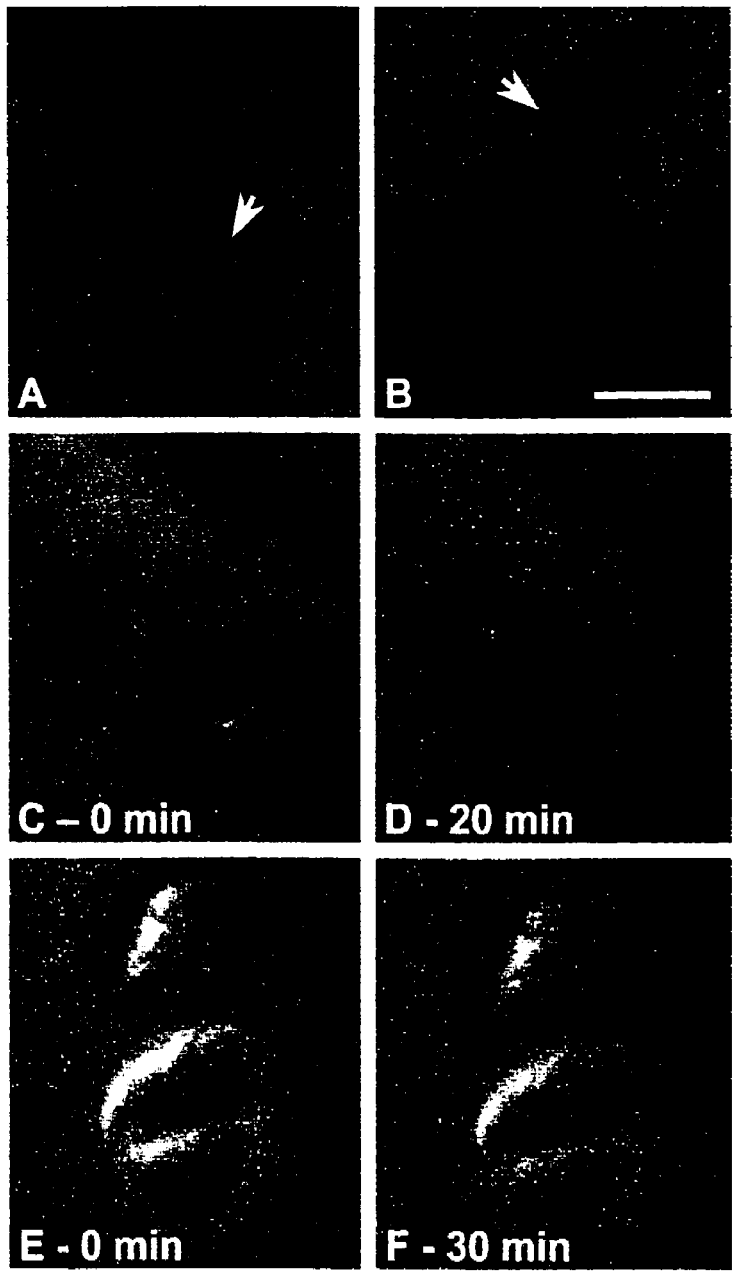

Figure 5.8: DIC images of cartilage sections. Vacuolar structures (arrows) were visible on freshly isolated disks (A) and on cultured disks (B). Also, as observed by time lapse imaging, cell morphology, including vacuole and nuclear size and shape, was maintained throughout the permeabilisation (C & D) and fixation (E & F) processing procedures. Scale bar = 10 μm.

5.6 Discussion

Structural studies of the cytoskeleton of chondrocytes in intact tissue sections of mature articular cartilage were undertaken to elucidate the *in situ* morphology of these systems in the different depth zones of articular cartilage. The dependence of morphology and labelling intensity on the different zones, and the potential roles and regulation of these filament systems in chondrocytes within mature articular cartilage were investigated. A uniform tissue preparation method was found to preserve *in situ* structures of all three filament systems, based on a non-ionic detergent/glutaraldehyde preparation of thick tissue sections followed by autofluorescence blocking and glycosaminoglycan digestion to allow for antibody penetration. We observed that each filament system possessed a distinct structure and that the intensity of labelling depended on the depth zone of the labelled chondrocyte. Some functional roles and cytoskeletal regulatory factors are compatible with these observations.

The specific structures pertaining to actin, tubulin and vimentin filament systems highlight certain functional roles of these systems in chondrocytes of articular cartilage.

The three cytoskeletal filament networks, MFs, MTs and vimentin IFs, exhibited specific structural characteristics which can be related to their distinctive functions. Actin MF labelling was dense and punctate at the peripheral cortex, similar to that reported by Durrant *et al.* 1999. The location of actin, just inside the cell membrane, has been observed in other cell types and is consistent with roles of secretion and endocytosis. The MF network could further offer structural protection against shear stress at the cell cortex, since at low strains, MF networks offer greater resistance to shear stress compared to IF and MT networks (Janmey *et al.*, 1991). In articular cartilage, fluid flow occurs during dynamic compression and this flow could impose

shear stress on the chondrocyte cortex via the cell membrane (Kim *et al.*, 1995). These focal points of actin at cell membranes of chondrocytes *in situ* were recently seen to colocalise with vinculin (Durrant *et al.*, 1999) and could therefore represent adhesion sites to the ECM. This cortical distribution of actin and apparent lack of a direct link between the MFs and the nucleus argues against direct transmission of mechanical deformation to the nucleus via microfilaments (Guilak, 1995). (It is also worth noting that cytochalasin D does not specifically alter cytoskeletal actin independently of nuclear actin (Karim *et al.*, 1992) or other cytoskeletal components). Instead, the linkage between actin MFs and the nucleus could be indirect, involving other cytoskeletal proteins such as IFs. Finally, the importance of microfilament architecture in the control of chondrocyte phenotype cannot be underestimated (Brown and Benya, 1988; Mallein-Gerin, 1991). Unlike chondrocytes grown in a monolayer, chondrocytes *in situ* contained no stress fibres, further emphasising the importance of developing these *in situ* observation techniques.

MTs formed a loose basket-like mesh spanning throughout the cytoplasm. This structure is in agreement with the intracytoplasmic transport functions associated with MTs. Also, the suggestion that MTs could serve as stabilising elements for other cytoskeletal systems (Janmey *et al.*, 1991; Maniotis *et al.*, 1997) is compatible with the MT organisation observed in our study.

Vimentin IFs displayed a tighter, yet finer mesh than MTs that also traversed the cytoplasm from the plasma membrane to the nuclear membrane. Intracellular mRNA transport and targeting functions of the IF cytoskeleton are well served by this spanning organisation of vimentin, which is also consistent with the notion that IFs may serve as mechanical integrators of cellular space (Lazarides, 1980). In agreement with its network organisation, spanning from the nuclear to the plasma membrane, the vimentin cytoskeleton could be part of an intracellular mechanical signal transduction system in chondrocytes. For example, mechanical forces can be transferred across the cell

membrane to the cytoskeleton via β1 integrins (Wang *et al.*, 1993), and mechanical coupling exists between cell surface integrin receptors, cytoskeletal filaments and the nuclear scaffold, even when MFs and MTs have been destabilised (Maniotis *et al.*, 1997). In chondrocytes, vimentin IFs can be disassembled and reassembled in response to the mechanical stimuli associated with tissue swelling during the generation of cartilage explants containing no subchondral bone (Durrant *et al.*, 1999). In that study, vimentin IFs were disassembled by tissue swelling and then spontaneously reassembled during subsequent culture and mechanical load was capable of limiting tissue swelling and thereby limiting vimentin IF disassembly. Furthermore, previous studies showed that changes in the synthesis of the main proteolgycan of the extracellular matrix in articular cartilage, aggrecan, strongly correlated with the alterations of cellular and especially nuclear structure in statically compressed cartilage explants (Buschmann *et al.*, 1996). The vimentin cytoskeleton could therefore be implicated in mechanotransduction by directly transducing cell deformation to nuclear deformation.

Depth-dependent labelling intensity suggests microenvironmental regulation of the chondrocyte cytoskeleton including that due to physical forces from load-bearing.

We verified whether histochemical gradients observed in low-magnification epifluorescence images could be confirmed by Western blot analysis of the three zones dissected from the explants, being careful to process pairs of neighbouring disks, one for immunohistochemistry and one for Western blotting. β-tubulin in the articular cartilage explants possessed biochemical and immunohistochemical gradients that self-conferred. The gradient of actin distribution in the Western analysis was discordant with the observed homogenous phalloidin staining pattern. It should be noted, however, that actin detected by immunoblot will represent both filamentous and unpolymerised actin, whereas phalloidin will only detect polymerised actin MFs remaining after permeabilisation. Thus the higher Western signal in the superficial zone could represent

higher content of actin in the soluble pool compared to deeper regions, potentially corresponding to higher remodelling in superficial zones. The distribution of RIPA-soluble vimentin in the three zones did not completely correlate with the histological staining pattern observed immunohistochemically. However, vimentin extracted with GuCl from the insoluble pellets revealed a distribution that clearly followed the histological staining intensity, suggesting that the vimentin histological staining pattern follows the protein content obtained from its least soluble fraction (RIPA-insoluble GuCl extracted). An important point in the interpretation of these western results is that although cell density decreases with depth, an increase in individual cell volume renders total cell volume (or cell volume fraction) depth-independent (Wong et al, 1996). Thus the intensities of protein bands in our western blots represent total protein normalised to total cell volume in a particular depth-zone. Finally, the observation by Durrant *et al.* (1999) concerning vimentin zonal distribution may appear to contradict our observed zonal distribution of vimentin. In that study vimentin was concentrated in the deeper zones rather than the superficial zones as depicted in our study. Several explanations, including different fixation procedures, are possible for this different observation. However, in particular, the rat tissue in Durrant *et al.* 1999 is only ~60μm thick compared to our 1200μm thick bovine tissue, potentially changing significantly the regulatory (mechanical and humoral) signals seen in the various zones.

Axial deformation under static load is higher in superficial regions of mature cartilage (Kolmonen *et al.*, 1997; Schinagl *et al.*, 1996), where we also observed more intense labelling of cytoskeletal components. This suggests that a denser cytoskeleton may be developed in chondrocytes that are subjected to higher levels of cell deformation. Chondrocytes in these regions may require a more robust cytoskeleton to satisfy especially structural and stability roles. In deeper layers, high levels of hydrostatic pressure rather than macromolecular deformation are expected to be present, at least during dynamic loading, so that cell mechanical requirements may be fundamentally different. It is also important to note that loading conditions can change across joint

surfaces further modulating form and content of the chondrocyte cytoskeleton, as observed in our study where differences were observed in histochemical gradients between peripheral and more centrally-located disks on the humeral head. Our disk explant system is amenable to further investigation of the roles and dynamics of the chondrocyte cytoskeleton and in particular its alteration due to load. Such studies may have implications for the ability of chondrocytes to structurally withstand certain levels of mechanical load and subsequently to properly maintain a functional tissue or lead to a cellular malfunction and net degeneration of articular cartilage. Furthermore, the techniques developed in our study could be applied to observe the chondrocyte cytoskeleton in cartilage tissue from animal models of disease or from humans, to aid understanding of cartilage pathology.

5.7 Acknowledgments

The Arthritis Society (Canada). Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (Scholarship to EL). The Swiss National Foundation for Scientific Research. The M.E. Müller Foundation of Switzerland. The Canton Basel Stadt.

5.8 Conclusion

Dans cette étude, l'organisation des trois composantes du cytosquelette des chondrocytes *in situ* a été examinée par microscopie confocale à fluorescence. Il a été conclu que les réseaux d'actine, de tubuline et de vimentine possèdent des morphologies structurales distinctes. Ainsi, il a été observé que les microfilaments d'actine ont une distribution ponctuelle et corticale tandis que les microtubules et les filaments de vimentine forment un treillis s'étendant de la membrane nucléaire à la membrane plasmique, le treillis formé de filaments de vimentine étant toutefois plus fin et plus serré que celui formé de

microtubules. La valeur de ces résultats est appuyée par l'examen des images prises au microscope à contraste d'interférence différentielle, qui a confirmé l'absence de changements morphologiques marqués dus à la culture, la perméabilisation ou la fixation.

Cette étude a également examiné par microscopie à épifluorescence la distribution des trois composantes du cytosquelette dans les trois zones du cartilage articulaire. Il a ainsi été démontré que le contenu protéique des filaments varie selon la profondeur dans le cartilage. La distribution des microfilaments d'actine est plutôt uniforme, alors que celles des microtubules et des filaments intermédiaires suivent un gradient dont l'intensité de marquage est maximale dans la zone superficielle. L'analyse par SDS-PAGE des extraits RIPA et GuCl appuie ces résultats et suggère : 1) que le bassin d'actine globulaire est plus important dans la zone superficielle que dans les régions profondes; et 2) qu'il existe un pool de vimentine soluble qui est extrait lors de la perméabilisation des coupes pour la microscopie à fluorescence.

À la suite de ces observations, deux hypothèses ont été proposées relativement aux rôles mécaniques du cytosquelette des chondrocytes :

- Vu son organisation spatiale, le réseau de vimentine pourrait être impliqué dans la mécanotransduction en transformant par un lien mécanique la déformation cellulaire en déformation nucléaire.
- Vu la distribution de ses composantes, le réseau formant le cytosquelette pourrait être plus robuste chez les chondrocytes de la zone superficielle afin de remplir des fonctions structurales.

CHAPITRE VI

AUTRES RÉSULTATS – ÉTUDE DU CYTOSQUELETTE

Ce chapitre présente une étude complémentaire à l'article 1 traitant de l'effet des compressions mécaniques sur le cytosquelette des chondrocytes. Il s'agit cependant d'une étude préliminaire vu le nombre restreint d'échantillons testés et d'images microscopiques captées.

Sept sections principales composent ce chapitre. Est d'abord exposée la problématique, laquelle est suivie de la revue de littérature et des objectifs. Ensuite sont rapportés brièvement la méthodologie ainsi que les résultats et conclusions, qu'on trouve détaillés dans l'annexe II. Enfin, une analyse des résultats et conclusions est présentée et des expérimentations additionnelles sont suggérées.

6.1 Problématique

L'article 1 présenté au chapitre V avait pour but de décrire l'organisation et la distribution du cytosquelette des chondrocytes *in situ*, informations essentielles à l'étude des fonctions du cytosquelette. À la suite de l'examen des trois réseaux du cytosquelette, il a été proposé que le réseau de vimentine soit impliqué dans la mécanotransduction en transformant par un lien mécanique la déformation cellulaire en déformation nucléaire. Pour appuyer cette hypothèse, citons la forte corrélation observée entre les changements de synthèse d'agrécannes et les altérations structurales des chondrocytes et des noyaux sous compression statique (Buschmann *et al.* 1996), la réorganisation du réseau de vimentine en réponse au gonflement du cartilage (Durrant *et al.*, 1999) ainsi que l'existence d'un lien mécanique entre les intégrines, le cytosquelette

et le noyau, même en l'absence de microfilaments et de microtubules (Maniotis *et al.*, 1997).

De son côté, l'examen de la distribution des trois composantes du cytosquelette dans les différentes zones du cartilage articulaire a dévoilé un marquage plus intense (vimentine et β-tubuline) dans la zone superficielle, où les déformations statiques sont plus importantes (Kolmonen *et al.* 1997; Schinagl *et al.* 1996). Il a été proposé que les chondrocytes de cette région nécessitent un réseau plus robuste pour remplir des fonctions structurales.

De nouvelles expérimentations sont essentielles afin d'approfondir l'étude des fonctions mécaniques du cytosquelette. Une première étape dans la validation des hypothèses avancées et dans l'investigation des voies d'action du cytosquelette consiste à examiner les changements d'organisation du cytosquelette causés par des perturbations mécaniques.

Récemment, une première étude a paru concernant les changements d'organisation du cytosquelette des chondrocytes *in situ* en réponse à des stimuli mécaniques associés au gonflement du cartilage en culture (Durrant *et al.*, 1999) (section 6.2). La présente étude est préliminaire; elle a pour objectif d'examiner les changements dans l'organisation du cytosquelette des chondrocytes *in situ* à la suite de l'application de compressions statiques ou dynamiques contrôlées. Elle complète l'étude de Durrant *et al.* principalement parce que les conditions de chargement sont différentes (c'est-à-dire contrôlées) et que les tissus étudiés sont d'origine, d'épaisseur et de configuration différentes (Durrant *et al.* : rat ~60 μm sans os; présente étude : bœuf ~1200 μm avec os).

Un second point d'intérêt à examiner est la phosphorylation de la vimentine puisque, comme souligné à la section 2.1.9, la phosphorylation des filaments intermédiaires

polymérisés peut conduire à leur réorganisation ou leur séparation. Ainsi, un changement dans le niveau de phosphorylation de la vimentine après l'application de contraintes mécaniques sur le cartilage articulaire pourrait indiquer une réorganisation du réseau de vimentine induite par l'action d'une kinase ou d'une phosphatase. Au meilleur de ma connaissance, il s'agirait de la première étude de ce genre.

6.2 Revue de littérature

Cette section présente une revue de littérature élargie qui ne traite pas seulement des changements d'organisation du cytosquelette des chondrocytes à la suite de perturbations mécaniques, la quantité d'information sur le sujet étant très restreinte. Elle aborde également la littérature se rapportant aux hypothèses impliquant le cytosquelette dans la mécanotransduction ou dans des fonctions structurales.

6.2.1 Le rôle du cytosquelette des chondrocytes dans la mécanotransduction

Une hypothèse a été présentée dans l'article 1 voulant que le cytosquelette de vimentine soit impliqué dans la mécanotransduction. D'ailleurs, une récente revue (Janmey, 1998) propose plusieurs chemins de signalisation basés sur le cytosquelette. Par exemple, puisque le cytosquelette forme un réseau tridimensionnel fournissant un lien mécanique continu à travers la cellule, il peut influer sur l'activité des canaux ioniques de la membrane plasmique et conduire les contraintes mécaniques de la membrane cellulaire vers les organelles internes. Ainsi, les réponses cellulaires comme les changements de concentration de Ca^{2+} intracellulaire et la transcription des gènes pourraient être modulées par les perturbations mécaniques via le cytosquelette. De plus, le cytosquelette fournit une grande surface de haute densité de charge électrostatique négative sur laquelle plusieurs molécules de signalisation comme les kinases, les

phospholipases et les GTPases peuvent se localiser. Il peut donc prévenir ou causer la réaction d'enzymes liés au cytosquelette avec leurs cibles.

Malgré le potentiel réel du cytosquelette à participer à la transduction de stimuli mécaniques, très peu d'études ont été consacrées à ce sujet chez les chondrocytes. La première démonstration de l'implication du cytosquelette des chondrocytes dans la mécanotransduction est probablement la modulation du phénotype chondrogénique par le réseau d'actine (section 2.2). En effet, la présence de fibres toniques d'actine chez les chondrocytes cultivés en monocouche occasionne l'arrêt de synthèse du collagène de type II (Brown et Benya, 1988, Mallein-Gerin *et al.*, 1991). Par contre, la culture des chondrocytes dans des conditions qui inhibent l'étalement cellulaire et la formation de fibres toniques permet de prévenir ou de renverser cette dédifférenciation (Benya et Shaffer, 1982, Zanetti et Solursh, 1984).

Wright *et al.* (1997) ont étudié le chemin de signalisation intracellulaire associé aux intégrines impliqué dans l'hyperpolarisation (augmentation du potentiel membranaire mesurée à l'aide d'une électrode simple et d'un circuit en pont) des chondrocytes en culture (chondrocytes humains provenant du condyle fémoral distal cultivés dans un milieu *Ham's F12* additionné de 10 % de sérum fœtal bovin) à la suite de l'application de déformations cycliques. Ils ont, entres autres, examiné l'effet de la cytochalasine D (qui rompt les microfilaments) sur le changement de potentiel membranaire. La cytochalasine D a inhibé l'hyperpolarisation des chondrocytes, suggérant un rôle pour le cytosquelette d'actine dans la réponse cellulaire. Il est à noter cependant que les chondrocytes utilisés dans cette étude étaient étendus puisque cultivés en monocouche, mais ne démontraient pas encore le cytosquelette d'actine typique aux chondrocytes dédifférenciés même si quelques courtes fibres toniques étaient visibles.

Toujours chez des chondrocytes en culture (chondrocytes bovin isolés de surfaces patellaires de fémurs d'animaux âgés de 1 à 2 ans et cultivés dans un milieu *Basal*

Medium Eagle (BME) additionné de 10 % de sérum fœtal bovin), Jortikka *et al.* (2000) ont étudié le rôle des microtubules dans le contrôle de la synthèse des protéoglycannes en réponse à une pression hydrostatique. Premièrement, en traitant des cellules avec du nocodazole (qui rompt les microtubules) ou du taxol (qui empêche la rupture normale des microtubules), ils ont observé une diminution de l'incorporation de sulfate[S^{35}]. Ils ont également remarqué qu'une pression hydrostatique intermittente (5 MPa à 0,5 Hz) stimule la synthèse de protéoglycannes, mais qu'elle n'a aucun effet en présence de nocodazole ou de taxol. Les auteurs proposent donc que les fonctions dynamiques des microtubules soient impliquées dans la sécrétion de protéoglycannes stimulée par une pression cyclique. Au cours des mêmes travaux, il a été noté qu'une pression hydrostatique constante n'affecte pas (5 et 15 MPa) ou même inhibe (30 MPa) la synthèse de protéoglycannes et que l'application conjointe d'une haute pression hydrostatique constante (30 MPa) et de nocodazole ou de taxol la réduit encore davantage. Les auteurs suggèrent cette fois que l'inhibition de la synthèse de protéoglycannes par une haute pression hydrostatique soit indépendante de l'état des microtubules. Précédemment, une étude (Parkkinen *et al.*, 1993) a démontré qu'une pression hydrostatique constante de 30 MPa affecte l'organisation de l'appareil de Golgi en le compactant et que cette réorganisation nécessite l'intégrité des microtubules. Cependant, le nocodazole fragmente et disperse l'appareil de Golgi et aucune réorganisation ne se produit à la suite de l'application d'une pression. Finalement, une pression cyclique (5-30 MPa) ne cause pas de changement apparent à l'appareil de Golgi. Ainsi, Jortikka *et al.* suggèrent que les pressions cycliques augmentent la sécrétion de protéoglycannes par un mécanisme dépendant du trafic vésiculaire associé aux microtubules et que les hautes pressions continues influent sur des cibles autres que les microtubules peut-être situées à un stade près de *cis*-Golgi.

De façon similaire, Parkkinen *et al.* (1995) ont appliqué des pressions hydrostatiques (constantes ou cycliques, d'amplitude égale à 5, 15 ou 30 MPa) à des chondrocytes en culture (chondrocytes bovin isolés de surfaces patellaires de fémurs d'animaux âgés de 2

ans et cultivés dans un milieu *Basal Medium Eagle (BME)* additionné de 10 % de sérum fœtal bovin) afin d'étudier leur influence sur l'organisation des fibres toniques. Ils ont observé que, chez les cellules exposées à une pression constante de 30 MPa, presque toutes les fibres toniques disparaissent. Par contre, une pression statique de 15 MPa ou une pression cyclique de 15 ou 30 MPa ne cause qu'une diminution du nombre de fibres. Enfin, ils ont noté qu'une pression de 5 MPa n'a aucun effet visible sur l'apparence des fibres toniques. Ces résultats indiquent donc que le cytosquelette d'actine pourrait être impliqué dans la réponse des chondrocytes aux pressions hydrostatiques.

Il est important de considérer que ces premières études ont été réalisées sur des chondrocytes en culture et qu'elles peuvent donc ne pas être représentatives de la réalité *in situ*. Les travaux suivants, eux, ont étudié la mécanotransduction chez des chondrocytes maintenus dans leur environnement matriciel, c'est-à-dire *in situ*.

Guilak (1995) a étudié la relation existant entre les déformations de la matrice extracellulaire, du chondrocyte et du noyau. Il a reconstruit les surfaces tridimensionnelles de chondrocytes et de noyaux à partir d'images captées par microscopie confocale avant et après la compression (15 % à 0,005 /s) d'un échantillon de cartilage articulaire. La déformation de la matrice extracellulaire entraîne des changements significatifs sur les plans de la hauteur, de la forme et du volume des chondrocytes et de leurs noyaux. Un prétraitement à la cytochalasine D effectué pour détruire les microfilaments d'actine n'entraîne que peu de changements dans les volumes cellulaire et nucléaire comparativement aux échantillons contrôles. Cependant, il affecte les relations existant entre la déformation de la matrice et la hauteur et la forme des noyaux. Guilak propose donc que les déformations de la matrice extracellulaire soient transmises aux noyaux des chondrocytes via les microfilaments d'actine. Deux mises en garde sont toutefois formulées par l'auteur :

1) La cytochalasine D n'est pas spécifique à l'actine formant le cytosquelette et peut aussi affecter l'actine nucléaire.

2) En se basant sur les données statistiques, on peut conclure que le prétraitement à la cytochalasine D diminue les changements de hauteur des noyaux induits par la déformation sans nécessairement les éliminer complètement. Ceci suggère que l'organisation du réseau de microfilaments joue un rôle important dans la déformation des noyaux, mais que d'autres éléments du cytosquelette peuvent aussi être impliqués.

Durrant *et al.* (1999) ont étudié le comportement du cytosquelette lors du gonflement de l'explant de cartilage articulaire. C'est que l'explant, qui ne compte pas d'os sous-jacent, gonfle en culture, car le réseau de collagène normalement ancré dans le cartilage calcifié est perturbé. Selon leurs observations la distribution de la vimentine semble être affectée par le gonflement. Une heure après le début de la culture, le réseau de vimentine est détruit; il en résulte un marquage diffus de vimentine. Après 24 à 48 heures, le marquage de vimentine filamenteuse est visible dans toutes les cellules. Une charge axiale de 1 MPa est suffisante pour assurer le maintien du réseau de vimentine, lequel est normalement formé d'une cage autour du noyau rattachée, via des filaments traversant le cytoplasme, à un autre réseau sous la surface cellulaire. Cependant, des charges supérieures (jusqu'à 4 MPa) augmentent la distribution de la vimentine dans le tissu. La distribution de l'actine, elle, ne semble pas être affectée par le gonflement. Le marquage apparaît toujours sous forme de points brillants à la surface cellulaire, rattachés à un réseau indistinct pénétrant à l'intérieur de la cellule vers le noyau.

Durrant *et al.* suggèrent que le réseau d'actine soit impliqué dans la perception des chargements à cause de son organisation, de sa colocalisation avec la vinculine (section 6.2) et de sa présence peu importe le chargement imposé. Leur hypothèse est de plus appuyée par l'article de Guilak (1995) cité précédemment.

6.2.2 Le rôle mécanique du cytosquelette des chondrocytes

Dans l'article 1, une seconde hypothèse a été proposée voulant cette fois que les chondrocytes de la zone superficielle, où les déformations statiques sont plus importantes, nécessitent un réseau plus robuste pour remplir des fonctions structurales.

De façon similaire, Durrant *et al.* (1999) proposent que la vimentine soit impliquée dans la résistance en compression de la cellule. Cette hypothèse est basée sur leur observation d'une plus grande distribution de vimentine chez les explants soumis à des chargements plus élevés. Elle est de plus corroborée par la constatation d'une accumulation de vimentine dans les régions du cartilage ou du tendon du quadriceps (fibrocartilages) subissant des plus hauts niveaux de compression (Eggli *et al.*, 1988, Ralphs *et al.*, 1991, 1992).

Eggli *et al.* (1988) ont comparé par microscopie électronique les zones transitionnelles de régions du cartilage articulaire bovin supportant des charges plus et moins élevées. Ils ont observé, dans les régions supportant des charges plus élevées, une augmentation du volume des chondrocytes, attribuable principalement à l'accumulation de filaments intermédiaires et de particules de glycogène. Selon les auteurs, il s'agirait d'une adaptation aux exigences fonctionnelles accrues.

Ralphs *et al.* (1991, 1992) ont étudié le développement des fibrocartilages d'attachement à la rotule et « suprapatella ». Les cellules précurseurs de ces deux zones de fibrocartilage semblent posséder des niveaux similaires de filaments intermédiaires de vimentine. Cependant, chez le rat adulte, les cellules du fibrocartilage « suprapatella » contiennent une plus grande densité de vimentine. Selon les auteurs, cette accumulation de vimentine pourrait provenir de la différence entre les environnements mécaniques, les efforts prédominants étant ceux en tension dans la zone d'attachement et ceux en compression dans la « suprapatella ».

6.3 Objectifs

Chez le cartilage articulaire, la compression de la matrice extracellulaire entraîne la déformation des cellules et de leur noyau (Buschmann *et al.*, 1996, Guilak, 1995), ce qui laisse prévoir la déformation des réseaux de filaments formant le cytosquelette des chondrocytes. L'accumulation de filaments intermédiaires dans les régions du cartilage et du tendon du quadriceps (fibrocartilages) supportant les plus grandes charges en compression (Eggli *et al.*, 1988, Ralphs *et al.*, 1991, 1992) ainsi que l'accumulation de filaments intermédiaires et de microtubules dans la zone superficielle où les déformations statiques sont les plus importantes (article 1) annoncent également des altérations au niveau du cytosquelette en réponse à des stimuli mécaniques.

Le but de ce projet est d'étudier ces hypothèses. Plus spécifiquement, les objectifs sont ceux-ci :

- Obtenir des images préliminaires du cytosquelette des chondrocytes *in situ* après l'application de compressions statiques et dynamiques.
- Obtenir des images préliminaires de la phosphorylation des sites Ser55 et Ser82 des filaments de vimentine chez les chondrocytes *in situ* après l'application de compressions statiques et dynamiques.

6.4 Méthodes

La méthodologie utilisée lors des essais de compressions est détaillée à l'annexe II. En résumé, des disques de cartilage ont été comprimés de façon non confinée selon un des trois protocoles suivants : compression statique (déformation de 100 μm à 1 μm/s pendant 1 heure), compressions dynamiques à basse vitesse (déformation de 100 μm à 5 μm/s; 10 cycles compression-décompression espacés de 260 secondes et répétés pendant 3 jours) ou compressions dynamiques à haute vitesse (déformation de 250 μm à 100

μm/s; 40 cycles compression-décompression espacés de 30 secondes). Ils ont ensuite été testés pour la viabilité cellulaire ou préparés pour la microscopie, c'est-à-dire perméabilisés, fixés, coupés, traités contre l'autofluorescence, digérés puis marqués pour la visualisation du cytosquelette. Il est à noter toutefois que les disques comprimés statiquement ont été perméabilisés et fixés sous compression statique afin de maintenir la structure comprimée pour la microscopie confocale.

Pour l'observation de la phosphorylation de la vimentine, des anticorps spécifiques à un site et un état de phosphorylation offerts par le Dr Inagaki ont été utilisés. L'anticorps 4A4 se lierait au site phosphorylé Ser55 de la vimentine, site phosphorylé spécifiquement par la kinase cdc2. De son côté, l'anticorps MO82 se lierait au site phosphorylé Ser82 de la vimentine, site phosphorylé spécifiquement par la kinase CaM II.

6.5 Résultats et conclusions

Des panneaux d'images regroupant des sections optiques prises au microscope confocal sont présentés et commentés à l'annexe II. Les conclusions tirées de l'analyse des observations microscopiques se résument ainsi :

1) À la suite des compressions statiques et dynamiques, les trois réseaux du cytosquelette sont toujours présents.
2) Le marquage d'actine devenant diffus lors de compressions dynamiques à haute vitesse, ces dernières semblent affecter l'organisation du cytosquelette de manière plus visible que les compressions statiques et dynamiques à basse vitesse.
3) La viabilité cellulaire ne semble pas affectée par les compressions dynamiques à haute vitesse.

4) L'anticorps 4A4 offert par le Dr Inagaki semble non spécifique à la vimentine dans le cartilage articulaire bovin, car le marquage obtenu avec l'anticorps 4A4 est pâle, diffus, et donc distinct de l'organisation typique des filaments intermédiaires de vimentine. Comme mentionné à l'annexe II (section A2.2), pour appuyer cette hypothèse seul un témoin interne a été considéré, soit le marquage de vimentine.
5) Il semble que les compressions mécaniques puissent moduler l'équilibre entre la phosphorylation par la kinase CaM II et la déphosphorylation. En effet, le marquage réalisé avec l'anticorps MO82 est perceptible dans les zones superficielle et transitionnelle de l'échantillon référence, dans la zone superficielle de l'échantillon comprimé statiquement, dans la zone transitionnelle de l'échantillon comprimé dynamiquement à basse vitesse mais est absent de l'échantillon comprimé dynamiquement à haute vitesse.

6.6 Discussion

En commençant, mentionnons que les pressions mesurées lors des compressions dynamiques exécutées à basse et à haute vitesse atteignaient jusqu'à 0,2 MPa et 2,9 MPa respectivement (ces données ne sont pas disponibles pour les compressions statiques). Il est raisonnable de penser que ces pressions se situent dans la plage physiologique, puisque Hodge *et al.* (1989) ont mesuré une pression maximale d'environ 20 MPa dans la hanche d'une femme âgée, un an après une chirurgie de remplacement de la tête fémorale.

Dans cette étude, il a été observé que le réseau d'actine est affecté par les compressions dynamiques exécutées à haute vitesse, le marquage initialement ponctuel devenant diffus. Si, comme le suggère Guilak (1995), le cytosquelette d'actine joue un rôle important dans la déformation du noyau en réponse à une compression, son implication pourrait être modulée par l'amplitude de déformation. Une hypothèse possible est que le

démantèlement du réseau d'actine constitue une protection contre les déformations excessives du noyau. Ainsi, en absence d'un réseau intact d'actine, le noyau pourrait quand même être déformé, mais à un niveau moindre. En effet, comme l'a observé Guilak, des changements de hauteur sont détectés même en présence de cytochalasine D, suggérant l'implication de plus d'un mécanisme dans la déformation du noyau. Il s'agit ici d'une simple spéculation puisque, lors de notre expérimentation, la réorganisation de l'actine a été notée pour des taux de déformation plus élevés que ceux utilisés par Guilak. Des essais supplémentaires, similaires à ceux de Guilak, accomplis pour une plus grande plage de déformation seraient nécessaires afin de corréler le degré de participation de l'actine avec l'amplitude de la déformation du noyau.

De leur côté, Durrant *et al.* (1999) ont observé que le marquage d'actine est présent pour des pressions allant jusqu'à 4 MPa. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans notre étude. Cependant, les tissus sont d'origine, d'épaisseur et de configuration différentes, (Durrant *et al.* : rat ~60 μm sans os; présente étude : bœuf ~1200 μm avec os).

À ce sujet, il importe de faire une brève parenthèse pour discuter de la méthodologie utilisée par Durrant *et al.* En résumé, la méthode employée pour caractériser le cytosquelette *in situ* se détaille ainsi :

1) Isolation d'échantillons de cartilage ne comportant pas d'os
2) Congélation sur de la glace sèche
3) Cryosection
4) Blocage - 20 min - sérum de chèvre
5) Marquage

Tout d'abord, insistons sur le fait que les disques de cartilage utilisés par Durrant *et al.* ne comportent pas d'os et sont donc sensibles au gonflement. D'ailleurs, une étude du gonflement en culture a permis aux auteurs de noter que le poids humide des disques de cartilage augmente durant les 15 première minutes de culture et demeure constant au

cours des 48 heures suivantes. Ainsi, la période de 20 minutes allouée au blocage des coupes devrait être suffisante pour permettre ce gonflement indésirable des échantillons pouvant augmenter la perte de molécules matricielles et perturber l'homéostasie.

Il y a également la congélation des échantillons qui constitue un événement pouvant affecter l'organisation du cytosquelette. D'ailleurs, des essais préliminaires réalisés à notre laboratoire sur des cryosections ont démontré une diminution nette du marquage d'actine comparativement aux coupes non congelées. Une hypothèse est que la congélation segmente les filaments d'actine, réduisant ainsi la quantité de phalloïdine associée au filaments d'actine et augmentant le pool soluble d'actine perdu.

Finalement, les auteurs n'utilisent aucun fixatif pour les coupes marquées contre la vimentine et ne sont donc pas assurés de l'absence de changements ultérieurs d'organisation du cytsoquelette. Il est à noter cependant que les échantillons chargés mécaniquement sont fixés sous compression afin de préserver le cytosquelette dans son état comprimé.

Nous constatons donc que la méthodologie utilisée par Durrant *et al.* n'est pas optimale et qu'elle soulève des incertitudes quant à la conformité des observations avec la réelle organisation du cytosquelette *in situ*.

Concernant le réseau de vimentine, il a été noté dans la présente étude que le niveau de phosphorylation du site Ser82 variait avec le niveau et le type de compression, les compressions de faible amplitude supprimant le marquage dans la zone superficielle ou transitionnelle, et les grandes compressions l'éliminant complètement. Une hypothèse découlant de ces observations est que la phosphorylation du site Ser82 assouplirait le cytosquelette de vimentine et faciliterait sa réorganisation, alors que la déphosphorylation du site Ser82 le rigidifierait. Cette proposition est appuyée par l'analyse SDS-PAGE de l'article 1, où l'extraction RIPA a dévoilé des quantités de

vimentine soluble plus grandes dans les zones supérieures. Ainsi, lors d'une sollicitation mécanique, la vimentine soluble intégrerait le cytosquelette et le rigidifierait davantage. Finalement, cette hypothèse pourrait expliquer les observations de Durrant *et al.* voulant que le marquage de vimentine disparaisse lorsque le disque de cartilage gonfle, qu'il soit maintenu lorsque le disque est comprimé d'une charge de 1 MPa et qu'il augmente en intensité lorsque des charges supérieures sont appliquées.

Pour un même niveau de déformation, le type de compression semble influer sur le niveau de phosphorylation du site Ser82. Ainsi, la compression statique diminue la phosphorylation dans la zone transitionnelle alors que compression dynamique (basse vitesse) diminue la phosphorylation dans la zone superficielle. Il est possible que les distributions de pression et de déformation dans le tissu ainsi que leurs variations dans le temps agissent sur le niveau de phosphorylation du site Ser82. Par exemple, dans le cartilage comprimé, la pression (*pore pressure*) est supérieure en surface et se dissipe lors de la relaxation (Li *et al.*, 2000). Ainsi, l'échantillon comprimé dynamiquement est soumis à des pressions intermittentes mais élevées en surface, alors que l'échantillon comprimé statiquement est constamment soumis à une pression initialement élevée mais qui diminue avec le temps. Les chondrocytes de la zone superficielle pourraient donc nécessiter un cytosquelette de vimentine plus résistant à la pression. De plus, la déformation axiale étant plus élevée en surface (Li *et al.*, 2000), le niveau de phosphorylation pourrait diminuer afin de rendre le cytosquelette de vimentine plus robuste à la déformation. En terminant, la diminution de marquage dans la zone transitionnelle du disque comprimé statiquement ne s'explique pas par l'hypothèse proposée, donc d'autres phénomènes pourraient aussi régir le niveau de phosphorylation du site Ser82.

Dans l'article 1, des différences de distribution ont été notées pour la vimentine entre les disques centraux et périphériques de la région *load bearing* (figures 5.1 et 5.2). Il est donc possible que des différences existent également dans les patrons de

phosphorylation des disques centraux et périphériques. Comparons l'emplacement des disques utilisés dans ces deux études. La figure 6.1, qui représente la région *load bearing*, montre l'emplacement des huit disques dits centraux (4) ou périphériques (4) utilisés pour l'étude de la distribution du cytosquelette. De son côté, la figure 6.2 indique l'emplacement des disques prélevés pour l'étude de la phosphorylation. Puisque les échantillons contrôles (R, CS, CDB et CDH) proviennent de la périphérie et que les échantillons expérimentaux (ES, EDB et EDH) proviennent généralement d'une position plus centrale, il se peut que les différences observées dans les patrons de phosphorylation proviennent de la position des disques sur l'épaule plutôt que des chargements imposés. Pour cette raison, et à cause du nombre restreint d'échantillons testés, il importe d'exécuter un plus grand nombre d'études afin de tirer des conclusions définitives, par exemple, réaliser la cartographie de la distribution de la phosphorylation sur la région *load bearing*.

En terminant, il est important de mentionner que les techniques microscopiques actuelles n'offrent pas les procédés adéquats permettant l'observation des changements survenant dans le cytosquelette d'un chondrocyte avant et après l'application d'une compression. Pour visualiser le cytosquelette, on doit le colorer pour le mettre en évidence. Si, pour ce faire, on utilise l'immunomarquage, il est alors essentiel de perméabiliser les membranes cellulaires, ce qui modifie complètement l'homéostasie. L'utilisation de marqueurs diffusant librement à travers les membranes serait donc nécessaire (Guilak, 1995). Cependant, l'association de ces marqueurs avec les filaments risquerait de modifier le comportement de ces derniers tant mécanique que biochimique. Une autre possibilité serait d'injecter dans la cellule de la tubuline à laquelle on aura lié de la rhodamine ou de la fluorescéine, comme dans l'étude de la dynamique des microtubules (Alberts *et al.*, 1994). Puisque les microtubules se régénèrent constamment, la tubuline colorée s'incorpore dans les microtubules. Toutefois, ce type de manipulation s'effectue sur des cellules en culture et non sur des tissus. L'environnement naturel de la cellule étant négligé, le comportement de celle-ci risque grandement de s'en trouver modifié.

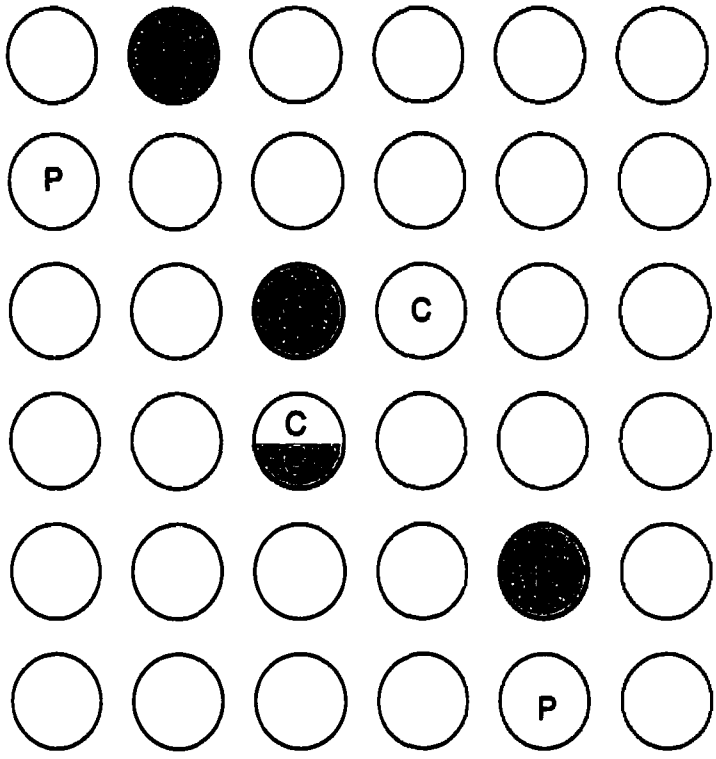

Figure 6.1 : Position sur la surface articulaire des disques utilisés pour la réalisation des images à faible grossissement démontrant la distribution des microfilaments d'actine, des filaments intermédiaire de vimentine et des microtubules. Les disques ont été prélevés de deux articulations différentes (cercles blancs vs cercles gris) près du centre (C) ou en périphérie (P) de la région *load bearing*.

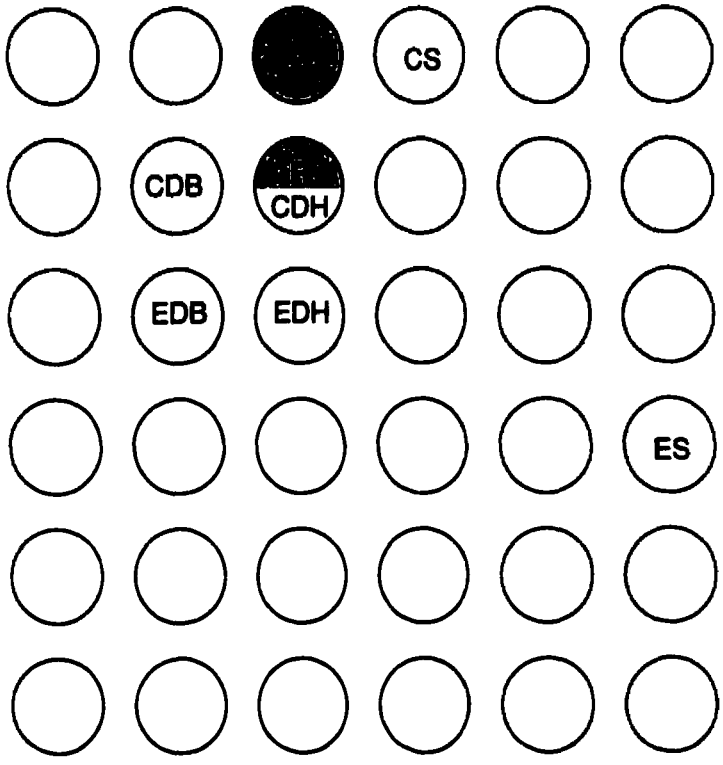

Figure 6.2 : Position sur la surface articulaire des disques utilisés pour l'observation des filaments de vimentine phosphorylés au site Ser82 à la suite des différents protocoles de compression (R : échantillons références; CS , CDB et CDH : contrôles statique, dynamique basse vitesse et dynamique haute vitesse; ES, EDB, EDH : expérimentaux statique, dynamique basse vitesse et dynamique haute vitesse). Les disques ont été prélevés dans la région *load bearing* de deux articulations différentes (cercles blancs vs cercles gris).

6.7 Travaux ultérieurs

Certaines observations réalisées au cours de l'étude du cytosquelette des chondrocytes requièrent d'autres expérimentations. Par exemple, il serait important de vérifier l'hypothèse avancée dans l'article 1 voulant que les différences de distributions

histologique et biochimique d'actine proviennent d'un pool soluble plus grand dans la zone superficielle que dans les zones profondes.

Également, les essais présentés dans ce chapitre devraient être répétés sur un plus grand nombre d'échantillons afin de confirmer les résultats obtenus, mais en tenant compte cette fois du lieu d'extraction de chacun dans l'articulation (région périphérique ou région centrale). Il serait aussi essentiel de connaître les distributions microscopique et biochimique du site phosphorylé Ser82 de la vimentine, comme cela a été fait pour les trois protéines du cytosquelette dans l'article 1. Toujours concernant la phosphorylation de la vimentine, d'autres anticorps comme le GK71, le YT33 et le TM50 devraient être testés, en plus des anticorps 4A4 et MO82 utilisés ici. L'anticorps GK71 reconnaît le site Ser71 de la vimentine (Goto *et al.*, 1998), site normalement phosphorylé par la kinase Rho. L'anticorps YT33 reconnaît le site Ser33 de la vimentine (Ogawara *et al.*, 1995) tandis que l'anticorps TM50 reconnaît le site phosphorylé Ser50 (Takai *et al.*, 1996), sites normalement phosphorylés par la kinase C. Il est à noter que les filaments de vimentine phosphorylés par ces protéines kinases se désassemblent (Goto *et al.*, 1998, Inagaki *et al.*, 1987). La réalisation de doubles marquages contre la vimentine et contre un site phosphorylé de la vimentine pourrait donner des indications quant à la spécificité des anticorps, par exemple l'anticorps 4A4 qui apparaît non spécifique à la vimentine dans l'étude actuelle.

Dans le but de poursuivre l'exploration de la réponse du cytosquelette à l'application de compressions mécaniques, il serait intéressant de comparer les distributions histologique et biochimique des trois types de filaments chez des échantillons comprimés et non comprimés. Une augmentation de l'intensité du marquage ou du contenu de protéines insolubles chez les cellules comprimées pourrait témoigner d'une structure plus dense, dont l'assemblage améliorerait la résistance mécanique des cellules. De façon similaire, les comparaisons des taux de synthèse et de la taille des pools d'actine, de tubuline et de vimentine, solubles et insolubles, pourrait signaler la réorganisation du cytosquelette.

Un autre moyen d'étudier l'adaptation du cytosquelette aux stimuli mécaniques serait d'examiner l'organisation et la distribution du cytosquelette des chondrocytes dans le cartilage articulaire immature. Le cartilage immature n'a été soumis qu'à très peu de déformations et de contraintes mécaniques comparativement au cartilage mature. La comparaison des résultats obtenus pour ces deux types de cartilages articulaires permettrait d'étudier l'évolution du cytosquelette des chondrocytes. Bien entendu, l'application de stimuli mécaniques *in vitro* permet de contrôler et de varier les niveaux, vitesses, fréquences et durées de déformation. Ce qui n'est pas négligeable.

Afin d'étudier le rôle du cytosquelette dans la résistance mécanique cellulaire et d'analyser la dépendance entre les différents types de filaments formant le cytosquelette, des agents spécifiques causant la dépolymérisation des filaments pourraient être utilisés (ex. : la cythocalasine D cause la dépolymérisation des microfilaments; la colchicine cause la dépolymérisation des microtubules; la calyculine A cause la dépolymérisation des filaments intermédiaires). L'organisation du cytosquelette, la morphologie cellulaire et nucléaire ainsi que la viabilité cellulaire seraient sondées après l'application, ou non, de déformations mécaniques sur les explants.

Dans une vue élargie, il serait intéressant de comparer le cytosquelette présent dans des tissus sains et arthritiques. Pour ce faire, on pourrait induire mécaniquement ou chimiquement l'arthrite à des disques de cartilage articulaire mature. Ces résultats permettraient l'étude de l'évolution du cytosquelette pendant le développement « forcé » de l'arthrite.

Parallèlement à ces études biochimiques, il importe de réaliser des études mécaniques pour comprendre la nature de la réponse du cartilage aux compressions mécaniques. La corrélation des phénomènes physiques avec les réponses biologiques est nécessaire à la dissection des processus responsables des changements d'organisation et de

phosphorylation du cytosquelette. Dans ce sens, une première analyse mécanique est présentée dans les prochains chapitres.

CHAPITRE VII

INTRODUCTION – ÉTUDE DU COMPORTEMENT MÉCANIQUE DU CARTILAGE ARTICULAIRE

Le chapitre précédent a exposé les résultats préliminaires concernant l'effet du chargement sur l'organisation du cytosquelette des chondrocytes. Dans le chapitre actuel, c'est le comportement mécanique du cartilage sous chargement qui est étudié.

Une première section introduit les notions de base nécessaires pour l'étude de la mécanique du cartilage articulaire. Suivent la problématique, une revue de littérature et les objectifs de cette analyse. Enfin, une dernière section présente le contenu des chapitres suivants.

7.1 L'évaluation des propriétés mécaniques du cartilage

Les propriétés mécaniques du cartilage articulaire en compression peuvent être évaluées à l'aide des différents types de géométrie et d'essais présentés ci-dessous. Pour cette étude, la géométrie non confinée conjointement avec l'essai de relaxation de contrainte ont été choisis. Une analyse mécanique de la compression du cartilage articulaire selon ces paramètres figure également dans cette section afin de faciliter la compréhension des phénomènes physiques connus dictant la réponse du cartilage sous compression. Une dernière sous-section est consacrée aux paramètres influant sur les propriétés mécaniques du cartilage articulaire mature.

7.1.1 La géométrie des essais de compression

Différents types de géométrie peuvent être utilisés pour l'étude du comportement du cartilage articulaire en compression.

7.1.1.1 L'indentation

Lors de l'essai d'indentation (figure 7.1), un indenteur rigide, plat ou arrondi, imperméable ou poreux, est utilisé pour comprimer une région du cartilage. (La surface comprimée est de beaucoup inférieure à la surface totale de l'échantillon.) Cet essai de compression permet de tester des surfaces articulaires intactes en plusieurs points et, dans ce cas, il simulerait mieux que les autres essais les conditions *in situ* (Suh et Spilker, 1994). Toutefois, les seuls modèles disponibles sont numériques (Athanasiou *et al.*, 1995; Mak *et al.*, 1987; Suh et Spilker, 1994) et comportent certaines instabilités ou singularités. L'analyse et l'interprétation des résultats s'avèrent donc difficiles actuellement.

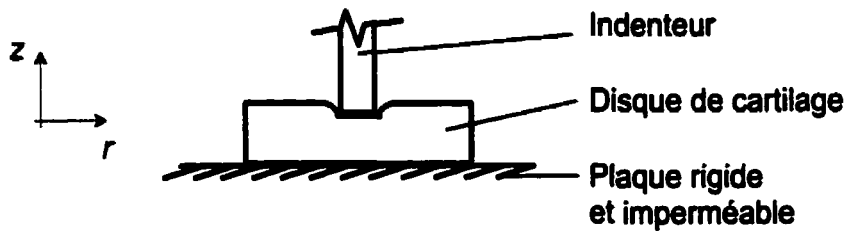

Figure 7.1 : Représentation schématique de la géométrie d'indentation *in vitro*.

7.1.1.2 La géométrie confinée

En compression confinée (figure 7.2), le disque de cartilage est contenu à l'intérieur d'une chambre rigide et imperméable restreignant ses mouvements latéraux et son expansion radiale. Un filtre rigide et poreux est utilisé pour comprimer le disque selon la direction axiale. L'écoulement du fluide interstitiel exclu du cartilage s'effectue à travers ce filtre. Un des avantages de cette géométrie est l'existence d'un modèle unidimensionnel (en z) simple (Mow *et al.*, 1980) permettant d'extraire le module de compression confinée H_a et la perméabilité hydraulique k. Cependant, Buschmann *et al.* (1998) ont démontré que les artefacts reliés aux conditions frontières (pénétration du cartilage dans les pores du filtre et confinement incomplet du disque) pouvaient mener à des estimations erronées de H_a et de k.

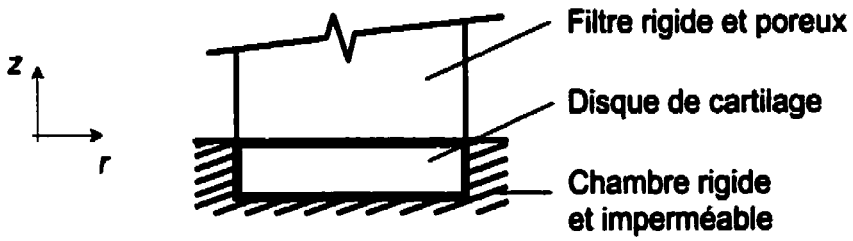

Figure 7.2 : Représentation schématique de la géométrie confinée.

7.1.1.3 La géométrie non confinée

En compression non confinée (figure 7.3), le disque de cartilage est comprimé dans la direction axiale par une tige rigide et imperméable. L'écoulement du fluide s'effectue dans la direction radiale par la périphérie du disque. Ne restreignant pas le disque de cartilage latéralement, cette géométrie permet au réseau de collagène de résister à la tension induite par l'expansion du disque lors de la compression. La compression non

confinée a donc l'avantage de « sonder » le réseau de collagène. Elle présente cependant un léger inconvénient. C'est que les modèles existants (Cohen et al, 1998; Soulhat *et al.*, 1999) sont bidimensionnels (en *z* et *r*), donc plus complexes que le modèle unidimensionnel représentant la compression confinée.

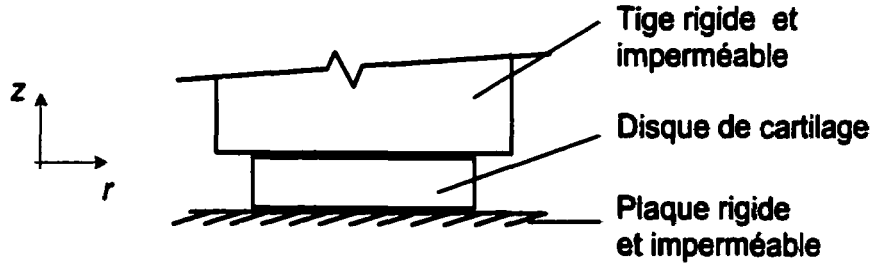

Figure 7.3 : Représentation schématique de la géométrie non confinée.

7.1.2 Les types d'essais de compression

Le cartilage articulaire est un matériau viscoélastique. Lorsqu'un travail est exécuté sur ce matériau, seule une partie de l'énergie peut être récupérée sous forme de travail mécanique accompli par le matériau, l'énergie complémentaire étant dissipée par des processus visqueux sous forme de chaleur. Trois expériences sont typiquement effectuées pour caractériser la viscoélasticité : l'essai de fluage, l'essai de relaxation de contrainte et la déformation sinusoïdale. (Buschmann, 1996a)

7.1.2.1 L'essai de fluage

Lors d'un essai de fluage (figure 7.4), le disque de cartilage est comprimé par l'application d'une charge contrôlée. La réponse temporelle en déplacement démontre une déformation initiale au moment de l'application de la charge, suivie d'une déformation lente en fluage tendant vers l'équilibre. Cet essai permet d'obtenir la

compliance de fluage : $J(t)=\varepsilon(t)/\sigma$ où $\varepsilon(t)$ représente la déformation au temps t et σ, la contrainte appliquée. (Buschmann, 1996a)

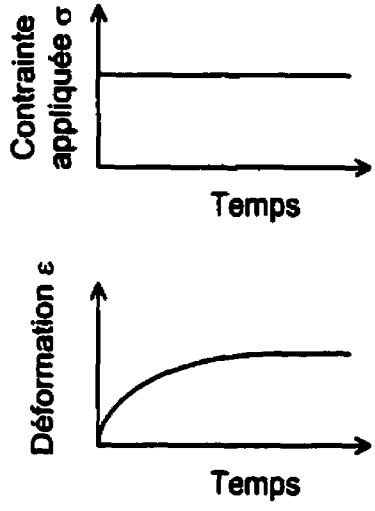

Figure 7.4 : Représentation schématique de l'essai de fluage où une contrainte mécanique contrôlée est appliquée et la déformation, enregistrée.

7.1.2.1 L'essai de relaxation de contrainte

Lors d'un essai de relaxation de contrainte (figure 7.5), un déplacement contrôlé sous forme de rampe comprime le disque de cartilage (car il est difficile d'appliquer un déplacement instantané). La contrainte enregistrée est maximale au moment où la déformation désirée est atteinte. Il y a par la suite relaxation de la contrainte, c'est-à-dire diminution de la contrainte enregistrée jusqu'à l'équilibre. Cet essai permet d'obtenir le module de relaxation : $G(t)=\sigma(t)/\varepsilon$ où $\sigma(t)$ représente la contrainte au temps t et ε, la déformation appliquée (Buschmann, 1996a)

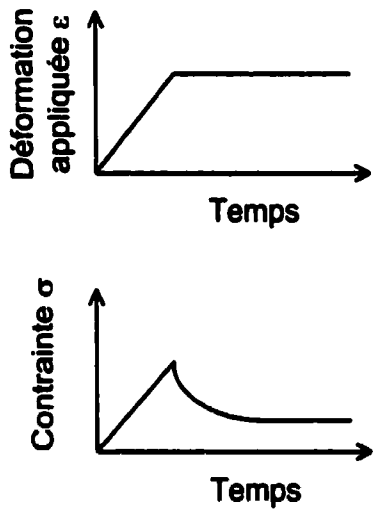

Figure 7.5 : Représentation schématique de l'essai de relaxation de contrainte où une déformation contrôlée est appliquée et la contrainte mécanique, enregistrée.

7.1.2.3 La déformation sinusoïdale

Cet essai consiste à appliquer une déformation sinusoïdale d'une amplitude ε_0 à une fréquence $f=\omega/2\pi$, puis à mesurer l'amplitude et la phase de la contrainte. Il permet d'obtenir la rigidité dynamique suivante : $G(j\omega)$ d'amplitude $|G(j\omega)|=\sigma_0/\varepsilon_0$ et de phase $\varphi=\Delta t \cdot f \cdot 360$ où ε_0 représente l'amplitude de la déformation appliquée, σ_0 représente l'amplitude de la contrainte et Δt, le temps de décalage entre le déformation et la contrainte. (Buschmann, 1996a)

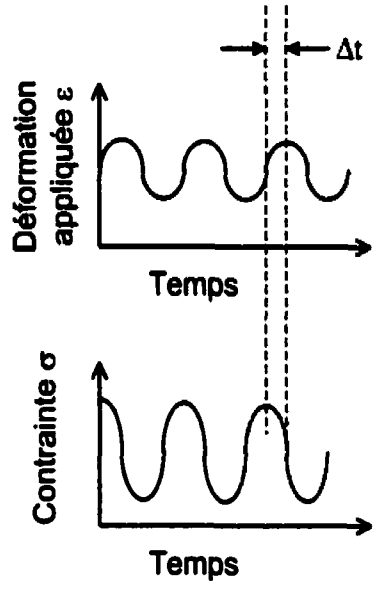

Figure 7.6 : Représentation schématique d'un essai dynamique où une déformation sinusoïdale est appliquée et la contrainte mécanique, enregistrée.

7.1.3 L'analyse de la compression non confinée du cartilage articulaire

Des modèles analytiques ont été développés permettant de comprendre le comportement mécanique du cartilage articulaire. La formulation biphasique modélise le cartilage comme un milieu continu composé de deux phases : 1) une phase solide; et 2) une phase fluide homogène incompressible. Armstrong *et al.* (1984) ont appliqué cette formulation au cartilage articulaire en compression non confinée et ont analysé sa réponse mécanique. Les observations se rapportant aux essais de relaxation de contrainte sont résumés dans les paragraphes suivants.

Il importe tout d'abord de préciser que l'analyse a été faite pour un disque circulaire mince comprimé entre deux plaques parfaitement lisses et imperméables. Dans ces conditions, la compression appliquée selon l'axe du disque cause une expansion radiale non contrainte. De plus, l'exsudation et/ou l'imbibition du fluide peut se produire à

travers la surface périphérique du disque. Finalement, selon les auteurs, puisque le contact avec les plaques est supposé être sans friction, le problème devient axisymétrique, indépendant de z et unidimensionnel en r.

L'effet du coefficient de Poisson de la matrice extracellulaire sur la contrainte a été analysé. C'est à un faible coefficient de Poisson (ν=0) que la matrice se comprime le plus et que la plus grande quantité de liquide doit être exclue afin que le spécimen retrouve son diamètre d'équilibre. C'est donc dans cette situation que les contraintes pointes (*peak transient stress*) maximales se produisent. La situation opposée est celle où le coefficient de Poisson est élevé (ν=0,5) et où la matrice ne change pas de volume, ne produisant donc aucun mouvement relatif du fluide. La contrainte mesurée est donc celle requise pour comprimer la matrice solide seulement et il n'y a pas de contrainte pointe ni de relaxation de contrainte.

L'effet du taux de déformation sur la contrainte a aussi été examiné. Si le taux de déformation est très bas comparativement au temps caractéristique pour l'écoulement de fluide dans le cartilage, alors la pression hydraulique ne participe pas de façon appréciable au support de la charge. Par contre, si le taux de déformation est élevé comparativement au temps caractéristique pour l'écoulement de fluide dans le cartilage, alors le spécimen se comporte comme un matériau incompressible.

D'après ces analyses, Armstrong *et al.* décomposent la réponse du cartilage en trois phases :

À $t=0^+$) Une réponse instantanée caractérisée par un changement de forme du matériau sans changement de volume qui s'explique par le fait que le fluide ne peut être expulsé instantanément du matériau.

À $t\rightarrow\infty$) Une réponse à l'équilibre où toute la charge est portée par la matrice extracellulaire puisque la pression hydraulique est nulle partout dans le tissu.

$0^+ < t < \infty$) Une réponse transitoire contrôlée par l'écoulement de fluide à travers la matrice solide où la relaxation de contrainte se produit et où le tissu reprend sa forme.

Le modèle biphasique isotrope ne décrit toutefois pas parfaitement la réalité expérimentale. Il prédit que le ratio $\sigma(t)/\sigma_{\acute{e}}$ est limité à 1,5 alors que Fortin *et al.* (2000) ont observé expérimentalement que ce ratio pouvait atteindre des valeurs autour de 15. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les propriétés du cartilage articulaire sont différentes en tension et en compression, ces deux états étant simultanément présents lors de la compression non confinée. Le tissu est soumis à la compression dans la direction z tandis que l'expansion latérale crée des tensions dans le plan $r\theta$. Cohen *et al.* (1998) ont donc inclus une description isotrope transverse de la matrice dans le modèle biphasique isotrope et suggèrent le modèle biphasique transverse isotrope. De leur côté, Soulhat *et al.* (1999) présentent un modèle composite basé sur la description physiologique du cartilage articulaire. Il est essentiellement fondé sur le modèle biphasique isotrope, auquel un réseau fibrillaire résistant en tension a été ajouté. Les solutions proposées décrivent adéquatement le comportement du cartilage articulaire en compression non confinée.

Soulhat *et al.* (1999) retiennent toutefois une limitation de ces deux modèles, soit qu'ils ne peuvent prédire des ratios $\sigma(t)/\sigma_{\acute{e}}$ élevés pour des coefficients de Poisson près de 0,185 tels que mesurés par Jurvelin *et al.* (1997). Cependant, cette limitation est levée par l'ajout d'un renforcement non linéaire du réseau de collagène en tension au modèle composite (Li *et al.*, 1999).

Ces analyses permettent donc de mieux comprendre le rôle de chaque constituant dans la réponse mécanique du cartilage articulaire. En résumé, les grandes contraintes pointes seraient générées par le changement de forme contré en compression (axe z) par le gel de protéoglycannes et en tension (plan $r\theta$) par le réseau de collagène se rigidifiant pour des

déformations croissantes. À l'équilibre, ce serait principalement le gel de protéoglycannes qui supporterait la contrainte. Finalement, la relaxation de contrainte serait l'effet de l'écoulement du fluide à travers la matrice solide.

7.1.4 Les propriétés mécaniques du cartilage articulaire

Comme mentionné à la section 1.1.2, la structure et la composition du cartilage articulaire varient de la surface articulaire jusqu'à l'os. Le comportement mécanique du cartilage articulaire découlant de cette organisation complexe varie aussi selon la position dans le cartilage (Guilak *et al.*, 1995; Jurvelin *et al.*, 1997; Kempson *et al.*, 1973; Kolmonen *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2000; Roth and Mow, 1980; Schinagl *et al.*, 1996; Woo, 1976).

Certains liens ont aussi été établis entre les propriétés mécaniques et la composition du cartilage, telles des dépendances entre la rigidité en tension et la concentration en collagène (Kempson *et al.*, 1973) ainsi qu'entre la rigidité en tension et le ratio collagène/protéoglycannes (Akizuki *et al.*, 1987). Il a aussi été démontré que, plus la concentration en eau est élevée, plus la rigidité en compression à l'équilibre est faible et plus la perméabilité est grande (Armstrong et Mow, 1982). D'autres essais ont dévoilé une corrélation positive entre le contenu en glycosaminoglycannes (chondroïtine sulfate et keratane sulfate) et la rigidité calculée 2 secondes après l'application de la charge (Kempson *et al.*, 1970). Finalement, Eisenberg et Grodzinsky (1985) ont remarqué une corrélation entre la concentration de composants ioniques associés aux protéoglycannes et la rigidité en compression à l'équilibre.

De plus, des études réalisées en tension sur des échantillons provenant des différentes zones du cartilage articulaire ont permis de démontrer que la rigidité en tension et la résistance du cartilage sont supérieures lorsque le chargement est appliqué parallèlement

plutôt que perpendiculairement aux fibres de collagène de la zone superficielle (Kempson *et al.*, 1973; Roth and Mow, 1980; Woo, 1976).

Finalement, les propriétés mécaniques du cartilage articulaire varient aussi selon l'espèce. Le cartilage humain est aussi rigide (Athanasiou *et al.*, 1991 : essais de fluage en indentation) et même plus rigide que le cartilage bovin (Athanasiou *et al.*, 1995 : essais de fluage en indentation; Kwan *et al.*, 1990: essais de fluage en compression confinée). De plus, sa perméabilité et son coefficient de Poisson sont plus faibles que ceux du cartilage bovin (Athanasiou *et al.*, 1991, 1995).

Plusieurs paramètres influent donc sur le comportement mécanique du cartilage articulaire. Afin de situer quantitativement la présente étude, nous introduisons des articles récents (Fortin *et al.*, 2000; Légaré *et al.*, 2000) traitant aussi d'essais de relaxation de contrainte réalisés sur des disques de cartilage articulaire bovin adulte (sans et avec os respectivement) selon la géométrie non confinée. Dans ces études, une série de petits pas égaux est appliquée aux disques de cartilage (20 X 5 μm à 1 μm/s; 5 X 20 μm à 2 μm/s respectivement). Des modules de relaxation plutôt constants sont mesurés autour de 0,54 et 0,77 MPa respectivement. Selon Fortin *et al.*, le rapport des modules transitoires et à l'équilibre pourrait atteindre 15 :1.

7.2 Problématique

Le chapitre précédent présente les résultats d'études préliminaires relativement à l'effet des compressions mécaniques sur le cytosquelette des chondrocytes *in situ*. Afin d'identifier les mécanismes impliqués dans les changements d'organisation et de phosphorylation du cytosquelette, il importe de corréler les paramètres physiques résolus dans l'espace (déformation de la matrice, écoulement de fluide interstitiel) avec les réponses biologiques observées, et donc de comprendre la nature de la réponse

mécanique du cartilage (Buschmann *et al.*, 1998). Une première étape est donc de caractériser le comportement mécanique du cartilage articulaire par des essais de compression *in vitro* où les conditions de chargement (type de géométrie et d'essai, niveau de déformation, vitesse de compression) se rapprochent de celles utilisées pour l'étude biologique.

Trois protocoles de compression non confinée ont servi dans l'étude du cytosquelette (sections 6.4 et A2.1 : A) Compressions statiques (100 μm à 1 μm/s); B) Compressions dynamiques à basse vitesse (100 μm à 5 μm/s); et C) Compressions dynamiques à haute vitesse (250 μm à 100 μm/s). Ces compressions représentent ~8 et 21 % de déformation pour des disques de cartilage de ~1,2 mm d'épaisseur et sont considérées comme des déformations finies. La majorité des études utilisent une séquence de petits pas (0,5 à 3 % de déformation) pour atteindre finalement des niveaux de déformation entre 5 et 70 % (section 7.3.1). Une seule étude, celle de Ateshian *et al.* (1997), a examiné la réponse du cartilage à une séquence de pas de 10 % de déformation menant à une compression finale de 50 %. Toutefois, c'est la compression confinée qui était utilisée.

L'étude actuelle caractérise la réponse du cartilage articulaire en compression non confinée lors d'essais de relaxation de contrainte avec déformations finies variant de ~1 à 25 % et des vitesses de compression variant de ~0,04 à 4 %/s. L'analyse est basée principalement sur l'étendue de la linéarité des réponses transitoires et à l'équilibre, données essentielles à la classification des mécanismes physiques à l'origine de la résistance du tissu à la déformation (Buschmann et al, 1998).

L'application répétée de grandes déformations soulève cependant des interrogations quant au maintien de l'intégrité tissulaire après chaque compression. La littérature contient beaucoup d'information sur la rupture du réseau de collagène à la suite d'impacts (compression à haute vitesse de déformation), mais peu sur les microdommages de la matrice extracellulaire causés par des compressions plus

modérées (section 7.3.2). Des essais biochimiques ont permis à Sah *et al.* (1991) ainsi qu'à Adams *et al.* (1997) de démontrer que les compressions cycliques pouvaient favoriser la perte de macromolécules de la matrice extracellulaire vers le milieu de culture. De leur côté, McCormack et Mansour (1998) ont mesuré une diminution de la résistance en tension à la suite de l'application de compressions cycliques, suggérant le bris de liens interfibrillaires du réseau de collagène. Le protocole utilisé dans la présente étude permet de déterminer mécaniquement, en cours d'expérimentation et sans détérioration du tissu (c'est-à-dire de façon non destructive), le niveau de déformation critique où la dégradation des propriétés mécaniques du matériau débute. En résumé, la méthode expérimentale consiste à soumettre un disque de cartilage à différents niveaux de déformation d'amplitude croissante, pour ensuite évaluer la réponse dynamique du tissu sous des conditions standards. Lorsque des diminutions significatives sont observées dans les fonctions de relaxation, on peut conclure qu'il y a eu endommagement du tissu.

7.3 Revue de littérature

Cette section présente la revue de la littérature touchant à l'étude du comportement mécanique du cartilage articulaire. Elle se divise en deux sous-sections : l'une concerne l'examen de la linéarité, l'autre, la dégradation mécanique du cartilage.

7.3.1 Comportement linéaire et non linéaire du cartilage articulaire *in vitro*

Quelques articles traitant du comportement mécanique du cartilage articulaire en compression exposent des résultats relatifs à la linéarité ou la non-linéarité de la réponse mécanique. Tous les articles recensés sont inclus dans cette section, car la comparaison

des résultats obtenus selon différents types de géométrie et d'essais pourrait dévoiler des pistes quant à l'origine des non-linéarités.

Hayes and Mockros (1971) ont soumis des disques de cartilage articulaire humain (avec os) à des essais de fluage en compression confinée ainsi qu'en torsion. Ils ont examiné la linéarité de la déformation à l'équilibre en appliquant aux disques de cartilage des séquences de 4 à 7 charges ou couples croissants, laissant toujours le temps aux échantillons d'atteindre l'équilibre entre les pas. Les contraintes maximales étudiées en compression et en cisaillement étaient de 0,5 MPa. Ils ont observé une relation linéaire entre la réponse à l'équilibre et le chargement ou couple appliqué.

Eisenfeld *et al.* (1978) ont utilisé la compression confinée sur des disques de cartilage articulaire (avec os). Ils ont réalisé une séquence d'essais de relaxation de contrainte où une série de pas successifs comprimait les échantillons jusqu'à ~20, 35, 52 et 70 % de déformation à une vitesse de 15 %/s. La contrainte à l'équilibre était reliée de façon linéaire à la déformation à l'équilibre pour des compressions allant jusqu'à ~ 52 %.

Mow et Lai (1979) ont examiné la réponse mécanique du cartilage articulaire à des essais de fluage en compression confinée. Ils ont noté que la relation « contrainte à l'équilibre vs déformation à l'équilibre » était linéaire jusqu'à 20 % de déformation, se rigidifiant par la suite.

Lee *et al.* (1981) ont étudié le comportement dynamique du cartilage articulaire bovin en soumettant des disques de cartilage (sans os) à des déplacements oscillatoires en compression confinée. À partir d'une déformation initiale (offset) située entre 5 et 30 %, ils ont appliqué des déformations sinusoïdales variant entre 0,5 et 2,5 % à des fréquences variant entre 0,001 et 20 Hz. Pour un offset de 5 % et une déformation sinusoïdale de 0,5 %, les auteurs ont noté que l'amplitude de la rigidité dynamique

augmentait avec la fréquence. Il ont aussi observé qu'elle augmentait avec l'amplitude du offset pour une fréquence et un déplacement sinusoïdal donnés.

Kwan *et al.* (1990) ont réalisé des essais de fluage sur des disques de cartilage articulaire (avec os) humains et bovins en compression confinée. Une séquence de chargements de 37, 87, 137, 237, 387, 587, 995, 1903 g (~ 0,01 à 0,59 MPa) était appliquée où, entre chaque chargement, un temps d'attente était alloué au spécimen pour atteindre l'équilibre. À l'équilibre, les courbes contrainte-déformation ont démontré un renforcement dramatique des matériaux pour des contraintes supérieures à 0,2 MPa ou des déformations dépassant ~20 %.

Ateshian *et al.* (1997) ont étudié la relaxation de contrainte du cartilage articulaire bovin en compression confinée. Ils ont appliqué une séquence de 5 pas consécutifs à des disques de cartilage (sans os). Chaque pas comprimait le disque de 10 % à une vitesse de 0,25 μm/s. Le temps de relaxation entre les pas était de 1400 s. Les courbes contraintes-déformation ont démontré des réponses transitoires et à l'équilibre linéaires jusqu'à 20-30 % de déformation mais non linéaires par la suite, où elles se rigidifiaient.

Khalsa et Eisenberg (1997) ont soumis des disques de cartilage articulaire bovin (sans os) à une séquence de compression de géométrie confinée. Les disques étaient soumis à 7 pas de 3 % de déformation, comprimant les disques de 5 à 26 %, et ce, à une vitesse de 10 %/s. Chaque pas était suivi d'une période de relaxation permettant l'atteinte d'un nouvel équilibre. La force axiale ainsi que les forces radiales ont été mesurées. Les courbes contrainte-déformation tirées de cette étude ont présenté un comportement linéaire à l'équilibre.

Buschmann *et al.* (1998) ont utilisé la compression confinée pour étudier la linéarité de la réponse du cartilage articulaire. Pour ce faire, ils ont soumis des disques de cartilage articulaire bovin (sans os) à une série de pas de 5 μm d'amplitude (~0,5 % de

déformation), appliqués à une vitesse de 1 μm/s, et ce, jusqu'à ce que la déformation totale soit de 15 %. Entre les pas, un temps d'attente était accordé pour la relaxation des échantillons. Ils ont observé une charge transitoire augmentant avec le niveau de déformation et donc une réponse transitoire non linéaire, mais une réponse linéaire à l'équilibre. À partir de cet offset de 15 %, ils ont appliqué des compressions dynamiques sinusoïdales pour des fréquences variant entre 0,001 et 1,0 Hz et des amplitudes de 5, 10 ou 15 μm (~0,5; 1,0; 1,5 % de déformation). Ces essais ont démontré une rigidité dynamique décroissant de façon non linéaire avec une augmentation de l'amplitude de la déformation. Finalement, à partir du même offset de 15 %, Buschmann *et al.* ont appliqué des déplacements en compression et en relâchement de 5, 10 ou 15 μm, tous d'une durée de 5 s. En compression, les trois courbes de relaxation normalisées se juxtaposaient parfaitement, indiquant une réponse linéaire du matériau tant dans la phase transitoire qu'à l'équilibre. En relâche, cependant, les courbes normalisées décroissaient alors que l'amplitude du relâchement augmentait, indiquant une réponse non linéaire du matériau.

Bursac *et al.* (1999) ont comparé le comportement de disques de cartilage articulaire bovin en compression confinée et non confinée. Cinq pas de 3 % de déformation étaient appliqués à une vitesse de 0,115 μm/s, chacun suivi d'un temps de relaxation de contrainte. Chaque disque était d'abord soumis à la compression confinée, où les forces axiale et radiale étaient mesurées, puis à la compression non confinée, où la force axiale était mesurée. Le module radial λ (compression confinée) à l'équilibre ne démontrait aucune dépendance vis-à-vis du niveau de déformation. Son comportement était linéaire. Toutefois, les modules axiaux H_A (compression confinée) et E_z (compression non confinée) à l'équilibre diminuaient pour une déformation croissante, indiquant un affaiblissement et démontrant un comportement non linéaire du matériau. Puisque leur observation de l'affaiblissement du cartilage en compression se distinguait de la littérature, Bursac *et al.* ont approfondi leur étude. Ils ont vérifié le comportement de leurs échantillons en compression confinée entre 0 et 40 % de déformation. Ils ont

observé un affaiblissement du cartilage, suivi d'un renforcement pour les grandes déformations.

Fortin *et al.* (2000) ont réalisé une étude similaire à celle de Buschmann *et al.* (1998), où toutefois, la compression était de géométrie non confinée et où la série de pas initiaux comprimait le disque jusqu'à 10 % de déformation au lieu de 15 %. Les résultats obtenus sont similaires à ceux de Buschmann *et al.* La série de petits pas identiques a démontré un comportement linéaire à l'équilibre, mais non linéaire dans la phase transitoire, où il y avait renforcement du matériau pour un niveau croissant de déformation. L'application de compressions sinusoïdales a démontré un affaiblissement du matériau pour des amplitudes croissantes de déformation. Finalement, les compressions appliquées à partir de l'offset de 10 % ont démontré un comportement linéaire tant dans la phase transitoire qu'à l'équilibre, tandis que les relâchements ont démontré un comportement non linéaire où l'amplitude des courbes normalisées diminuait avec un accroissement du relâchement.

D'autres résultats, similaires à ceux de Buschmann *et al.* (1998) et Fortin *et al.* (2000), ont été observés. La série de petits pas identiques (20 μm à 2 μm/s) a démontré un comportement linéaire à l'équilibre (Légaré *et al.*, soumis), tandis que les déplacement sinusoïdaux (2, 4 et 8 μm à 1, 0,1 et 0,01 Hz) appliqués à partir de l'offset de 10 % se comportaient de façon non linéaire, le matériau s'affaiblissant pour des amplitudes croissantes de déformation (Garon *et al.*, soumis; Légaré *et al.*, soumis).

7.3.2 Dégradation mécanique du cartilage articulaire *in vitro*

Plusieurs études portent sur la dégradation mécanique du cartilage articulaire quant à la « rupture » de la matrice extracellulaire. En général, elles utilisent l'application d'impacts (compression à haute vitesse de déformation) sur des explants pour déterminer

la contrainte, vitesse de déformation ou nombre de cycles requis pour qu'il y ait rupture du cartilage. Certaines autres études, moins nombreuses, se concentrent plutôt sur les microdommages de la matrice extracellulaire. Toutes serviront à situer notre étude relativement à la vitesse de déformation et au niveau de compression requis pour qu'il y ait endommagement microscopique ou macroscopique du tissu, ainsi qu'à comprendre les mécanismes à l'origine de la dégradation relativement à la diminution des propriétés mécaniques.

Repo et Finlay (1977) ont soumis des explants de cartilage articulaire humain (avec os) à des impacts par indentation dont la déformation variait entre 10 et 50 %, et ce, pour deux vitesses de déformation, soit 50000 et 100000 %/s. Ils ont observé la présence de dommages structuraux pour des contraintes supérieures à 25 MPa, ce qui correspond à un niveau de déformation autour de 25 %. Cet endommagement de la matrice extracellulaire a été détecté par une discontinuité soudaine sur la courbe contrainte-déformation et a été confirmé par une étude morphologique.

Broom (1986) a étudié, aux microscopes optique et électronique, les changements structuraux survenant dans la matrice extracellulaire d'explants de cartilage articulaire bovin (avec os) soumis à des séquences de 10 à 300 impacts d'énergie variant entre 2 et 12 J. Un peu moins de la moitié des explants testés ont présenté des signes de rupture. Ces explants ont montré un affaiblissement mécanique comparativement au explants de contrôle. Des images optiques à faible grossissement ont permis d'observer que les portions du cartilage les plus affectées étaient dépourvues de zone superficielle. À plus fort grossissement en DIC, il était possible d'observer une texture fibreuse ondulée suivant une direction préférentielle qui n'était normalement pas visible dans les explants de contrôle. Finalement, la microscopie électronique a permis de vérifier que c'étaient les fibres de collagène qui prenaient cet arrangement ondulé à l'intérieur du cartilage traumatisé.

Jeffrey *et al.* (1995) ont examiné les dommages causés par un seul impact à des disques de cartilage articulaire bovin (principalement sans os) provenant de jeunes animaux. Les impacts étaient appliqués par la chute d'une masse (100, 500 ou 1000g) sur les explants à partir d'une hauteur variable (2, 5, 10, 20 ou 50 cm) produisant ainsi différentes énergies et vitesses d'impact. Ils ont observé que les endommagements du cartilage augmentaient avec la hauteur et la masse de l'impacteur. Les échantillons de cartilage comptant de l'os étaient moins fissurés. Lorsque la hauteur ou la masse de l'impacteur était augmentée afin de reproduire des endommagements similaires à ceux observés chez les échantillons sans os, c'est l'os plutôt que le cartilage qui s'endommageait. L'énergie d'impact requise pour fissurer le cartilage devait alors être multipliée par 10. Les auteurs ont aussi noté qu'un simple impact pouvait avoir un effet considérable sur le contenu en eau. Par exemple, immédiatement après un impact de 500 g d'une hauteur de 20 cm, le contenu en eau était réduit à 60 % de son contenu initial, tandis qu'il était augmenté à 160 % de son contenu initial après deux jours de culture suivant l'impact.

Farquhar *et al.* (1996) ont étudié le gonflement du cartilage à la suite d'impacts. Pour ce faire, ils ont comprimé de façon cyclique des explants de cartilage articulaire canin (sans os). L'indentateur appliquait une pression d'une durée de 1 seconde, toutes les 5 secondes, sur une période de 30 minutes. Différents niveaux de contraintes maximales ont été testés (0, 0.5, 2, 5, 10, 20 ou 50 MPa) à une vitesse de déformation constante de 100 MPa/s. À la suite de l'application de charge de 0-10 MPa, aucun endommagement n'était visible au microscope optique (X20). Des dommages étaient toutefois perceptibles à l'œil nu à la suite des impacts de 20 ou 50 MPa. Comparativement aux échantillons de contrôle, le contenu en eau des échantillons comprimés de 5 à 20 MPa avait augmenté de 2 à 4 % 10 jours après le chargement, alors qu'il était demeuré inchangé 4 ou 24 heures après impact. Il est intéressant de noter que, seulement 4 heures après l'impact, le gonflement en solution saline 0,01 M des échantillons comprimés avait augmenté considérablement comparativement aux échantillons de contrôle, suggérant une altération de la matrice extracellulaire pour les chargements

excédant 5 MPa. Cette pression osmotique était cependant moins importante 10 jours après le chargement, ce qui est interprété par les auteurs comme une diminution du contenu en protéoglycannes lors de la culture.

Borelli *et al.* (1997) ont appliqué, par indentation, des impacts uniques à des explants composés de cartilage et d'os prélevés de vertèbres cervicales bovines (140 MPa à 35 MPa/s). Les courbes charge-déplacement présentaient deux maximums autour de 50 et 75 MPa. Le premier maximum coïnciderait avec la fracture du cartilage, tandis que le second coïnciderait avec la fracture de l'os sous-jacent. Ces endommagements ont été confirmés par radiographie, histologie et microscopie électronique. Finalement, la zone comprimée contiendrait plus d'eau que la zone non comprimée, ce qui concorderait avec le bris du réseau de collagène sous l'indentateur.

Kerin *et al.* (1998) ont cherché à déterminer la contrainte ultime du cartilage articulaire bovin en compression. Ils ont réalisé une séquence d'indentations où la durée d'un cycle chargement-déchargement était constante à 1 seconde, et où la déformation était croissante (non spécifiée). Sur les courbes force-déplacement, trois critères suggéraient l'endommagement du spécimen : 1) une diminution marquée de la force maximale; 2) une grande augmentation dans l'hystérésis du cycle de fracture comparativement au cycle précédent attribuable à l'énergie absorbée par le mécanisme de fracture; et 3) un déplacement résiduel dans la section « chargement » du cycle suivant la fracture. Pour une vitesse moyenne de 0.7/s, la fracture du cartilage s'effectuerait à une contrainte moyenne de 35.7 MPa (variation de 14 à 59 MPa pour 20 spécimens). L'endommagement du cartilage à la surface a été vérifié à l'aide d'encre, tandis que l'endommagement des zones plus profondes a été confirmé par histologie.

Quinn *et al.* (1998) ont comprimé de façon non confinée des disques de cartilage articulaire (sans os) provenant de jeunes veaux. Six cycles chargement/déchargement de 50 % de déformation ont été appliqués à une vitesse d'environ 0,07 mm/s sur une

période de 12 heures. Cette étude ne cherchait pas à identifier un seuil critique où l'endommagement du cartilage se produit, mais tentait plutôt de vérifier qu'il y avait altération de la matrice pour les paramètres de compression choisis. Des analyses histologiques ont démontré la présence fréquente de grandes fissures dans les explants comprimés. De plus, leur masse humide était de 50 % plus élevée que celle des explants de contrôle. Des investigations précédentes avaient permis d'observer que la rigidité des explants endommagés diminuait de 25 % en compression confinée et de 75 % en compression non confinée, situation où le réseau de collagène influe sur la rigidité mécanique en restreignant l'expansion latérale du gel de protéoglycannes. Ensemble, ces résultats suggèrent une détérioration de la matrice extracellulaire et principalement du réseau de collagène.

Chen *et al.* (1999) ont cherché à déterminer, en matière de contrainte, vitesse de déformation et nombre de cycles, les seuils critiques à partir desquels il y a endommagement du cartilage. Pour ce faire, ils ont soumis des explants de cartilage articulaire canin (sans os) à des cycles de chargement-déchargement par indentation. Plusieurs paramètres étaient variés : nombre de cycles (entre 0 et 1440 cycles équivalents à 0 et 120 minutes), contrainte maximale (entre 0 et 40 MPa) et vitesse de compression (impact et 25 % de la vitesse maximale d'impact). Pour provoquer une augmentation marquée du contenu en eau après 20 minutes de compression, les contraintes minimales requises étaient de 2,5 MPa pour l'impact et de 10 MPa pour la compression à vitesse modérée. La valeur minimale requise du taux de compression maximal, calculée à partir des résultats précédents, était de 30 MPa/s, tant pour l'impact que pour la compression à vitesse modérée. Finalement, le temps minimal de compression requis était de 2 minutes pour un impact de 5 MPa. L'observation d'une augmentation du niveau de collagène dégradé chez des échantillons comprimés pendant 2, 20 et 120 minutes à une contrainte maximale de 5MPa appuie l'idée d'endommagement du réseau de collagène. Le collagène dénaturé a été détecté dans les

explants endommagés principalement dans les zones superficielle et profonde du cartilage.

Torzilli *et al.* (1999) ont appliqué, par indentation, des impacts uniques à des explants de vertèbres cervicales bovines (contrainte maximale variant entre 0,5 et 65 MPa à 35 MPa/s). Une augmentation du contenu en eau était perceptible à partir de 10 MPa et augmentait par la suite de façon proportionnelle à la contrainte maximale. Toutefois, la discontinuité observée dans la courbe contrainte/déformation autour de 21,8 MPa semblait l'indicateur le plus révélateur de l'existence d'un seuil critique pour l'endommagement du réseau de collagène.

Kurz *et al.* (2000) ont examiné l'importance du taux de déformation lors d'un endommagement mécanique. Ils ont comprimé des disques de cartilage articulaire bovin (sans os) en géométrie non confinée à un niveau de 50 % de déformation en utilisant différents taux de compression (1, 10 et 100 %/s). Les auteurs ont mesuré la masse humide, l'incorporation de sulfate-S^{35} et de proline-H^3 (à la suite ou non d'une stimulation mécanique) ainsi que les propriétés mécaniques des échantillons 0,25 et 3 jours après l'endommagement. Ils ont observé, 6 heures après l'endommagement, une augmentation de la masse humide dépendante du taux de déformation. Cette augmentation n'était cependant plus apparente 3 jours après l'endommagement. Ils ont également noté une diminution des propriété mécaniques pour les taux de déformation de 10 et 100%/s. Aussi, une diminution de l'activité biosynthétique des échantillons stimulés et non stimulés mécaniquement a été observée pour ces mêmes taux.

Quinn *et al.* (2000) ont étudié l'effet du taux de compression (0,03 à 70 %/s) et des contraintes pointes (3,5 à 14 MPa) sur le niveau et le caractère des endommagements causés à la matrice extracellulaire et aux cellules. Pour ce faire, ils ont soumis des disques de cartilage articulaire bovin (avec os) à une compression unique en géométrie non confinée. Ils ont ensuite examinés leur viabilité, leur microstructure ainsi que leur

niveau d'incorporation de sulfate-S^{35}. Les auteurs ont noté que les compressions appliquées à un taux de déformation de 0,03 %/s ne semblaient pas causer d'endommagement matricielle, mais résultaient en une désactivation cellulaire ainsi qu'en une diminution de la synthèse de protéoglycannes. Au contraire, les compressions appliquées à des taux de déformation situés entre 30 et 70 %/s causaient des endommagements matricielles incluant la rupture de la surface articulaire et une augmentation de la perte de protéoglycannes, en plus d'une désactivation cellulaire. Dans ces deux cas, la sévérité des effets augmentaient avec la grandeur de la contrainte pointe.

L'étude de McCormack et Mansour (1998) se démarque des précédentes, car elle examine les « microdommages » du réseau de collagène par fatigue plutôt que sa rupture complète par impact. Ils ont soumis des explants de cartilage articulaires bovins (avec os) à 64 800 ou 97 200 cycles de compression. Une force approximative de 65 N était appliquée par indentation en 0,125 s, créant des contraintes initiales autour de 3,2 MPa et des contraintes finales autour de 0,5 MPa. L'examen de la surface des explants comprimés n'a dévoilé aucun signe d'endommagement. Toutefois, la résistance en tension des explants (dont l'os a été préalablement enlevé), comprimés pendant 97 200 cycles, a diminué de façon significative. Selon les auteurs, cette réduction de la résistance en tension serait attribuable au bris de connexions interfibrillaires, étant donné que : 1) ce sont principalement les fibres de collagène présentes à la surface articulaire qui ont résisté à la tension, et que 2) la surface articulaire est demeurée intacte après la fatigue de l'explant.

D'autres études se concentrent plutôt sur l'effet des compressions mécaniques sur la perte des protéoglycannes et autres protéines du cartilage articulaire. Par exemple, Sah *et al.* (1991) ont examiné la perte de macromolécules marquées au S^{35} et H^3 pour des disques de cartilage articulaire bovin (sans os) de 1,25 mm d'épaisseur. Ils ont soumis ces explants à différents niveaux de compression (1,25; 1,00; 0,75 et 0,50 mm) selon un

des protocoles de compression non confinée suivants : compression statique de 2 heures, compression statique de 12 heures, ou compression dynamique de 24 heures (compression de 2 heures suivie d'un relâchement de 2 heures et ainsi de suite). Ils ont observé que les compressions dynamiques augmentaient la perte de macromolécules et que la magnitude de cette perte était dépendante du degré de compression. Cette redistribution des molécules de la matrice extracellulaire serait entraînée par l'écoulement de fluide imposé par la compression mécanique. Ils ont également observé une diminution de la perte de macromolécules durant une compression statique prolongée, ce qui suggère une diminution de la vitesse de diffusion des molécules causée, en partie par les barrières physiques limitant la diffusion par la circonférence des disques de cartilage, et en partie par l'entassement de la matrice (Jones *et al.*, 1982). Finalement, Sah *et al.* suggèrent que la compression à 0,50 mm soit suffisante pour rompre le réseau de collagène, hypothèse appuyée par le patron de perte de macromolécules ainsi que par l'augmentation du contenu en eau et du rapport [H^3]hydroxyproline/[H^3]proline.

Adams *et al.* (1997) ont utilisé l'essai DMB pour étudier la perte de glycasaminoglycannes (GAG) pour des explants de cartilage (avec os). Au départ, les explants baignaient dans du PBS pour une période de 2 heures. Ils ont ensuite été comprimés cycliquement par indentation (amplitude maximale de 2 MPa; fréquence de 0,25 Hz) sur une période de 2 heures, à la suite de laquelle ils étaient endommagés mécaniquement. Les compressions se poursuivaient pour une période supplémentaire de 2 heures. Des échantillons de PBS étaient prélevés régulièrement pour l'analyse DMB. Adams *et al.* ont démontré que, chez les explants intacts, les compressions cycliques augmentaient la perte de GAG, mais qu'il y avait stabilisation après environ 1 heure. Chez les explants endommagés, la perte de GAG était importante et augmentait de façon linéaire jusqu'à 6 heures après l'endommagement. Selon les auteurs, la création de nouvelles surfaces durant les compressions cycliques suivant l'endommagement

expliquerait l'augmentation linéaire de la perte en GAG, ce qui a d'ailleurs été confirmé par une coloration à l'encre.

7.4 Objectifs

La linéarité de la réponse du cartilage articulaire pour des essais de relaxation de contrainte en compression non confinée n'a été étudiée que partiellement, c'est-à-dire pour de faibles niveaux de déformation. Vu l'hétérogénéité du matériau, il est difficile d'extrapoler et de prédire où se situent les limites de la linéarité et de la non-linéarité. Des essais réalisés à des niveaux de déformation plus élevés et à des vitesses différentes sont donc essentiels, d'où le premier objectif de cette étude :

- Examiner l'étendue de la linéarité de la réponse mécanique du cartilage articulaire à un essai de relaxation de contrainte impliquant de grandes déformations exécuté en compression non confinée.

Le protocole conçu pour évaluer l'étendue de la linéarité requiert l'application d'une série de compressions d'amplitude croissante allant jusqu'à ~ 26,5 % de déformation. Pour ces niveaux de déformation, des endommagements peuvent être causés à la matrice extracellulaire qui affecteront la mesure de linéarité, d'où le second objectif :

- Examiner les altérations dans le comportement du cartilage articulaire causées par le chargement mécanique en compression non confinée.

7.5 Présentation des chapitres suivants

La section de cette thèse portant sur le comportement mécanique du cartilage contient quatre chapitres. Le chapitre actuel a introduit les notions entourant les propriétés mécaniques du cartilage articulaire, a présenté la problématique et les objectifs du projet,

et a revu les articles d'intérêt sur le sujet. Le chapitre VIII résume et traite des résultats expérimentaux obtenus lors de cette étude. Le chapitre IX expose les considérations techniques et expérimentales complémentaires à l'information contenue dans l'article ou nécessaires à sa compréhension. Finalement, le chapitre X présentera l'article rédigé dans le cadre de cette étude.

CHAPITRE VIII

SYNTHÈSE – ÉTUDE DU COMPORTEMENT MÉCANIQUE DU CARTILAGE ARTICULAIRE EN COMPRESSION NON CONFINÉE

Le cartilage articulaire en compression non confinée peut être modélisé à partir de la théorie biphasique (Mow *et al.*, 1980). En appliquant cette théorie, Armstrong *et al.* (1984) ont souligné l'importance de la matrice solide dans le support de la contrainte à l'équilibre ainsi que le rôle de l'écoulement latéral du fluide dans la relaxation de contrainte. Ce modèle ne décrivant pas adéquatement la réponse transitoire caractérisée par un rapport $\sigma(t)/\sigma_{\acute{e}}$ élevé (Brown et Singerman, 1986; Fortin *et al.*, 2000), d'autres modèles basés sur des lois constitutives différentes ont été proposés par Cohen *et al.* (1998) de même que par Soulhat *et al.* (1999). Récemment, l'ajout d'un renforcement non linéaire du réseau de collagène en tension (Li *et al.*, 1999) a aussi permis de prédire des comportements non linéaires mesurés expérimentalement lors de compressions de faible amplitude (Fortin *et al.*, 2000).

Les études portant sur la linéarité ou non-linéarité de la réponse mécanique du cartilage articulaire en compression sont peu nombreuses. De nouvelles recherches sont essentielles afin de caractériser ces comportements lors de déformations finies, les analyses précédentes ayant majoritairement employé des séquences de pas infinitésimaux menant à des niveaux de déformation variant entre 5 et 70 %. L'hypothèse à la base de ce projet propose que la réponse du cartilage à un déplacement imposé peut être linéaire ou non linéaire selon la déformation appliquée et le taux de déformation utilisé. Les observations découlant de l'étude de cette hypothèse pourraient nous aider à déterminer les mécanismes physiques à l'origine de la résistance du tissu à la déformation.

8.1 Le comportement non linéaire du cartilage articulaire

Le premier objectif de ce projet était d'examiner les réponses transitoires et à l'équilibre du cartilage articulaire soumis à des essais de relaxation de contraintes, de déformations finies, appliqués en compression non confinée. Pour ce faire, un protocole a été conçu afin de soumettre des disques de cartilage à une séquence d'essais de relaxation de contrainte d'amplitude croissante (~1,1 à 26,5 %) à différentes vitesses de compression. Les expérimentations démontrent que la réponse transitoire est non linéaire, s'affaiblissant initialement puis se rigidifiant significativement lorsque l'amplitude de la déformation augmente. L'affaiblissement initial pourrait s'expliquer par une relaxation de contrainte associée à un écoulement de fluide ou par une restructuration de la matrice extracellulaire. De son côté, le renforcement de la réponse transitoire pourrait être attribuable soit à une consolidation de la matrice extracellulaire accompagnée d'une diminution de la perméabilité causés par le compactage des protéoglycannes, soit à un renforcement non linéaire du réseau de collagène en tension causé par l'expansion latérale de l'échantillon, ou soit à l'hétérogénéité du tissu en fonction de la profondeur.

Les résultats ont aussi démontré que la réponse transitoire est sensible au taux de déformation, son renforcement étant plus important à une vitesse élevée de compression. Il a été suggéré qu'un temps de compression moindre à haut taux de déformation limite l'exsudation du fluide, cause une expansion latérale et augmente ainsi la rigidité des fibrilles de collagène. De façon similaire, un temps de compression réduit limiterait le glissement structural entre les phases de collagènes et de protéoglycannes et réduirait donc la diminution de la contrainte.

Les expérimentations ont dévoilé un comportement complexe de la réponse à l'équilibre qui peut être linéaire ou non selon le taux de déformation utilisé. À basse vitesse (0,5 μm/sec), les modules à l'équilibre augmentent avec l'amplitude de la déformation tandis qu'ils sont constants aux vitesses moyenne (5 μm/sec) et élevée (50 μm/sec). La

dégradation de la matrice extracellulaire, plus importante à haute vitesse de compression, pourrait expliquer cette dépendance de la réponse à l'équilibre envers la vitesse de compression.

À ce point, il importe de noter que les modules transitoires et à l'équilibre ont été calculés selon la convention utilisée en ingénierie, c'est-à-dire en normalisant la force par la surface initiale de l'échantillon, et le déplacement par son épaisseur initial. En recalculant les modules à l'aide de la contrainte réelle et de la déformation logarithmique, nous avons noté une sous-estimation de l'ordre de 3 % qui n'affecte pas significativement les relations entre les groupes (basse, moyenne et haute vitesses). Cette convention a été choisie pour sa simplicité, mais aussi afin de pouvoir comparer les données expérimentales de ce projet avec celles collectées précédemment.

Après comparaison des résultats obtenus à partir de disques frais et congelés, il a été noté que ces derniers présentaient des réponses mécaniques plus faibles que celles des échantillons frais. Une hypothèse a été proposée à ce sujet voulant que certains liens du réseau de collagène soient brisés par la formation de cristaux lors de la congélation.

8.2 La dégradation des propriétés mécaniques du cartilage articulaire comprimé

Le second objectif de ce projet consistait à évaluer les altérations dans le comportement du cartilage articulaire causées par le chargement mécanique étant donné que les grandes déformations utilisées dans l'étude de la linéarité comportaient le risque d'endommager la matrice extracellulaire et d'affecter la mesure de linéarité. Il semble que des compressions de seulement 25-50 μm affaiblissent la matrice extracellulaire, et que cet affaiblissement soit plus important à haute (50 μm/s) qu'à basse (0,5 & 5 μm/s) vitesse de compression.

CHAPITRE IX

CONSIDÉRATIONS TECHNIQUES ET EXPÉRIMENTALES - ÉTUDE DU COMPORTEMENT MÉCANIQUE DU CARTILAGE ARTICULAIRE

Ce chapitre présente les techniques utilisées dans l'étude du comportement mécanique du cartilage. On y traite, dans un premier temps, de l'isolation et de la conservation des explants et, dans un deuxième temps, des compressions mécaniques. Finalement, une dernière section commente en détail l'analyse des résultats.

9.1 Isolation et conservation des explants

Cette section présente la méthodologie utilisée pour l'isolation et la conservation des explants. On trouve les détails importants de ce protocole dans les sous-sections suivantes, à l'exclusion de l'isolation, dont on a déjà parlé dans la section 4.1. En résumé, des cylindres composés de cartilage et d'os sont extraits de têtes humérales bovines à l'aide d'une mèche à biopsie sous irrigation continue. La longueur des cylindres est ensuite réduite à environ 1,5 mm de façon à obtenir des disques de cartilage rattachés à une mince couche d'os. Ces disques sont finalement poinçonnés afin de réduire leur diamètre à 3 mm. À la suite de l'isolation, les disques sont lavés cinq fois en présence d'inhibiteurs de protéases et sont ensuite congelés ou conservés à 4 °C à l'intérieur de chambres humidifiées jusqu'au moment des compressions (maximum 36 heures).

9.1.1 Les lavages

Les lavages s'effectuent avec une solution HBSS additionnée d'inhibiteurs de protéases

(tableau 9.1). Le but des lavages est d'éliminer les particules adhérant aux disques et de ralentir la dégradation par les protéases.

Tableau 9.1 : Spécificité des inhibiteurs utilisés lors des lavages et des compressions

Inhibiteur	Spécificité de l'inhibiteur
EDTA	Agent chélateur qui se lie fortement aux ions Ca^{++} et Mg^{++} inactivant ainsi les protéinases dont l'activité dépend de ces métaux.
Iodoacetamide	Inhibe les peptidases thiol comme la pyroglutamate aminopeptidase.
Pepstatin A	Inhibe des aspartyl-protéases, par exemple : pepsine, renine, cathepsin D et chymosin. Inhibe également plusieurs protéases d'acide microbien.
PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride)	Inhibe de façon irréversible plusieurs protéases à sérine, par exemple : trypsine et chymotrypsine. Inhibe aussi certaines protéases à cystéine de façon réversible comme la papaine.

9.1.2 La conservation à 4 °C

Les résultats présentés dans l'article 2 proviennent principalement d'essais réalisés sur des échantillons conservés à 4 °C car, à basse température, le métabolisme ralentit et, par conséquent, la dégradation des tissus aussi. Les échantillons frais sont simplement déposés (os vers le bas) sur un papier « kimwipes » imbibé de solution HBSS additionnée d'inhibiteurs de protéases à l'intérieur d'un cryotube fermé hermétiquement.

Ils sont gardés ainsi pour une période maximale de 36 heures avant d'être testés. Ce délai maximal fut établi lors des essais mécaniques où les échantillons conservés au-delà de ces 36 heures se comportaient différemment des autres échantillons, montrant des signes de dégradation. Notamment, on observe une plus grande variabilité des réponses mécaniques aux *compressions témoins* (voir section 9.2.2.2) chez les échantillons conservée au-delà de 36 heures.

Il a été prouvé que les disques de cartilage cultivés perdent des protéoglycannes de façon significative pendant les quatre premiers jours de culture. (Dumont *et al.*, 1999). Cette diminution du contenu en protéoglycannes pourrait modifier le comportement mécanique des disques de cartilage. Même si les propriétés mécaniques évaluées à de faibles niveaux de déformation (10 %) varient très peu entre les jours 2 et 25 de culture (Dumont *et al.*, 1999), c'est par précaution que la conservation des explants à l'intérieur de chambres humides a été préférée à la conservation en solution.

9.1.3 La congélation

Certains échantillons ont été congelés à –20 °C à l'intérieur de cryotubes contenant un peu de solution HBSS additionnée d'inhibiteurs de protéases. L'avantage de la congélation est l'arrêt de l'activité métabolique et la stabilisation des structures. Cependant, la croissance des cristaux de glace occasionne le bris des membranes cellulaires, ce qui libère ainsi les protéases dans la matrice extracellulaire lors de la décongélation. De plus, il peut arriver qu'il résulte de certains bris du réseau de collagène des changements au niveau des propriétés mécaniques du disque de cartilage. Il est à noter que la solution de HBSS a pour but de prévenir le dessèchement du cartilage et n'est pas, en tant que telle, responsable de la croissance des cristaux qui se produit même en absence de solution à cause de la grande concentration en eau dans le cartilage articulaire.

C'est parce qu'elle est un moyen de conservation pratique que la congélation a été utilisée, avec retenue toutefois.

9.2 Les compressions mécaniques

Les compressions mécaniques sont réalisées à l'aide du MACH1™ de BioSynTech Ltée, présenté à l'annexe III. L'échantillon déposé au centre d'une chambre de compression baigne dans une solution HBSS additionnée d'inhibiteurs de protéases à température ambiante. L'assèchement est prévenu par l'ajout d'un couvercle et d'eau en périphérie de la chambre de compression. Un chargement initial est appliqué, suivi du protocole de compression. Ces dernières étapes sont détaillées dans les paragraphes suivants.

9.2.1 Le chargement initial

En tout premier lieu, avant d'exécuter le protocole de compression, un chargement initial d'environ 6 g à l'équilibre est appliqué au disque de cartilage afin d'assurer un contact parfait entre la tige de compression et la surface articulaire, qui ne sont pas toujours exactement parallèles. Ce point de contact est défini comme la position de départ des compressions (déformation zéro). Il est cependant important de comprendre que l'épaisseur du cartilage affecte cette position de départ à cause de l'hétérogénéité du tissu selon la profondeur. Les trois zones du cartilage sont de rigidités différentes, la zone superficielle étant la moins rigide. Ainsi, un disque mince nécessite une compression plus faible afin d'atteindre la charge de 6 g qu'un disque épais, sa zone superficielle étant plus mince et donc comprimée plus rapidement.

9.2.2 Le protocole de compression

Un protocole de compression a été élaboré afin de sonder la linéarité et la dégradation mécanique du cartilage articulaire en compression non confinée (figure 10.1). Pour des fins de simplification, la description du protocole est divisée en trois parties : l'examen de la linéarité, l'évaluation du seuil de dégradation et l'attente entre les compressions.

9.2.2.1 L'examen de la linéarité

Le protocole de compression doit d'abord répondre au premier objectif du projet, c'est-à-dire examiner l'étendue de la linéarité de la réponse mécanique à un essai de relaxation de contrainte impliquant de grandes déformations. Il comporte donc une série de *compressions tests* (compression en rampe/relaxation de 10 minutes/relâchement en rampe) de différentes amplitudes (12,5; 25; 50; 100; 150; 200; 250; 300 µm). Ces *compressions tests* sont exécutées à une des trois vitesses de compression sélectionnées (0,5; 5; 50 µm/s), permettant ainsi l'étude de l'influence de la vitesse sur la linéarité.

9.2.2.2 L'évaluation du seuil de dégradation

Afin de répondre au second objectif, c'est-à-dire examiner les altérations dans le comportement du cartilage causées par le chargement mécanique, des *compressions témoins* (compression en rampe/relaxation de 10 minutes/relâchement en rampe) d'amplitude de 12,5 µm appliquées à une vitesse de 5 µm/s sont insérées entre les *compressions tests*. Lorsque des diminutions significatives sont observées dans les fonctions de relaxation de ces *compressions témoins*, on peut conclure qu'il y a eu endommagement du tissu. Il est ainsi possible d'évaluer, en cours d'expérimentation et

sans détérioration du tissu, le niveau de déformation critique où la dégradation des propriétés mécaniques du matériau débute.

9.2.2.3 L'attente entre les compressions

Un temps d'attente entre chaque compression doit être alloué au cartilage pour qu'il puisse reprendre sa forme et atteindre l'équilibre, d'où l'introduction d'un troisième type de compression nommé *compression contact* (compression en rampe/relâchement en rampe). Ces *compressions contacts* ont une amplitude de 10 µm et sont appliquées à une vitesse de 5 µm/sec. Une série de 10 *compressions contacts* est d'abord effectuée au début du protocole afin d'évaluer le seuil de contact défini comme les 2/3 de la force pointe moyenne enregistrée. Pendant l'exécution du protocole, des *compressions contacts* sont appliquées de façon continue après chaque *compression test* ou *témoin*. Il a été proposé que le contact et la fin de la relaxation soient atteints lorsque la force maximale enregistrée dépasse deux fois consécutives le seuil de contact prédéfini. Après l'atteinte du seuil de contact, un temps d'attente supplémentaire de 15 minutes est respecté. Le temps maximal de relaxation est de 60 minutes. Tel que mentionné dans l'article (section 10.5), des essais réalisés avec des temps d'attente fixes de 4 heures et 45 minutes, n'ont pas altéré la réponse globale du cartilage, suggérant que le temps maximal proposé est suffisent.

Le seuil de contact a été établi à 66 % et non à 100 % de la force maximale, car un disque dégradé pourrait ne jamais atteindre un seuil trop élevé, même après une relaxation complète, sa rigidité étant diminuée. Pour les disques intacts, le quart d'heure supplémentaire d'attente permet la relaxation complète. Il permet aussi à tous les disques de relaxer les *compressions contacts*.

9.3 L'analyse des résultats

Les paragraphes qui suivent expliquent comment les résultats ont été analysés pour déterminer l'étendue de la linéarité et détecter le seuil de dégradation.

9.3.1 L'analyse de la linéarité

L'analyse de la linéarité est basée sur les graphes présentant les modules de relaxation normalisés en fonction du déplacement appliqué. Pour un taux de déformation choisi, des modules constants indiqueraient un comportement linéaire. Tout autre résultat dénoterait un comportement non linéaire, par exemple, une courbe croissante signalerait un renforcement tandis qu'une courbe décroissante indiquerait un affaiblissement du cartilage.

Les paragraphes suivants décrivent les techniques utilisées dans l'obtention des modules normalisés.

9.3.1.1 Le calcul des modules

Le module de relaxation est décrit par l'équation $G(t)=\sigma(t)/\varepsilon$, où la contrainte apparente est calculée en divisant la force par l'aire originale du disque et où la déformation apparente est obtenue en divisant l'amplitude du déplacement par l'épaisseur originale du disque (paragraphe 9.3.2). Il est calculé en deux points : G_0 est le module pointe (calculé à partir de la force maximale) et $G_\acute{e}$ est le module à l'équilibre (calculé à partir de la force à l'équilibre).

Cette convention est celle utilisée en ingénierie, et est préférée ici pour sa simplicité et pour des fins de comparaison avec la littérature. Les modules G_0 et $G_{\acute{e}}$ ont cependant été recalculés à l'aide des contraintes et déformations réelles afin de visualiser l'impact du choix de convention sur nos conclusions. La contrainte réelle est donc calculée en divisant la force par l'aire étendue du disque comprimé, aire calculée à partir des observations de Jurvelin *et al.* (1997). Selon ces auteurs, les déformations latérales du cartilage non calcifié mesurées 3 s après l'application de la charge ainsi qu'à l'équilibre correspondent respectivement à 38 et 18.5 % de sa déformation axiale.

La déformation réelle, elle, est calculée suivant la définition de Ludwick (en 1909), selon laquelle la déformation réelle correspond à une sommation de petites déformations qui se succèdent (Gosselin, 1997). En faisant tendre le pas de déformation vers zéro, on obtient :

$$\bar{\varepsilon} = \ln(l/l_o)$$

Finalement, en exprimant la déformation réelle en fonction de la déformation apparente, on obtient :

$$\bar{\varepsilon} = \ln(1+\varepsilon).$$

9.3.1.2 La mesure de l'épaisseur du cartilage

L'épaisseur des disques de cartilage est mesurée par microscopie après l'application du protocole de compression. Des coupes rectangulaires comprenant les quatre zones du cartilage articulaire sont obtenues à l'aide d'un Tissue Chopper (voir paragraphe 4.3.2). Déposées sur une lame possédant une règle de 2 mm, elles sont photographiées à faible grossissement au microscope optique (figure 10.2). Il est ensuite possible de mesurer l'épaisseur du cartilage non calcifié dans le programme de traitement d'images Northern

Eclipse (Empix Imaging). La moyenne de trois mesures perpendiculaires à la surface osseuse est calculée de manière à couvrir la plus grande surface possible.

9.3.1.3 La normalisation des modules

La rigidité du cartilage articulaire varie d'une épaule à l'autre mais varie aussi selon la position de l'échantillon sur une même épaule. Afin de rendre l'analyse insensible à ces variations, les modules G_0 et $G_{\acute{e}}$ sont normalisés par rapport au module $G_{\acute{e}}$ de la première *compression test* (12,5 μm), et ce, pour chaque disque.

9.3.2 La détection de la dégradation

La détection de la dégradation est basée sur la comparaison des courbes de relaxation des *compressions témoins*. Pour un échantillon intact ayant complété sa relaxation, toutes les courbes devraient se superposer. Par contre, puisque les échantillons dégradés sont affaiblis, les courbes devraient « descendre », c'est-à-dire que les forces mesurées devraient diminuer après chaque *compression test* causant des endommagements supplémentaires.

9.3.3 Les analyses statistiques

Les modules présentés dans l'article 2 sous forme de graphiques statistiques avec barres d'erreurs (figures 10.4, 10.5 & 10.7) ont été analysés à l'aide d'un modèle d'analyse de variance (ANOVA) avec mesures répétées. Dans ce modèle, les variables dépendantes étaient les modules transitoires et les modules à l'équilibre, tandis que le facteur était l'amplitude des compressions appliquées sur un disque de cartilage. Ces analyses

statistiques ont été réalisées par le Service de consultation statistique de l'Université Laval à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA). C'est la procédure *mixed* de SAS qui a été utilisée avec une structure de variance-covariance SP(POW). Cette structure suppose que la corrélation entre les modules mesurés à différentes amplitudes de *compression test* dépend de la différence d'amplitude entre deux *compressions tests* successives. Lors de l'analyse des modules obtenus des *compressions témoins* et donc mesurés à une amplitude constante (12,5 μm), la corrélation était encore une fois basée sur la différence d'amplitude entre deux *compressions tests* successives. Ces dernières étant insérées entre les *compressions témoins*, elles auraient pu avoir influencé leur réponse mécanique. Lorsque nécessaire, des transformations par logarithme ou racine carrée ont été appliquées aux mesures afin d'améliorer leur homogénéité ou leur normalité. Les résultats démontrant une valeur-p ≤ 0.05 étaient considérés statistiquement significatifs, c'est-à-dire que pour ces résultats, l'hypothèse proposant l'existence d'une différence était acceptée.

Les analyses ANOVA ont été réalisées afin de comparer les modules de *compressions tests* ou *témoins* adjacentes mesurés à un taux de déformation spécifique, mais aussi pour comparer les comportements transitoires et à l'équilibre entre les différents groupes. Les disques frais et congelés extraits de la même surface articulaire et comprimés à la même vitesse ont été comparés. Cependant, les trois groupes (basse, moyenne et haute vitesse) de spécimens frais non pas tous étés comparés entre eux puisqu'ils provenaient de trois animaux différents. Seuls les groupes d'échantillons comprimés à basse et à haute vitesse ont été comparés parce qu'ils étaient d'épaisseurs similaires (basse vitesse : 0.92 – 0.96 et haute vitesse : 0.69 – 1.07 mm) et parce que des analyses ANOVA ont démontré que leurs réponses mécaniques à la première rampe témoin n'étaient pas significativement différentes ($p=0.6087$ pour le module transitoire et $p=0.2209$ pour le module à l'équilibre).

CHAPITRE X

ARTICLE 2 – LE COMPORTEMENT NON LINÉAIRE ET LES ALTÉRATIONS DES PROPRIÉTÉS INTRINSÈQUES DU CARTILAGE ARTICULAIRE EN COMPRESSION NON CONFINÉE

Ce chapitre présente le second article rédigé dans le cadre de cette thèse.

10.1 Présentation de l'article

L'article présenté dans ce chapitre (Langelier et Buschmann) caractérise le comportement mécanique du cartilage articulaire par des essais de compression *in vitro* reproduisant les conditions de chargement (type de géométrie et d'essai, niveau de déformation, vitesse de compression) utilisées dans l'étude biologique, le but ultime du projet (excédant le cadre de cette thèse) étant d'identifier les mécanismes impliqués dans les changements d'organisation et de phosphorylation du cytosquelette. Dans un contexte plus général, l'intention du projet est de recueillir les données nécessaires pour déterminer et comprendre les mécanismes physiques à l'origine de la résistance du tissu à la déformation. En résumé, la méthode consiste à soumettre des disques de cartilage à une séquence d'essais de relaxation de contrainte d'amplitude croissante (~1,1 à 26,5 %). L'analyse des résultats est basée sur l'étendue de la linéarité des réponses transitoires et à l'équilibre. Cette étude complète les travaux de Bursac *et al.* (1999), Fortin *et al.* (2000) et Légaré *et al.* (soumis) parce qu'elle utilise des déformations finies de grande amplitude, mais aussi parce qu'elle examine la dépendance de la linéarité envers la vitesse de déformation.

Comme les niveaux de déformation exploités dans cette analyse risquaient d'endommager la matrice extracellulaire et ainsi d'affecter la mesure de linéarité, le

protocole de compression a été conçu afin d'examiner les altérations dans le comportement du cartilage articulaire causées par le chargement mécanique. Il a permis de déterminer mécaniquement, en cours d'expérimentation et sans détérioration du tissu, le niveau de déformation critique où la dégradation des propriétés mécaniques du matériau débutait.

Strain-Amplitude and Strain-Rate Dependent Nonlinear Behavior and Intrinsic Property Alterations of Articular Cartilage in Unconfined Compression.

E. Langelier*, M.D. Buschmann°*

*Institute of Biomedical Engineering, °Department of Chemical Engineering,

Ecole Polytechnique, Montreal, Quebec, Canada.

Soumis pour publication dans : *Journal of Biomechanical Engineering.*

Key Words : cartilage, biomechanics, nonlinear behavior, viscoelasticity, poroelasticity, biphasic model, unconfined-compression, cartilage degradation.

Address correspondence and reprint requests to :
Dr. M.D. Buschmann, Dept. Chemical Eng. & Inst. Biomedical Eng,
Ecole Polytechnique of Montreal, PO Box 6079 Station Centre-Ville,
Montreal, Quebec, Canada, H3C 3A7
Fax: 514 340 4611, Tel: 514 340 4711 ext. 4931
E-mail: mike@grbb.polymtl.ca

10.2 Abstract

Nonlinear behavior and load-induced material property alterations of full-thickness cartilage attached to bone was investigated in unconfined compression. A sequence of test compressions (ramp compression/relaxation/ramp release) of finite deformation ~1.1 to 26.5 % was performed at one of three strain rates ~0.044 to 4.4 %/s. Peak and equilibrium loads were analyzed to determine strain-amplitude and strain-rate dependence of linear versus nonlinear responses. The test protocol was designed to reveal changes in intrinsic material properties due to the finite deformations by interspersing small-amplitude witness ramps ~1.1 % deformation and ~0.44 %/s strain rate between the test ramps. Significant changes in the load response to witness ramps indicated alteration of intrinsic properties of tested specimens at a certain point in the testing protocol. We found that peak loads displayed high nonlinearity, stiffening with both increasing compression amplitude and increasing strain rate. The witness ramps suggested that weakening of intrinsic material behavior occurred when compression amplitude reached ~2.2-4.4 % and beyond, and that weakening was much more significant at higher strain rate. These findings aid our understanding of cartilage biomechanics, its linear versus nonlinear behavior, and indicates the types of loads which can cause material alterations.

10.3 Introduction

The ex vivo test of uniaxial unconfined compression has been the subject of several model studies of cartilage mechanics. The biphasic theory was applied to articular cartilage in unconfined compression (Armstrong *et al.*, 1984; Mow *et al.*, 1980) and highlighted deformation of solid matrix as principally supporting the equilibrium stress while lateral fluid flow through the solid matrix contributed to stress relaxation behavior. However, the model had difficulty in explaining the short term response characterized

by high peak to equilibrium stress ratio; the model allowed for a maximum peak to equilibrium stress ratio of 1.5 whereas values up to ~15 were experimentally determined (Brown et Singerman, 1986; Fortin *et al.*, 2000). Models allowing for the prediction of high peak to equilibrium load ratios by considering alternative constitutive laws for the solid matrix were proposed later (Cohen *et al.*, 1998; Soulhat *et al.*, 1999). Recently, small amplitude experimentally measured nonlinear behavior (Fortin *et al.*, 2000) was also successfully predicted by the addition of a nonlinear stiffening of the collagen network under tension (Li *et al.*, 1999).

Recent experimental studies have provided information on nonlinear versus linear behavior of articular cartilage in unconfined and in confined compression. Application of small identical ramp compressions (up to ~15 % total axial strain) to immature articular cartilage disks in unconfined compression showed weakening of the equilibrium response for small strains followed by a stiffening for larger strains up to ~40 % (Bursac *et al.*, 1999). In contrast, application of a similar protocol (up to ~10 % axial strain) to adult articular cartilage showed stiffening in the transient phase and linearity at equilibrium (Fortin *et al.*, 2000; Légaré *et al.*, soumis). Furthermore, ramp compressions (resulting in ~0.5 %, 1.0 % and 1.5 % strains) applied from the 10 % offset exhibited linearity in both the transient phase and at equilibrium, while the stress responses to release ramps and superimposed sinusoidal displacements from the 10 % offset were nonlinear (Fortin *et al.*, 2000). Similar results to the latter study were obtained previously in confined compression (Buschmann *et al.*, 1998). Other studies using confined compression have also shown linear equilibrium behavior up to ~20 % (Ateshian *et al.*, 1997; Mow et Lai, 1979), ~25 % (Khalsa et Eisenberg, 1997) or to ~50 % strain (Eisenfeld *et al.*, 1978), whereas stiffening of the equilibrium response has also been observed past ~20 % strain (Ateshian *et al.*, 1997; Mow et Lai, 1979).

An important point to be considered is the maintenance of tissue integrity during sequences of high strain compressions, since the alteration of intrinsic properties by

mechanical load is thought to be a principal factor in the development of cartilage diseases such as Osteoarthritis. Also, intrinsic property alteration due to load history might indeed influence measured linearity or nonlinearity of cartilage behavior. Existing literature contains information mainly on collagen network failure following impact loading (high strain-rate compression) (Borelli *et al.*, 1997; Broom, 1986; Chen *et al.*, 1999; Farquhar *et al.*, 1996; Jeffrey *et al.*, 1995; Kerin *et al.*, 1998; Quinn *et al.*, 1998; Repo et Finlay, 1977; Torzilli *et al.*, 1999) but few data exist concerning microdamage or molecular damage of the extracellular matrix caused by moderate strain-rate compressions on cartilage. Examples of the latter demonstrated that cyclical compressions could favor loss of macromolecules from the extracellular matrix into the surrounding culture medium (Adams *et al.*, 1997; Sah *et al.*, 1991). It has also been shown that cyclical compressions could decrease the tensile strength of articular cartilage without damage to the articular surface (ascertained by India ink staining), suggesting damage to the interfibrillar connections of the collagen network (McCormack et Mansour, 1998).

Both the extent of linearity or nonlinearity of the mechanical response of articular cartilage to load as well as alterations of this mechanical response to load due to the load itself need to be addressed. In this study we have posed two hypotheses : 1) that the stress response to an imposed displacement could be linear or nonlinear depending on the strain amplitude and strain rate and 2) that intrinsic material behavior of the cartilage could be altered due to loading after a certain threshold of strain amplitude or of strain rate is reached. To explore these hypotheses we performed sequences of stress relaxation tests of finite deformation, up to ~ 26.5 % strain, at different strain rates on adult bovine articular cartilage in unconfined compression. We designed our protocol to provide information on alterations in intrinsic mechanical behavior during the sequence of mechanical tests, i.e. where in the sequence does the cartilage begin to behave differently due to the load it has already experienced. We found that transient responses displayed high nonlinear stiffening with increasing compression amplitude and strain

rate. Alteration in intrinsic material properties suggesting molecular level cartilage degradation also appeared to occur after relatively small compressions of only 25-50 μm in amplitude.

10.4 Materials and Methods

10.4.1 Tissue Explant Isolation

A recently described cartilage-bone tissue explant system was used in these studies (Dumont *et al.*, 1999). The unique features of this disk explant system compared to most previously used cartilage explant systems (Grodzinsky, 1990) are the presence of an intact articular surface and a thin layer of subchondral bone (Fig 1A). Briefly, cartilage/bone cores were isolated from the load bearing areas of the humeral heads of 1-2 years old steers using an orthopaedic coring bit (050.720, Straumann Canada, Toronto, Ontario), under constant cooling irrigation with HBSS at pH 7,4 (1,26 mM $CaCL_2$; 136,9 mM NaCl; 5,36 mM KCl; 0,44 mM KH_2PO_4; 0,49 mM $MgCl_2$; 0,466 mM $MgSO_4$; 4,2 mM $NaHCO_3$; 0,336 mM Na_2HPO_4; 5,55 mM D-Glucose; 0,03 mM Phenol red) (14060, Gibco BRL, Rockville, Maryland). The explants were cut just beneath the bone-cartilage interface with a specialized device in order to retain a thin layer of subchondral bone thus preserving the natural cartilage/bone interface. The resulting disks (4 mm dia., ~1.5 mm thick) contained the entire thickness of articular cartilage (0.7-1.5 mm thick) attached to a layer of subchondral bone. Disk diameter was reduced to 3 mm using a biopsy punch (Miltex 15-33-33, Apocom, Montreal, Quebec) cutting from the cartilage surface through the bone. Following isolation, the disks were washed 5 times with HBSS containing antibiotics and protease inhibitors (1 mM PMSF (P7626); 1 mM iodoacetimide (I6125); 5 mg/ml pepstatin A (PP4265); 1 mM EDTA (ED4SS), all from Sigma) and were maintained, until testing (36 hours maximum), at 4 °C in humidified chambers consisting of cryotubes inside of which were kimwipes soaked

with HBSS containing antibiotics and protease inhibitors. Disks were placed on top of the kimwipes with the bone layer down. Other disks were preserved at –20 °C in cryotubes containing HBSS and inhibitors.

10.4.2 Mechanical Testing

Individual disks were transferred to a uniaxial unconfined compression chamber containing HBSS with protease inhibitors (Fig 1B). At the chamber periphery a compartment containing water, together with the chamber cover, prevents evaporation and concentration of the saline solution. Specimens were subjected to the following compression protocol to characterize amplitude-dependent nonlinear responses and tissue degradation thresholds (Fig 1C) : Contact (zero strain) was determined by achieving a tare load of 6 g at equilibrium (corresponding to a ~1.5 to 2 % equilibrium strain). A series of test compressions (ramp compression/10 min relaxation/ramp release) of increasing amplitudes (12.5; 25; 50; 100; 150; 200; 250; 300 μm) was performed at room temperature using 1 of 3 ramp speeds (0.5; 5; 50 μm/sec or ~0.044 %/s; ~0.44 %/s; ~4.4 %/s) (n = 4 fresh disks for each speed; n = 4 frozen disks at 5 μm/sec). Peak and equilibrium moduli were calculated using the engineering convention from the test ramps by dividing peak and equilibrium forces by original area and by displacement amplitude normalized to original cartilage thickness (measured microscopically – see below). For graphical representation, both moduli were normalized for each disk to the equilibrium modulus of the first test ramp (12.5 μm). Interspersed between test ramps were witness ramps of 12.5 μm amplitude and 5 μm/sec velocity whose purpose was to monitor intrinsic material property changes during the sequence (Fig 1C). Each test and witness compression was followed by a 15 to 60 min rest phase, the time being determined by using a third type of compression, namely a contact ramp of 10 μm amplitude and 5 μm/sec velocity (Fig 1C). Recorded peak force amplitude of the contact ramp had to reach a predefined threshold two times

consecutively to indicate contact and relaxation completion. This threshold was determined just after tare loading, prior to the compression protocol when 10 contact ramps were applied to the disk and the threshold was set to 2/3 of the mean peak force amplitude of these 10 ramps. The maximum duration for the whole compression protocol was ~12 hours. These experiments were performed using the Mach1™ mechanical testing system (Biosyntech, Laval, Quebec).

10.4.3 Cartilage Thickness Measurement

Thickness of cartilage disks was measured microscopically after completion of the compression protocol. Rectangular cartilage sections (100 μm thick) were taken slicing from the articular surface through the thin bone layer with a Tissue-Chopper (McTwain, Brinkmann, Westbury, New York). Photographs of the sections on a calibration slide were captured at low magnification using a digital camera on an inverted microscope. We used Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, Ontario) to evaluate the cartilage thickness at three points on the digital images, being careful to measure perpendicularly to the articular surface (Fig 2).

10.4.4 Statistical Analysis

Mechanical data were statistically interpreted by analysis of variance (ANOVA) with repeated measures. We investigated the strain-amplitude and strain-rate dependence of peak and equilibrium moduli, as well as the effect of freezing on these parameters. These analysis were performed using the mixed procedure of SAS (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA) with a SP(POW) variance-covariance structure. Logarithmic or square root transformations were applied to improve normality or homogeneity when necessary. Results yielding a p-value ≤ 0.05 were considered statistically significant.

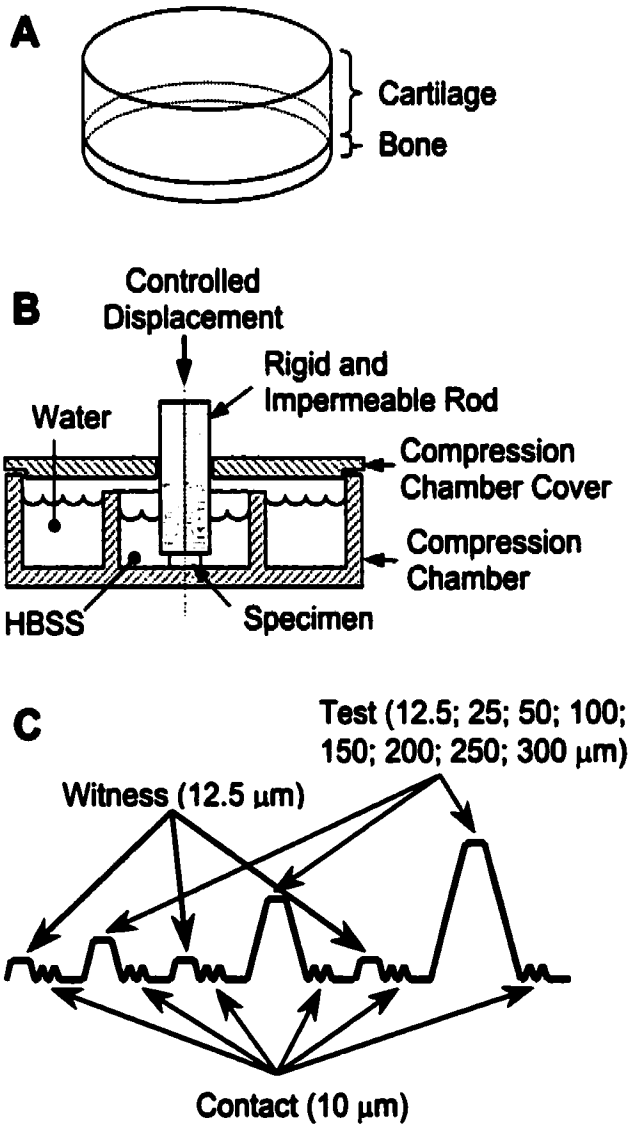

Figure 10.1 : The compressed specimen consists of an articular cartilage disk attached to a thin layer of subchondral bone (A). It is transferred to a uniaxial unconfined compression chamber containing HBSS with protease inhibitors (B) and subjected to the compression protocol sequence (C) where: test ramps are performed at 12.5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 and 300 μm using 1 of 3 speeds: 0.5, 5 or 50 μm/sec. Witness ramps for determining load-induced changes in intrinsic properties have 12.5 μm amplitude and 5 μm/sec velocity. Contact ramps used to ascertain full reswelling of samples after ramp-hold loading have 10 μm amplitude and 5 μm/sec velocity.

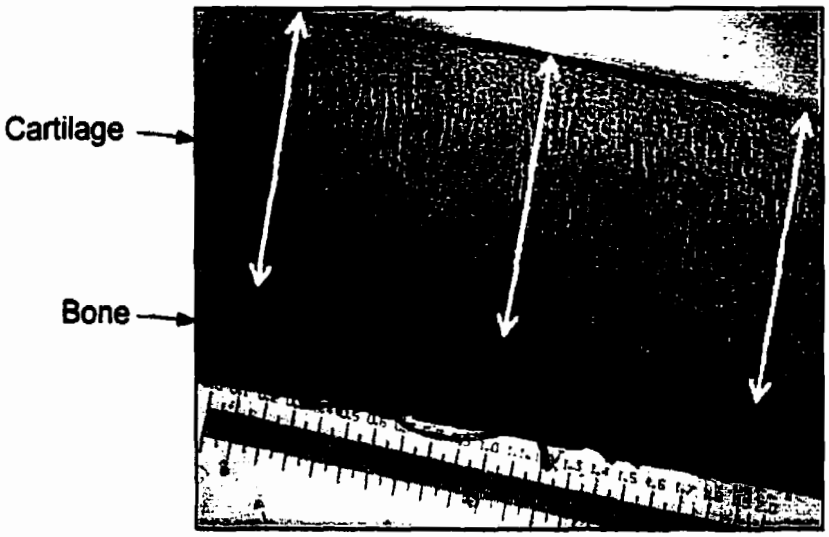

Figure 10.2 : Thickness of cartilage disks was evaluated at three points on the digital micrographs, being careful to measure perpendicularly to the articular surface.

10.5 Results

Cartilage thickness in the three groups (three compression speeds; one articular surface for each speed) was 0.92 - 0.96 mm range for low strain rate compression, 1.19 - 1.47 mm for moderate strain rate compression (fresh and frozen specimens) and 0.69 - 1.07 mm for high strain rate compression. For specimens subjected to witness ramps only (see below), cartilage thickness was between 1.01 and 1.22 mm.

Stress relaxation profiles for the test ramps displayed high peak to equilibrium load ratios and attainment of equilibrium (examples in Fig 3A). The stress rise during the ramp began with a convex form (decreasing slope with time) but became concave during the ramp (Fig 3B). As mentioned in the Experimental Methods section, peak and equilibrium moduli were normalized for each disk to the equilibrium modulus of the first test ramp (0.40 - 0.61 MPa range for low strain rate compression, 0.30 - 0.56 MPa for

moderate strain rate (fresh and frozen specimens) compression and 0.33-0.56 MPa for high strain rate compression) found from the test sequence. The appearance of equilibrium and peak modulus curves depended on the deformation rate (Figs 4 & 5). Peak moduli were strongly non-linear, initially weakening from 12.5 to around 25 - 50 μm amplitude for low and moderate strain rate, and then stiffening up to 300 μm amplitude (Fig 4). (ANOVA at the high strain rate showed the peak moduli to initially follow a plateau up to 50 μm amplitude, $p=0.16$, and to stiffen thereafter, $p\leq0.004$). Peak moduli showed significant sensitivity to strain rate, stiffening greatly for the highest compression speed (Fig 4A) (ANOVA of peak moduli measured at high and low strain rate showed that the two groups are statistically distinct for test compression amplitude above 50 μm, $p=0.016$ at 100 μm to $p<0.0001$ at 300 μm). Equilibrium moduli had a more complex behavior (Fig 5), they increased with compression amplitude at low ramp speed (0.5 μm/sec), but were constant at intermediate speed (5 μm/sec) and seemed to decrease slightly at higher speed (50 μm/sec). (ANOVA suggested, however, high speed equilibrium moduli to be constant with $p=0.16$ for the first compared to the last compression. Nonetheless, ANOVA of equilibrium moduli measured at high and low strain rate showed that the two groups were statistically distinct for amplitudes above 50 μm, $p=0.0006$ at 100 μm to $p<0.0001$ at 300 μm).

Witness ramp amplitudes began to decline after application of the 25 or the 50 μm ramp, suggesting weakening of material behavior due to these compressions (Fig 6A and 7A, B & C). (ANOVA tests showed a distinct difference between the two first witness compressions and the third witness compression where, at low strain rate, $p=0.78$ between the first and the second witness ramp, and $p=0.0005$ between the second and the third witness ramp. At moderate strain rate, values were $p=0.90$ and $p<0.0001$, and at high strain rate, $p=0.82$ and $p=0.02$). Since the test compression protocol can last up to ~12 hours, the absence of spontaneous (enzymatic or other) alterations in material properties was assessed by subjecting disks to a series of 12 witness compressions only, each followed by a fixed 45 min rest phase ($n=3$). These witness stress relaxation

profiles (in the absence of test ramps) superposed very closely (Fig 6B and 7D) eliminating spontaneous degradation as a cause of observed material property alterations. Also in order to assess whether limited time to equilibrium between test and witness ramps was responsible for reduced witness stress relaxation profiles during the sequence, a protocol with 25 and 50 μm amplitudes only, and expanded rest time between test and witness ramps (4 hours and 45 min instead of 60 minutes maximum) was applied (n = 4). Here we still observed reduced witness stress relaxation profiles after the 25 μm ramp (data not shown), suggesting time to equilibrium was sufficient in the first test protocol.

Frozen specimens tested at intermediate strain rate exhibited decreasing equilibrium moduli for 12.5 to 200 μm ramps and stabilized thereafter in contrast to fresh specimens whose equilibrium moduli were constant at this strain rate (Fig 5C). Peak moduli behavior of frozen disks was similar to that observed for freshly isolated disks tested at the same speed, however, the stiffening phase was less significant (Fig 4C). (ANOVA of moduli measured from fresh and frozen specimen showed that the two groups were statistically distinct for amplitudes above 50 μm with $p=0.039$ at 100 μm to $p<0.0001$ at 300 μm for peak moduli, and $p=0.0045$ at 100 μm to $p<0.0001$ at 300 μm for equilibrium moduli).

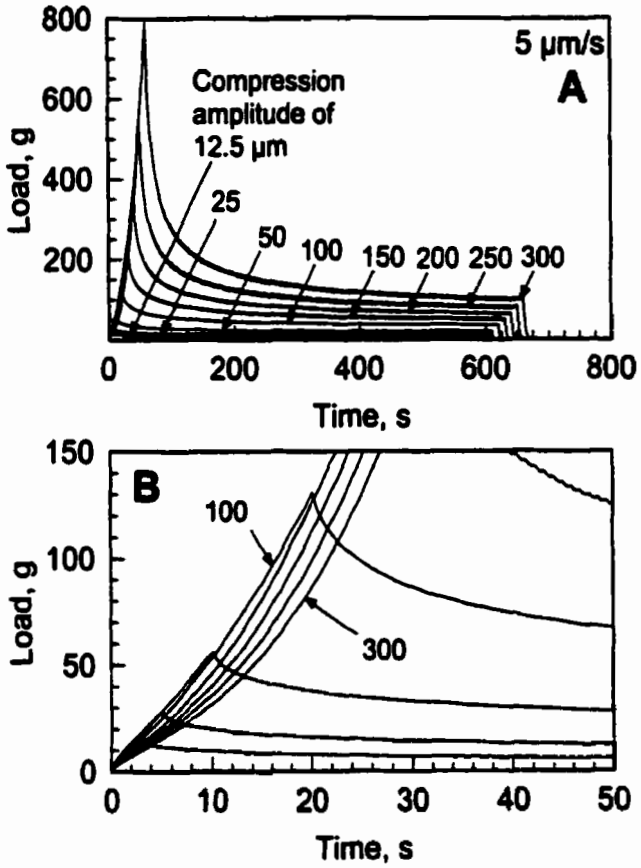

Figure 10.3 : Example of stress relaxation profiles for the test ramps performed at 5 µm/sec (A), with magnification showing the form of the stress rise during the ramp (B).

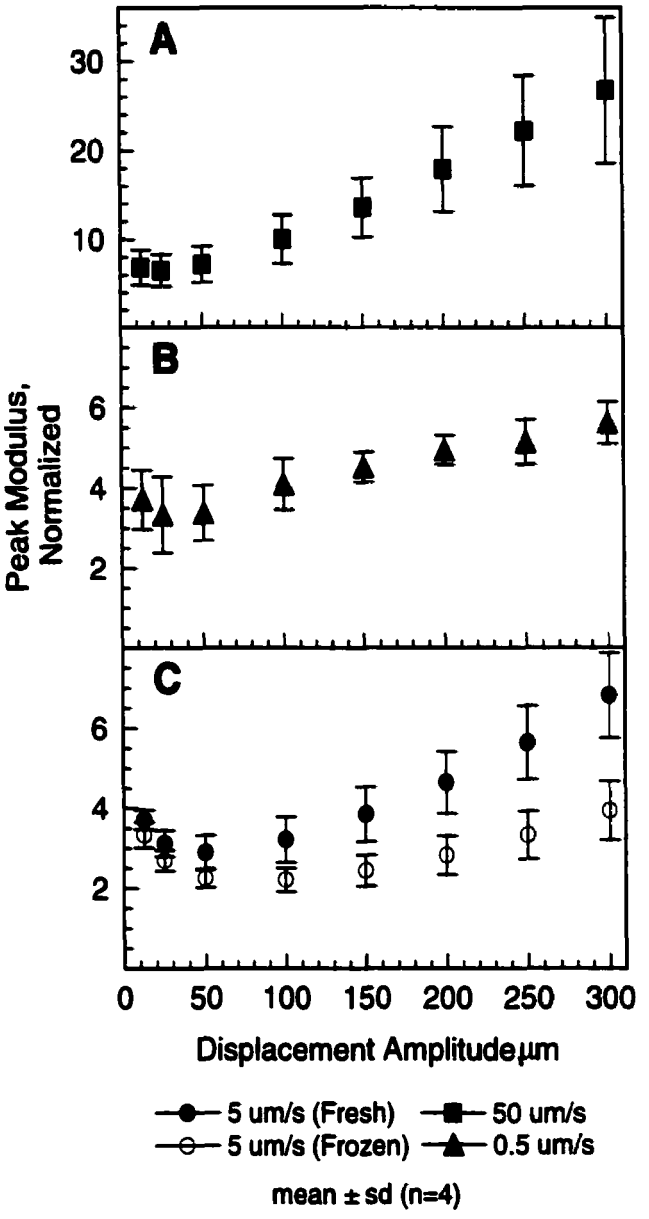

Figure 10.4 : Peak moduli for the test ramps performed at 0.5, 5 and 50 µm/sec. Moduli were calculated from the test ramps by dividing forces by original area and by displacement amplitude normalized to original cartilage thickness. Peak moduli were normalized for each disk to the equilibrium modulus of the first test ramp (12.5 µm).

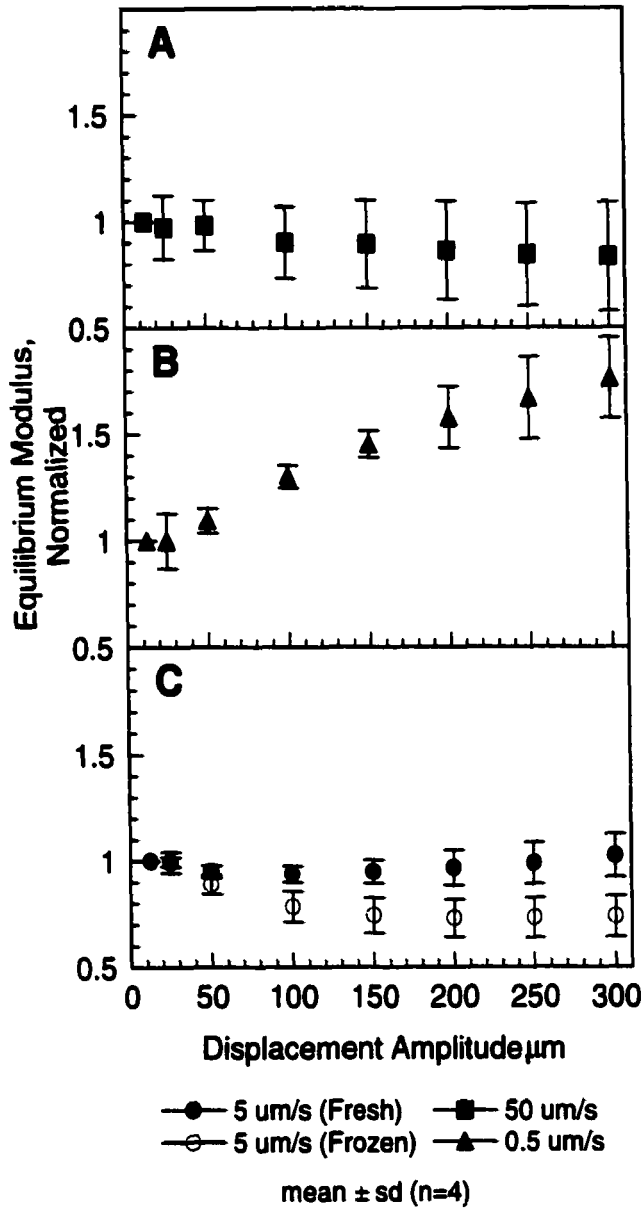

Figure 10.5 : Equilibrium moduli for the test ramps performed at 0.5, 5 and 50 µm/sec. Moduli were calculated from the test ramps by dividing forces by original area and by displacement amplitude normalized to original cartilage thickness. Equilibrium moduli were normalized for each disk to the equilibrium modulus of the first test ramp (12.5 µm).

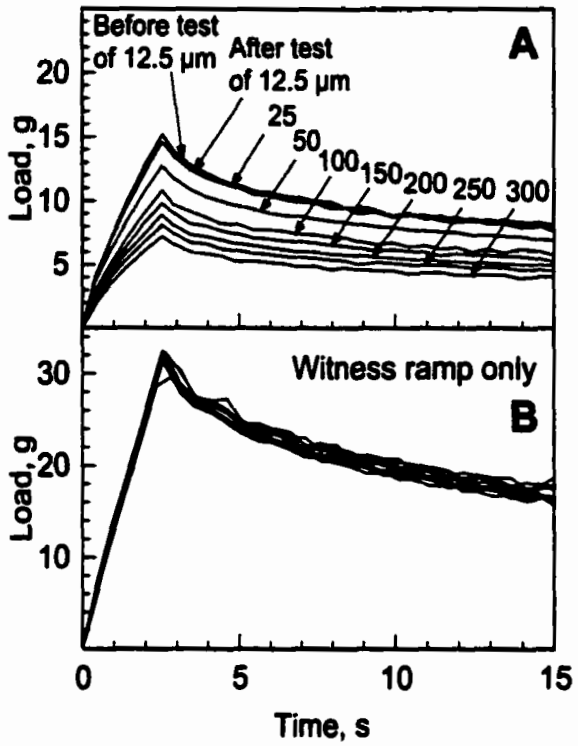

Figure 10.6 : Example of stress relaxation profiles for witness ramps performed at different times during the compression protocol (A) and for witness ramps alone (performed in the absence of test ramps) over a 12 hour period (B).

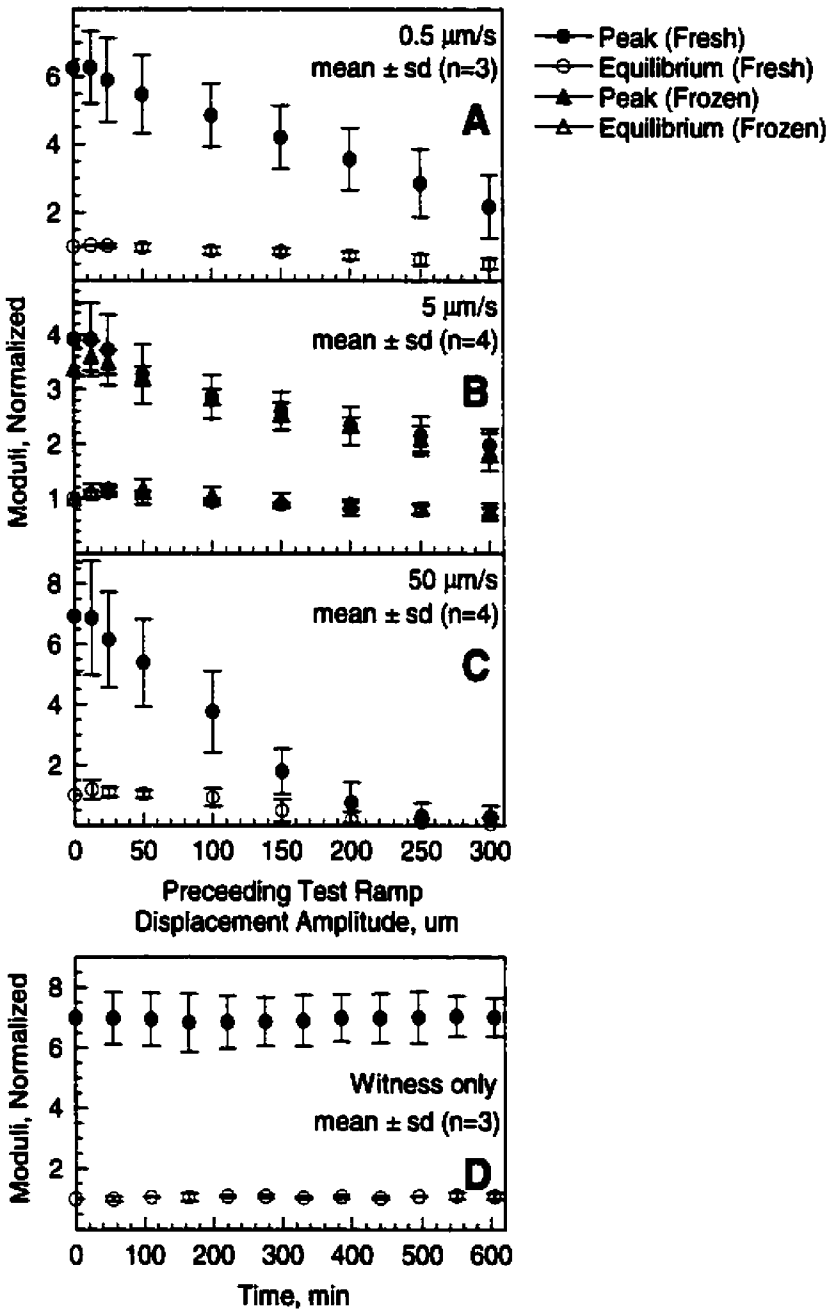

Figure 10.7 : Peak and equilibrium moduli for the witness ramps performed at different times during the compression protocol (A, B, C) and for the witness ramps alone (performed in the absence of test ramps) over a 12 hours period (D) normalized to the equilibrium modulus obtained with the first witness ramp.

10.6 Discussion

The two objectives of this study were to investigate 1) the extent of linearity of the stress response to an imposed displacement in unconfined compression and 2) the alteration of cartilage behavior due to mechanical loading. The results of the study demonstrate that unconfined compression of adult articular cartilage from a free-swelling state exhibits i) a nonlinear transient response that stiffens significantly when compression amplitude is increased and stiffens even more as a function of compression amplitude when strain rate is increased and ii) an equilibrium response that can be linear or nonlinear depending on the strain rate used. In addition the intrinsic material properties of articular cartilage tested in unconfined compression were altered, i.e. weakened, after a compression of only 25-50 μm in amplitude.

The equilibrium response to load was dependent on the strain rate of compression. At low strain rate, equilibrium response nonlinearly stiffens with increasing compression amplitude (Fig 5B) while it is constant at intermediate and high strain rate (Fig 5A & 5B). The dependence of equilibrium modulus on strain rate can be partially explained by the behavior of the witness ramps where the application of finite deformation compression appeared to cause intrinsic property changes much more so at high strain rate (50 μm/s) than at low strain rate (0.5 μm/s) (compare A & C of Fig 7).

Nonequilibrium responses were characterized by strain-amplitude and strain-rate dependent behavior as indicated by the peak modulus (Fig 4). The peak modulus weakens initially up to a minimum near a 50 μm amplitude compression (Fig 4). After this initial weakening a much stronger stiffening is observed from ~50 μm amplitude ramp to the highest amplitude tested of 300 μm. This stiffening of the transient load depended on compression strain rate where, for example, at 300 μm compression, normalized peak modulus (ratio of 300 μm peak modulus to 12.5 μm equilibrium modulus) was ~6 at low strain rate to ~27 at high strain rate. Hypothetical explanations

of the initial weakening up to ~50 μm compression amplitude include allowing time for fluid exudation during the ramp (since the initial weakening was greater at lower strain rates), and structural changes leading to weakening of the extracellular matrix. The more significant stiffening phase starting at ~50 μm compression amplitude also has several possible sources ranging from axial compaction of the proteoglycan phase, thereby increasing its compressive stiffness and reducing its hydraulic permeability (Mansour et Mow, 1976), lateral expansion resulting in non-linearly increasing fibrillar network stiffness and associated increases in tissue pressurization during the transient (Li *et al.*, 2000) and depth-dependent heterogeneity where weaker portions of the articular cartilage are initially compressed and stiffened. The strain rate-dependence of this stiffening phenomenon is of particular interest and could be the result of less time for fluid flow at higher strain rates producing increasing lateral expansion and increasing fibrillar network stiffness, under lateral extension, during the transient phase. Structural slippage between collagen and proteoglycan phases could also be involved in the strain rate dependence of the transient response since low strain rates allow longer times for slippage and relaxation during the ramp due to this fluid-flow independent mechanism. Clearly, further investigation is necessary in order to retain or eliminate the various candidate mechanisms.

The engineering convention used in calculating moduli from finite deformation data needs to be kept in mind when interpreting these results. We recalculated peak and equilibrium moduli using Cauchy stress and logarithmic strain and noted a global underestimation of the order of 3 % that did not significantly alter changes between groups. Our convention was chosen in order to provide simplicity and to compare with previous data. For example, previous results from Bursac et al. (1999) showed strain-softening of the equilibrium modulus for a sequence of superposing deformations up to a final 15 % strain, even though these compressions were executed at very low strain rate (~0.003 %/s) whereas we found strain-stiffening (0.044 %/s or 0.5 μm/s) (Fig 5B). The tissue weakening observed in that study (Bursac *et al.*, 1999) could be explained in part

by the freezing preservation method (see below), by the absence of subchondral bone which constrains lateral expansion of the specimen, or by the use of young tissue where composition and organization differ from mature articular cartilage. Importantly, the application of protocols similar to those of the present study (up to 10 % axial strain at ~0.1 and 0.2 %/s) to a cartilage or cartilage-bone tissue explant system identical to ours, exhibited linear equilibrium modulus (Fortin *et al.*, 2000; Légaré *et al.*, soumis) which agrees with the equilibrium behavior observed at 0.44 %/s (5 um/s) in the present study (Fig 5). Finally, Fortin et al. (2000) reported initial stiffening transient moduli in tests corresponding to the strain rates between 0.044 and 0.44 %/s differing from the behavior observed here (Fig 4), initially weakening up to ~2.2-4.4 % strain before stiffening. This difference could be due to the study by Fortin et al. (2000) using a sequence of superposed compression steps identical in amplitude rather than compressions of different amplitudes beginning from the same zero-strain point.

In the present study, alteration of cartilage intrinsic properties was examined with witness curves (Fig 6A and 7A, B & C) that exhibited similar behavior up to 25-50 μm compression, but weakened thereafter. Degradation of the cartilage matrix was also noticed from the stress-strain profiles (Fig 3B), where curves corresponding to the 12.5, 25 et 50 μm compressions followed the same trajectory, but curves occurring later in the sequence appeared lower on the graph, also suggesting tissue degeneration. Such a degeneration during the test sequence would decrease measured moduli and therefore the amplitude of the observed nonlinear stiffening of the cartilage transient response (Fig 4A, B & C).

It is also worth noting that cartilage mechanical properties appeared to be altered by freezing/thawing in our study, since the peak and equilibrium responses to load were decreased for frozen versus fresh specimens (Fig 4C & 5C). Since these samples were extracted from the same articular surface and had similar thickness (fresh ≈ 1.32 mm,

frozen ≈ 1.38 mm), this observed weakening is likely the result of tissue degradation due to freezing and/or thawing.

Finally, cartilage thickness, which varies among the three articular surfaces, might affect measured modulus amplitudes especially through depth-dependent heterogeneity. For example, a 12.5 μm compression would represent a smaller strain for thicker disks tested at 5 μm/s than for thinner disks tested at 0.5 and 50 μm/s. Therefore, larger compressions can be absorbed by the more superficial and weaker portions of these specimens, leading to reduced loads. Cartilage thickness could thus explain the lower absolute stresses recorded in response to witness ramps for the thicker cartilage disks tested at 5 μm/s compared to the thinner ones tested at 0.5 μm/s and 50 μm/s (compare Fig 7A, B & C).

In conclusion, we have investigated the extent of linear and nonlinear responses of articular cartilage attached to bone in unconfined compression using a specifically designed test sequence which allows indication of intrinsic property alterations during the testing protocol. The novel findings such as strain-amplitude and strain rate dependency of equilibrium and the transient nonlinearities and alterations in intrinsic properties due to quite small amplitude compressions, provide important information towards a fuller understanding of cartilage mechanics in physiological situations. Testing protocols should account for the effects of strain amplitude, strain rate and load history on measured properties. Most essentially, the effects of mechanical load on cartilage function in situ will also depend critically on these parameters. For example, recent studies have shown that injurious loading affect cell viability as well as protein and proteoglycan synthesis in a strain rate dependent manner (Kurz *et al.*, 2000; Quinn *et al.*, 2000).

10.7 Acknowledgment

This research was supported by the Arthritis Society of Canada, and the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche as a scholarship to E. Langelier.

10.8 Conclusion

Dans cette étude, nous avons examiné l'étendue de la linéarité de la réponse mécanique du cartilage articulaire à un déplacement appliqué en compression non confinée. Il a été conclu que la réponse transitoire du cartilage articulaire adulte est non linéaire, celle-ci s'affaiblissant initialement puis se rigidifiant significativement lorsque l'amplitude de la déformation augmente. Elle démontre aussi une grande sensibilité au taux de déformation, son renforcement étant plus important à une vitesse élevée de compression. La réponse à l'équilibre, elle, peut être linéaire ou non linéaire selon le taux de déformation utilisé. Les modules à l'équilibre augmentent avec l'amplitude de la déformation à basse vitesse (0.5 μm/s) et sont constants aux vitesses moyenne (5 μm/s) et élevée (50 μm/s). Des compressions réalisées sur des échantillons congelés ont démontré que ces derniers présentent moins de résistances aux compressions, leurs modules normalisés, transitoires et à l'équilibre, étant inférieurs à ceux des échantillons frais.

Nous avons également évalué l'altération des propriétés mécaniques du cartilage articulaire que cause le chargement appliqué. Un affaiblissement de la matrice extracellulaire a été noté suite à des compressions d'amplitudes aussi faibles que 25-50 μm. La valeur de ces résultats est appuyée par des essais complémentaires qui ont confirmé l'absence de dégradation spontanée et vérifiant si le temps d'attente entre les compressions était suffisamment long pour l'atteinte de l'équilibre.

Suite à ces observations, des hypothèses ont été proposées pour expliquer les comportements non linéaires du cartilage articulaire :

- Vu la diminution dominante des propriétés mécaniques notée pour le haut taux de déformation, la dépendance de la réponse à l'équilibre envers la vitesse de compression pourrait reposer sur la dégradation de la matrice extracellulaire.

- Puisque l'affaiblissement initial du module transitoire est plus important aux basses vitesses de déformation, il pourrait s'expliquer partiellement par un temps plus long de compression permettant ainsi l'exsudation du fluide et donc une relaxation partielle de la contrainte pendant l'application de la rampe. Une hypothèse alternative serait un changement structural de la matrice extracellulaire pendant la compression qui ait pour effet de modifier sa rigidité.

- Plusieurs possibilités peuvent expliquer le renforcement observé dans les modules transitoires, par exemple : le compactage des protéoglycannes causant un renforcement de la matrice extracellulaire et une diminution de sa perméabilité ou l'expansion latérale augmentant de façon non linéaire la rigidité des fibrilles de collagène. L'hétérogénéité du tissu en fonction de la profondeur pourrait aussi expliquer ce phénomène, les zones plus faibles étant comprimées les premières suivies des zones plus rigides. Par conséquent, plus l'amplitude de la déformation augmente, plus la rigidité de l'échantillon augmente.

- La dépendance du renforcement observé chez les modules transitoires envers le taux de déformation pourrait être le résultat d'une expansion latérale, laquelle causerait une augmentation de la rigidité des fibrilles de collagène puisque, à haut taux de déformation, la réponse transitoire se rigidifie davantage et le temps d'exsudation du fluide est réduit. De plus, à cette vitesse, il y a moins de temps pour le glissement structural entre les phases de collagènes et de protéoglycannes ainsi que pour la relaxation de contrainte durant l'application de la rampe.

À propos de la dégradation observée suite à l'application de compressions de très faible amplitude, on peut imaginer qu'il s'agit d'un mécanisme naturel de remaniement de la matrice extracellulaire. Mais, comme les échantillons utilisés ici n'étaient pas maintenus vivants en culture, les chondrocytes ne pouvaient pas « réparer » ces bris.

Finalement, une dernière hypothèse concernant la conservation des échantillons veut que la congélation affaiblisse la réponse du cartilage. Il est possible que la formation de cristaux pendant la congélation endommage la matrice extracellulaire, par exemple en ségrégeant les protéoglycannes (Studer *et al.*, 1995) ou en brisant certains liens du réseau de collagène.

10.9 Travaux ultérieurs

L'exploration des hypothèses proposées dans l'étude du comportement mécanique du cartilage articulaire requiert d'autres expérimentations. Par exemple, il serait important de réaliser les mêmes essais sur un échantillonnage plus grand de vitesses, par exemple : 0,5; 1,5; 5; 15; 50; 150 μm/s, ce qui nous permettrait de mieux visualiser et de mieux comprendre l'évolution des changements de modules en fonction de la vitesse. Il est à noter que le choix initial des vitesses de compression a été réalisé en fonction de la littérature disponible sur les essais de compression *in vitro* (études mécaniques de non-linéarité et études biologiques). Les vitesses sélectionnées ne sont pas nécessairement physiologiques, mais nous permettent de mieux comprendre la mécanique du chargement du cartilage. De plus, l'application de taux de compression plus élevés requerrait l'utilisation d'une cellule de force de plus grande capacité. Ainsi, la précision des mesures obtenues lors des courbes témoins de faible amplitude serait diminuée et notre identification d'un seuil de dégradation, affectée.

De plus, il serait intéressant de comparer, à l'aide du protocole développé, des courbes de modules obtenues avec des échantillons de différents diamètres. Ainsi, nous pourrions vérifier si la corrélation des modules avec le taux de déformation dépend aussi de la taille de l'échantillon comme d'autres phénomènes prédits par les modèles biphasiques et poroélastiques. Par exemple, selon ces modèles (Armstrong *et al.*, 1984; Mow *et al.*, 1980), la dimension de l'échantillon détermine la longueur à travers laquelle la pression diminue du maximum, au centre de l'échantillon, au minimum, à sa surface. En réduisant cette longueur au-delà d'une valeur critique, on peut réduire la pressurisation du fluide et ainsi la rigidité mesurée. Il a été démontré expérimentalement pour de petites déformations, qu'en modifiant l'échelle du temps selon une transformation fréquentielle dépendant du rayon de l'échantillon, les réponses observées avec les différents diamètres se superposent. (Fortin *et al.*, 2000)

Il serait également intéressant de modifier la concentration en sel et d'examiner les variations de modules afin de comparer la contribution électrostatique pour les différentes vitesses et les différents niveaux de compression. Par exemple, Eisenberg et Grodzinsky (1985) ont noté qu'à une concentration de 1.0 M NaCl, la contribution électrostatique est nulle et qu'à mesure que la concentration est diminuée, les forces électrostatiques de répulsion entres les molécules adjacentes de chondroïtine sulfate entrent en jeu.

En terminant, des analyses mécaniques plus poussées réalisées à l'aide d'un modèle, par exemple celui de Li *et al.* (1999) sont essentielles. Elles aideraient à déterminer lesquels des mécanismes proposés (exsudation du fluide, hétérogénéité du tissu, compactage des protéoglycannes, expansion latérale, glissement structural entre les phases de collagènes et de protéoglycannes) influencent le comportement non linéaire du cartilage articulaire mature en compression non confinée.

CHAPITRE XI

CONCLUSION

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse de doctorat se rapportent à l'étude du cytosquelette des chondrocytes *in situ*. Lors d'une première étape, nous avons travaillé à caractériser l'organisation et la distribution des trois éléments du cytosquelette. Nous avons ensuite poursuivi avec une étude préliminaire afin d'observer les changements dans l'organisation et la phosphorylation du cytosquelette suite à l'application de compressions mécaniques. Enfin, nous avons entamé une étude mécanique afin de corréler les phénomènes physiques avec les réponses biologiques observées.

Ce chapitre résume les principaux résultats obtenus lors de la réalisation de cette thèse.

11.1 Les études portant sur le cytosquelette des chondrocytes

Le premier objectif de ce projet consistait à décrire l'organisation tridimensionnelle des trois composantes du cytosquelette des chondrocytes *in situ*. L'existence de structures caractéristiques à chaque type de filaments a été démontrée. Les microfilaments d'actine constituent un réseau dense et ponctuel en périphérie de la cellule alors que les microtubules forment un treillis lâche traversant le cytoplasme pour s'étendre de la membrane nucléaire à la membrane plasmique. Tout comme les microtubules, les filaments intermédiaires de vimentine se présentent sous la forme d'un treillis joignant les membranes nucléaire et plasmique. Ce treillis de filaments de vimentine est toutefois plus fin et plus serré que celui des microtubules.

L'observation de structures propres aux microfilaments, aux microtubules et aux filaments de vimentine dans les chondrocytes *in situ* est en accord avec l'existence de

diverses fonctions spécifiques à chaque type de filaments et permet d'appuyer certaines de ces fonctions potentielles. Une hypothèse suggérée veut que le réseau de vimentine soit impliqué dans la mécanotransduction, celui-ci convertissant par un lien mécanique, la déformation cellulaire en déformation nucléaire. La forte corrélation observée entre les changements de synthèse d'agrécannes et les altérations structurales des chondrocytes et des noyaux sous compression statique (Buschmann *et al.* 1996), la réorganisation du réseau de vimentine en réponse au gonflement du cartilage (Durrant *et al.*, 1999) ainsi que l'existence d'un lien mécanique entre les intégrines, le cytosquelette et le noyau, même en l'absence de microfilaments et de microtubules (Maniotis *et al.*, 1997) appuient cette hypothèse.

Le second objectif du projet consistait à décrire la distribution des composantes du cytosquelette dans les différentes zones du cartilage articulaire. Nous avons démontré que le contenu protéique des filaments varie selon la profondeur dans le cartilage. Les microfilaments d'actine sont répartis assez uniformément, alors que les microtubules et les filaments intermédiaires sont distribués sous forme de gradient, avec une plus grande quantité de protéine près de la surface articulaire.

La distribution hétérogène des composantes du cytosquelette observée à travers le cartilage articulaire mature suggère un contrôle microenvironnemental de l'expression du cytosquelette. Il a été proposé que les chondrocytes de la zone superficielle où les déformations statiques sont plus importantes (Kolmonen *et al.* 1997; Schinagl *et al.* 1996) nécessitent un réseau plus robuste pour remplir des fonctions structurales.

Des expérimentations complémentaires ont été menées pour corroborer les hypothèses émises. Ces essais avaient pour objectif d'examiner les changements d'organisation et de phosphorylation du cytosquelette causés par des perturbations mécaniques (compression statique, compression dynamique basse vitesse et compression dynamique haute vitesse). Nous avons observé que la compression dynamique haute vitesse affecte

l'organisation du cytosquelette, notamment en dispersant le marquage d'actine habituellement ponctuel. En considérant que le cytosquelette d'actine est impliqué dans la déformation du noyau en réponse à une compression (Guilak, 1995), il est possible que le démantèlement du réseau d'actine constitue une protection contre les déformations excessives du noyau.

Ces essais ont également permis de noter que le patron de phosphorylation du site Ser82 de la vimentine se modifie différemment selon le type de compression appliquée. Il est concevable que la phosphorylation du site Ser82 assouplisse le cytosquelette de vimentine et en facilite la réorganisation, alors que la déphosphorylation du même site le rigidifierait. Ainsi, lors d'une sollicitation mécanique, la vimentine soluble, dévoilée en quantité plus élevée dans les zones supérieures du cartilage soumises à de plus grandes déformations (article 1), pourrait intégrer le cytosquelette et le rigidifier davantage.

Parallèlement à ces études biochimiques, une analyse mécanique a été entreprise afin de corréler les phénomènes physiques avec les réponses biologiques, cette analyse étant nécessaire pour disséquer des processus responsables des changements d'organisation et de phosphorylation du cytosquelette.

11.2 L'étude du comportement mécanique du cartilage articulaire

Cette partie du projet décrit le comportement mécanique du cartilage articulaire pour des conditions de chargement (type de géométrie et d'essai, niveau de déformation, vitesse de compression) semblables à celles utilisées pour l'étude biologique. Relativement à l'étude du cytosquelette, l'analyse mécanique vise à identifier les mécanismes impliqués dans les changements d'organisation et de phosphorylation du cytosquelette, alors que dans un contexte plus général, elle vise à comprendre des mécanismes physiques à l'origine de la résistance du tissu à la déformation.

Cette recherche a porté sur l'étendue de la linéarité de la réponse mécanique du cartilage articulaire à des essais de relaxation de contrainte impliquant de grandes déformations, lesquelles étaient exécutés en compression non confinée. Il a été démontré que la réponse transitoire du cartilage est non linéaire, celle-ci s'affaiblissant initialement puis se rigidifiant significativement lorsque l'amplitude de la déformation augmente. De plus, il a été noté qu'elle est sensible au taux de déformation, son renforcement étant plus important pour une vitesse élevée de compression. Nous supposons donc que l'affaiblissement initiale est causé par une relaxation partielle de la contrainte, relaxation qui s'accentue à de faibles vitesses de compression, ces dernières offrant un temps plus long d'exsudation du fluide pendant l'application de la rampe. Alternativement (ou conjointement), un changement structural de la matrice extracellulaire pendant la compression pourrait changer sa rigidité. Le renforcement observé s'expliquerait, quant à lui, par le compactage des protéoglycannes, lequel occasionne un renforcement de la matrice extracellulaire et une diminution de sa perméabilité, ou par l'expansion latérale, laquelle accroît de façon non linéaire la rigidité des fibrilles de collagène. L'hétérogénéité du tissu en fonction de la profondeur peut aussi expliquer ce phénomène, les zones présentant une plus faible résistance étant comprimées les premières suivies des zones plus rigides. Par conséquent, plus l'amplitude de la déformation augmente, plus la rigidité de l'échantillon s'amplifie.

Nous avons également énoncé des hypothèse concernant la dépendance du renforcement des modules transitoire envers le taux de déformation. Puisque la réponse transitoire se rigidifie davantage à haut taux de déformation où le temps d'exsudation du fluide est réduit, il est possible qu'une expansion latérale soit à l'origine de ce phénomène, celle-ci causant une augmentation de la rigidité des fibrilles de collagène. Aussi, vu que, à cette vitesse, le temps pour le glissement structural entre les phases de collagènes et de protéoglycannes est moindre, la diminution de contrainte se trouve réduite.

Cette étude affirme également que la réponse à l'équilibre peut être linéaire ou non selon le taux de déformation utilisé. À basse vitesse (0.5 μm/sec), les modules à l'équilibre augmentent avec l'amplitude de la déformation tandis qu'ils sont constants à vitesse moyenne (5 μm/sec) et à vitesse élevée (50 μm/sec). Il a été suggéré que la dépendance de la réponse à l'équilibre envers la vitesse de compression repose sur la dégradation de la matrice extracellulaire puisque cet endommagement semble plus important à haute vitesse qu'à basse vitesse de compression (voir plus bas).

Des compressions réalisées sur des échantillons congelés ont démontré que ces derniers présentent moins de résistances à la déformation, leurs modules normalisés, transitoires et à l'équilibre, étant inférieurs à ceux des échantillons frais. Il est possible que la formation de cristaux lors de la congélation endommage la matrice extracellulaire, par exemple en brisant certains liens du réseau de collagène.

Comme le protocole de compression employé fait appel à des déformations élevées, la matrice extracellulaire peut avoir subit des dommages, et la mesure de linéarité peut s'en être trouvée affectée. Aussi, cette recherche avait-elle pour objectif secondaire d'examiner les altérations dans le comportement du cartilage articulaire causées par le chargement mécanique. Un affaiblissement de la matrice extracellulaire a été noté suite à des compressions d'amplitudes aussi faibles que 25-50 μm. De plus, cet affaiblissement semble être plus important à haute vitesse (50 μm/s) qu'à basse (0.5 & 5 μm/s) vitesse de compression.

11.3 Contribution

Ces travaux de recherche nous ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur le cytosquelette des chondrocytes *in situ* et le comportement du cartilage articulaire mature en compression non confinée. Plus précisément, l'étude du cytosquelette par

microscopie confocale apporte des informations complémentaires à celles de Durant *et al.* (1999) en dévoilant l'organisation des microtubules, en étudiant des tissus d'origine, d'épaisseur et de configuration différente (Durrant *et al.* : rat ~60 μm sans os ; Langelier *et al.* : bœuf ~1200 μm avec os), et en utilisant des techniques supérieures de coupe, de perméabilisation, de fixation et d'immunomarquage. Un protocole a d'ailleurs été mis au point afin de confirmer, à l'aide de la microscopie à contraste d'interférence différentielle (DIC), l'absence de changements morphologiques marqués lors de la culture, de la perméabilisation ou de la fixation des échantillons. L'analyse de la distribution des protéines du cytosquelette apporte également un complément à celle de Durrant *et al.* car l'électrophorèse a été utilisée comme contrôle pour la microscopie à faible grossissement. Les expérimentations préliminaires portant sur les changements d'organisation du cytosquelette en réponse à des stimuli mécaniques complètent, encore une fois, l'étude de Durrant *et al.* principalement parce que les conditions de chargement diffèrent. L'examen des changements de phosphorylation de la vimentine, quant à lui, constitue la première étude de ce genre.

En ce qui concerne l'analyse mécanique, il s'agit de la seule étude portant sur la linéarité/non-linéarité de la réponse du cartilage articulaire à des déformations finies appliquées en géométrie non confinée, la majorité des études utilisant une séquence de petits pas superposés. Elle a aussi l'exclusivité d'examiner la dépendance de la linéarité envers la vitesse de déformation. De plus, le protocole de compression conçu pour l'expérimentation est unique étant donné qu'il permet de déterminer mécaniquement, en cours d'expérimentation et sans détérioration du tissu, le niveau de déformation critique où débute la dégradation des propriétés mécaniques du matériau.

Terminons en mentionnant que les expériences réalisées au cours de ce projet de doctorat ont mené à des résultats intéressants, justifiant le poursuite de la recherche. Des travaux ont d'ailleurs été proposés en ce sens aux sections 6.7 et 10.9.

RÉFÉRENCES

ADAMS, M.A., MERRILL, A.K. et KERIN, A.J. (1997). Mechanically-induced proteoglycan loss from damaged articular cartilage in-vitro. Transaction of the Orthopaedic Research Society, 43, 409.

AEBI, U., BIENZ, K., BRACK, C.H.R., BULLOCK, G., DÜGGELIN, M., DÜRRENBERGER, M., ENGEL, A., GSCHWIND, R., GUGGENHEIM, R., MATHYS, D. et RUDIN, W. (1996). Introduction to Practical Light and Electron Microscopy, Notes de cours, Biozentrum, Suisse, 207 p.

AEBI, U., MILLONIG, R., SALVO, H. et ENGEL, A. (1986). The three-dimensional structure of the actin filament revisited. Annals of the New York Academy of Sciences, 483, 100-119.

AKIZUKI, S., MOW, V.C., MULLER, F., PITA, J.C. et HOWELL, D.S. (1987). Tensile properties of human knee joint cartilage. II. Correlation between weight bearing and tissue pathology and the kinetics of swelling. Journal of Orthopaedic Research, 5, 173-186.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. et WATSON, J.D. (1990). Biologie moléculaire de la cellule, 2e éd., traduit de l'anglais par M. Minkowski, Flammarion médecine-sciences, 1219 p.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. et WATSON, J.D. (1994). Molecular Biology of the Cell, 3e éd., Garland Publishing Inc, 1219 p.

ARMS, K. et CAMP, P.S. (1989). Biologie tome II, traduit de l'anglais par J. Fontaine et L. Morin, Éditions Études Vivantes, 566 p.

ARMSTRONG, C.G., LAI, W.M. et MOW, V.C. (1984). An analysis of the unconfined compression of articular cartilage. Journal of biomedical Engineering, 106, 165-173.

ARMSTRONG, C.G. et MOW, V.C. (1982). Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content. Journal of Bone and Joint Surgery, 64-A, 88-94.

ATESHIAN, G.A., WARDEN, W.H., KIM, J.J., GRELSAMER, R.P. et MOW, V.C. (1997). Finite deformation biphasic material properties of bovine articular cartilage from confined compression experiments. Journal of Biomechanics, 30, 1157-1164.

ATHANASIOU, K.A., AGARWAL, A., MUFFOLETTE, A., DZIDA, F.J., CONSTANTINIDES, G. et CLEM, M. (1995). Biomechanical properties of hip cartilage in experimental animal models. Clinical orthopaedics, 316, 254-266.

ATHANASIOU, K.A., ROSENWASSER, M.P., BUCKWALTER, J.A., MALININ, T.I. et MOW, V.C. (1991). Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. Journal of Orthopaedic Research, 9, 330-340.

BACALLAO, R., KIAI, K. et JESAITIS, L. (1995). Guiding Principles of Specimen Preservation for Confocal Fluorescence Microscopy. Handbook of Biological Confocal Microscopy, Plenum Press, New York, 311-325.

BARNES, D. et SATO, G. (1980). Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. Analytical Biochemistry, 102, 255-270.

BARNETT, C.H., COCHRANE, W. et PALFREY, A.J. (1963). Age changes in articular cartilage of rabbits. Annals of Rheumatic Diseases, 22, 389-400.

BASCHONG, W., SUTTERLIN, R. et AEBI, U. (1997). Punch-wounded, fibroblast populated collagen matrices - a novel approach for studying cytoskeletal changes in three dimensions by confocal laser scanning microscopy. European Journal of Cell Biology, 72,189-201.

BAUER, C. et TRAUB, P. (1995).Interaction of intermediate filaments with ribosomes *in vitro*. European Journal of Cell Biology, 68, 288-296.

BAYLISS, M.T., VENN, M., MAROUDAS, A. et ALI, S.Y. (1983). Structure of proteoglycans from different layers of human articular cartilage. Biochemical Journal, 209, 387-400.

BELL, P.B., LINDROTH, M. et FREDRIKSSON, B.-A. (1988). Preparation of cytoskeletons of cells in culture for high resolution scanning and scanning transmission electron microscopy. Scanning Microscopy, 2, 1647-1661.

BENJAMIN, M., ARCHER, C.W. et RALPHS, J.R. (1994). Cytoskeleton of cartilage cells. Microscopy Research and Technique, 28, 372-7.

BENJAMIN, M., RALPHS, J.R., ARCHER, C.W., MASON, R.M. et CHAMBERS, M. (1995). Cytoskeletal changes in articular fibrocartilage are an early indicator of osteoarthritis in STR/ORT mice. Transaction of the Orthopaedic Research Society, 41, 246.

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

BERSHADSKY, A.D. et VASILIEV, J.M. (1988). Cytoskeleton, Plenum Press, New York, 298 p.

BIRD, T.A., SCHWARTZ, N.B. et PETERKOFSKY, B. (1986). Coordinate regulation of collagen and proteoglycan synthesis in costal cartilage of scorbutic and acutely fasted, vitamin C-supplemented guinea pigs. Archives of Biochemistry and Biophysics, 246, 42-51.

BOOS, N., NERLICH, A.G., WIEST, I., VON DER MARK, K., GANZ, R. et AEBI, M. (1999). Immunohistochemical analysis of type-X-collagen expression in osteoarthritis of the hip. Journal of Orthopaedic Research, 17, 495-502.

BORELLI, J.Jr, TORZILLI, P.A., GRIGIENE, R. et HELFET, D.L. (1997). Effect of impact load on articular cartilage : Development of an intra-articular fracture model. Journal of Orthopaedic Trauma, 11, 319-326.

BRIGHTON, C.T., KITAJIMA, T. et HUNT, R.M. (1984). Zonal analysis of cytoplasmic components of articular cartilage chondrocytes. Arthritis and Rheumatism, 27, 1290-1299.

BROOM, N.D. (1986). Structural consequences of traumatising articular cartilage. Annals of the Rheumatic Diseases, 45, 225-234.

BROWN, P.D. et BENYA, P.D. (1988). Alterations in chodrocyte cytoskeletal achitecture during phenotypic modulation by retinoic acid and dihydrocythocalasin B-induced reexpression. Journal of Cell Biology, 106, 171-179.

BROWN, T.D. et SINGERMAN, R.J. (1986). Experimental determination of the linear biphasic constitutive coefficients of human fetal proximal femoral chondroepiphysis. Journal of Biomechanics, 19, 597-605.

BRUCKNER, P. et VAN DER REST, M. (1994). Structure and function of cartilage collagens. Microscopy Research and Technique, 28, 378-384.

BUCKWALTER, J.A. (1997). Articular cartilage part I : Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. Journal of Bone and Joint Surgery, 79-A, 600-611.

BURSAC, P.M., OBITZ, T.W., EISENBERG, S.R. et STAMENOVIC, D. (1999). Confined and unconfined stress relaxation of cartilage : appropriateness of a transversely isotropic analysis. Journal of Biomechanics, 32, 1125-1130.

BUSCHMANN, M.D. (1996). Notes de cours : Biomécanique avancée GBM6117. École Polytechnique.

BUSCHMANN, M.D. et GRODZINSKY, A.J. (1995). A molecular model of proteoglycan-associated electrostatic forces in cartilage mechanics. Journal of Biomechanical Engineering, 117, 179-192.

BUSCHMANN, M.D., HUNZIKER, E.B., KIM, Y.J. et GRODZINSKY, A.J. (1996). Altered aggrecan synthesis correlates with cell and nucleus structure in statically compressed cartilage. Journal of Cell Science, 109, 499-508.

BUSCHMANN, M.D., SOULHAT, J., SHIRAZI-ADL, A., JURVELIN, J.S. et HUNZIKER, E.B. (1998). Confined compression of articular cartilage : linearity in ramp and sinusoidal tests and the importance of interdigitation and incomplete confinement. Journal of Biomechanics, 31, 171-178.

CHEN, C.-T., BURTON-WURSTER, N., LUST, G., BANK, R.A. et TEKOPPELE, J.M. (1999). Compositional and metabolic changes in damaged cartilage are peak-stress, stress-rate, and loading-duration dependent. Journal of Orthopaedic Research, 17, 870-879.

CHOU, Y.-H., BISCHOFF, J.R., BEACH, D. et GOLDMAN, R.D. (1990). Intermediate filament reorganization during mitosis is mediated by $p34^{cdc2}$ phosphorylation of vimentin. Cell, 62, 1063-1071.

CHOU, C.F. et OMARY, M.B. (1994). Mitotic arrest with anti-microtubule agents or okadaic acid is associated with increased glycoprotein terminal GlcNAc's. Journal of Cell Science, 107, 1833-1843.

COHEN, B., LAI, W.M. et MOW, V.C. (1998). A transversely isotropic biphasic model for unconfined compression of growth plate and chondroepiphysis. Journal of Biomechanical Engineering, 120, 491-496.

COLLINS, D.H., GHADIALLY, F.N. et MEACHIM, G. (1965). Intra-cellular lipids of cartilage. Annals of the Rheumatic Diseases, 24, 123-135.

COOKE, R. (1986). The mechanism of muscle contraction. CRC Critical Reviews in Biochemistry, 21, 53-118.

DUMONT, J., IONESCU, M., REINER, A., POOLE, A.R., TRAN-KHANH, N., HOEMANN, C.D., MCKEE, M. et BUSCHMANN, M.D. (1999). Mature Full-thickness Articular Cartilage Explants Attached to Bone are Physiologically Stable over Long-term Culture in Serum-free Media. Connective Tissue Research, 40, 259-272.

DUNN, M.J. (1989). Electrophoretic analysis methods. Protein Purification Methods : a Practical Approach, IRL Press, 18-40.

DURRANT, L.A., ARCHER, C.W., BENJAMIN, M. et RALPHS, J.R. (1999). Organisation of the chondrocyte cytoskeleton and its response to changing mechanical conditions in organ culture. Journal of Anatomy, 194, 343-353.

DÜRRENBERGER, M. et SÜTTERLIN, R. (1996). Looking inside cells and tissues by optical sectioning with a confocal laser scanning microscope. From Bones to Atoms : Imaging Nature across Dimensions, Brochure, M.E. Müller Institut fo Microscopy, Biozentrum, Suisse, 38 p.

DYKSTRA, M.J. (1992). Biological Electron Microscopy : Theory, Techniques, and Troubleshooting, Plenum Press, 360 p.

EGGLI, P.S., HUNZIKER, E.B. et SCHENK, R.K. (1988). Quantitation of structural features characterizing weight- and less- weight-bearing regions in articular cartilage: a stereological analysis of medial femoral condyles in young adult rabbits. The Anatomical Record, 222, 217-227.

EISENBERG, S.R. et GRODZINSKI, A.J. (1985). Swelling of articular cartilage and other connective tissues. Journal of Orthopaedic Research, 3, 148-159.

EISENFELD, J., MOW, V.C. et LIPSHITZ, H. (1978). Mathematical analysis of stress relaxation in articular cartilage during compression. Mathematical Bioscience, 39, 97-112.

FARQUHAR, T., XIA, Y., MANN, K., BERTRAM, J., BURTON-WURSTER, N., JELINSKI, L. et LUST, G. (1996). Swelling and fibronectin accumulation in articular cartilage explants after cyclical impacts. Journal of Orthopaedic Research, 14, 417-423.

FARQUHARSON, C., LESTER, D., SEAWRIGHT, E., JEFFRIES, D. et HOUSTON, B. (1999). Microtubules are potential regulators of growth-plate chondrocyte differentiation and hypertrophy. Bone, 25, 405-12.

FOISNER, R., TRAUB, P. et WICHE, G. (1991). Protein kinase A- and protein kinase C-regulated interaction of plectin with lamin B and vimentin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88, 3812-3816.

FORTIN, M., SOULHAT, J., SHIRAZI-ADL, A., HUNZIKER, E.B. et BUSCHMANN, M.D. (2000). Unconfined compression of articular cartilage : Nonlinear behavior and comparison with a fibril-reinforced biphasip model. Journal of Biomechanical Engineering, 122, 189-195.

FOSTER, B. (1997). Optimizing Light Microscopy for Biological and Clinical Laboratories, Kendall/Hunt, 187 p.

GARAVITO, R.M. et ROSENBUSCH, J.P. (1986). Isolation and crystallization of bacterial porin. Methods in Enzymology, 125, 309-328.

GARON, M. LÉGARÉ, A., GUARDO, R., SAVARD, P. et BUSCHAMNN, M.D. (soumis). Spatially resolved detection of streaming potentials in articular cartilage. Journal of Biomechanics.

GEORGATOS, S.D. et BLOBEL, G. (1987a). Two distinct attachment sites for vimentin along the plasma membrane and the nuclear envelope in avian erythrocytes : A basis for a vectoral assembly of intermediate filaments. The Journal of Cell Biology, 105, 105-115.

GEORGATOS, S.D. et BLOBEL, G. (1987b). Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope. The Journal of Cell Biology, 105, 117-125.

GEORGATOS, S.D., WEBER, K., GLEISLER, N. et BLOBEL, G. (1987c). Binding of two desmin derivatives to the plasma membrane and the nuclear envelope of avian erythrocytes : Evidence for a conserved site-specificity in intermediate filament-membrane interactions. Cell Biology, 84, 6780-6784.

GIBBONS, I.R. (1981). Cilia and flagella of eukaryotes. Journal of Cell Biology, 91, 107s-124s.

GLOTZER, J.B. et EPHRUSSI, A. (1996). mRNA Localization and the Cytoskeleton. Seminars in Cell & Developmental Biology, 7, 357-365.

GODMAN, G.C. et PORTER, K.R. (1960). Chondrogenesis, studied with the electron microscope. The Journal of Biophysiscal and Biochemical Cytology, 8, 710-760.

GOSSELIN, C. (1997). Essais de caractérisation des propriétés mécaniques des matériaux. Notes de cours : Laboratoire de génie mécaniques I GMC-10316. Université Laval, 30 p.

GOTO, H., KOSAKO, H., TANABE, K., YANAGIDA, M., SAKURAI, M., AMANO, M., KAIBUCHI, K. et INAGAKI, M. (1998). Phosphorylation of vimentin by Rho-associated kinase at a unique amino-terminal site that is specifically phosphorylated during cytokinesis. Journal of Biological Chemistry, 273, 11728-11736.

GRAY. M.L., PIZZANELLI, A.M., GRODZINSKY, A.J. et LEE. R.C. (1988). Mechanical and physicochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. Journal of Orthopaedic Research Society, 6, 777-792.

GRIFFITHS, G. (1993). Fine Structure Immunohistochemistry, Springer Verlag, New York, 480 p.

GRODZINSKY, A.J. (1990). Mechanical and Electrical Properties and Their Relevance to Physiological Processes. Methods in Cartilage Research, Academic Press, New York, 275-281.

GUILAK, F. (1995). Compression-induced changes in the shape and volume of the chondrocyte nucleus. Journal of Biomechanics, 28, 1529-1541.

HAYAT, M.A. (1981). Fixation for electron microscopy, Academic Press, New York, 501 p.

HAYES, A.J., BENJAMIN, M. et RALPHS, J.R. (1999). Role of actin stress fibres in the development of the intervertebral disc: cytoskeletal control of extracellular matrix assembly. Developmental Dynamics, 215, 179-89.

HAYES, W.C. et MOCKROS, L.F. (1971). Viscolelastic properties of human articular cartilage. Journal of Applied Physiology, 31, 562-568.

HEATH, J.P. et HOLIFIELD, B.F. (1991). Cell locomotion: new research tests old ideas on membrane and cytoskeletal flow. Cell Motility and the Cytoskeleton, 18, 245-257.

HEINEGARD, D. et SOMMARIN, Y. (1987). Isolation and characterization of Proteoglycans. Methods in Enzymology, 144, 319-372.

HIRSCH, M.S., COOK, S.C., KILLIIANY, R. et SVOBODA, K.K.H. (1996). Increased cell diameter precedes chondrocyte terminal differentiation, whereas cell-matrix attachment complex proteins appear constant. The Anatomical Record, 244, 284-96.

HIRSCH, M.S., LUNSFORD, L.E., TRINKAUS-RANDALL, V. et SVOBODA, K.K.H. (1997). Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediated. Developmental Dynamics, 210, 249-63.

HODGE, W.A., CARLSON, K.L., FIJAN, S.M., BURGESS, R.G., RILEY, P.O., HARRIS, W.H. et MANN, R.W. (1989). Contact pressures from an instrumented hip endoprosthesis. Journal of Bone and Joint Surgery, 71-A, 1378-1385.

INAGAKI, M., NISHI, Y., NISHIZAMA, K., MATSUYAMA, M. et SATO, C. (1987). Site-specific phosphorylation induces disassembly of vimentin filaments in vitro. Nature, 328, 649-652.

INAGAKI, M., INAGAKI, N., TAKAHASHI, T. et TAKAI, Y. (1997). Phosphorylation-dependent control of structures of intermediate filaments: a novel approach using site- and phosphorylation state- specific antibodies. Journal of Biochemistry, 121, 407-414.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY. NOMENCLATURE COMMITTEE (1984). Enzyme Nomenclature, Academic Press Inc, 646 p.

ISHIKAWA, H., BISCHOFF, R. et HOLTZER, H. (1969). Formation of arrowhead complexes with heavy meromyosin in a variety of cell types. The Journal of Cell Biology, 43, 312-328.

JANMEY, P.A. (1998). The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. Physiological Reviews, 78, 763-81.

JANMEY, P.A., EUTENEUER, U., TRAUB, P. et SCHLIWA, M. (1991). Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. Journal of Cell Biology, 113, 155-160.

JEFFREY, J.E., GREGORY, D.W. et ASPEND, R.M. (1995). Matrix damage and chondrocyte viability following a single impact load an articular cartilage. Archives of Biochemistry and Biophysics, 322, 87-96.

JONES, I.L., KLÄMFELDT, A. et SANDSTRÖM, T. (1982). The effect of continuous mechanical pressure upon the turnover of articular cartilage proteoglycans in vitro. Clinical Orthopaedics and Related Research, 165, 283-289.

JORTIKKA, M.O., PARKKINEN, J.J., INKINEN, R.I., KARNER, J., JARVELAINEN, H.T., NELIMARKKA, L.O., TAMMI, M.I. et LAMMI, M.J. (2000). The role of microtubules in the regulation of proteoglycan synthesis in chondrocytes under hydrostatic pressure. Archives of Biochemistry and Biophysics, 374, 172-80.

JULIANO, R.L. et HASKILL, S. (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. Journal of Cell Biology, 120, 577-585.

JURVELIN, J.S., BUSCHMANN, M.D. et HUNZIKER, E.B. (1997). Optical and mechanical determination of Poisson's ratio of adult bovine humeral articular cartilage. Journal of Biomechanics, 30, 235-241.

KARIM, O.M., SEKI, N., PIENTA, K.J. et MOSTWIN, J.L. (1992). The effect of age on the response of the detrusor to intracellular mechanical stimulus: DNA replication and the cell actin matrix. Journal of Cellular Biochemistry, 48, 373-384.

KEMPSON, G.E., MUIR, H., POLLARD, C. et TUKE, M. (1973). The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans. Biochimica Biophysica Acta, 297, 456-472.

KEMPSON, G.E., MUIR, H., SWANSON, S.A.V. et FREEMAN, M.A.R. (1970) Correlations between stiffness and the chemical constituents of cartilage on the human femoral head. Biochimca Biophysica Acta, 215, 70-77.

KERIN, A.J., WISNOM, M.R. et ADAMS, M.A. (1998). The compressive strength of articular cartilage. Proceedings. Institution of Mechanical Engineers, 212, 273-280.

KHALSA, P.S. et EISENBERG, S.R. (1997). Compressive behavior of articular cartilage is not completely explained by proteoglycan osmotic pressure. Journal of Biomechanics, 30, 589-594.

KIM, Y.J., BONASSAR, L.J. et GRODZINSKY, A.J. (1995). The role of cartilage streaming potential, fluid flow and pressure in the stimulation of chondrocyte biosynthesis during dynamic compression. Journal of Biomechanics, 28, 1055-1066.

KISHINO, A. et YANAGIDA, T. (1988). Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles. Nature, 334, 74-76.

KOLMONEN, P., HUNZIKER, E.B., BUSCHMANN, M.D. et JURVELIN, J.S. (1997). Determination of the interstitial deformation of articular cartilage in unconfined compression. Transaction of the Orthopaedic Research Society, 22, 2279.

KOUKOURITAKI, S.B., THEODOROPOULOS, P.A., MARGIORIS, A.N., GRAVANIS, A. et STOURNARAS, C. (1996). Dexamethasone Alters Rapidly Actin Polymerization Dynamics in Humman Endometrial Cells - Evidence for Nongenomic Actions Involving cAMP Turnover. Journal of Cellular Biochemistry, 62, 251-261.

KU, N.-O., LIAO, J., CHOU, C.-F. et OMARY, B. (1996a). Implications of intermediate filament protein phosphorylation. Cancer and Metastasis Reviews, 15, 429-444.

KU, N.-O., MICHE, S., SOUTIKNO, R.M., RESURRECCION, E.Z., BROOME, R.L., OSHIMA, R.G. et OMARY, M.B. (1996b). Susceptibility to hepatotoxicity in transgenic mice expressing a dominant-negative human keratin 18 mutant. Journal of Clinical Investigation, 98, 1034-1046.

KURZ, B., JIN, M., PATWARI, P., LARK, M.W. et GRODZINSKY, A.J. (2000). Biosynthetic response and mechanical properties of articular cartilage after injurious compression: The importance of strain rate. Transaction of the Orthopaedic Research Society, 46, 180.

KWAN, M.K., LAI, W.M. et MOW, V.C. (1990). A finite deformation theory for cartilage and other soft hydrated connective tissues-I. Equilibrium results. Journal of Biomechanics, 23, 145-155.

LA SOCIÉTÉ D'ARTHRITE. (1999a). Cahier spécial, La Presse, Montréal, 25 septembre 1999.

LA SOCIÉTÉ D'ARTHRITE. (1999b). www.arthritis.ca.

LANSING TAYLOR, D. et SALMON, E.D. (1989). Basic fluorescence microscopy. Methods in Cell Biology, 29, 207-237.

LAZARIDES, E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. Nature, 283, 249-256.

LEE, R.C., FRANK, E.H., GRODZINSKY, A.J. et ROYLANCE, D.K. (1981). Oscillatory compressional behavior of articular cartilage and its associated electromechanical properties. Transactions of the ASME, 103, 280-292.

LÉGARÉ, A., GARON, M., GUARDO, R., SAVARD, P. et BUSCHMANN, M.D. (soumis). Detection and analysis of cartilage degeneration by spatially resolved streaming potentials. Arthritis and Rheumatism.

LI, L.P., BUSCHMANN, M.D., and SHIRAZIL-ADL. (2000). A fibril reinforced nonhomogeneous poroelastic model for articular cartilage. Journal of Biomechanics, 33, 1533-1541.

LI, L.P., SOULHAT, J., BUSCHMANN, M.D. et SHIRAZI-ADL, A. (1999). Nonlinear analysis of cartilage in unconfined ramp compression using a fibril reinforced poroelastic model. Clinical Biomechanics, 14, 673-682.

LIAO, J., LOWTHERT, L.A., Ku, N.O., Fernandez, R. et OMARY, M.B. (1995a). Dynamics of human keratin 18 phosphorylation : polarized distribution of phosphorylated keratins in simple epithelial tissues. Journal of Cell Biology, 131, 1291-1301.

LIAO, J., LOWTHERT, L.A. et OMARY, M.B. (1995b). Heat stress or rotavirus infection of human epithelial cells generates a distinct hyperphosphorylated form of keratin 8. Experimental Cell Research, 219, 348-357.

LINDROTH, M., BELL, P.B., FREDRIKSSON, B.A. et LIU, X.D. (1992). Preservation and visualization of molecular structure in detergent- extracted whole mounts of cultured cells. Microscopy Research and Technique, 22, 130-50.

LINSS, W., NEUPERT, G. et LANGBEIN, L. (1986). Intermediate filaments in cells of hyaline cartilage. Acta Histochemica., 80, 29-34.

LOGIN, A., SOUCHIER, C., FFRENCH, M. et BRYON, P.-A. (1993). Comparison of anti-fading agents used in fluorescence microscopy : Image analysis and laser confocal microscopy study. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 41, 1833-1840.

MAK, A.F., LAI, W.M. et MOW, V.C. (1987). Biphasic indentation of articular cartilage – I. Theoritical analysis. Journal of Biomechanics, 20, 703-714.

MALLEIN-GERIN, F., GARRONE, R. et VAN DER REST, M. (1991). Proteoglycan and collagen synthesis are correlated with actin organization in dedifferentiating chondrocytes. European Journal of Cell Biology, 56, 364-373.

MANIOTIS, A.J., CHEN, C.S. et INGBER, D.E. (1997). Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94, 849-854.

MANSOUR, J.M. et MOW, V.C. (1976). The permeability of articular cartilage under compressive strain and at high pressures. Journal of Bone and Joint Surgery [Am], 58, 509-16.

MAROUDAS, A. (1979). Physicochmical properties of articular cartilage. Adult Articulat Cartilage, 2e édition, M. A. R. Freeman éditeur, 215-290.

MARTIN, I., VUNJAK-NOVAKOVIC, G., YANG, J., LANGER, R. et FREED, L.E. (1999). Mammalian chondrocytes expanded in the presence of fibroblast growth factor 2 maintain the ability to differentiate and regenerate three- dimensional cartilaginous tissue. Experimental Cell Research, 253, 681-8.

McCORMACK, T et MANSOUR, JM. (1998). Reduction in tensile strength of cartilage precedes surface damage under repeated compressive loading in vitro. Journal of Biomechanics, 31, 55-61.

MEACHIN, G. et ROY, S. (1967). Intracytoplasmic filaments in the cells of adult human articular cartilage. Annals of the Rheumatic Diseases, 26, 50-58.

MITCHISON, T., EVANS, L., SCHULZE, E. et KIRSCHNER, M. (1986). Sites of microtubule assembly and disassembly in the mitotic spindle. Cell, 45, 515-527.

MOW, V.C., KUEI, S.C., LAI, W.M. et ARMSTRONG, C.G. (1980). Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression : Theory and experiments. Journal of Biomechanical Engineering, 102, 73-84.

MOW, V.C. et LAI, W.M. (1979). Mechanics of animal joints. Annual Review of Fluid Mechanics, 11, 247-288.

MUIR, H., BULLOUGH, P. et MAROUDAS, A. (1970). The distribution of collagen in human articular cartilage with some of its physiological implications. Journal of Bone and Joint Surgery, 52, 554-563.

NIXON, R.A., PASKEVICH, P.A., SIHAG, R.K., THAYER, C.Y. (1994). Phosphorylation on carboxyl terminus domains of neurofilament proteins in retinal ganglion cell neurons in vivo : influences on regional neurofilament accumulation, interneurofilament spacing, and axon caliber. Journal of Cell Biology, 126, 1031-1046.

OGAWARA, M., INAGAKI, N., TSUJIMURA, K., TAKAI, Y., SEKIMATA, M., HA, M.H., IMAJOH-OHMI, S., HIRAI, S.-I., OHNO, S., SUGIURA, H., YAMAUCHI, T. et INAGAKI, M. (1995). Differential targeting of protein kinase C and CaM kinase II signalings to vimentin. Journal of Cell Biology, 131, 1055-1066.

OTTAVIANO, Y. et GERACE, L. (1985). Phosphorylation of the nuclear lamins during interphase and mitosis. Journal of Biological Chemistry, 260, 624-632.

OTTO, J.J. et SCHROEDER, T.E. (1990). Association of actin and myosin in the contractile ring. Annals of the New York Academy of Sciences, 582, 179-184.

PALFREY, A.J. et DAVIES, D.V. (1966). The fine structure of chondrocytes. Journal of Anatomy, 100, 213-226.

PARKKINEN, J.J., LAMMI, M.J., INKINEN, R., JORTIKKA, M., TAMMI, M., VIRTANEN, I. et HELMINEN, H.J. (1995). Influence of short-term hydrostatic pressure on organization of stress fibers in cultured chondrocytes. Journal of Orthopaedic Research, 13, 495-502.

PARKKINEN, J.J., LAMMI, M.J., PELTTARI, A., HELMINEN, H.J., TAMMI, M. et VIRTANEN, I. (1993). Altered Golgi apparatus in hydrostatically loaded articular cartilage chondrocytes. Annals of the Rheumatic Diseases, 52, 192-8.

PAUKKONEN, K. et HELMINEN, H.J. (1987). Rough endoplasmic reticulum and fine intracytoplasmic filaments in articular cartilage chondrocytes of young rabbits; a stereological morphometric study using transmission electron microscopy. Journal of Anatomy, 152, 47-54.

POWERS, J.C., ODAKE, S., OLEKSYSZYN, J., TOSHIHISA, H.H., BODUSZEK, B. et KAM, C.-M. (1993). Proteases – Structure, mechanism and inhibitors. Agents and Actions. Supplements, 42, 3-18.

QUINLAN, R., LANE, B. et HUTCHISON, U.K. (1994). Intermediate filament proteins. Protein Profil, 1, 779-801.

QUINN, T., ALLEN, R., SCHALET, B., PERUMBULI, P. et HUNZIKER, E. (2000). Matrix damage and cell injury caused by ramp compression of adult bovine articular cartilage explants: Effects of strain rate and peak stress. Transaction of the Orthopaedic Research Society, 46, 106.

QUINN, T.M., GRODZINSKY, A.J., HUNZIKER, E.B. et SANDY, J.D. (1998). Effects of injurios compression on matrix turnover around individual cells in calf articular cartilage explants. Journal of Orthopaedic Research, 16, 490-499.

RALPHS, JR., BENJAMIN, M. et THORNETT, A. (1991). Cell and matrix biology of the suprapatella in the rat: a structural and immunocytochemical study of fibrocartilage in a tendon subject to compression. The Anatomical Record, 231, 167-177.

RALPHS, J.R., TYERS, R.N. et BENJAMIN, M. (1992). Development of functionally distinct fibrocartilages at two sites in the quadriceps tendon of the rat: the suprapatella and the attachment to the patella. Anatomy and Embryology, 185, 181-187.

REPO, R.U. et FINLAY, J.B. (1977). Survival of articular cartilage after controlled impact. Journal of Bone and Joint Surgery [Am], 59-A, 1068-1076.

RIEZMAN, H., MUNN, A., GELI, M.I. et HICKE, L. (1996). Actin-, myosin- and ubiquitin-dependent endocytosis. Experientia, 52, 1033-1041.

ROTH, V. et MOW, V.C. (1980). The intrinsic tensile behavior of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age. Journal of Bone and Joint Surgery, 62, 1102-1117.

SAH, R.L.-Y., DOONG, J.-Y.H., GRODZINSKY, A.J., PLAAS, A.H.K. et SANDY, J.D. (1991). Effect of compression on the loss of newly synthesized proteoglycans and proteins from cartilage explants. Archives of Biochemistry and Biophysics, 286, 20-29.

SAJDERA, S.W. et HASCALL, V.C. (1969). Proteinpolysaccharide complex from bovine nasal cartilage Acomparison of low and high shear extraction procedures. Journal of Biological Chemistry, 144, 77-87.

SCHENK, R.K., EGGLI, P.S. et HUNZIKER, E.B. (1986). Articular Cartilage Morphology. Articular Cartilage Biochemistry, Raven Press, New York, 3-22.

SCHINAGL, R.M., TING, M.K., PRICE, J.H. et SAH, R.L. (1996). Video Microscopy to Quanitaite the Inhomogeneous Equilibrium Strain within Articular Cartilage During Confined Compression. Annals of Biomedical Engineering, 24, 500-512.

SHETERLIN, P. et SPARROW, J.C. (1994). Actin. Protein Profile, 1, 1-62.

SIMON, V.R. et PON, L.A. (1996). Actin-based organelle movement. Experientia, 52, 1117-1122.

SIMS, J.R., KARP, S. et INGBER, D.E. (1992). Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal and nuclear shape. Journal of Cell Science, 103, 1215-1222.

SONTAG, J.M., AUNIS, D. et BADER, M.F. (1988). Peripheral actin filaments control calcium-mediated catecholamine release from streptolysin-O-permeabilized chromaffin cells. European Journal of Cell Biology, 46, 316-26.

SOULHAT, J., BUSCHMANN, M.D. et SHIRAZI-ADL, A. (1999). A fibril-network-reinforced biphasic model of cartilage in unconfined compression. Journal of Biomechanical Engineering, 121, 340-347.

SPEER, D.P. et DAHNERS, L. (1979). The collagenous architecture of articular cartilage. Correlation of scanning electron microscopy and polarized light microscopy observations. Clinical orthopaedics, 139, 267-275.

STERNBERGER, L.A. et STERNBERGER, N.H. (1983). Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilements *in situ*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 80, 6126-6130.

STOCKWELL, R.A. (1967). The lipid and glycogen content of rabbit articular hyaline and non-articular hyaline cartilage. Journal od Anatomy, 102, 87-94.

STOCKWELL, R.A. et MEACHIM, G. (1979). The chondrocyte. Adult Articulat Cartilage, 2e édition, M. A. R. Freeman éditeur, 69-144.

STREIFEL, T.D., AVALOS, R.T. et COHLBERG, J.A. (1996). cAMP-dependent phosphorylation of neurofilament proteins NF-L and NF-M inhibits their coassembly into filaments *in vitro*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 222, 646-651.

STUDER, D., MICHEL, M., WOHLWEND, M., HUNZIKER, E.B. et BUSCHMANN, M.B. (1995). Vitrification of articular cartilage by high-pressure freezing. Journal of Microscopy, 179, 321-332.

SUH, J.-K. et SPILKER, R.L. (1994). Indentation analysis of biphasic articular cartilage : Nonlinear phenomena under finite deformation. Journal of Biomechanical Engineering, 116, 1-9.

SVITKINA, T.M., VERKHOVSKY, A.B. et BORISY, G.G. (1996). Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. Journal of Cell Biology., 135, 991-1007.

TAKAI, Y., OGAWARA, M., YASUKO, T., MORITOH, C., IMAJOH-OHMI, S., TSUTSUMI, O., TAKETANI, Y. et INAGAKI, M. (1996). Mitosis-specific phosphorylation of vimentin by protein kinase C coupled with reorganization of intracellular membranes. Journal of Cell Biology, 133, 141-149.

TORZILLI, P.A., GRIGIENE, R., BORELLI, J.Jr. et HELFET, D.L. (1999). Effect of impact load on articular cartilage : Cell metabolism and viability, and matrix water content. Journal of Biomechanical Engineering, 121, 433-441.

TRAUB, P. (1995). Intermediate filaments and gene regulation. Physiological Chemistry & Physics & Medical NMR, 27, 377-400.

TURNER, C.E. et BURRIDGE, K. (1991). Transmembrane molecular assemblies in cell-extracellular matrix interactions. Current Opinion in Cell Biology, 3, 849-853.

VALE, R.D. (1987). Intracellular transport using microtubule-based motors. Annual review of cell biology, 3, 347-378.

VOET, D. et VOET, G. (1995) Biochemistry, 2e éd., John Wiley & Sons Inc, 1361 p.

WANG, N., BUTLER, J.P. et INGBER, D.E. (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. Science, 260, 1124-1127.

WEBER, K., RATHKE, P.C. et OSBORN, M. (1978). Cytoplasmic microtubular images in glutaraldehyde-fixed tissue culture cells by electron microscopy and by immunofluorescence microscopy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 75, 1820-1824.

WILLINGHAM, M.C. (1983). An alternative fixation-processing method for preembedding ultrastructural immunocytochemistry of cytoplasmic antigens : The GBS (glutaraldehyde-borohydride-saponin) procedure. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 31, 791-798.

WONG, M., WUETHRICH, P., EGGLI, P. et HUNZIKER, E. (1996). Zone-specific cell biosynthetic activity in mature bovine articular cartilage: a new method using confocal microscopic stereology and quantitative autoradiography. Journal of Orthopaedic Research, 14, 424-432.

WOO, S.L., AKESON, W.H. et JEMMOTT, G.F. (1976). Measurements of nonhomogeneous, directional mechanical properties of articular cartilage in tension. Journal of Biomechanics, 9, 785-791.

WRIGHT, M.O., NISHIDA, K., BAVINGTON, C., GODOLPHIN, J.L., DUNNE, E., WALMSLEY, S., JOBANPUTRA, P., NUKI, G. et SALTER, D.M. (1997). Hyperpolarisation of cultured human chondrocytes following cyclical pressure-induced strain: evidence of a role for alpha 5 beta 1 integrin as a chondrocyte mechanoreceptor. Journal of Orthopaedic Research., 15, 742-747.

WRIGHT, G.C.Jr, WEI, X., MCDEVITT, C.A., LANE, B.P. et SOKOLOFF, L. (1988). Stimulation of matrix formation in rabbit chondrocyte cultures by ascorbate. 1. Effet of ascorbate analogs and β-aminopropionitrile. Journal of Orthopaedic Research, 6, 397-407.

ZANETTI, N.C. et SOLURSH, M. (1984). Induction of chondrogenesis in limb mesenchymal cultures by disruption of the actin cytoskeleton. Journal of Cell Biology, 99,115-123.

ANNEXE I

A1. AMÉLIORATION DES TECHNIQUES MICROSCOPIQUES UTILISÉES – ÉTUDE DU CYTOSQUELETTE

Cette annexe présente des résultats obtenus au cours de ce projet mais non inclus dans l'article. Nous les en avons exclus parce qu'ils n'étaient pas reliés directement au sujet de l'article mais concernaient plutôt l'amélioration des techniques microscopiques.

A1.1 Les conditions de perméabilisation et de fixation

Le protocole initial de perméabilisation/fixation a été développé pour visualiser le cytosquelette des chondrocytes dans des tranches de cartilage articulaire de 100 µm d'épaisseur (Buschmann, communication personnelle). Ce protocole se détaille ainsi :

1) Perméabilisation - 40 minutes - 2 % Octyl Poe et 0,125 % glutaraldéhyde dans HBSSm
2) Rinçage - 5 minutes - HBSSm
3) Fixation - 1 heure - 1 % glutaraldéhyde dans HBSSm
4) Rinçage - 3 X 5 minutes - HBSSm
5) Conservation à 4 °C - HBSSm

Dans le but d'optimiser ce protocole, différentes conditions de perméabilisation et de fixation ont été testées. Tout d'abord, trois types d'échantillons ont été soumis aux étapes de perméabilisation et de fixation : des disques de 3 mm de diamètre comportant l'épaisseur entière de cartilage articulaire rattachée à une mince couche d'os, des coupes rectangulaires de 100 µm d'épaisseur comportant aussi l'épaisseur entière de cartilage rattachée à une mince couche d'os (figure 4.9) et finalement des coupes circulaires de 3 mm de diamètre et 100 µm d'épaisseur (figure 4.12). L'avantage des disques par

rapport aux coupes est qu'ils ont subi moins de manipulations, diminuant ainsi les risques de perturbation du cytosquelette, et peuvent être préparés dans une configuration comprimée. Toutefois, les temps requis pour la diffusion des agents de perméabilisation et de fixation sont plus faibles dans le cas des coupes. Évidemment, pour être examinés au microscope, les disques doivent être coupés après la fixation. Dans le cas des disques de cartilage, deux configurations expérimentales ont été examinées, soit les disques contrôles libres et les disques expérimentaux comprimés de façon non confinée (100 μm de compression, soit environ 10 % de déformation). Cette dernière configuration permet l'étude des changements du cytosquelette dus à une compression statique. En effet, les disques peuvent être fixés sous compression statique afin de maintenir la structure comprimée pour la microscopie confocale. La compression statique est réalisée à l'aide du MACH1™ de BioSynTech Ltée présenté à l'annexe 3 (figure A3.1). Il est à noter que le protocole de fixation a été adapté pour les disques de cartilage en augmentant la concentration de glutaraldéhyde de 1 à 2 %.

Les temps de perméabilisation et de fixation ont également été variés, le but étant ici de trouver un compromis entre une fixation longue, qui assure une meilleure préservation du tissu, et une fixation plus courte, qui diminue le niveau d'autofluorescence.

Plusieurs tampons de stabilisation pour le cytosquelette ont été examinés (Lindroth *et al.*, 1992). La majorité de ces tampons avait un pH légèrement acide (entre 6,0 et 6,9). C'est pourquoi les résultats obtenus avec des pH de 6,5 et 7,2 ont été comparés. Comme la matrice extracellulaire du cartilage possède une densité de charges fixes hautement négative, l'effet Donnan y est important. Ainsi, un pH de 7,2 dans le bain devrait produire un pH d'environ 6,88 à l'intérieur du cartilage (Gray *et al.*, 1988). De manière similaire, un pH de 6,5 dans le bain devrait produire un pH autour de 6,15 (Gray *et al.*, 1988). Les protocoles expérimentés sont donc :

A) Disques de cartilage (perméabilisation/fixation puis coupe) : 1 disque contrôle réservé pour des coupes rectangulaires réalisées au Tissue Chopper, 1 disque contrôle réservé pour des coupes circulaires réalisées au Vibratome, 1 disque comprimé réservé pour des coupes rectangulaires réalisées au Tissue Chopper et 1 disque comprimé réservé pour des coupes circulaires réalisées au Vibratome.

1) Perméabilisation = 2 heures; fixation = 3 heures; pH = 6,5
2) Perméabilisation = 1 heure; fixation = 2 heures; pH = 6,5
3) Perméabilisation = 1 heure; fixation = 2 heures; pH = 7,2

B) Coupes de cartilage (coupe puis perméabilisation/fixation) : coupes rectangulaires réalisées au Tissue Chopper et coupes circulaires réalisées au Vibratome provenant de deux disques différents.

1) Perméabilisation = 40 minutes; fixation = 1 heure; pH = 6,5
2) Perméabilisation = 20 minutes; fixation = 30 minutes; pH = 6,5
3) Perméabilisation = 20 minutes; fixation = 30 minutes; pH = 7,2

Ces expérimentations ont mené aux observations présentées ci-dessous (figures A1.1 à A1.6). Il est important de noter que ces figures sont présentées à titre d'exemples seulement, car les observations ont été faites par examen visuel des coupes au microscope à épifluorescence et non des images digitales. C'est qu'il est essentiel, lors de la comparaison de deux échantillons, d'étudier des régions correspondantes afin de ne pas considérer les différences dérivant de l'hétérogénéité du tissu. Cependant, l'origine des images (zone superficielle, transitionnelle ou profonde) ne peut être précisée, car il y a eu un mauvais transfert d'informations avec le laboratoire de Suisse. De plus, sur les images, le contraste et l'intensité du marquage varient selon l'intensité du laser lors de la photographie ainsi que selon le traitement informatique (ajustement de la plage des couleurs par la fonction « equalize » des logiciels Northern Eclipse ou Scion Image).

1) La coupe des tranches circulaires à partir de disques non fixés est plus délicate que celle réalisée à partir de disques fixés. La distribution des protéoglycannes dans le cartilage articulaire mature suit un gradient avec la densité maximale près de l'os. C'est pourquoi les coupes non fixées ont tendance à s'enrouler sur elles-mêmes, surtout dans la zone profonde du cartilage. On ne peut utiliser ces coupes pour la microscopie en raison d'une simple question technique : les coupes enroulées ne peuvent être montées sur une lame et être observées au microscope avec un objectif à immersion. De plus, comme l'enroulement des coupes perturbe les cellules et leur environnement, le cytosquelette aussi pourrait être affecté.

2) Afin de vérifier que la structure comprimée des disques de cartilage est maintenue adéquatement, l'épaisseur des échantillons testés a été mesurée avant et après la compression. Ces mesures d'épaisseur ne sont toutefois pas concluantes car trop variables. Cependant, il a été noté que, lors de la décompression, un pas de seulement 5 µm est suffisant pour complètement retirer la charge du disque, indiquant une certaine stabilisation de la structure comprimée. Par contre, il a été observé que l'apparence globale des disques contrôles libres est différente de celle des disques expérimentaux fixés sous compression. Les disques libres ont une coloration homogène alors que les disques comprimés sont plus foncés en périphérie et plus pâles au centre. Les surfaces supérieures et inférieures des disques comprimés étant recouvertes, la diffusion des agents de perméabilisation et de fixation doit s'effectuer à travers le diamètre des disques. Cette diffusion peut être lente et aboutir à cette différence de coloration entre la périphérie et le centre. Il est donc probable que des différences structurales existent aussi entre ces deux régions. D'ailleurs, l'observation de coupes circulaires sectionnées après la fixation démontre des marquages de vimentine et de tubuline diffus et peu contrastés au centre des coupes comparativement à la périphérie, même pour les temps longs de perméabilisation/fixation. Cette différence semble également exister dans les disques libres, mais de façon beaucoup moins frappante (aucune image disponible).

Une solution pour pallier ce problème est d'utiliser des disques de 2 mm de diamètre, où le temps de diffusion jusqu'au centre est plus rapide. L'inconvénient de ces petits disques est qu'ils sont plus difficiles à couper en tranches minces pour la microscopie car plus difficiles à stabiliser dans l'agarose lors de l'utilisation du Tissue Chopper. Une autre possibilité est de conserver les disques de 3 mm de diamètre, mais de n'examiner que les cellules situées en périphérie.

3) Pour les disques de cartilage, les meilleurs résultats sont obtenus avec le protocole 2, soit avec les temps courts de perméabilisation et de fixation ainsi que le pH acide (figures A1.1 à A1.3). Les images obtenues à partir de ce protocole sont plus contrastées et les détails, plus précis, et ce, pour les trois types de filaments. Il est à noter cependant qu'une erreur a été commise dans la concentration de la solution pour bloquer l'autofluorescence. Pour les disques ayant subi le protocole 3, la concentration de $NaBH_4$ était de 2 mg/ml au lieu de 5 mg/ml. Cette erreur a dû affecter principalement le niveau d'autofluorescence des échantillons.

4) Concernant la comparaison des trois protocoles expérimentés sur des coupes de cartilage, les coupes circulaires générées à partir d'un disque étant peu nombreuses, les coupes rectangulaires ont été préférées. Ces dernières ont, de plus, l'avantage de contenir chacune l'épaisseur entière du cartilage articulaire. Les meilleurs résultats pour ces coupes rectangulaires sont obtenus avec le protocole 1, soit avec les temps longs de perméabilisation et de fixation et le pH acide (figures A1.4 à A1.6). Il y avait plus de cellules marquées dans la zone superficielle des coupes ayant subi le protocole 1 que dans celle des autres coupes. Toutefois, comme il n'y avait qu'un seul disque par protocole, il est possible que le disque utilisé pour le protocole 1 ait été en meilleure condition que les autres disques. Dans les autres zones, les résultats obtenus avec les protocoles 1 et 2 sont comparables. On pourrait croire que les protocoles 1 et 2 offrent en réalité des résultats similaires. Toutefois, le protocole 2 a l'avantage de nécessiter moins de temps à réaliser. En terminant, le protocole 3

produit des images de moins bonne qualité avec un niveau d'autofluorescence plus élevé et des détails moins précis. Ces échantillons ont cependant aussi été affectés par l'erreur de concentration en $NaBH_4$. Il est à noter que c'est le protocole 2 qui a été utilisé dans l'article 1 puisqu'au moment de l'expérimentation, seules les images avaient été observées, et non les coupes.

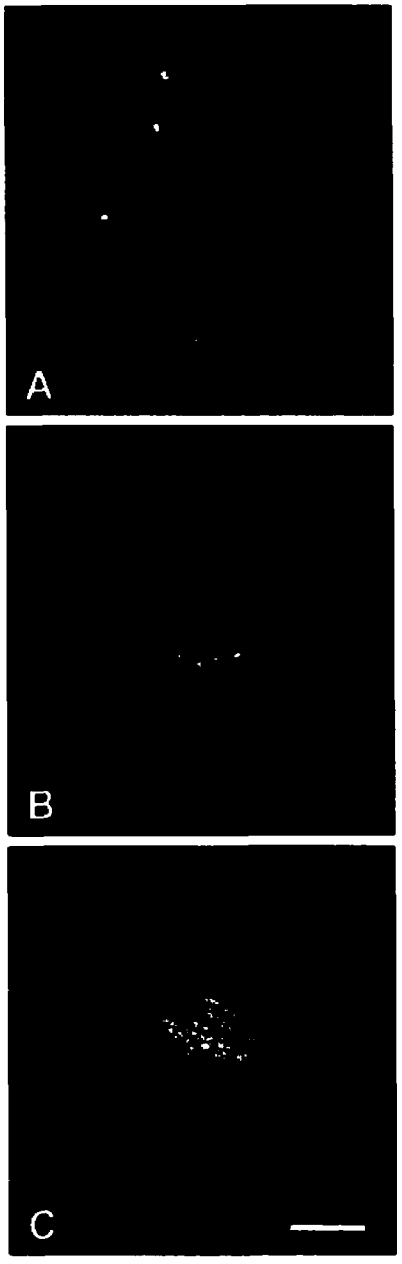

Figure A1.1 : Sections optiques provenant de trois disques de cartilage soumis au protocole 1 (A), 2 (B) ou 3 (C), puis marqués contre les microfilaments d'actine. Barre = 5 µm.

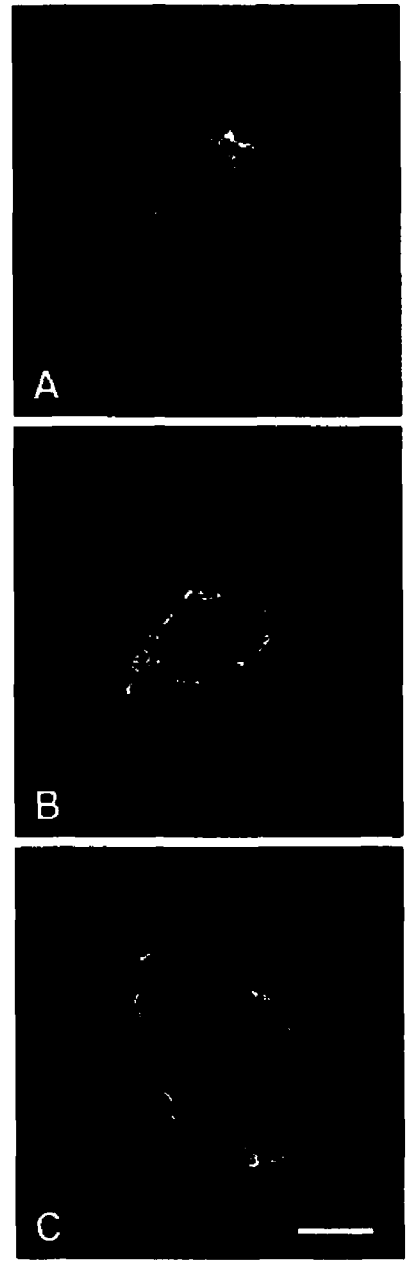

Figure A1.2 : Sections optiques provenant de trois disques de cartilage soumis au protocole 1 (A), 2 (B) ou 3 (C), puis marqués contre la β-tubuline. Barre = 5 μm.

Figure A1.3 : Sections optiques provenant de trois disques de cartilage soumis au protocole 1 (A), 2 (B) ou 3 (C), puis marqués contre la vimentine. Barre = 5 μm.

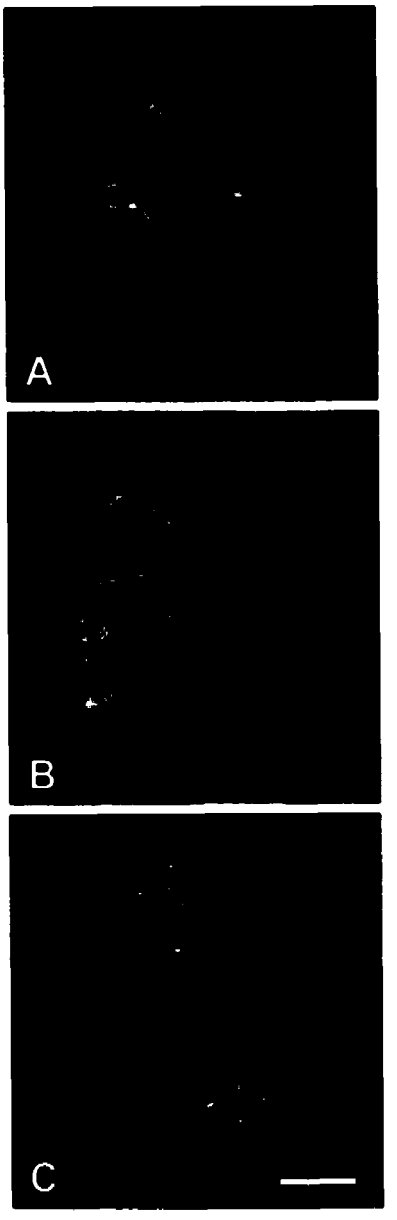

Figure A1.4 : Sections optiques provenant de trois coupes de cartilage soumises au protocole 1 (A), 2 (B) ou 3 (C), puis marquées contre les microfilaments d'actine. Barre = 5 μm.

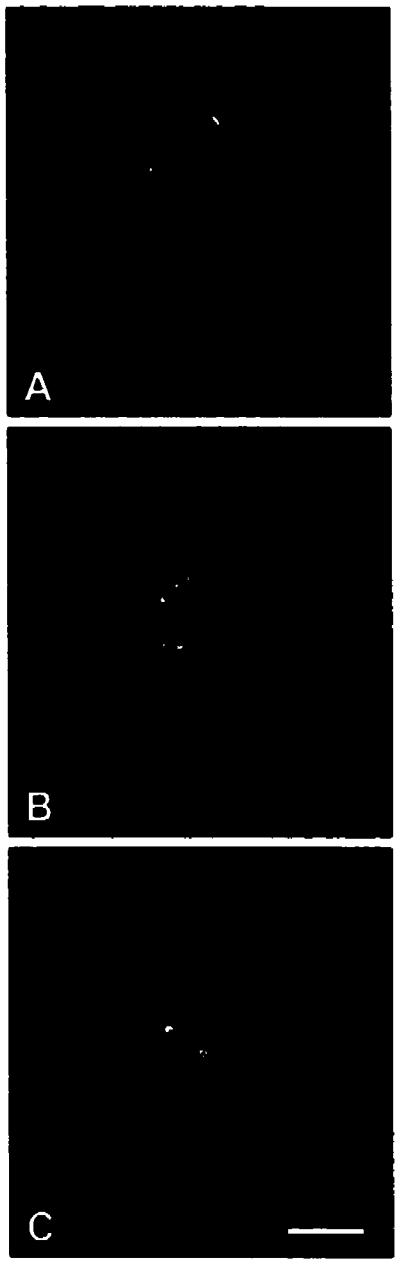

Figure A1.5 : Sections optiques provenant de trois coupes de cartilage soumises au protocole 1 (A), 2 (B) ou 3 (C), puis marquées contre la β-tubuline. Barre = 5 μm.

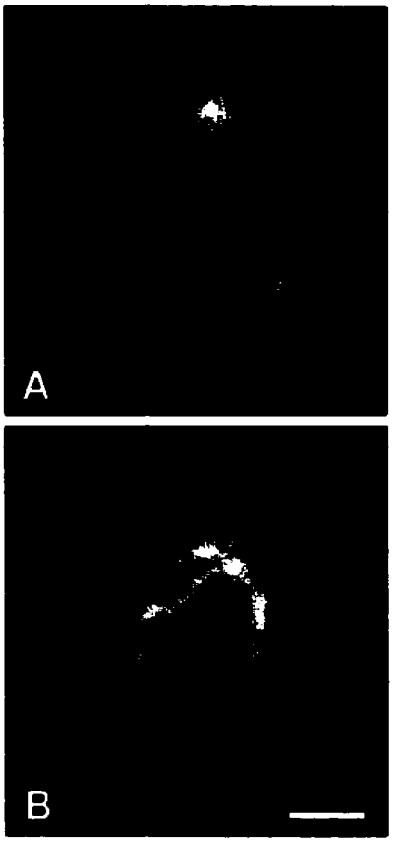

Figure A1.6 : Sections optiques provenant de deux coupes de cartilage soumises au protocole 1 (A) ou 3 (B), puis marquées contre la vimentine. Barre = 5 µm.

A1.2 La séquence digestion-blocage $NaBH_4$

Initialement, les échantillons étaient traités avec des enzymes pour la digestion des protéoglycannes, puis envoyés à *l'Institut M.E. Müller pour la biologie structurale* (Bâle, Suisse) où l'on effectuait le blocage de l'autofluorescence. Puisque l'efficacité du traitement $NaBH_4$ est directement dépendante du temps écoulé depuis le moment de la fixation, ce traitement devait être réalisé dans un très court délai, préférablement avant l'envoi en Suisse. Les coupes rectangulaires provenant du disque contrôle ayant subi le protocole 2 (section A1.1) ont été soumises à l'une des deux séquences suivantes : 1) la digestion suivie du traitement NaBH4; et 2) le traitement $NaBH_4$ suivi de la digestion. Il est à noter que toutes les coupes ont été fixées et traitées au $NaBH_4$ en même temps et que seule la digestion a été déplacée dans le temps.

La deuxième séquence donne réellement de meilleurs résultats. Le bruit de fond causé par l'autofluorescence est grandement diminué, et les détails sont beaucoup plus précis lorsque le blocage est effectué avant la digestion. Ainsi, le blocage de l'autofluorescence peut être réalisé immédiatement après la fixation, ce qui augmente l'efficacité du traitement.

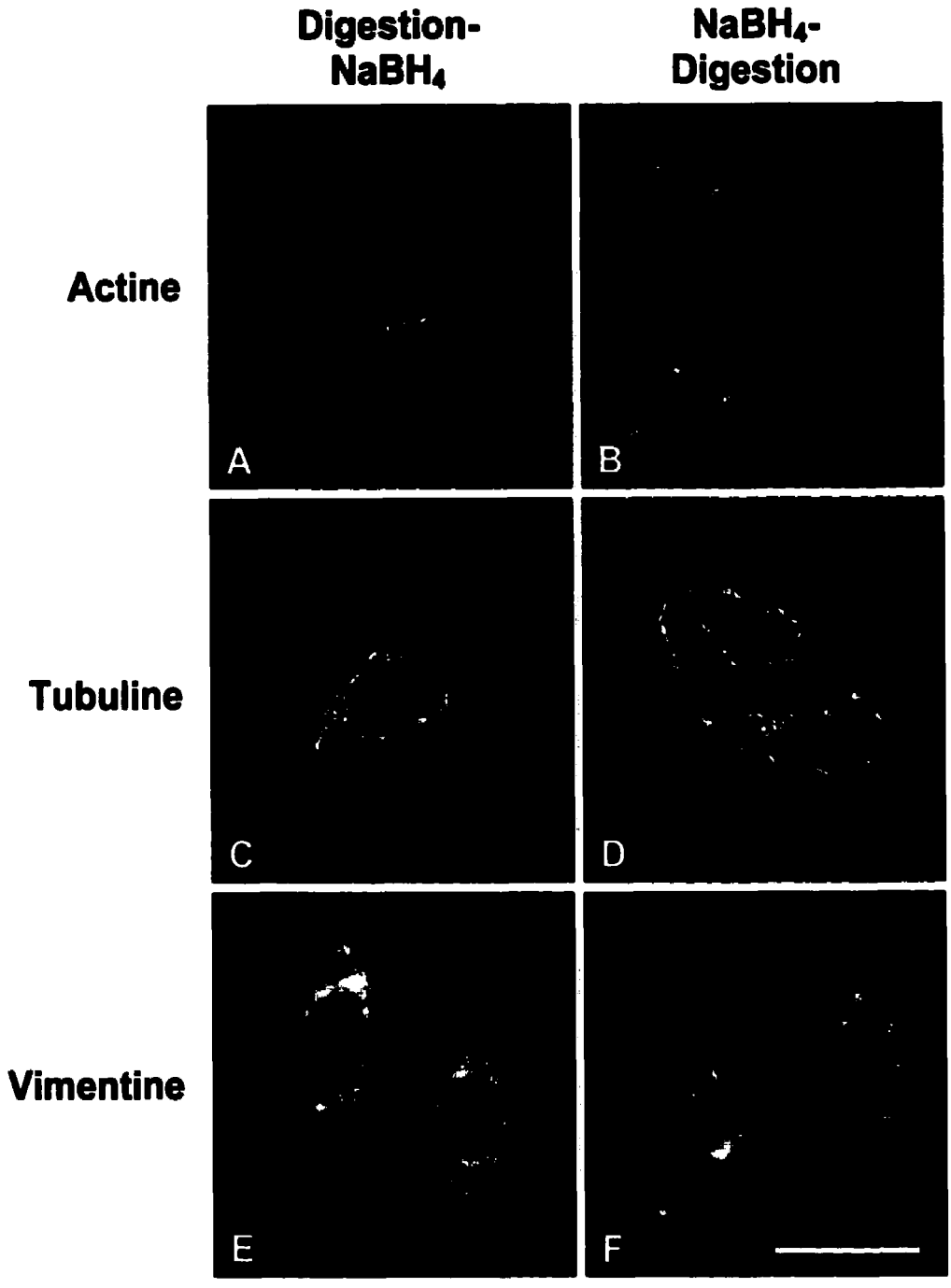

Figure A1.7 : Sections optiques provenant de deux disques de cartilage soumis à la séquence digestion-blocage $NaBH_4$ (A, C, E) ou blocage $NaBH_4$-digestion (B, D, F), puis marqués contre les microfilaments d'actine (A-B), la β-tubuline (C-D) ou la vimentine (E-F). Barre = 10 μm.

A1.3 La séquence fixation-coupe

Les essais présentés dans la section A1.1 n'ont pas permis de déterminer lequel des deux types d'échantillons, disque ou coupe, offrait une meilleure qualité d'image. C'est pourquoi nous avons repris l'expérience. Ici, chacun des deux protocoles 2 présentés en A1.1 (temps courts de perméabilisation/fixation et pH acide) ont été appliqués à un groupe de 4 échantillons.

En général, les coupes de cartilage (les disques ayant été coupés d'abord puis perméabilisés/fixés ensuite) semblent offrir des images moins diffuses, aux contours plus définis que les disques de cartilage (les disques ayant été perméabilisés/fixés d'abord, puis coupés ensuite). La différence entre les deux types d'échantillons est principalement visible pour l'actine. Des exemples d'images provenant de deux disques de cartilage sont présentés aux figures A1.8 à A1.10.

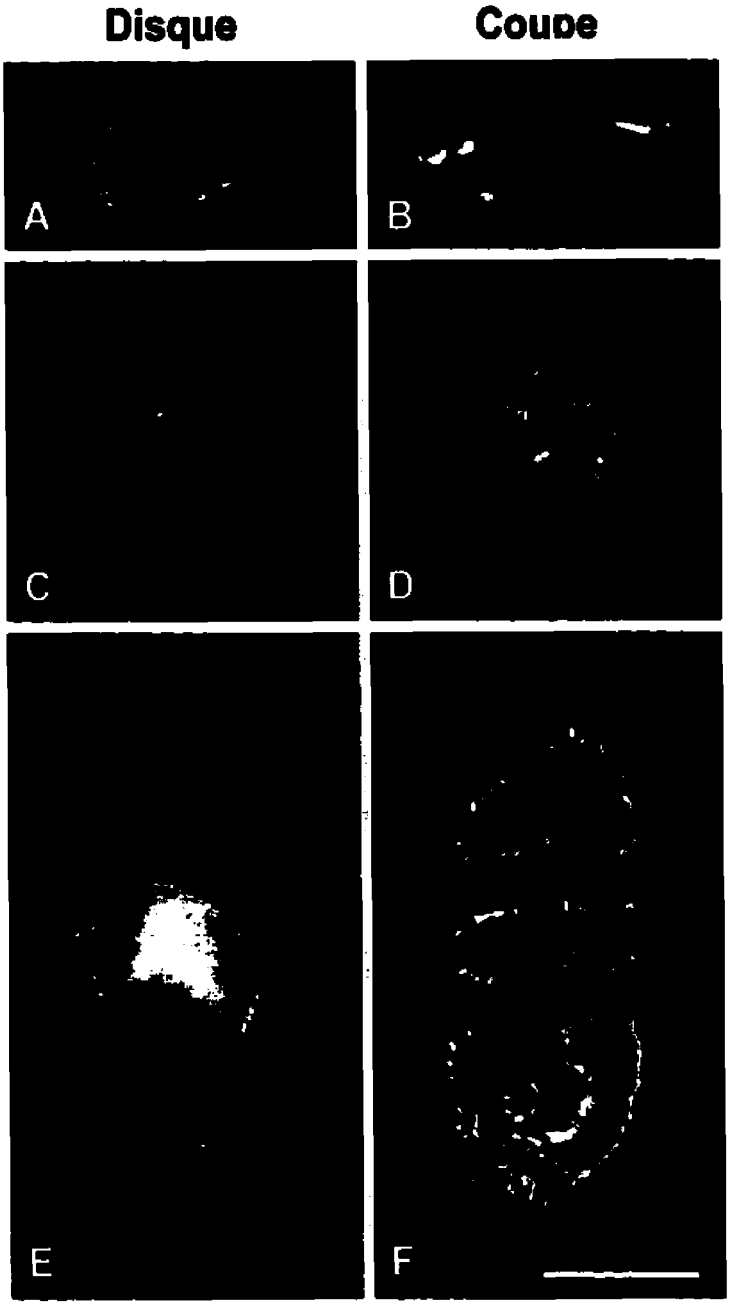

Figure A1.8 : Sections optiques provenant d'un disque de cartilage (A, C, E) et d'une coupe de cartilage (B, D, F) marqués contre l'actine dans les différentes zones : superficielle (A-B), transitionnelle (C-D) et profonde (E-F). Barre = 10 µm.

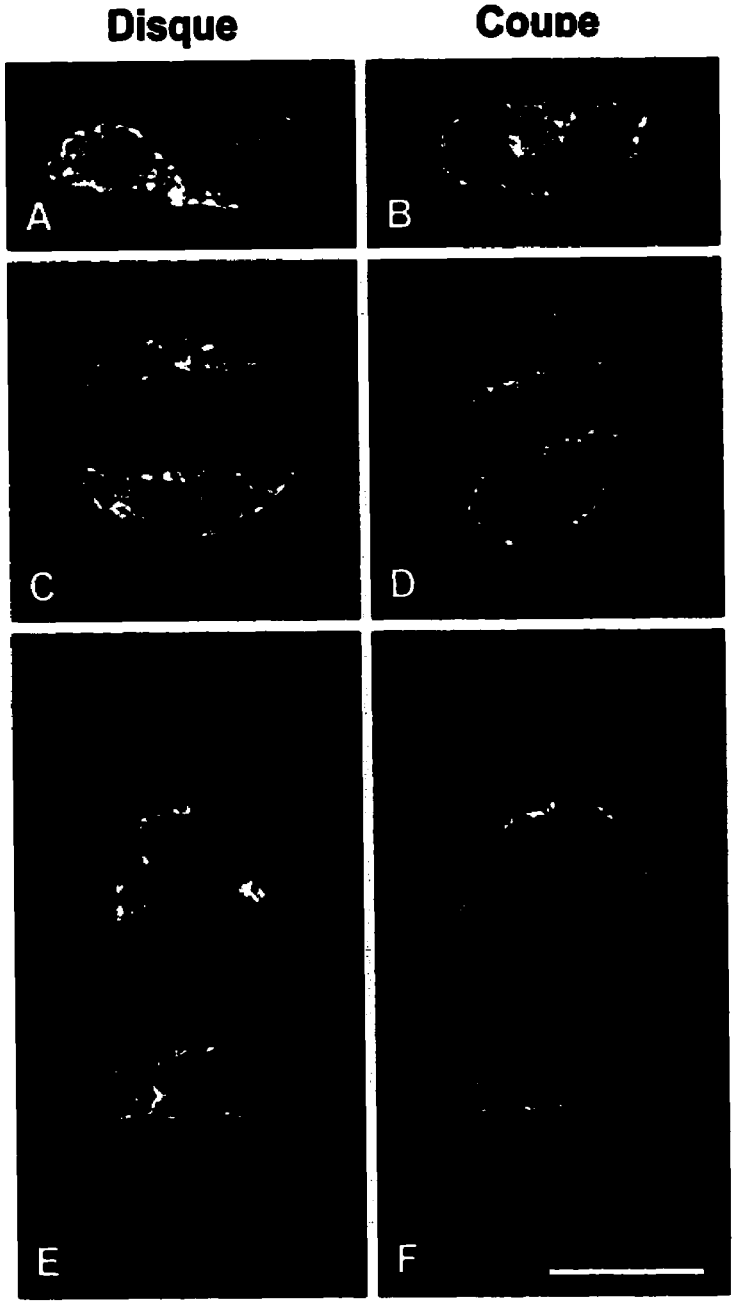

Figure A1.9 : Sections optiques provenant d'un disque de cartilage (A, C, E) et d'une coupe de cartilage (B, D, F) marqués contre la β-tubuline dans les différentes zones : superficielle (A-B), transitionnelle (C-D) et profonde (E-F). Barre = 10 μm.

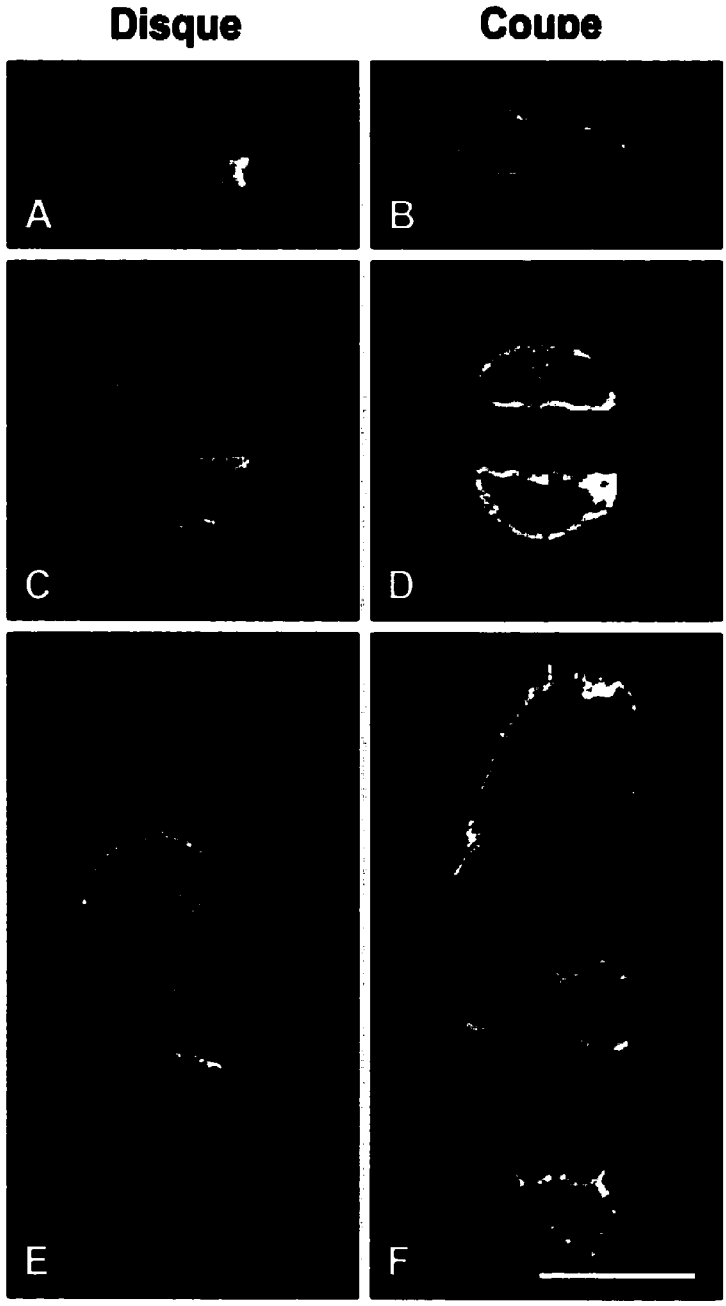

Figure A1.10 : Sections optiques provenant d'un disque de cartilage (A, C, E) et d'une coupe de cartilage (B, D, F) marqués contre la vimentine dans les différentes zones : superficielle (A-B), transitionnelle (C-D) et profonde (E-F). Barre = 10 μm.

A1.4 Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre doivent être interprétés avec prudence compte tenu du nombre restreint d'échantillons examinés dans la majorité des essais. Ils ont cependant permis d'affiner les techniques microscopiques.

Voici les points que nous retenons de ces expérimentations :

1) Pour l'observation de coupes circulaires, il est nécessaire que les disques de cartilage soient d'abord perméabilisés/fixés et ensuite coupés, les coupes non fixées s'enroulant sur elles-mêmes.
2) Les disques de 3 mm de diamètre fixés sous compression statique semblent démontrer des différences structurales entre le centre et la périphérie. Cette observation devrait être considérée lors de l'analyse des changements du cytosquelette à la suite de compressions statiques.
3) Les disques de cartilage perméabilisés/fixés d'abord et coupés ensuite offrent des images plus contrastées ainsi que des détails plus précis avec les temps courts de perméabilisation et de fixation et le pH légèrement acide.
4) Les coupes de cartilage offrent des images plus contrastées et des détails plus précis avec le pH légèrement acide.
5) Le niveau d'autofluorescence est plus bas lorsque les coupes sont d'abord traitées au $NaBH_4$ et ensuite digérées. Comme mentionné dans la section 4.3.5, le traitement $NaBH_4$ rendrait les protéines fixées plus flexibles par la réduction des liaisons doubles en liaisons simples des bases de Schiff (Willingham, 1983). Il est possible que la matrice extracellulaire plus souple favorise la digestion enzymatique en dégageant l'accès aux substrats et qu'elle facilite le transport des produits de la digestion.

ANNEXE II

A2. AUTRES RÉSULTATS – ÉTUDE DU CYTOSQUELETTE

Cette annexe contient les résultats préliminaires obtenus au cours de ce projet mais n'ayant pas été inclus dans l'article. Nous y présentons les résultats d'expérimentations portant sur les effets des compressions statique et dynamiques sur l'organisation du cytosquelette et la phosphorylation de la vimentine.

Il est à noter que très peu d'images sont disponibles pour ces essais. Pour la microscopie confocale, les coupes ont été préparées à Montréal et expédiées à *l'Institut M.E. Müller pour la biologie structurale* (Bâle, Suisse) pour le marquage et la prise d'images. Normalement, la technicienne (Rosmarie Sutterlin) devrait examiner les échantillons marqués au microscope à épifluorescence, puis tous les scanner au microscope confocal. Des images confocales n'ont cependant pas été prises pour tous les échantillons. Aussi, les conclusions tirées dans cette annexe sont-elles principalement basées sur les observations de la technicienne.

Un autre point à souligner est le fait que ces essais se sont déroulés simultanément avec ceux de la section A1.3. Par conséquent, la conclusion voulant que la séquence coupe-fixation soit préférable à la séquence fixation-coupe n'a pu être appliquée. Donc, dans la présente annexe, tous les échantillons ont d'abord été perméabilisés/fixés, et ensuite coupés.

A2.1 Les compressions statiques et dynamiques

L'objectif de ces essais était d'obtenir des images préliminaires du cytosquelette à la suite de l'application de compressions statiques et dynamiques. Les disques étaient

placés sous compression non confinée (un échantillon à la fois) à l'aide du MACH1™ présenté à la section A1.3. Pour chaque essai, nous avons utilisé une paire de disques composée d'un disque comprimé et d'un autre, non comprimé, qui servait de contrôle. Voici les trois protocoles expérimentés :

A) Compression statique[1]

1) Compression de 100 µm à 1 µm/s dans le milieu de culture - 1 heure
2) Rinçage - 5 minutes - HBSSm
3) Perméabilisation - 1 heure - 2 % Octyl Poe et 0,125 % glutaraldéhyde dans HBSSm
4) Rinçage - 5 minutes - HBSSm
5) Fixation - 2 heures - 1 % glutaraldéhyde dans HBSSm
6) Rinçage - 3 X 5 minutes - HBSSm
7) Décompression
8) Conservation à 4 °C - HBSSm

B) Compression dynamique à basse vitesse

1) Compression de 100 µm à 5 µm/s dans le milieu de culture
2) Décompression
3) Attente de 260 secondes

Répétition des étapes 1 à 3, 10 fois par jour pendant 3 jours[2]

4) Transfert du disque dans un cryotube rempli de HBSSm - 5 minutes
5) Perméabilisation - 1 heure - 2 % Octyl Poe et 0,125 % glutaraldéhyde dans HBSSm
6) Rinçage - 5 minutes - HBSSm
7) Fixation - 2 heures - 1 % glutaraldéhyde dans HBSSm

---

[1] Ces disques sont fixés sous compression statique afin de maintenir la structure comprimée pour la microscopie confocale.
[2] Entre les trois séries de compressions, ces disques sont conservés en culture.

8) Rinçage - 3 X 5 minutes - HBSSm
9) Conservation à 4 °C - HBSSm

C) Compression dynamique à haute vitesse
1) Compression de 250 µm à 100 µm/s dans le milieu de culture
2) Décompression
3) Attente de 30 secondes
Répétition des étapes 1 à 3, 40 fois
4) Transfert du disque dans un cryotube rempli de HBSSm - 5 minutes
5) Perméabilisation - 1 heure - 2 % Octyl Poe et 0,125 % glutaraldéhyde dans HBSSm
6) Rinçage - 5 minutes - HBSSm
7) Fixation - 2 heures - 1 % glutaraldéhyde dans HBSSm
8) Rinçage - 3 X 5 minutes – HBSSm
9) Conservation à 4 °C – HBSSm

Les disques étaient ensuite préparés pour la microscopie, c'est-à-dire coupés, traités contre l'autofluorescence, digérés puis marqués selon le protocole de l'article 1. Des essais de viabilité ont aussi été conduits sur les échantillons comprimés dynamiquement à haute vitesse, comme indiqué dans l'article 1.

Ces expérimentations ont mené aux observations suivantes (figures A2.1 et A2.2) :

1) Les trois réseaux de filaments sont présents dans tous les échantillons. Les compressions n'affectent donc pas le cytosquelette au point de le démanteler complètement.

2) Ce sont les compressions dynamiques à haute vitesse qui semblent modifier le plus l'organisation du cytosquelette. Le marquage d'actine est principalement diffus dans

cet échantillon. Il est à noter que des essais de viabilité ne démontrent aucun signe de mortalité cellulaire après l'application de ces compressions à haute vitesse.

3) Les essais de viabilité ne dévoilent aucune différence entre les échantillons comprimés et les échantillons contrôles.

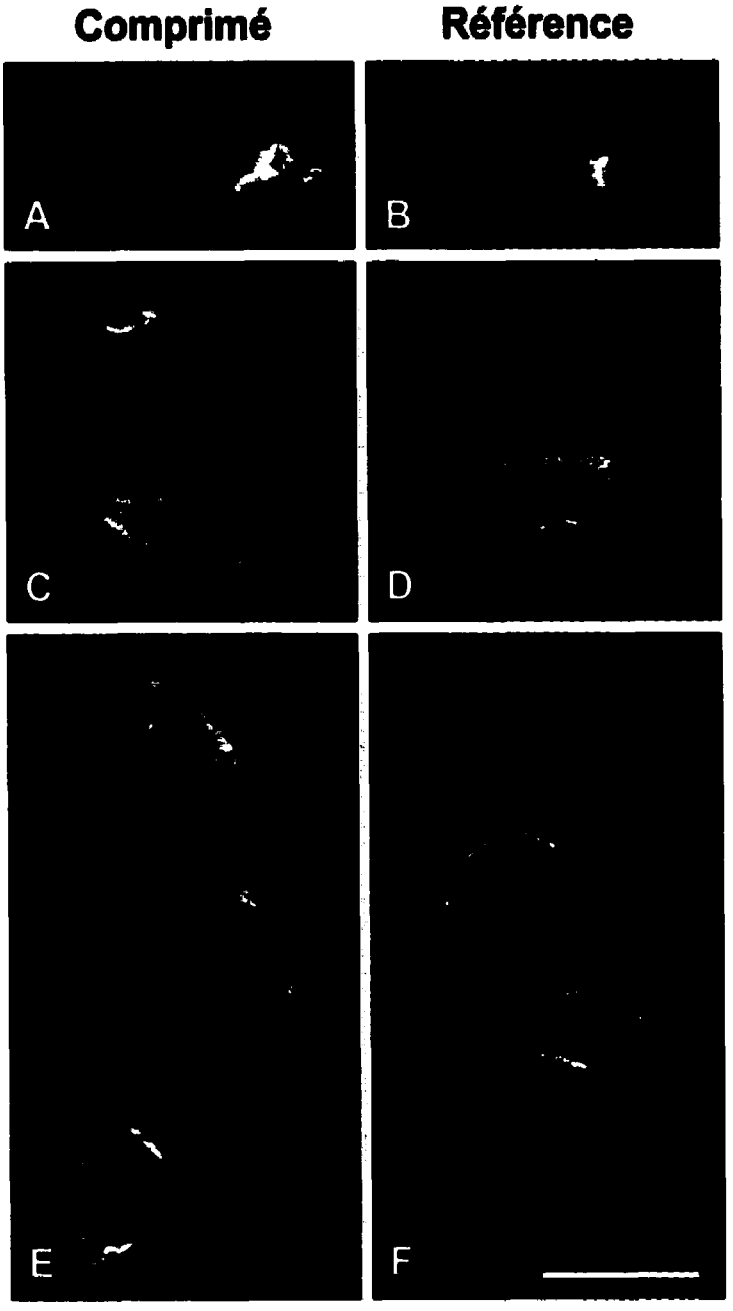

Figure A2.1 : Sections optiques de coupes provenant d'un disque de cartilage comprimé dynamiquement à haute vitesse (A, C, E) et d'un disque référence (B, D, F) marquées contre la vimentine dans les différentes zones : superficielle (A-B), transitionnelle (C-D) et profonde (E-F). Barre = 10 μm.

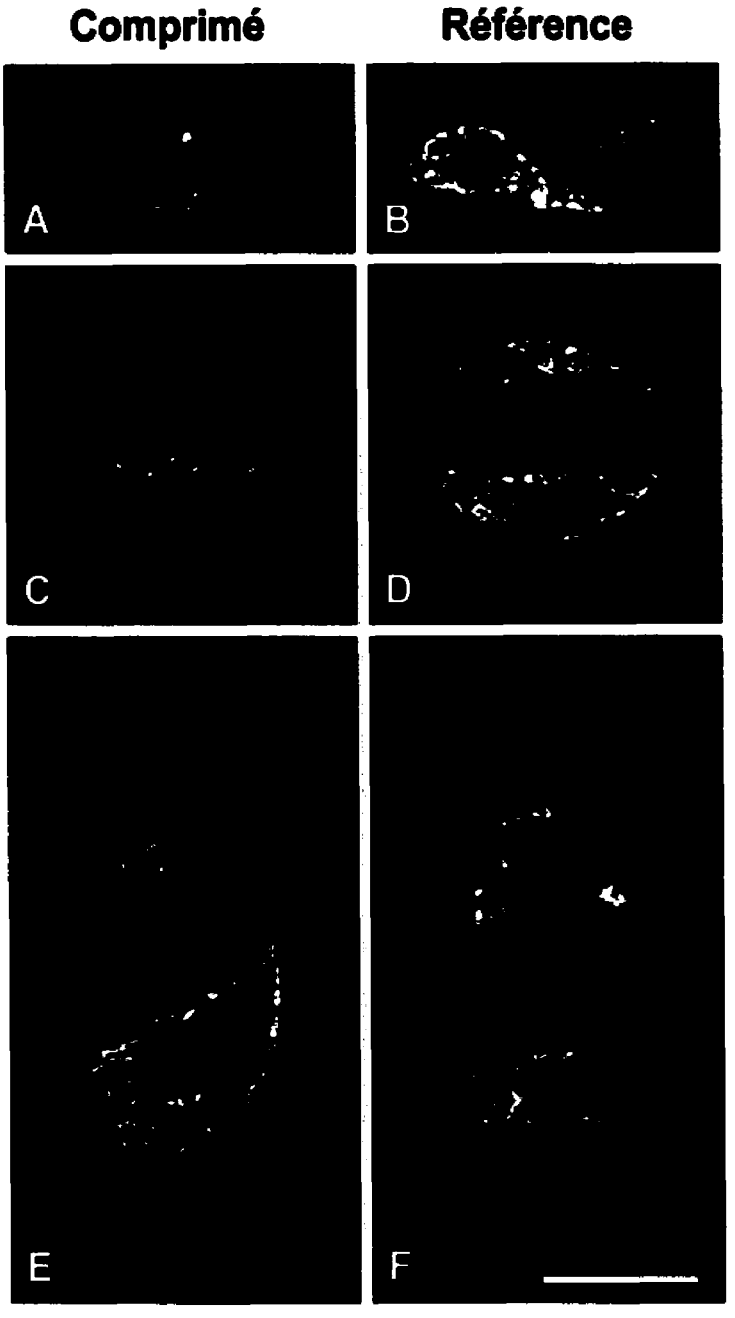

Figure A2.2 : Sections optiques de coupes provenant d'un disque de cartilage comprimé dynamiquement à haute vitesse (A, C, E) et d'un disque référence (B, D, F) marquées contre la β-tubuline dans les différentes zones : superficielle (A-B), transitionnelle (C-D) et profonde (E-F). Barre = 10 μm.

A2.2 La phosphorylation de la vimentine

Quoique les filaments intermédiaires furent considérés comme étant relativement stables comparativement aux microtubules et aux microfilaments, il est devenu de plus en plus évident que la phosphorylation de sites spécifiques des protéines de filaments intermédiaires altère dynamiquement leur structure filamenteuse. Ainsi, dans le but d'étudier la dynamique des filaments de vimentine, des anticorps spécifiques à un site et à un état de phosphorylation offerts par le Dr Inagaki ont été utilisés. L'anticorps 4A4 se lierait au site phosphorylé Ser55 de la vimentine, site phosphorylé spécifiquement par la kinase cdc2. De son côté, l'anticorps MO82 se lierait au site phosphorylé Ser82 de la vimentine, site phosphorylé spécifiquement par la kinase CaM II. La phosphorylation du site Ser55 est observée au début de la mitose dans plusieurs types de cellules alors que la phosphorylation du site Ser82 se produit lorsque la kinase est activée par la signalisation Ca^{++}. Pour plus d'information, le lecteur est invité à se référer à la revue de Inagaki *et al.* (1997).

Les échantillons étudiés consistaient en deux disques de référence et trois paires de disques comportant chacune un disque contrôle et un disque comprimé selon un des trois protocoles (statique, dynamique à basse vitesse, dynamique à haute vitesse).

La méthode utilisée pour le marquage des coupes est celle présentée dans l'article 1, avec les dilutions proposées par le Dr Inagaki. En résumé, les coupes ont été incubées avec l'anticorps primaire (4A4 dilué 1 :100; MO82 dilué 1 :100) pendant 4 heures, puis avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé au fluorochrome Cy2 pendant 4 autres heures.

L'examen des échantillons traités a mené aux observations suivantes (figures A2.3 et A2.4) :

1) Les coupes d'échantillons contrôles marquées avec l'anticorps 4A4 démontrent un marquage pâle et diffus dans les trois zones du cartilage. Des coupes provenant des mêmes échantillons, mais marquées cette fois contre la vimentine, démontrent l'organisation typique des filaments intermédiaires de vimentine. Pour cette raison, et en considérant que les tétramères libres de vimentine avaient été extraits lors de la perméabilisation, il est raisonnable de penser que l'anticorps 4A4 ne serait pas spécifique à la vimentine dans le cartilage articulaire bovin. Il est possible que le transport des anticorps entre le Japon et la Suisse ait affecter leur conformation.

2) Les coupes d'échantillons contrôles marquées avec l'anticorps MO82 dévoilent clairement, dans les zones superficielle et transitionnelle, une organisation similaire à celle observée pour les filaments intermédiaires. Cependant, aucun marquage n'a été observé dans la zone profonde. Dans le disque comprimé statiquement, le marquage est principalement présent dans la zone superficielle, alors que dans le disque comprimé dynamiquement à basse vitesse, le marquage s'aperçoit dans la zone transitionnelle seulement. Aucun marquage n'a été observé dans le disque soumis aux compressions dynamiques à haute vitesse. (Un résumé est présenté au tableau A2.1 où « + » et « - » indiquent la présence et l'absence de marquage respectivement.) Selon ces observations préliminaires, les compressions mécaniques pourraient modifier le niveau de phosphorylation du site Ser82 et donc moduler l'équilibre entre la phosphorylation par la kinase CaM II et la déphosphorylation.

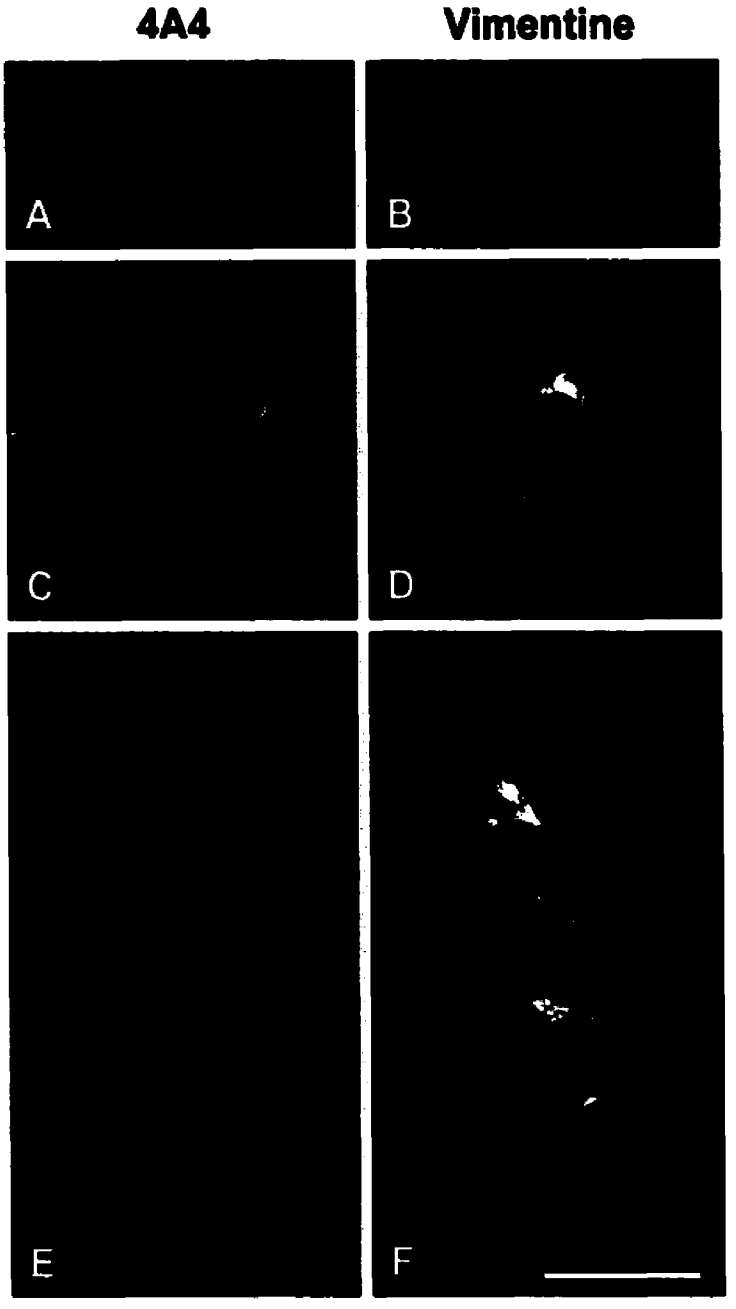

Figure A2.3 : Sections optiques de coupes provenant du même disque référence de cartilage marquées avec des anticorps dirigés contre la vimentine (B, D, F) et son site phosphorylé Ser55 (4A4) (A, C, E) dans les différentes zones : superficielle (A-B), transitionnelle (C-D) et profonde (E-F). Barre = 10 µm.

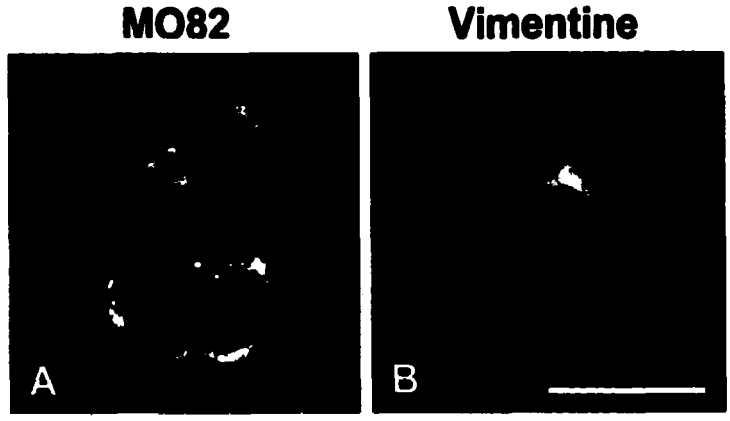

Figure A2.4 : Sections optiques de coupes provenant du même disque référence de cartilage marquées avec des anticorps dirigés contre la vimentine (B) et son site phosphorylé Ser82 (MO82) (A) dans la zone transitionnelle. Barre = 10 µm.

Tableau A2.1 : Distribution zonale du marquage observé avec l'anticorps MO82

	Contrôle	Compression statique	Compression dynamique basse vitesse	Compression dynamique haute vitesse
Zone superficielle	+	+	-	-
Zone transitionnelle	+	-	+	-
Zone profonde	-	-	-	-

A2.3 Conclusion

Les résultats présentés dans cette annexe invitent à poursuivre dans ces voies d'exploration. Toutefois, c'est avec prudence que nous devons interpréter ces résultats compte tenu du petit nombre d'échantillons examinés.

Voici les points à retenir de ces expérimentations :

1) À la suite des compressions statiques et dynamiques, les trois réseaux du cytosquelette sont toujours présents.
2) Les compressions dynamiques à haute vitesse semblent affecter l'organisation du cytosquelette de manière plus visible que les compressions statiques et dynamiques à basse vitesse.
3) La viabilité cellulaire ne semble pas affectée par les compressions dynamiques à haute vitesse.
4) L'anticorps 4A4 offert par le Dr Inagaki semble non spécifique à la vimentine dans le cartilage articulaire bovin.
5) Il semble que les compressions mécaniques puissent moduler l'équilibre entre la phosphorylation par la kinase CaM II et la déphosphorylation.

ANNEXE 3

A3. LE MONTAGE EXPÉRIMENTAL

Dans cette annexe, nous présentons le montage expérimental utilisé pour la réalisation des compressions mécaniques tant dans l'étude du cytosquelette des chondrocytes que dans l'étude du comportement mécanique du cartilage. Seront exposés, dans un premier temps, le montage mécanique et, dans un second temps, les programmes LabVIEW de contrôle et d'analyse.

A3.1 Le montage mécanique

Le MACH1™ de BioSynTech Ltée (figure A3.1) est un appareil destiné à la mesure de déformations et de contraintes. L'échantillon expérimental est positionné au centre de la chambre de compression et comprimé par la tige de compression lors du mouvement vertical de l'actuateur. Une cellule de charge fixant la tige de compression au bâti permet de mesurer la force appliquée à l'échantillon. Le contrôle en déplacement et l'acquisition des données sont réalisés par des programmes LabVIEW (section A3.2).

Nous avons conçu la chambre de compression afin maintenir le disque à comprimer dans un environnement physiologique (figure A3.2). Des compartiments ont donc été prévus pour recevoir une solution physiologique afin de baigner le disque (milieu de culture ou HBSS) ainsi que de l'eau afin d'humidifier la chambre par évaporation. Un couvercle s'ajoute à la chambre pour restreindre le volume d'air humide mais aussi pour diminuer les risques de contamination. Lorsque des essais stériles sont nécessaires, le disque est positionné à l'intérieur de la chambre sous le flux laminaire.

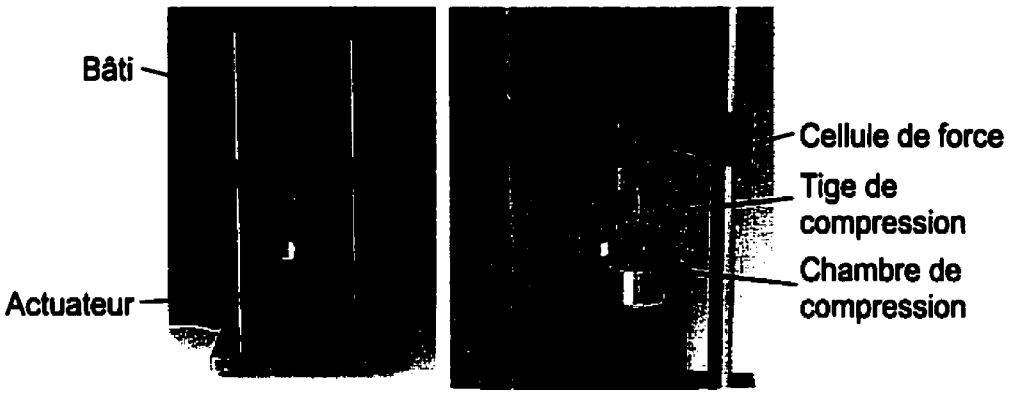

Figure A3.1 : Le MACH1™ de BioSynTech Lté

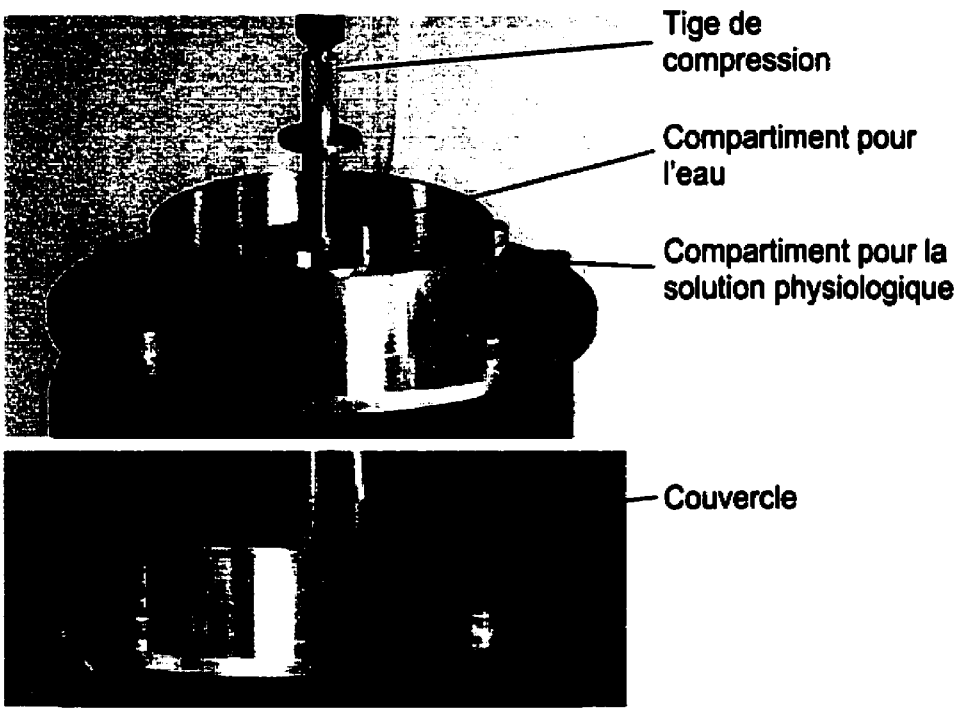

Figure A3.2 : La chambre de compression

La tige de compression utilisée lors des essais stériles comporte quatre sections particulières (figure A3.2). Tout en haut, une section filetée permet à la tige de se fixer à la cellule de force. Sous la section filetée, une section moletée indique à l'utilisateur où saisir la tige pour limiter la contamination et lui offre une meilleure prise. Un peu plus bas, une mince section de grand diamètre protège l'orifice du couvercle contre la chute de débris, principalement lors des manipulations de la tige. Finalement, tout en bas, une seconde section de grand diamètre offre une surface plus étendue pour faciliter le positionnement du disque de cartilage.

A3.2 Les programmes LabVIEW

Le contrôle en déplacement du MACH1 et l'acquisition des données sont réalisés à l'aide de deux programmes LabVIEW : « *Ramp-Release* » et Test de relaxation.

Nous avons conçu le programme « *Ramp-Release* » pour l'étude du cytosquelette (figure A3.3). Il permet d'exécuter des déformations statiques ou dynamiques sous forme de rampe (compression, attente, relâchement, attente) et d'acquérir les données de force, temps et position. À l'aide du panneau de contrôle, plusieurs paramètres peuvent être variés tels le nombre de cycles, les vitesses de déformation et les temps d'attente. Des graphes nous permettent de visualiser le déroulement de l'essai.

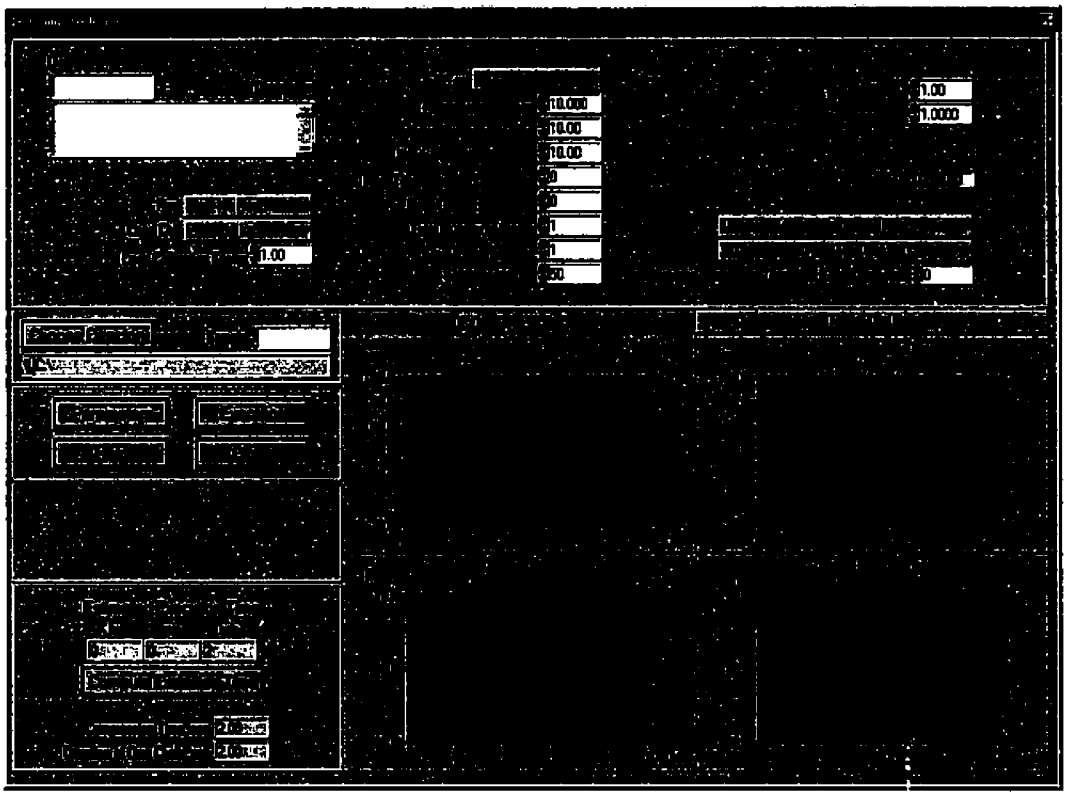

Figure A3.3 : Le panneau de contrôle du programme « *Ramp-Release* ».

De son côté, le programme Test de relaxation a été élaboré pour l'étude de la linéarité et de la dégradation du cartilage (figure A3.4). Il permet d'exécuter une série d'essais de relaxation de contraintes d'amplitude, de vitesse et de temps de relaxation variables, et d'acquérir les données de force, de temps et de position. De plus, ce programme gère les temps d'attente changeant entre chaque compression. Une fois l'exercice terminé, des graphes affichent les courbes de force et de position.

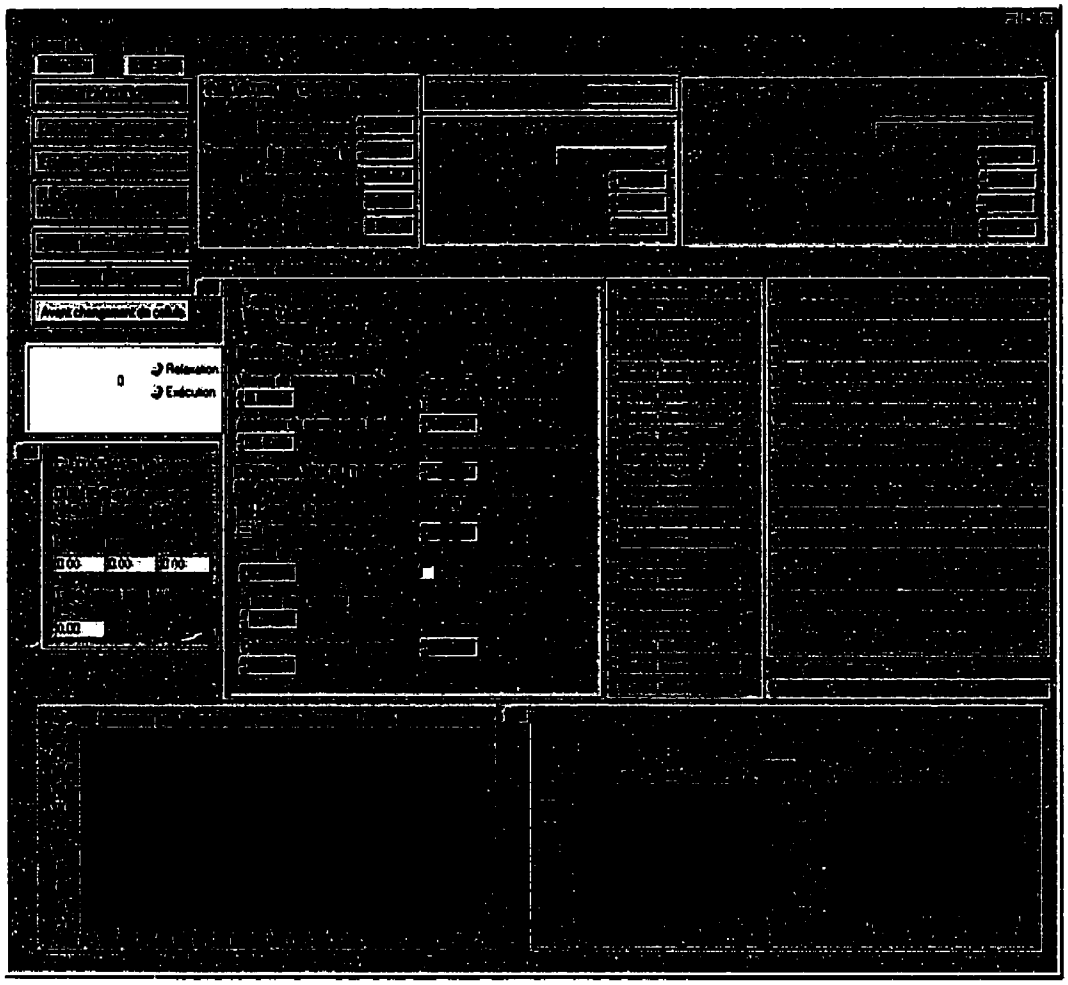

Figure A3.4 : Le panneau de contrôle du programme Test de relaxation.

Nous avons créé deux autres programmes LabVIEW pour visualiser, analyser et traiter les données acquises, soit « *Read Ramp* » et Comparaison.

Comme son nom l'indique, le programme « *Read Ramp* » (figure A3.5) lit les données obtenues avec le programme « *Ramp-Release* » lors de compressions statiques ou dynamiques. En plus d'afficher les courbes de force, de position et d'hystérésis, ce

programme peut soustraire les offsets de force et de position, convertir les données de grammes à mégapascals et sauvegarder les données modifiées.

Figure A3.5 : Le panneau de contrôle du programme « *Read Ramp* ».

Le programme Comparaison (figure A3.6), quant à lui, lit les données obtenues avec le programme Test de relaxation. Il permet l'étude de la linéarité par comparaison des différents essais de relaxation en superposant les courbes de force et en affichant les modules pointes et à l'équilibre. L'étude de la dégradation est rendue possible par la superposition des courbes de force et d'hystérésis des *compressions témoins* (voir section 9.2.2.2). Enfin, tout comme le programme « *Read Ramp* », le programme Comparaison peut soustraire les offsets, convertir et sauvegarder les données.

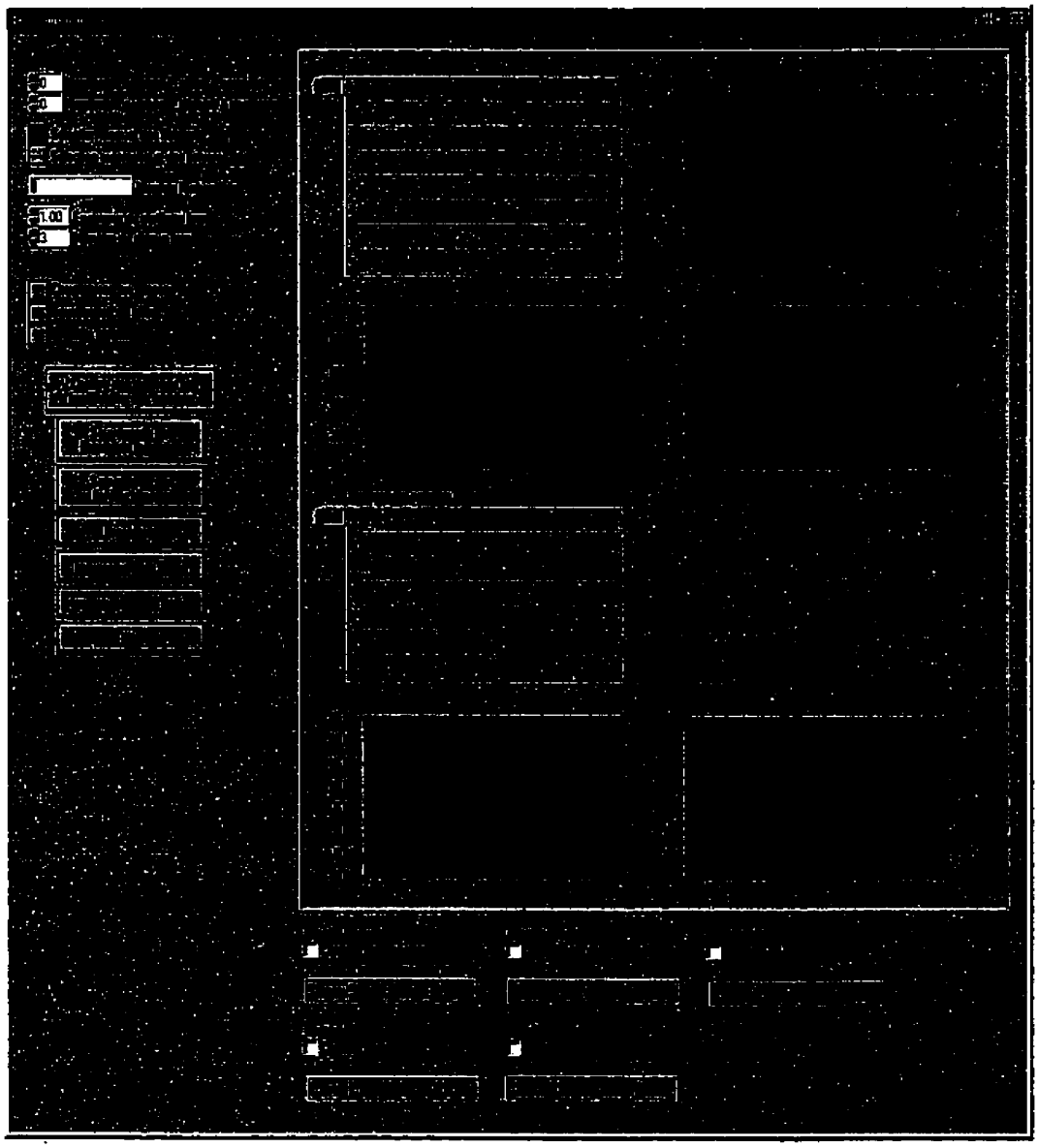

Figure A3.6 : Le panneau de contrôle du programme Comparaison.