

2m11.2838.7

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MODULATION DE LA SYNTHÈSE DU COLLAGÈNE TYPE II DANS LE
CARTILAGE PAR DES COMPRESSIONS MÉCANIQUES

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

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

OCTOBRE 2000

© Nicolas Tran-Khanh, 2000.



w

4

U58

2001

v.018

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Modulation de la synthèse du collagène type II dans le cartilage par des compressions
mécaniques

présenté par:

Nicolas Tran-Khanh

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

M. SHIRAZI-ADL Aboulfazl	président du jury
M. BUSCHMANN Michael	directeur de recherche
M. WU William	membre du jury

Mémoire accepté le 7 décembre 2000

Sommaire

Le cartilage articulaire est l'un des tissus corporels dont la dégénérescence mène à des douleurs chroniques. Le maintien de sa fonctionnalité dépend de l'intégrité de sa structure, qui est assurée par les chondrocytes, cellules du cartilage. Ces dernières utilisent, entre autres, les signaux mécaniques pour réguler leur activité métabolique. Peu de travaux ont réussi à éclaircir le rôle des stimulations mécaniques dans le contrôle de la synthèse du collagène type II, qui est une composante majeure du cartilage. Dans ce projet, nous avons tenté de vérifier si les compressions mécaniques, en configuration non confinée, peuvent moduler la synthèse du collagène type II dans des explants de cartilage articulaire bovin mature (un à deux ans), par le biais de facteurs physiques spécifiques.

Les compressions ont été effectuées à l'aide du montage MACH-1 (Biosyntech Canada Incorporée) combinée à une chambre à compressions multiples (*Quattro*) sur des explants cylindriques mis en culture pendant quelques jours. Ces explants comprenaient toute l'épaisseur du tissu, de la surface articulaire à la zone calcifiée, en plus d'inclure une couche de l'os subchondral. La première méthode utilisée pour évaluer le taux de synthèse du collagène type II fut le dosage de son propeptide C-terminal (CPII) par *RIA* et par *Western Blot*. La deuxième méthode fut la mesure d'incorporation de ^3H -proline par les comptes en scintillation du précipité NaCl (0.9M en milieu acide).

Les compressions statiques (déformation axiale de 25%) ont induit une augmentation du contenu en CPII dans le tissu, accompagnée d'une baisse dans le milieu de culture ; il semble que cette réponse soit associée à une baisse de diffusion ou à un mécanisme de rétention du CPII dans le tissu. L'incorporation de ^3H -proline en collagène type II nouvellement synthétisé a été diminuée dans le tissu comme dans le milieu de culture, proposant une baisse de synthèse. Les compressions dynamiques (déformation axiale de 25 %) en dent de scie ont induit une augmentation du contenu en CPII dans le tissu et dans le milieu de culture ; cette réponse suggère la hausse du

taux de synthèse du collagène type II. Cependant, cette hausse de synthèse n'est pas reflétée par l'incorporation de ^3H -proline en collagène type II ; en fait, les compressions à vitesse rapide ne démontre aucune modulation alors que celles à vitesse moyenne suggèrent une baisse de synthèse.

Les résultats contradictoires obtenus par les deux méthodes (CPII vs ^3H -proline) pointent vers des artefacts potentiels. Par exemple, les compressions mécaniques peuvent induire des bris structuraux du cartilage, facilitant l'extraction du CPII présent dans le tissu (hausse reliée à l'extraction et non à une augmentation de synthèse). Elles peuvent aussi diminuer l'accessibilité de la ^3H -proline par les cellules (baisse d'incorporation de ^3H -proline qui n'est pas nécessairement reliée à une baisse de synthèse). Il est aussi possible que ces résultats soient le reflet de mécanismes de régulation complexes.

La tentative de localiser les modulations de CPII pour les comparer aux prédictions du modèle composite biphasique (dans le but de déterminer les facteurs physiques impliqués) est particulièrement difficile ; le CPII semble diffuser facilement dans le tissu et les conditions expérimentales ne concordent pas très bien avec les conditions supposées dans le modèle.

Différents résultats complémentaires ont été obtenus au cours de ce projet afin de mieux comprendre la synthèse du collagène type II dans notre système d'explants, et dévoilent la complexité de sa régulation. Certains de ces résultats proposent des mécanismes intéressants, qui ne sont toutefois pas en rapport avec les stimulations mécaniques.

La modulation de la synthèse du collagène type II par les compressions mécaniques n'est pas encore clairement démontrée. L'utilisation de cartilage articulaire immature, mis en culture en présence de FBS, semble être la voie à suivre pour augmenter les possibilités d'induire des réponses observables.

Table des matières

Sommaire.....	iv
Table des matières	vi
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des abréviations.....	xvi
Remerciements.....	xviii
Introduction	1
Chapitre 1 : Le cartilage articulaire	4
<i>1.1 Anatomie du cartilage articulaire</i>	<i>4</i>
<i>1.2 La matrice extracellulaire</i>	<i>6</i>
1.2.1 Les collagènes du cartilage.....	8
1.2.2 Les protéoglycanes	12
1.2.3 Les autres composantes de la MEC.....	14
<i>1.3 Le chondron.....</i>	<i>14</i>
Chapitre 2 : La synthèse du collagène de type II.....	15
2.1 <i>Formes de COLII</i>	<i>15</i>
2.2 <i>Traduction et trimérisation</i>	<i>15</i>
2.3 <i>Sécrétion et assemblage dans la MEC</i>	<i>17</i>

2.4 CPII	19
2.5 HSP47.....	20
Chapitre 3 : Revue de la littérature sur l'effet des stimulations mécaniques	22
3.1 Études animales <i>in vivo</i> et observations cliniques	22
3.2 Systèmes d'explants	23
3.3 Cellules en suspension.....	25
3.4 Culture de cellules en monocouches	25
Chapitre 4 : Design et modélisation pour les compressions mécaniques non confinées	27
4.1 Chambre à compression.....	28
4.2 Prédications du modèle biphasique composite	30
4.3 Sommaire du chapitre.....	42
Chapitre 5 : Le système d'explants cartilage/os : méthodes et analyses préliminaires du CPII	43
5.1 Méthodes utilisées	44
5.1.1 Isolation et culture des explants	44
5.1.2 Extraction des protéines avec la chlorure de guanidine	45
5.1.3 Dialyse et précipitation à l'éthanol.....	46
5.1.4 RIA	46
5.1.5 Immunofluorescence	47
5.1.6 SDS-PAGE.....	49
5.2 Paires expérimentales	50
5.2.1 Variabilité du contenu en CPII.....	51
5.2.2 CPII dans le milieu de culture	53
5.3 Effet de la condition scorbutique.....	55

5.4 Détection de HSP47	59
5.5 Effet d'EDTA	62
5.6 Sommaire du chapitre.....	64
Chapitre 6 : Compressions mécaniques et CPII.....	66
6.1 Compressions dynamiques et CPII : protocoles dynamiques I, II et III	66
6.2 Compressions statiques et CPII : protocoles statiques I, II et III	68
6.3 Distribution radiale et ajout de β -APN : protocoles dynamique V et statique IV	70
6.4 Viabilité	74
6.5 Sommaire du chapitre.....	75
Chapitre 7 : Incorporation de ^3H-proline	78
7.1 Une journée avec les conditions de culture différentes.....	80
7.1.1 Autoradiogramme des extraits GuCl	81
7.1.2 Autoradiogramme des milieux de culture	83
7.1.3 Digestions à la pepsine	86
7.2 Plusieurs jours avec les conditions de culture différentes	88
7.2.1 Autoradiogramme de extraits GuCl	88
7.2.2 Autoradiogramme des milieux de culture	90
7.3 Sommaire du chapitre.....	91
Chapitre 8 : Effets du FBS sur la synthèse du collagène type II.....	93
8.1 FBS et incorporation de ^3H -proline	94
8.1.1 Digestion à la collagénase	95
8.1.2 Digestion à la pepsine.....	99
8.1.3 Précipitations au NaCl.....	101
8.2 FBS et CPII.....	103

8.3 FBS et ARNm du collagène type II, de l'aggrécane et de GAPDH.....	105
8.4 Sommaire du chapitre.....	106
Chapitre 9 : Compressions mécaniques et incorporation de ³H-proline.....	109
9.1 Compressions dynamiques et incorporation de ³ H-Proline.....	109
9.1.1 Protocole dynamique VI.....	111
9.1.2 Protocole dynamique VII.....	112
9.1.3 Protocole dynamique VIII.....	114
9.2 Compression statique IV et incorporation de ³ H-Proline.....	114
9.3 Protocole dynamique VII et incorporation de ³⁵ S-méthionine.....	115
9.4 Compressions et GAG dans le milieu de compression.....	116
9.5 Sommaire du chapitre.....	117
Conclusion.....	122
Références.....	130
Annexe I : Exemple de calcul du poids moléculaire d'une protéine à partir de la séquence en acides aminés, à l'aide du logiciel <i>Mathematica</i>.....	147
Annexe II : Dessin d'assemblage de <i>Quattro</i>.....	148
Annexe III : Expressions du modèle composite biphasique dans le domaine de Laplace (Soulhat J. et al., 1999).....	149
Annexe IV : Protocole du RIA de CPII.....	150
Annexe V : Protocole d'extraction pour l'essai multivalent.....	155
Annexe VI : Protocole d'immunofluorescence pour les cryosections.....	159

Liste des tableaux

TABLEAU 1-I : QUANTITÉS RELATIVES DES COLLAGÈNES DU CARTILAGE ARTICULAIRE (RÉSUMÉ PAR DIAB M. ET AL., 1996).....	8
TABLEAU 4-I : COMPARAISON DE LA CHAMBRE INITIALE ET DE <i>QUATTRO</i>	29
TABLEAU 4-II : EXPRESSIONS DES PARAMÈTRES PHYSIQUES DU MODÈLE ASSOCIÉS AU DÉPLACEMENT AXIAL EN DENT DE SCIE, POUR $0 \leq T \leq T_0$	33
TABLEAU 4-III : EXPRESSIONS DES PARAMÈTRES PHYSIQUES DU MODÈLE ASSOCIÉS AU DÉPLACEMENT AXIAL EN DENT DE SCIE, POUR $T_0 \leq T \leq 2T_0$	34
TABLEAU 4-IV : EXPRESSIONS DES PARAMÈTRES PHYSIQUES DU MODÈLE ASSOCIÉS AU DÉPLACEMENT AXIAL EN DENT DE SCIE, POUR $2T_0 \leq T$	35
TABLEAU 4-V : PARAMÈTRES UTILISÉS DANS LES ÉQUATIONS POUR LA MODÉLISATION	36
TABLEAU 6-I : PARAMÈTRES DES PROTOCOLES DYNAMIQUES UTILISÉS POUR COMPARAISON DES CONTENUS EN CPII	66
TABLEAU 6-II : PARAMÈTRES DES PROTOCOLES STATIQUES UTILISÉS POUR COMPARAISON DES CONTENUS EN CPII	69
TABLEAU 7-I : EFFETS PRÉDITS DES DIFFÉRENTES CONDITIONS DE CULTURE	80
TABLEAU 7-II : CONDITIONS DE CULTURE DES ÉCHANTILLONS DES AUTORADIOGRAMMES DES FIGURES 7.1 ET 7.2	82
TABLEAU 7-III : CONDITIONS DE CULTURE DES ÉCHANTILLONS DES AUTORADIOGRAMMES DES FIGURES 7.6 ET 7.7	89
TABLEAU 9-I : PARAMÈTRES DES PROTOCOLES DYNAMIQUES UTILISÉS LORS DE L'INCORPORATION DE ^3H -PROLINE	110
TABLEAU 9-II : PARAMÈTRES DU PROTOCOLE STATIQUE UTILISÉ LORS DE L'INCORPORATION DE ^3H -PROLINE	114

Liste des figures

CHAPITRE 1

FIGURE 1.1 : FORMATION DU CARTILAGE ARTICULAIRE PENDANT LA CROISSANCE.....	5
FIGURE 1.2 : ZONES DU CARTILAGE ARTICULAIRE MATURE, SELON LA PROFONDEUR (MODIFIÉE DE AYDELOTTE M.B. ET KUETTNER K.E., 1993)	6
FIGURE 1.3: FIBRILLE DE COLLAGÈNE DU CARTILAGE ARTICULAIRE (MODIFIÉE DE BRUCKNER P. ET VAN DER REST M., 1994)	9
FIGURE 1.4 : AGGRÉGAT DE PROTÉOGLYCANES (MODIFIÉE DE ALBERTS B. ET AL., 1989)	13

CHAPITRE 2

FIGURE 2.1 : MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES ET TRIMÉRISATION DU PROCOLLAGÈNE FIBRILLAIRE (MCLAUGHLIN S.H. ET BULLEID N.J., 1998).....	16
FIGURE 2.2 : LE TROPOCOLLAGÈNE ET LES PROPEPTIDES, TYPE I (MODIFIÉE DE LINSENMYER T.F., 1991)	18
FIGURE 2.3 : FORMATION DE LIAISONS COVALENTES ENTRE LES TÉLOPEPTIDES DES MOLÉCULES DE TROPOCOLLAGÈNE (BAILEY A.J. ET PAUL R.G., 1997)	19
FIGURE 2.4 : FONCTIONS POSSIBLES DE HSP47 (NAGATA K., 1998)	21

CHAPITRE 4

FIGURE 4.1 : SCHÉMA DE LA CONFIGURATION D'UNE COMPRESSION NON CONFINÉE.....	27
FIGURE 4.2 : SURFACES DU DISQUE PERMETTANT LA DIFFUSION DES MOLÉCULES, SELON L'ORIENTATION DE LA SURFACE ARTICULAIRE : (A) CONFIGURATION UTILISÉE ET (B) CONFIGURATION À ÉVITER.....	28
FIGURE 4.3 : GRAPHIQUE DE LA DÉFORMATION AXIALE EN FONCTION DU TEMPS D'UNE COMPRESSION EN DENT DE SCIE	31
FIGURE 4.4 : MODÉLISATION DE LA PRESSION À LA SURFACE À $T = T_0$, POUR DIFFÉRENTS TEMPS DE MONTÉE (PARAMÈTRES DU TABLEAU 4-V, ÉQUATION 4 DU TABLEAU 4-II)	37

FIGURE 4.5 : MODÉLISATION DE LA DISTRIBUTION RADIALE DE LA PRESSION RELATIVE DU FLUIDE À $T = T_0$, POUR DIFFÉRENTS TEMPS DE MONTÉE (PARAMÈTRES DU TABLEAU 4-V, ÉQUATION 8 DU TABLEAU 4-II).....	38
FIGURE 4.6 : MODÉLISATION DE LA DISTRIBUTION RADIALE DE LA VITESSE RELATIVE DU FLUIDE À $T = T_0$, POUR DIFFÉRENTS TEMPS DE MONTÉE (PARAMÈTRES DU TABLEAU 4-V, ÉQUATION 9 DU TABLEAU 4-II)	39
FIGURE 4.7 : ZOOM DE LA MODÉLISATION DE LA DISTRIBUTION RADIALE DE LA VITESSE RELATIVE DU FLUIDE À $T = T_0$, POUR DIFFÉRENTS TEMPS DE MONTÉE (PARAMÈTRES DU TABLEAU 4-V, ÉQUATION 9 DU TABLEAU 4-II).....	39
FIGURE 4.8 : MODÉLISATION DE LA DISTRIBUTION RADIALE DU DÉPLACEMENT RADIAL À $T = T_0$, POUR DIFFÉRENTS TEMPS DE MONTÉE (PARAMÈTRES DU TABLEAU 4-V, ÉQUATION 5 DU TABLEAU 4-II).....	40
FIGURE 4.9 : MODÉLISATION DE LA DISTRIBUTION RADIALE DE LA DÉFORMATION RADIALE À $T = T_0$, POUR DIFFÉRENTS TEMPS DE MONTÉE (PARAMÈTRES DU TABLEAU 4-V, ÉQUATION 6 DU TABLEAU 4-II).....	40
FIGURE 4.10 : MODÉLISATION DE LA DISTRIBUTION RADIALE DE LA DÉFORMATION CIRCONFÉRENTIELLE À $T = T_0$, POUR DIFFÉRENTS TEMPS DE MONTÉE (PARAMÈTRES DU TABLEAU 4-V, ÉQUATION 7 DU TABLEAU 4-II).....	41

CHAPITRE 5

FIGURE 5.1 : COURBE STANDARD TYPIQUE DU RIA ANTI-CPII	47
FIGURE 5.2 : IMMUNOFLUORESCENCE ANTI-CPII : PROBLÈME DE FIXATION	48
FIGURE 5.3 : MOYENNE (ET DÉVIATION STANDARD) DU CONTENU EN CPII DES DISQUES FRAIS ET CULTIVÉS PENDANT CINQ JOURS.....	52
FIGURE 5.4 : CONTENU EN CPII RELÂCHÉ DANS LE MILIEU DE CULTURE EN FONCTION DU CPII EXTRAIT DU TISSU	53
FIGURE 5.5 : CONTENU EN CPII DANS LE MILIEU DE CULTURE : PRÉSENCE ET ABSENCE D'ACIDE ASCORBIQUE.....	56
FIGURE 5.6 : IMMUNOFLUORESCENCE DU CPII D'UNE COUPE DE 8 μM , CULTIVÉ EN PRÉSENCE (A) OU EN ABSENCE (B) D'ACIDE ASCORBIQUE PENDANT DEUX JOURS ..	57

FIGURE 5.7 : <i>WESTERN BLOT</i> DU MILIEU DE CULTURE ET DE L'EXTRAIT GUCL : PRÉSENCE ET ABSENCE D'ACIDE ASCORBIQUE.....	58
FIGURE 5.8 : IMMUNOFLUORESCENCE ANTI-HSP47, ANTI-CPII ET MARQUAGE NUCLEAIRE HOESCHT : CHOC THERMIQUE ET CONTRÔLE (IMAGE <i>EQUALIZED</i> ET <i>EMBOSSSED</i>).....	60
FIGURE 5.9 : <i>WESTERN BLOT</i> ANTI-HSP47 DES EXTRAITS RIPA ET COMPARAISON AVEC LE <i>WESTERN BLOT</i> ANTI-CPII DES EXTRAITS GUCL : DIFFÉRENTES CONDITIONS DE CULTURE	61
FIGURE 5.10 : <i>WESTERN BLOT</i> DU MILIEU DE CULTURE, DE L'EXTRAIT GUCL ET DE L'EXTRAIT RIPA : EFFET DE LA PRÉSENCE D'EDTA PENDANT LA CULTURE	63

CHAPITRE 6

FIGURE 6.1 : MOYENNE (ET DÉVIATION STANDARD) DES RATIOS DE CPII (DYNAMIQUE/CONTRÔLE).....	67
FIGURE 6.2 : MOYENNE (ET DÉVIATION STANDARD) DES RATIOS DE CPII (STATIQUE/CONTRÔLE).....	70
FIGURE 6.3 : MOYENNE (ET DÉVIATIONS STANDARD) DES RATIOS DE CPII (STIMULÉS/CONTRÔLE) ; DÉPENDANCE RADIALE ET AJOUT DE β -APN	72
FIGURE 6.4 : <i>WESTERN BLOT</i> ANTI-CPII DES MILIEUX DE CULTURE (POOLÉS, N = 4) DES PROTOCOLES STATIQUE IV ET DYNAMIQUE V : ABSENCE ET PRÉSENCE DE β -APN, AVANT ET PENDANT LES COMPRESSIONS.....	73
FIGURE 6.5 : QUANTITÉS RELATIVES DU CONTENU EN CPII : CENTRE ET PÉRIPHÉRIE ...	74

CHAPITRE 7

FIGURE 7.1 : AUTORADIOGRAMME DES EXTRAITS GUCL (MARQUAGE À LA ^3H -PROLINE) : DIFFÉRENTES CONDITIONS DE CULTURE PENDANT UNE JOURNÉE	82
FIGURE 7.2 : AUTORADIOGRAMME DES MILIEUX DE CULTURE (MARQUAGE À LA ^3H -PROLINE) : DIFFÉRENTES CONDITIONS DE CULTURE PENDANT UNE JOURNÉE	83
FIGURE 7.3 : DISTRIBUTION DU POIDS MOLÉCULAIRES DES DIFFÉRENTS DOMAINES DU PROCOLLAGÈNE TYPE II (HUMAIN), CALCULÉS À PARTIR DE LA SÉQUENCE LOCUS CA12_HUMAN	85

FIGURE 7.4 : DISTRIBUTION DU POIDS MOLÉCULAIRE DES PRÉCURSEURS DU COLLII, CALCULÉE ET MESURÉE	86
FIGURE 7.5 : AUTORADIOGRAMME DE LA DIGESTION À LA PEPSINE DES EXTRAITS GUCL ET DES MILIEUX DE CULTURE (MARQUAGE À LA ^3H -PROLINE) : ABSENCE D'ACIDE ASCORBIQUE ET PRÉSENCE D'EDTA	87
FIGURE 7.6 : AUTORADIOGRAMME DES EXTRAITS GUCL (MARQUAGE À LA ^3H - PROLINE) : DIFFÉRENTES CONDITIONS DE CULTURE PENDANT PLUS D'UNE JOURNÉE	89
FIGURE 7.7 : AUTORADIOGRAMMES DES MILIEUX DE CULTURE (MARQUAGE À LA ^3H - PROLINE) : DIFFÉRENTES CONDITIONS DE CULTURE PENDANT PLUS D'UNE JOURNÉE	90

CHAPITRE 8

FIGURE 8.1 : AUTORADIOGRAMME DES EXTRAITS GUCL (MARQUAGE À LA ^3H - PROLINE) : DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE FBS	94
FIGURE 8.2 : COMPTES EN SCINTILLATION DES EXTRAITS RIPA ET GUCL, ET DU MILIEU DE CULTURE DES ÉCHANTILLONS DE L'ÉPAULE 1 (MARQUAGE À LA ^3H -PROLINE) : DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE FBS ET DIGESTION À LA COLLAGÉNASE	96
FIGURE 8.3 : AUTORADIOGRAMMES (DE MINI-GELS) DES ÉCHANTILLONS DE L'ÉPAULE 1 (MARQUAGE À LA ^3H -PROLINE) : DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE FBS ET DIGESTION À LA COLLAGÉNASE	97
FIGURE 8.4 : AUTORADIOGRAMME (MARQUAGE À LA ^3H -PROLINE) DES MILIEUX DE CULTURE (SOUS DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE FBS) ET D'UN EXTRAIT GUCL (20 % DE FBS) : DIGESTIONS À LA PEPSINE.....	100
FIGURE 8.5 : AUTORADIOGRAMME DES CULOTS OBTENUS PAR PRÉCIPITATIONS SUCCESSIVES AU NaCl D'UN MILIEU DE CULTURE (MARQUAGE À LA ^3H -PROLINE)	102
FIGURE 8.6 : AUTORADIOGRAMME DU SDS-PAGE D'UN MILIEU DE CULTURE (MARQUAGE À LA ^3H -PROLINE EN PRÉSENCE DE FBS) EN CONDITIONS RÉDUCTRICE ET NON RÉDUCTRICE.....	103

FIGURE 8.7 : <i>WESTERN BLOT</i> ANTI-CPII DES EXTRAITS GUCL ET DES MILIEUX DE CULTURE : DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE FBS	104
FIGURE 8.8 : AUTORADIOGRAMME DE LA PROTECTION DE LA ARNASE POUR LES ÉCHANTILLONS FRAIS, ET LES ÉCHANTILLONS CULTIVÉS EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE FBS	105

CHAPITRE 9

FIGURE 9.1 : MOYENNE (ET DÉVIATION STANDARD) DES RATIOS DES COMPTES EN SCINTILLATION (DYNAMIQUE/CONTRÔLE)	110
FIGURE 9.2 : MOYENNE (ET DÉVIATION STANDARD) DES RATIOS DES COMPTES EN SCINTILLATION (COMPRIMÉ/CONTRÔLE) : DÉPENDANCE RADIALE ET AJOUT DE β -APN	113
FIGURE 9.3 : QUANTITÉS RELATIVES DE PROTÉINES MARQUÉES : CENTRE, PÉRIPHÉRIE ET MILIEU DE CULTURE.....	113
FIGURE 9.4 : MOYENNE (ET DÉVIATION STANDARD) DES RATIOS DES COMPTES EN SCINTILLATION (STATIQUE/CONTRÔLE)	115
FIGURE 9.5 : MOYENNE (ET DÉVIATION STANDARD) DES RATIOS DES COMPTES EN SCINTILLATION (COMPRIMÉ/CONTRÔLE) : ^3H -PROLINE VS ^{35}S -MÉTHIONINE	116
FIGURE 9.6 : MOYENNE (ET DÉVIATION STANDARD) DES RATIOS DU CONTENU EN CHONDROÏTINE SULFATE DANS LES MILIEUX DE CULTURE (COMPRIMÉ/CONTRÔLE)	117

Liste des abréviations

A	Coefficient
a_n	$n^{\text{ième}}$ racine de l'équation 3
APN	Aminopropionitrile
B	Coefficient
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
C	Coefficient
COLLII	Collagène type II
CPII	Propeptide C-terminal du collagène type II
E_{33}	Module de compression non confinée
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
E_f	Module de Young effectif du réseau de fibrilles
E_m	Module de Young de la matrice écoulée
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
GAG	Glycosaminoglycane
GuCl	Chlorure de guanidine
HBSS	<i>Hanks' buffer salt solution</i>
HMW	<i>High molecular weight</i>
HSP47	<i>Heat shock protein 47</i>
IF	Immunofluorescence
J_m	Fonction de Bessel d'ordre m
k	Perméabilité hydraulique
LMW	<i>Low molecular weight</i>
MEC	Matrice extracellulaire
NPII	Propeptide N-terminal du collagène type II
p	Pression relative du fluide
pC-COLLII	Collagène type II avec son propeptide C-terminal lié
PG	Protéoglycane
pN-COLLII	Collagène type II avec son propeptide N-terminal lié

proCOLLII	Procollagène type II
r_0	Rayon initial du disque
RE	Réticulum endoplasmique
RIA	<i>Radio immunoassay</i>
S_{13} et S_{33}	Éléments de la matrice de rigidité
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
t_0	Temps de montée
u_r	Déplacement radial
ν_m	Coefficient de Poisson de la matrice
ν_r	Déplacement radial
α	Rapport du volume de solide sur le volume du fluide
ε_0	Amplitude maximale de déformation axiale
ε_r	Déformation circonférentielle
σ_a	Contrainte moyenne à la surface

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement Michael Buschmann de m'appuyer dans mon désir de faire de la recherche, et de me permettre de le faire sous son aile. Je tiens aussi à remercier Jean Dumont, qui a fait preuve de patience et de dévouement pendant ces dernières années, ainsi que Caroline Hoemann, pour sa générosité et ses conseils techniques précieux.

Je désire remercier en même temps tous les étudiants du département qui font de la recherche un milieu si stimulant, ma famille qui me soutient dans toutes les étapes de ma vie, ainsi que mes amis qui endurent encore mes discours idéologiques.

Je ne pourrais passer sous silence le travail courtois et efficace de Diane Goulet, Louise Clément et Louise Bélanger. Finalement, j'aimerais souligner mon admiration pour M. Pierre Savard, pour qui l'étudiant passe avant la machine.

Introduction

L'environnement mécanique des chondrocytes, cellules du cartilage articulaire, est un facteur important qui influence l'état de santé et la fonctionnalité de la jointure diarthroïdale. Les chondrocytes utilisent des signaux mécaniques en conjonction avec d'autres facteurs environnementaux et génétiques pour réguler leur activité métabolique. Cette aptitude fournit un moyen par lequel le cartilage articulaire peut modifier sa structure et sa composition afin de satisfaire aux exigences physiques du corps.

De nombreuses approches différentes sont utilisées afin d'étudier le rôle des stimulations physiques dans la régulation de l'activité des chondrocytes et du cartilage, allant des études *in vivo* aux expériences *in vitro* au niveau cellulaire et moléculaire. Les séquences des événements biomécaniques et biochimiques régulant la transduction des signaux mécaniques ne sont toutefois pas encore bien élucidées. Une compréhension approfondie de ces parcours régulateurs fournirait un aperçu important des processus biologiques normaux responsables du maintien du tissu, ainsi que des processus pathologiques qui mènent aux maladies dégénératives comme l'arthrose.

La majorité des résultats obtenus *in vitro* par différents groupes de recherche sur les effets des stimulations mécaniques dans le cartilage articulaire portent sur la synthèse des protéoglycanes, composantes importantes du cartilage, et des résultats récents sont liés à une protéine moins abondante, la fibronectine. Par contre, très peu d'études ont mené à des résultats concluants en rapport avec la synthèse du collagène type II, qui est une protéine structurale majeure du cartilage articulaire.

Le but de ce projet de M.Sc.A. en génie biomédical est de vérifier l'hypothèse que la synthèse et l'assemblage du collagène type II peuvent être modulés par des

compressions mécaniques dans le cartilage articulaire mature, et que cette modulation est reliée à certains facteurs physiques.

Les compressions ont été effectuées en configuration non confinée sur des explants cylindriques de cartilage bovin mature de pleine épaisseur, ayant une base d'os subchondral. Deux stratégies principales ont été utilisées pour évaluer le taux de synthèse du collagène type II. La première fut de doser le propeptide C-terminal du collagène type II (CPII), dont le contenu corrèle avec le taux de synthèse du collagène type II. La deuxième fut de mesurer l'incorporation de ^3H -proline, cette dernière étant préférentiellement assimilée dans les protéines collagèneuses.

Le parcours menant à l'accomplissement de ce projet s'est avéré plus difficile que prévu, et le but ultime n'a pas encore été atteint. Cependant, la méthode expérimentale a constamment été améliorée et des techniques d'analyse se sont ajoutées au fur et à mesure que les obstacles et les questionnements se présentaient. Le projet est présentement en attente et pourra être continué ultérieurement par une autre personne ou moi-même.

Les chapitres 1 et 2 de ce document sont plutôt théoriques. Le chapitre 1 tente de donner une idée globale de la composition et de la structure du cartilage articulaire, qui sont directement liées à ses fonctions biomécaniques. Le chapitre 2 survole le processus complexe de la synthèse du collagène type II.

Le chapitre 3 rassemble les résultats obtenus par différents groupes de recherches sur les effets des stimulations mécaniques dans le cartilage articulaire, *in vivo* et *in vitro*. Le chapitre 4 présente la chambre à compression qui a été fabriquée et utilisée dans ce projet, ainsi que la prédiction théorique des phénomènes physiques induits par les compressions non confinées.

Le chapitre 5 présente les différentes méthodes utilisées ainsi que les analyses préliminaires reliées au CPII. Le chapitre 6 dévoile les résultats obtenus sur la modulation de ce dernier par les compressions mécaniques.

Les chapitres 7, 8 et 9 contiennent les résultats centrés sur l'incorporation de ^3H -proline dans notre système. Dans le chapitre 7, l'identification des bandes (sur les autoradiogrammes) du collagène type II et de ses précurseurs est tentée. Le chapitre 8 décrit principalement les effets observés lors de l'ajout de FBS dans le milieu de culture. Le chapitre 9 résume les résultats obtenus sur les marquages radioactifs effectués pendant les compressions mécaniques.

Finalement, la conclusion résumera les résultats principaux, discutera quelques points spécifiques ou généraux, et proposera des nouvelles avenues que pourrait prendre ce projet.

Chapitre 1 : Le cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif qui suscite l'intérêt de plusieurs scientifiques. Sa composition biochimique et sa structure particulière lui confèrent une efficacité unique à lubrifier les jointures et à amortir les chocs. Le maintien de son intégrité, donc de sa fonctionnalité, dépend de l'équilibre entre la synthèse, l'assemblage et la dégradation de ses composantes. Ce système complexe est sous le contrôle des chondrocytes, cellules du cartilage, ainsi que des fluides et des tissus environnants.

Lorsque aucune référence n'est mentionnée dans certaines sections de ce chapitre, c'est que l'information provient du premier chapitre du livre *Orthopaedic Basic Science* (Mankin H.J. et al., 1994) ou des chapitres 1, 2 et 4 du livre *Joint Cartilage Degradation* (Poole C.A., Aydelotte M.B. et Kuettner K.E., Mayne R. et Brewton R.G., 1993).

1.1 Anatomie du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est un cartilage hyalin qui recouvre les surfaces articulaires de toutes les jointures diarthrodiales. Il est dépourvu de nerfs, de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Pendant la croissance et le développement, il est formé d'une épaisse couche de cellules à l'extrémité de la plaque de croissance. C'est lorsque le squelette atteint la maturité, et que la plaque de croissance se referme, que le cartilage articulaire révèle complètement sa structure pleinement différenciée (figure 1.1).

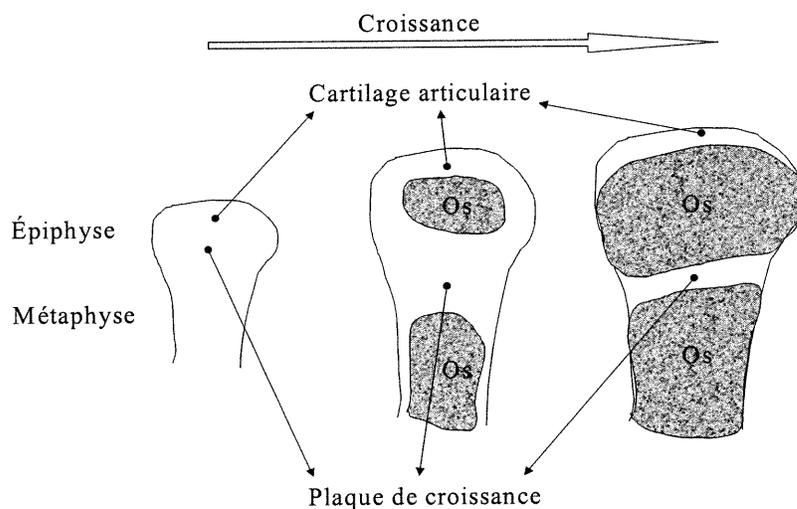


Figure 1.1 : Formation du cartilage articulaire pendant la croissance

Chez les jeunes animaux, la surface articulaire dévoile une couche lisse, luisante et d'un blanc perlé couvrant les extrémités des os longs. Cette couche varie en transparence et en épaisseur d'une région à l'autre dans une même jointure, d'une jointure à l'autre dans la même espèce, et d'une espèce à l'autre. Des études indiquent que l'épaisseur du cartilage articulaire augmente dans les régions de chargements physiologiques élevés. En vieillissant, il adopte une teinte jaunâtre et ses degrés de fibrillation et d'érosion augmentent. Il est maintenant accepté que le plus grand taux de fibrillation se trouve dans les régions épaisses du cartilage directement exposées aux chargements mécaniques.

Les fonctions du cartilage articulaire sont les suivantes : couvrir l'os subchondral afin de le protéger de l'abrasion et d'autres dommages, transmettre et distribuer les chargements de compression et de cisaillement à cet os, maintenir un contact congru à contraintes minimales entre les os apposés et, finalement, fournir une surface lisse et lubrifiée qui facilite un mouvement presque sans friction.

1.2 La matrice extracellulaire

Le cartilage articulaire est constitué d'une abondante matrice extracellulaire (MEC) clairsemée de cellules hautement spécialisées, les chondrocytes. Principalement, la MEC est constituée d'eau, de fibrilles de collagène et de gros protéoglycanes, les agrécanes. D'autres protéines, petits protéoglycanes et autres glycoprotéines participent aussi à la structure de la MEC, mais s'y retrouvent en plus petites quantités. La force en tension des fibrilles de collagène s'oppose à la pression osmotique, due à la grande densité de charges négatives des agrécanes, pour former un système biologique amortisseur de chocs.

La structure et la composition du cartilage articulaire varient selon sa profondeur ; les différences incluent la forme et le volume des cellules, le diamètre et l'orientation des fibrilles de collagène, ainsi que la concentration en protéoglycanes. Le cartilage peut être divisé en quatre zones (figure 1.2) : la zone superficielle (zone I), la zone de transition (zone II), la zone profonde (zone III) et la zone calcifiée (zone IV).

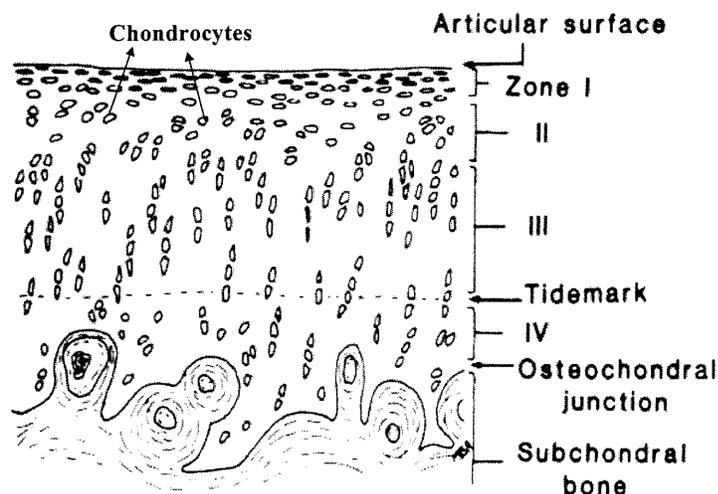


Figure 1.2 : Zones du cartilage articulaire mature, selon la profondeur (Modifiée de Aydelotte M.B. et Kuettner K.E., 1993)

La zone superficielle forme la surface glissante du cartilage. Les minces fibrilles de collagène sont parallèles à la surface, les chondrocytes sont allongés (avec l'axe long parallèle à la surface) et le contenu en protéoglycanes est à son plus bas niveau. La zone de transition contient des fibres de collagène sans orientation préférentielle qui ont un diamètre plus grand, et les chondrocytes y ont une apparence plus ronde. La zone profonde contient la plus forte concentration de protéoglycanes et la plus faible en eau ; les fibrilles de collagène ont un gros diamètre et sont perpendiculaires à la surface articulaire. Les chondrocytes y sont sphériques et disposés en colonnes. La zone profonde est séparée de la zone calcifiée par une frontière appelée, en anglais, la *tidemark*. La zone du cartilage calcifié sépare le cartilage hyalin de l'os subchondral. Elle est caractérisée par des chondrocytes sphériques dans des lacunes non calcifiées, l'absence de protéoglycanes, et l'ancrage de fibrilles de collagène perpendiculaires à la surface articulaire (Poole C.A., 1997).

La MEC est aussi divisée en régions qui dépendent de leur proximité aux chondrocytes : péricellulaire, territoriale et interterritoriale. Poole C.A. (1997) résume bien les différences entre ces trois matrices (c'est la référence de ce paragraphe). La matrice péricellulaire est une fine couche adjacente à la membrane cellulaire et entoure complètement le chondrocyte. Elle est enrichie d'acide hyaluronique, de protéoglycanes sulfatés, de biglycane, et d'une variété de glycoprotéines matricielles comme la protéine de liaison, la fibronectine et la laminine ; c'est aussi dans cette région que les collagènes types VI et IX sont concentrés. Les fibrilles de collagène sont très fines dans la matrice péricellulaire et tissent une enceinte compacte autour de chaque chondrocyte. Dans la matrice territoriale, les fibrilles sont empaquetées de façon radiale au chondrocyte et sont séparées par des régions riches en protéoglycanes. La matrice interterritoriale est la plus grande des régions et contribue de façon majeure aux propriétés matérielles du cartilage articulaire. Elle comprend toute la matrice entourant les matrices territoriales, contient les grosses fibrilles de collagène et la majorité des protéoglycanes (Mankin H.J. et al., 1994). Les protéoglycanes riches en kératane sulfate semblent plus concentrés dans la matrice interterritoriale, alors que les

protéoglycanes riches en chondroïtine sulfate semblent plus concentrés dans la matrice territoriale.

1.2.1 Les collagènes du cartilage

La composante structurale principale du cartilage hyalin est le collagène type II. Le tissu contient aussi les collagènes type IX, type XI et type VI. La proportion de chacun de ces collagènes est indiquée dans le tableau 1-I.

Type de collagène	% du collagène total	
	Cartilage foetal	Cartilage mature
II	80	95
IX	10	1
XI	10	3
VI	< 1%	

Tableau 1-I : Quantités relatives des collagènes du cartilage articulaire (Résumé par Diab M. et al., 1996)

Les zones hypertrophique et calcifiée de la plaque de croissance et du cartilage articulaire contiennent aussi le collagène type X. D'autres types de collagène ont aussi été identifiés dans le cartilage malade (Young R.D. et al., 2000) ou sous certaines conditions de culture (Ronzière M.C. et al., 1997).

Les fibrilles de collagène

Les fibrilles de collagène forment un réseau dense dont la fonction primaire est de donner au tissu une forte résistance en tension et en cisaillement. Ce réseau fournit aussi un support qui immobilise les agrégats de protéoglycanes dans la MEC. Le diamètre de ces fibrilles varie de 10 à 100 nanomètres, bien qu'il puisse augmenter

avec l'âge et la maladie. Ces fibrilles contiennent, entre autres, les collagènes types II, IX et XI (figure 1.3).

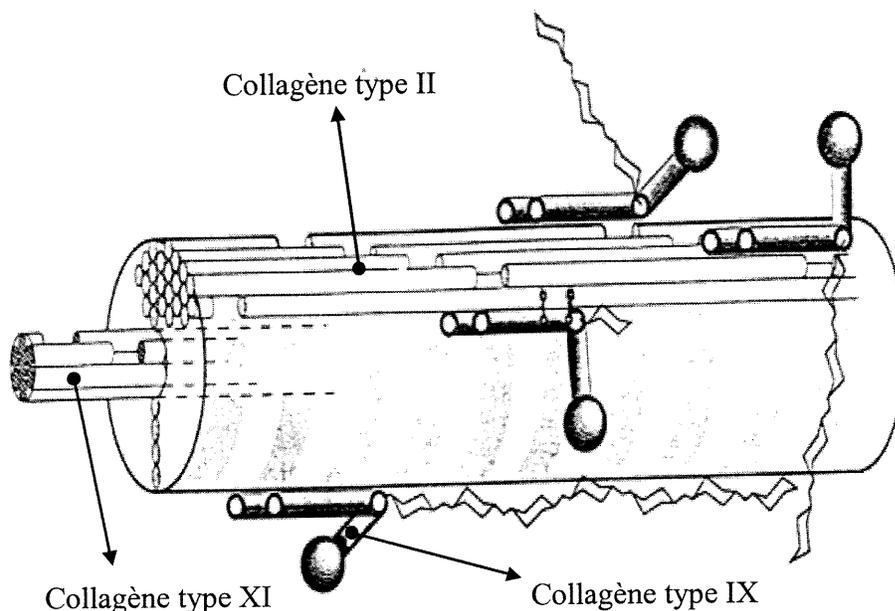


Figure 1.3: Fibrille de collagène du cartilage articulaire (Modifiée de Bruckner P. et van der rest M., 1994)

Le collagène type II est le principal constituant des fibrilles du cartilage articulaire. Étant donnée sa grande importance dans ce projet, le chapitre suivant lui est consacré (chapitre 2).

Le collagène type IX

L'information de ce paragraphe est tirée de Diab M. et al. (1996). La molécule de collagène type IX est un hétérotrimère de trois chaînes génétiquement distinctes : α_1 , α_2 et α_3 . Chaque chaîne contient quatre domaines non collagèneux (NC1 à NC4) et trois domaines collagèneux (COL1 à COL3). La chaîne α_2 peut contenir une chaîne de glycosaminoglycane dans son domaine NC3. Les chaînes sont liées par des

ponts disulfures liant les domaines NC1 et NC3. Le collagène type IX semble tapisser la surface des fibrilles. Des liaisons covalentes relient les molécules de collagène type IX entre elles, tout comme elles relient le collagène type IX au collagène type II. La plupart des résidus de liaison dans le cartilage articulaire mature sont des pyridinolines trivalentes ; dans le cartilage fœtal, des liaisons bivalentes et réductibles par borohydrure prédominent. Les fonctions potentielles du collagène type IX sont les suivantes : limiter le diamètre des fibrilles, interagir avec d'autres composantes de la MEC, et prévenir les interactions entre les fibrilles. Il a été montré que les domaines NC2 et NC4 du collagène type IX peuvent être clivés par la stomélysine-1 (MMP-3).

Les poids moléculaires calculés des chaînes α du collagène type IX sont les suivants : 92.9 kDa pour $\alpha 1$ (locus NP_001842, humain), 65.1 kDa pour $\alpha 2$ (locus CAB81611, humain) et 63.7 kDa pour $\alpha 3$ (locus NP_001844, humain).

NOTE : L'utilisation du logiciel *Mathematica* permet le calcul rapide du poids moléculaire des protéines, à partir de la séquence en acides aminés (un exemple est présenté dans l'annexe I). Ce poids moléculaire n'inclut pas les parties glucidiques ni les modifications post-traductionnelles.

Le collagène type XI

La molécule de collagène type XI est aussi un hétérotrimère. Sa chaîne $\alpha 3$ s'apparente beaucoup à la chaîne $\alpha 1$ du collagène type II, ces dernières étant transcrites du même gène ; cependant, les résidus de lysine de la chaîne $\alpha 3$ (type XI) sont modifiés davantage en résidus d'hydroxylysine glycosylée. Le collagène type XI est résistant à la collagénase interstitielle (MMP-1) (Gadher S.J. et al., 1988). Sa fonction suggérée est de former une microfibrille autour de laquelle le collagène type II peut s'organiser (Mendler M. et al., 1989).

Hétérogénéités des fibrilles

Bien que les fibrilles du cartilage soient morphologiquement semblables, elles ont une composition biochimique hétérogène. Hagg R. et al. (1998) ont rassemblé des résultats intéressants à ce propos (c'est la référence de ce paragraphe). Dans le cartilage articulaire mature (bovin), le collagène type IX est présent dans les fibrilles de faible diamètre mais il se retrouve rarement dans les grosses fibrilles. Inversement, le petit protéoglycane décorine est associé aux grosses fibrilles et est absent des fines fibrilles. La coexistence de décorine et du collagène type IX est rare dans le cartilage adulte et ne se trouve que dans des fibrilles de diamètre intermédiaire. Par contre, dans le cartilage fœtal, le collagène type IX se retrouve dans des fibrilles de tous diamètres et côtoie souvent la décorine.

Le collagène type VI

L'information contenue dans ce paragraphe provient de Bruckner P. et van der rest M. (1994), sauf si une autre référence est mentionnée.

Ce collagène est préférentiellement localisé dans l'environnement péricellulaire des chondrocytes. Il est constitué de trois chaînes distinctes $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ (poids moléculaires apparents de 150, 140 et 260 kDa respectivement) qui ont une structure de mosaïque. La chaîne $\alpha 3$ interagit avec l'acide hyaluronique, et a des modules similaires à des protéines salivaires, à fibronectine type III, et à des inhibiteurs d'enzymes de type Kunitz. Plusieurs séquences RGD des régions tri-hélicoïdales du collagène type VI sont en rapport avec sa propriété d'attachement à la cellule. Ses molécules s'assemblent d'abord en dimères (de façon anti-parallèle) puis en tétramères par aggrégation latérale de deux dimères. Ses fonctions potentielles sont les suivantes : interagir avec la matrice dans l'orchestration de l'architecture péricellulaire, fournir un ancrage et un moyen de signalisation entre le chondrocyte et

son environnement par le biais de récepteurs de la membrane plasmique (Poole C.A., 1997).

1.2.2 Les protéoglycanes

La référence principale de ce paragraphe et de la section suivante (l'aggrécane) est le chapitre 14 du livre *Biologie moléculaire de la cellule* (Alberts B. et al., 1989).

Les protéoglycanes (PG) sont des glycoprotéines ayant des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) sulfatées. Les propriétés des PG dépendent de la structure des GAG, comme de la partie protéique.

Les GAG sont de longues chaînes polysaccharidiques non ramifiées composées d'unités disaccharidiques répétitives. Ils portent le nom de GAG du fait que l'un des deux résidus glucidiques du motif disaccharidique est toujours un glucide aminé. Dans la majorité des cas, ce glucide aminé est sulfaté et le second glucide est un acide uronique. Grâce aux groupements sulfate ou carboxyle situés sur la majorité de leurs résidus glucidiques, les GAG possèdent une forte charge négative. Quatre groupes principaux de GAG ont été distingués par leurs résidus glucidiques, le type de liaison entre ces résidus, le nombre et la position des groupements sulfate : (1) l'acide hyaluronique, (2) la chondroïtine sulfate et le dermatane sulfate, (3) l'héparane sulfate et l'héparine, et (4) le kératane sulfate. Les chaînes polysaccharidiques sont trop rigides pour se replier et sont très hydrophiles, d'où leur tendance à adopter des conformations très étirées. Leur forte densité de charges attire un nuage de cations qui sont actifs du point de vue osmotique, provoquant l'absorption de grandes quantités d'eau dans la matrice. Ceci crée une pression de gonflement qui permet à la matrice de résister aux forces de compression. Par leur organisation poreuse et hydratée, les chaînes de GAG remplissent la plus grande partie de l'espace extracellulaire, fournissant un support mécanique aux tissus, tout en permettant la diffusion rapide des molécules hydrosolubles et la migration des cellules.

L'aggrécane

L'aggrécane est un gros PG qui participe grandement au comportement mécanique du cartilage. Il est constitué d'une protéine centrale à laquelle sont liées des chaînes de chondroïtine sulfate et de kératane sulfate. Par le biais de protéines de liaison, les aggrécanes peuvent se lier à l'acide hyaluronique pour former de gros complexes, les agrégats de PG (figure 1.4).

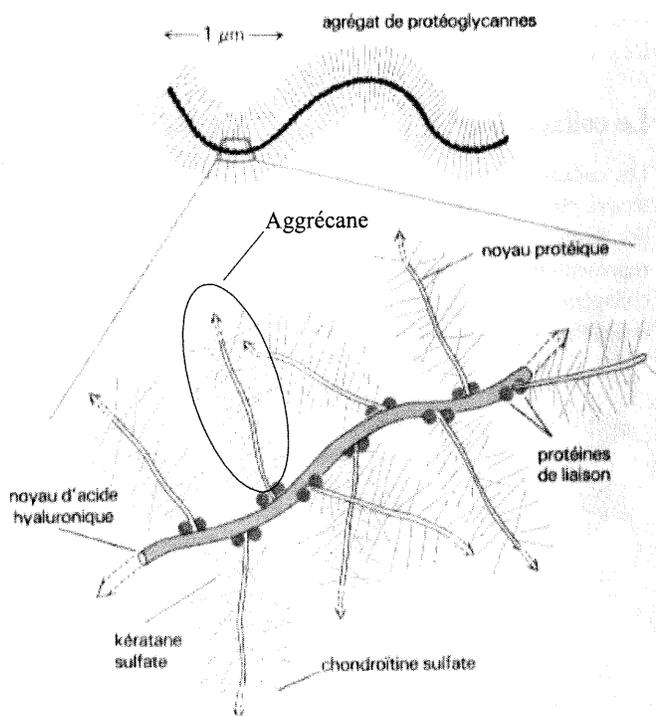


Figure 1.4 : Agrégat de protéoglycannes (Modifiée de Alberts B. et al., 1989)

Les petits protéoglycannes

Les autres PG connus du cartilage articulaire ne forment pas d'aggrégats et sont petits comparativement à l'aggrécane : la décorine, le biglycane, la fibromoduline et le perlecan. La décorine est une composante des fibrilles de collagène ayant un

gros diamètre (Hagg R. et al, 1998), et est localisée dans la matrice interterritoriale, surtout des zones superficielle et profonde (Hagg R. et al, 1998 ; Miosge N. et al., 1994). La fibromoduline semble aussi interagir avec le collagène fibrillaire (Hedbom E. et Heinegard D., 1989), mais ce n'est pas le cas de la biglycane (Brown D.C. et Vogel K.G., 1989). Le niveau de perlecan est bas dans les tissus précartilagineux, mais est élevé dans le cartilage mature ; il peut lier certains facteurs de croissance et supporte potentiellement la différenciation des chondrocytes (Résumé par Costell M. et al., 1999). Il existe fort probablement d'autres PG dans la MEC du cartilage, mais ils n'ont pas encore été bien étudiés.

1.2.3 Les autres composantes de la MEC

L'anchoring II semble aider les chondrocytes à se lier à la matrice. La COMP (*cartilage oligomeric protein*) peut servir de marqueur de renouvellement et de dégénération du cartilage. D'autres protéines, comme la ténascine et la fibronectine, peuvent influencer les interactions entre les chondrocytes et la matrice. (Résumé par Buckwalter J.A. et Mankin J., 1998.) D'autres protéines sont présentes dans la MEC, mais ne sont pas encore bien caractérisées.

1.3 Le chondron

Le chondrocyte et ses matrices péricellulaire et territoriale peuvent être extraits, par homogénéisations successives à basse vitesse, en une unité intacte qu'on appelle communément chondron. Cette technique permet d'analyser le contenu de l'environnement périphérique de la cellule séparément du contenu de la matrice interterritoriale. (Résumé par Poole C.A., 1997.)

Chapitre 2 : La synthèse du collagène de type II

La molécule de collagène type II (COLLII) a une structure hélicoïdale à trois brins identiques nommés chaînes $\alpha 1(\text{II})$. Ces dernières sont enroulées les unes autour des autres en une super hélice régulière pour former une molécule à l'allure de corde (environ 300 nm de longueur et 1,5 nm de diamètre).

2.1 Formes de COLLII

Deux épissages différents mènent à deux formes différentes de COLLII, les types IIA et IIB. Zhu Y. et al. (1999) résumant les détails contenus dans ce paragraphe. Le type IIA est synthétisé par les cellules préchondrogéniques, épithéliales et mésenchymateuses, tandis que le type IIB est synthétisé par les chondrocytes. L'ARNm du procollagène de type IIA contient un exon supplémentaire et code pour un domaine riche en cystéines du NPII. Le procollagène type IIA est déposé dans la MEC du tissu préchondrogénique sans clivage du NPII et peut se lier à TGF- $\beta 1$ (*transforming growth factor- $\beta 1$*) et à BMP-2 (*bone morphogenetic protein-2*).

L'expression du gène du collagène type IIA a aussi été observé dans un modèle d'ostéoarthrose (Lefkoe T.P. et al., 1997) et dans certains échantillons de cartilage mature (van der Kraan P.M. et al., 1998).

2.2 Traduction et trimérisation

NOTE : Le processus décrit ici n'est pas spécifique au COLLII, mais est celui des collagènes fibrillaires. C'est le processus proposé par McLaughlin S.H. et Bulleid N.J. (1998), Bailey A.J. et Paul R.G. (1997) et Alberts B. et al. (1989).

La synthèse d'une molécule de COLII est un processus à plusieurs étapes (voir figure 2.1). Tout d'abord, des chaînes polypeptidiques individuelles sont synthétisées sur des ribosomes liés à la membrane ; elles sont transloquées de façon cotraductionnelle vers la lumière du réticulum endoplasmique (RE) sous la forme de précurseurs de plus grande taille, appelés pro-chaînes α . Ces précurseurs possèdent un court peptide signal à l'extrémité N-terminale, en plus des propeptides non collagéniques se retrouvant aux extrémités C- et N-terminales (CPII et NPII). Le peptide signal est nécessaire au passage des pro-chaînes à travers la membrane du RE et est enlevé immédiatement après sa translocation.

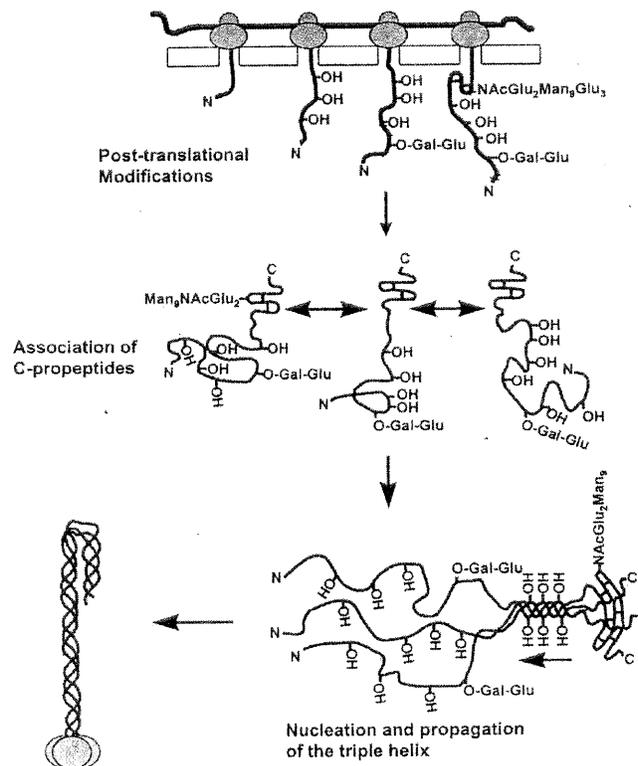


Figure 2.1 : Modifications post-traductionnelles et trimérisation du procollagène fibrillaire (McLaughlin S.H. et Bulleid N.J., 1998)

En passant dans la lumière du RE, certains résidus proline et lysine sont hydroxylés pour former respectivement l'hydroxyproline et l'hydroxylysine ; l'hydroxylation des résidus est catalysée par des hydroxylases qui ont l'acide

ascorbique et le Fe^{2+} comme cofacteurs (Kivirikko K.I. et Pihlajaniemi T., 1998). Les groupements hydroxyles des résidus d'hydroxyproline forment des liaisons hydrogène qui servent à stabiliser l'hélice triple de COL2. L'hydroxylation des résidus de lysine, quant à elle, est nécessaire à l'obtention d'une certaine forme de glycosylation (dont la fonction demeure inconnue), et est essentielle à la vaste réticulation des molécules de COL2 dans la MEC (Mankin H.J. et al., 1994).

Une fois complètement entrés dans la lumière du RE, les domaines CII et NII se replient dans des conformations stabilisées par liaisons disulfures intracaténares. La formation des liaisons disulfures est catalysée par PDI (*protein disulfide isomerase*) ; cette dernière est une sous-unité de la prolyl 4-hydroxylase (Kivirikko K.I. et Pihlajaniemi T., 1998), et agit comme chaperone lors de l'assemblage du procollagène (Wilson R. et al., 1998). La trimérisation des domaines CII, par formation de liaisons disulfures intercaténares, conduit l'association initiale de trois pro-chaînes α . L'hélice triple s'enroule ensuite par nucléation des triplets séquentiels proline-hydroxyproline-glycine et propagation jusqu'au rassemblement des domaines NII.

2.3 Sécrétion et assemblage dans la MEC

Une fois bien polymérisée, la super hélice est sécrétée hors de la cellule et les propeptides y sont clivés par les N- et C-protéinases ; ces dernières sont des métalloprotéinases. La N-protéinase ne clive que le NII en conformation native, et une de ses formes possède une séquence RGD qui lie les intégrines. La C-protéinase peut cliver le CII en conformation native ou dénaturée, est identique à une protéine précédemment identifiée, BMP-1 (*bone morphogenetic protein-1*), et clive spécifiquement un précurseur de la lysyl oxidase. (Les 3 dernières phrases sont tirées de Prockop D.J. et Li S.W., 1998.) Le clivage du CII diminue la solubilité du procollagène et est critique pour l'auto-assemblage des fibrilles (Mould A.P. et al., 1990). Il a été signalé que la région du procollagène type I entourant le site de clivage

par BMP-1 est sensible à d'autres endopeptidases (Helseth D.L. et Veis A., 1984 ; Bateman J.F. et al., 1987 ; Kessler E. et Adar R., 1989).

Une fois libéré de ses propeptides, le procollagène devient une molécule de collagène (aussi appelée tropocollagène) ; la partie centrale est hélicoïdale tandis que les extrémités, les télépeptides, ne le sont pas (le tropocollagène type I est illustré à la figure 2.2).

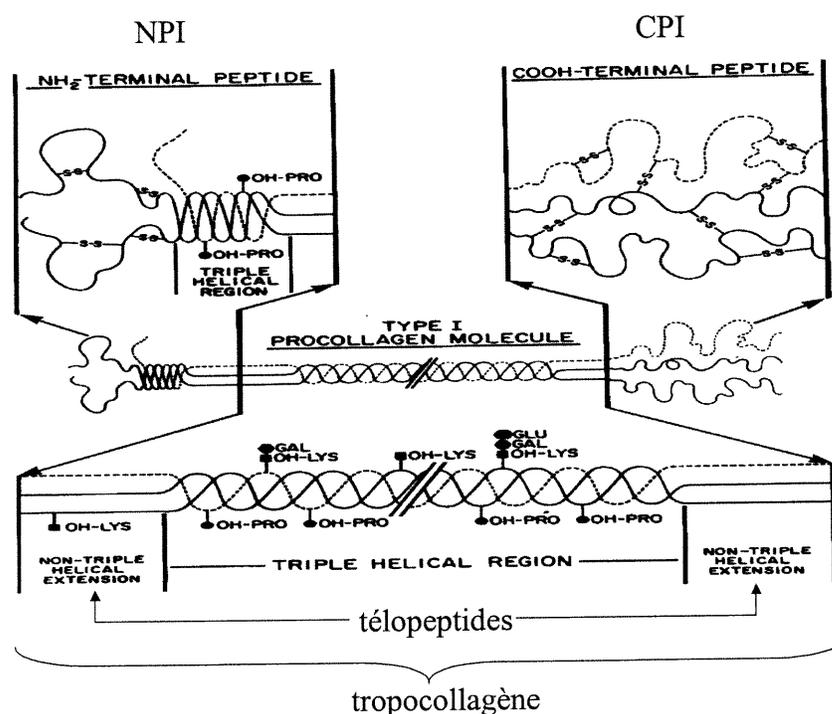


Figure 2.2 : Le tropocollagène et les propeptides, type I (Modifiée de Linsenmayer T.F., 1991)

Les fibrilles sont ensuite formées par association de plusieurs molécules de COLLI ; le processus exact par lequel les fibrilles s'assemblent n'est pas encore clair, mais il est probablement gouverné par le clivage systématique des propeptides, les différentes proportions des types de collagène, et la présence d'autres composantes de la MEC (Bailey A.J. et Paul R.G., 1997). La formation de liaisons covalentes intra et intermoléculaires, catalysée par la lysyl oxidase et inhibée par le β -aminopropionitrile, vient ensuite stabiliser les fibrilles (Smith-Mungo L.I. et Kagan H.M., 1998). La

formation de ces liaisons est initiée par l'oxydation de résidus lysyl et hydroxylysyl spécifiques des télépeptides. Des réactions spontanées mènent ensuite à des liaisons divalentes qui seront converties, avec le temps, en liaisons multivalentes pouvant lier plusieurs molécules (voir figure 2.3) (Bailey A.J. et Paul R.G., 1997).

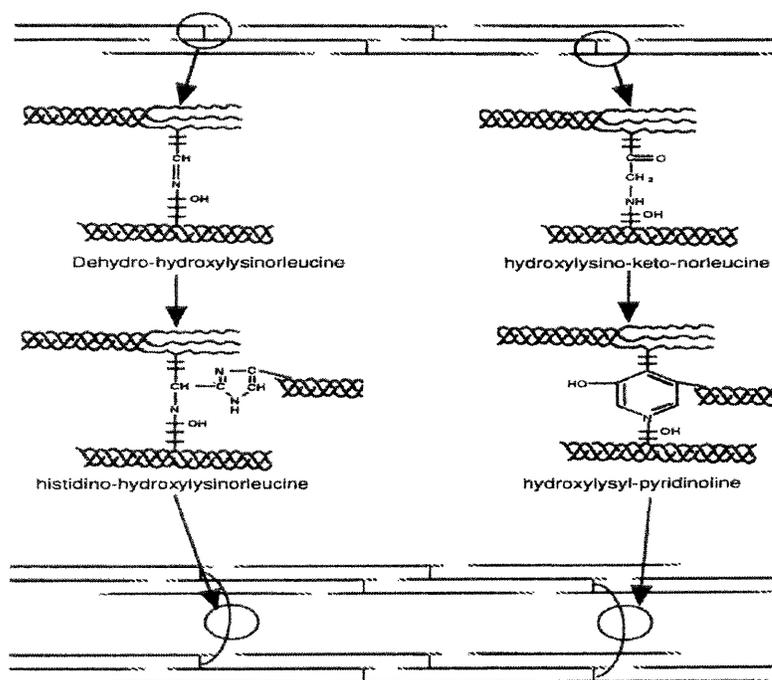


Figure 2.3 : Formation de liaisons covalentes entre les télépeptides des molécules de tropocollagène (Bailey A.J. et Paul R.G., 1997)

2.4 CII

Une fois clivé du procollagène, le CII consiste en un trimère de chaînes identiques, reliées par ponts disulfures, ayant chacune 35 kDa de poids moléculaire. Le CII a été précédemment identifié dans l'épiphyse bovin sous le nom de *chondrocalcin* (van der Rest M. et al., 1986 ; Poole A.R. et al., 1984). Dans le cartilage en calcification, le CII se concentre dans les sites de minéralisation (van der Rest M. et al., 1986 ; Poole A.R. et al., 1984). Dans la plaque de croissance, le CII est préférentiellement associé aux fibrilles de collagène et aux sites de minéralisation

(Lee E.R., et al., 1996). Son contenu est relié au taux de synthèse du COLLI, et est souvent augmenté dans le cartilage ostéoarthritique ; cette hausse n'est pas reflétée dans le sérum, où une baisse est plutôt observée (Nelson F. et al., 1998). Le contenu de CPII dans le liquide synovial est modulé de différentes façons selon le type d'arthrite, et dépend de la sévérité de la pathologie (Shinmei M. et al., 1993). Il a été montré que le CPII réduit la transcription du gène de collagène type II, par liaison directe avec la région *enhancer* du premier intron des chondrocytes *in vitro* (Nakata K. et al., 1996). Des études en cours tentent de découvrir ses implications potentielles dans les processus de calcification matricielle et de différenciation terminale des chondrocytes (Matsui Y. et al., 2000).

2.5 HSP47

Ces informations sont principalement tirées de Nagata K. (1998).

HSP47 (*heat shock protein 47*), aussi connue sous les noms de colligine et GP46, est une glycoprotéine du RE qui lie spécifiquement différents types de collagène, en conformation dénaturée ou en hélice triple. Elle possède un peptide signal dans sa partie N-terminale ainsi que deux sites de N-glycosylation. Elle fait partie de la famille des serpines (inhibiteurs de protéases de type sérine), même si elle n'en possède pas l'activité d'inhibition. Elle possède une séquence RDEL dans son extrémité C-terminale ; cette dernière, comme la séquence KDEL, a une fonction de rétention dans le RE.

HSP47 a été localisée dans différents tissus et sous différentes conditions (choc thermique, pathologies, conditions normales, etc.) ; elle a entre autres été observée dans les chondrocytes (Hattori T. et al., 1998 ; Hirata H. et al., 1999 ; Kambe K. et al., 1994 ; Kuboki T., et al., 1999 ; Masuda H. et al., 1998 ; Miyaishi O. et al., 1992 ; Romano P.R. et al., 1998 ; Natsume T. et al., 1994). Sa hausse dans le cartilage des

souris noires C57 (qui développent spontanément des lésions d'ostéoarthrite) est reliée à la hausse de IL-6 (Takahashi K. et al., 1997).

Les fonctions exactes de HSP47 ne sont pas encore bien claires, mais quelques rôles possibles lui sont associés (figure 2.4): prévenir la formation d'aggrégats de pro-chaînes α , affecter la modification et prévenir la dégradation des pro-chaînes α dans le RE, prévenir l'auto-assemblage intracellulaire de triples hélices de procollagène, faire le contrôle de qualité sous conditions de stress et faciliter la sécrétion sous conditions normales.

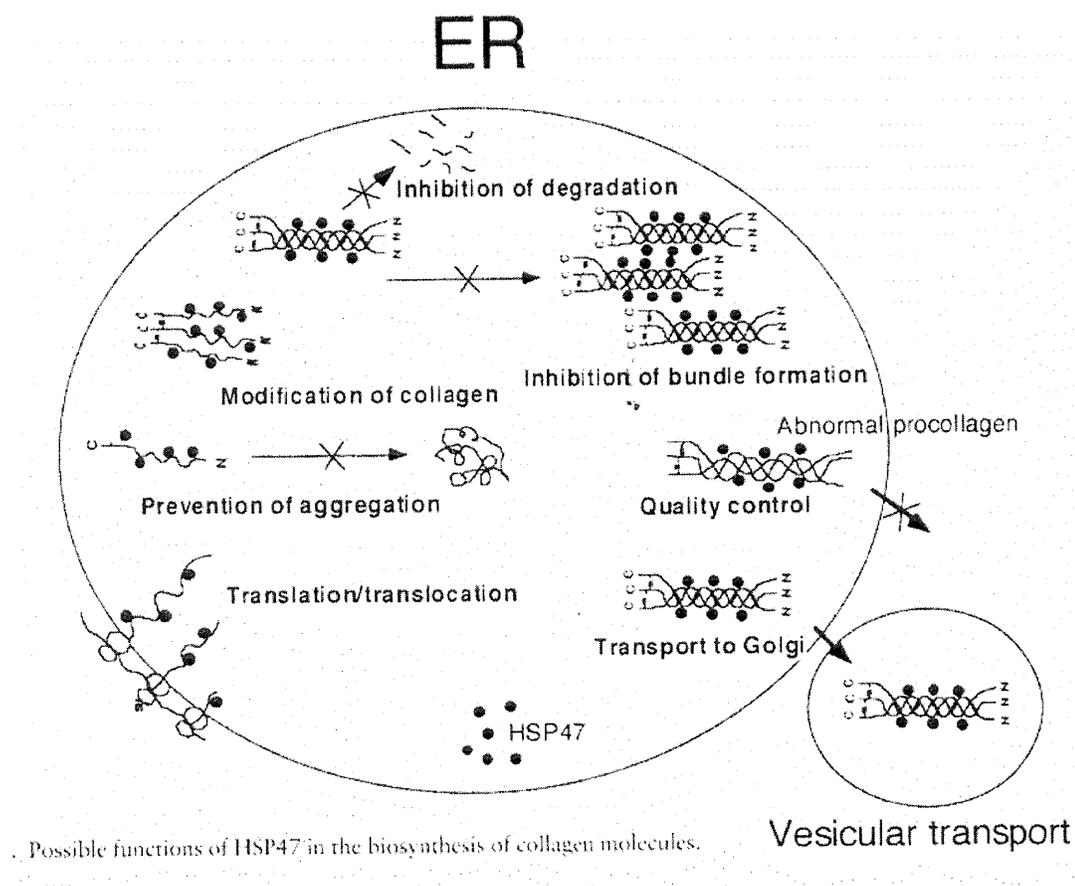


Figure 2.4 : Fonctions possibles de HSP47 (Nagata K., 1998)

Chapitre 3 : Revue de la littérature sur l'effet des stimulations mécaniques

Dans les activités quotidiennes, le cartilage est soumis à une grande variété de chargements statiques et dynamiques. Par exemple, des contraintes de l'ordre de 15 MPa peuvent survenir pendant la montée de marches d'escalier (Hodge W.A. et al., 1986). La capacité du cartilage à supporter les forces de compression, de tension et de cisaillement dépend, de façon critique, de l'intégrité de la structure et de la composition de sa MEC. Le maintien d'une MEC fonctionnellement intacte est assurée, en grande partie, par le contrôle des chondrocytes sur la synthèse, l'assemblage et la dégradation des PG et autres glycoprotéines, des collagènes et autres protéines, ainsi que des autres molécules matricielles (Heinegard D. et Oldberg A., 1989).

La documentation décrivant l'effet des stimulations mécaniques sur la structure et le métabolisme du cartilage porte sur les études *in vivo*, les systèmes d'explants de tissu *in vitro*, et les modèles de culture cellulaire.

3.1 Études animales *in vivo* et observations cliniques

Les résultats suggèrent que le chargement des jointures et le mouvement puissent induire plusieurs réponses métaboliques dans le cartilage. La concentration des PG est souvent plus élevée dans les régions de cartilage habituellement chargées (Slowman S.D. et Brandt K.D., 1986), peut être augmentée par une élévation du chargement dynamique physiologique (Caterson B. et Lowther D.A., 1978 ; Salter R.B., 1980 ; Kiviranta I. et al., 1988), et est diminuée de façon réversible (Muller F.J. et al., 1994) dans les joints immobilisés (Akeson W.H. et al., 1973 ; Kiviranta I. et al., 1987 ; Olah E.H. et Kostenszky K.S., 1972 ; Palmoski M. et al., 1979). L'acide hyaluronique est diminué dans les joints instables (Muller F.J., 1994), tandis que

l'exercice augmente le contenu en décorine sans changer le contenu en aggrecane (Visser N.A. et al., 1998). Le patron de variations topographiques de la synthèse des PG est relié aux stress mécaniques et change après altération du ménisque (Little C.B. et al., 1996 ; Leroux M.A. et al., 2000). La composition biochimique du cartilage semble être homogène à la naissance ; les variations des contenus en PG (Little C.B. et Ghosh P., 1997), d'ADN, de collagène et d'hydroxylysine apparaissent pendant la croissance (postnatale) pour satisfaire aux demandes physiques de l'articulation et sont conservées dans le cartilage mature (Brama P.A. et al., 2000). Des chargements excessifs, bien que physiologiques, semblent réduire le contenu en PG (Arokoski J. et al., 1993 ; Jurvelin J. et al., 1990) ou induire des fissures dans le cartilage (Donohue J.M. et al., 1983 ; Pickvance E.A. et al., 1993 ; Radin E.L. et al., 1984 ; Radin E.L. et al., 1991 ; Thompson R.C. et al., 1991).

3.2 Systèmes d'explants

Les mécanismes de transduction mécanique sont difficiles à identifier *in vivo*. L'utilisation d'explants, en combinaison avec les modèles mathématiques, permet de découpler et d'isoler certains phénomènes, tout en permettant de conserver les interactions entre les chondrocytes et la MEC.

Il est bien accepté que les compressions statiques aient un effet inhibiteur sur la synthèse des protéines et des PG en général (Jones I.L. et al., 1982 ; Gray M.L. et al., 1988 ; Gray M.L. et al., 1989 ; Sah R.L. et al., 1989 ; Schneiderman R. et al., 1986 ; Urban J.P. et Bayliss M.T., 1989 ; Ragan P.M. et al., 1999 ; Wong M. et al., 1999 ; Burton-Wurster N. et al., 1993) qui semble correspondre aux changements de structure des cellules et des noyaux (Buschmann M.D. et al., 1996) ; cependant, les effets sur la synthèse de l'aggrecane, la protéine de liaison et l'acide hyaluronique sont différents (mais semblables aux effets de IL-1), ce qui propose un mécanisme de mécanotransduction spécifique plutôt qu'une baisse générale de l'activité cellulaire (Kim Y.J. et al., 1996). Les compressions statiques induisent une augmentation

transitoire suivie d'un retour au niveau normal de l'ARNm de l'aggrécane et de la protéine de liaison (Valhmu W.B. et al., 1998), ou suivie d'une forte diminution du contenu en ARNm de l'aggrécane, de COLLI et de GAPDH (Ragan P.M. et al., 1999) ; les résultats conflictuels sur l'ARNm de l'aggrécane sont probablement dus à des différences de la technique de chargement (contrôle du chargement vs contrôle du déplacement), des techniques d'analyse d'ARNm, ou de l'âge des animaux utilisés. La modulation de l'ARNm de l'aggrécane est inhibée par Rp-cAMP et U-73122 (Valhmu W.B. et al., 1998), proposant l'implication d'une voie de signalisation classique. Les compressions statiques inhibent (Burton-Wurster N. et al., 1993) ou stimulent (Wong M. et al., 1999) la synthèse de fibronectine ; la cause de ces résultats contradictoires n'est pas claire. Finalement, les compressions statiques ne changent pas le taux de transport de IGF-I mais diminuent sa concentration matricielle (Bonassar L.J. et al., 2000).

Les compressions dynamiques ont un effet plutôt stimulateur sur la production matricielle, qui dépend des amplitudes et des fréquences appliquées (Larsson T. et al., 1991 ; Kim Y.J. et al., 1994 ; Korver T.H. et al., 1992 ; Palmoski M.T. et al., 1984 ; Parkkinen J.J. et al., 1992 ; Sah R.L. et al., 1989). L'augmentation de la synthèse des PG est associée au courant du fluide interstitiel (Buschmann M.D. et al., 1999) et à la pression hydrostatique (Parkkinen J.J. et al., 1993) ; elle est plus importante dans les tissus de jeunes individus et en présence de FBS (Maroudas A. et al., 1999). Certaines études reportent une baisse de synthèse des PG causée par les compressions dynamiques (Wong M. et al., 1999 ; Steinmeyer J. et Knue S., 1997 ; Torzilli P.A. et al., 1997), ce qui est contradictoire avec les résultats précédemment cités. La synthèse de fibronectine semble être plus sensible que les autres protéines aux stimulations mécaniques ; elle est augmentée par des compressions intermittentes (Steinmeyer J. et al., 1997) ou cycliques, parallèlement à COMP (Wong M. et al., 1999), mais peut être diminuée si la durée et l'amplitude de compression sont augmentées (Steinmeyer J. et al., 1999). La synthèse de décorine est augmentée par des compressions qui ne changent pas la synthèse des autres PG, dans les cartilages immatures et matures (Visser N.A. et al., 1994). Des compressions de forte amplitude peuvent induire une

augmentation de la dénaturation du COLLII (dans la zone profonde et près de la surface articulaire), une hausse de la synthèse des PG et de fibronectine, ainsi qu'un contenu en eau élevé (Chen C.T. et al., 1999). Finalement, les compressions dynamiques peuvent induire des changements dans l'orientation des fibrilles de collagène (Kiraly K. et al., 1998).

3.3 Cellules en suspension

Des recherches ayant pour but la régénération du cartilage articulaire portent sur l'étude des chondrocytes cultivés en suspension. Le rôle des stimulations mécaniques peut être étudié dans ces systèmes.

Pour les chondrocytes cultivés dans l'agarose, les compressions statiques réduisent la biosynthèse des PG et des protéines, tandis que les compressions dynamiques l'augmente (Buschmann M.D. et al., 1995) ; ces dernières stimulent aussi la prolifération des cellules provenant de la zone superficielle (Lee D.A. et al., 2000). Lorsque des chondrocytes (provenant d'adultes) sont extraits de différentes zones topographiques de la surface articulaire (zone de chargement vs zone sans chargement) et sont mis en culture dans l'alginate, ils conservent la variabilité au niveau du métabolisme des PG (Little C.B. et Ghosh P., 1997). Les déformations cycliques appliquées aux cultures de chondrocytes dans des matrices tridimensionnelles de collagène augmentent la prolifération des chondrocytes immatures et influencent l'étendue de la différenciation cellulaire (Wu Q.Q. et Chen Q., 2000).

3.4 Culture de cellules en monocouches

L'étude des effets causés par les stimulations mécaniques sur les chondrocytes extraits du cartilage, et mis en culture en monocouches, présente certains avantages

(extraction facile de l'ARNm, découplage des certains paramètres physiques, etc.). Cependant, le principal inconvénient de ce système est que les chondrocytes ne sont plus dans des conditions semblables à leur environnement *in vivo*, et perdent entre autres leurs interactions avec la matrice. De plus, il est difficile de maintenir le phénotype chondrocytique des cellules lorsqu'elles sont en monocouches. Le prochain paragraphe n'est qu'un survol des effets des stimulations mécaniques sur les chondrocytes en culture, et les détails y sont omis.

Les étirements cycliques peuvent induire l'expression d'une protéine de stress de haut poids moléculaire (SIC1) (Chano T. et al., 2000), peuvent agir comme antagoniste des actions de IL-1b (Xu Z. et al., 2000), ou peuvent induire la production de MMP-9 et de Il-1 (Fujisawa T. et al., 1999), selon le protocole utilisé. Les signaux induits par l'écoulement du fluide induisent l'activation de la voie de signalisation MEK-1/ERK, menant à une diminution de l'expression du gène d'aggrécane (Hung C.T. et al., 2000). La pression hydrostatique intermittente augmente l'ARNm de l'aggrécane et de COLLI, mais est suivie d'une diminution de l'ARNm de COLLI si le protocole de stimulation est maintenu plus de 8 heures consécutives (Smith R.L. et al., 2000). La pression hydrostatique cyclique inhibe la synthèse des PG pour un temps de compression inférieur à deux heures ; cependant, pour un temps de compression de vingt heures et à fréquence élevée, la synthèse de PG est augmentée (Parkkinen J.J. et al., 1993). La pression intermittente subambiante augmente la synthèse des PG et des protéines non collagèneuses de façon réversible, et augmente le niveau d'ARNm de l'aggrécane. L'inhibition de la synthèse des PG par la pression hydrostatique continue n'interfère pas avec le trafic vésiculaire associé aux microtubules, tandis que la stimulation de la synthèse des PG par pression cyclique n'a pas lieu si la nature dynamique des microtubules est dérangée par nocodazole (Jortikka M.O. et al., 2000). La pression cause une hyperpolarisation de la membrane des cellules saines tandis qu'elle cause une dépolarisation de la membrane des cellules provenant de cartilage ostéoarthritique (Millward-Sadler S.J. et al., 2000).

Chapitre 4 : Design et modélisation pour les compressions mécaniques non confinées

Dans ce projet, les stimulations mécaniques sont induites par le biais de compressions mécaniques, en configuration non confinée (figure 4.1). Cette configuration ne limite pas l'expansion latérale des explants comprimés, et contourne certains problèmes de modélisation de la compression confinée (Buschmann M.D. et al., 1998).

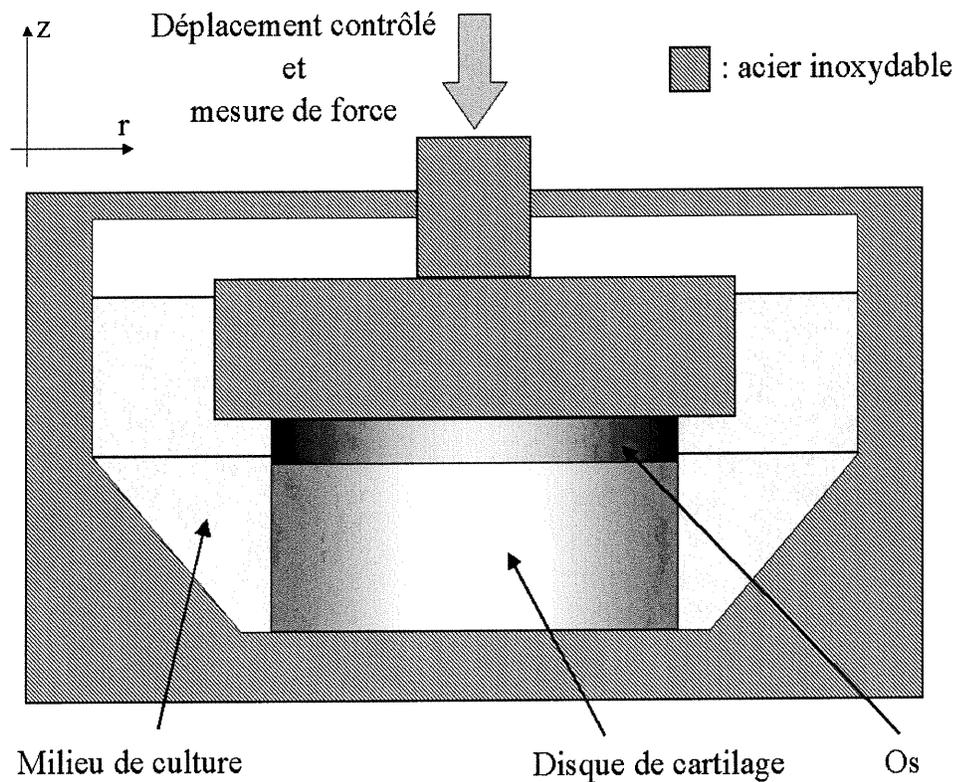


Figure 4.1 : Schéma de la configuration d'une compression non confinée

Les disques (explants cylindriques de cartilage/os) sont toujours placés de façon à exposer la surface articulaire au fond des puits (figure 4.2 A), permettant la diffusion par la paroi latérale des disques seulement (l'os agit comme une barrière). Dans le cas contraire, les disques non comprimés auraient une surface supplémentaire,

la surface articulaire, exposée au milieu de culture (figure 4.2 B), ce qui induirait un artefact.

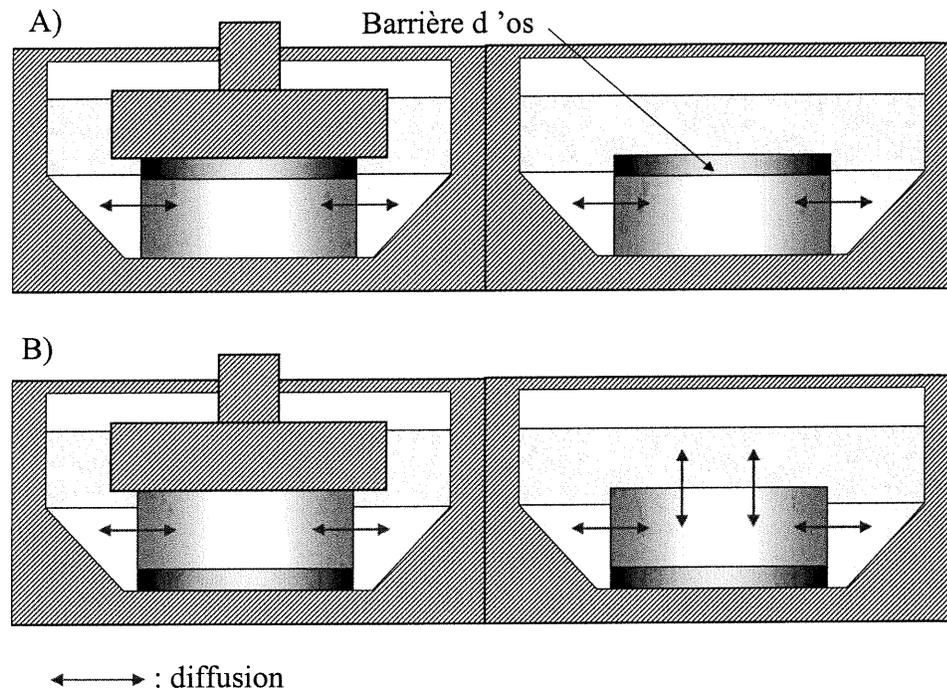


Figure 4.2 : Surfaces du disque permettant la diffusion des molécules, selon l'orientation de la surface articulaire : (A) configuration utilisée et (B) configuration à éviter

4.1 Chambre à compression

Les compressions sont effectuées dans une chambre à compression. Cette dernière est déposée sur un actionneur qui assure le déplacement, tandis que la tige supérieure est fixée à une cellule de charge. Le montage expérimental est le MACH-1 (version 101), de la compagnie Biosyntech Canada Incorporée ; il comprend le bâti (auquel sont fixés l'actionneur et la cellule de charge), le contrôleur de l'actionneur, l'amplificateur de la cellule de charge, ainsi que le logiciel permettant le choix du déplacement, ainsi que l'enregistrement de la charge et du déplacement.

La chambre à compression initiale comportait certains points faibles, d'où le besoin d'en concevoir une nouvelle appelée *Quattro*. Les améliorations apportées par cette dernière sont résumées dans le tableau 4-I et le plan d'assemblage est présenté à l'annexe II).

La chambre initiale :	<i>Quattro</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Ne comprime qu'un échantillon à la fois ; 	<ul style="list-style-type: none"> • Permet de comprimer simultanément quatre échantillons d'épaisseurs différentes, grâce à l'utilisation de micromètres ;
<ul style="list-style-type: none"> • contient l'échantillon comprimé et son échantillon contrôle dans le même compartiment ; 	<ul style="list-style-type: none"> • permet l'analyse des milieux de culture, chaque échantillon étant dans un compartiment séparé ;
<ul style="list-style-type: none"> • comporte un problème de friction entre la tige de compression et le couvercle de la chambre (fausse la valeur de la charge et pose un problème pour trouver la position de contact) ; 	<ul style="list-style-type: none"> • élimine la friction par l'utilisation d'un anneau qui glisse librement autour des tiges de compression et sur le couvercle ;
<ul style="list-style-type: none"> • induit la charge de la tige sur l'échantillon pendant le transport à partir de la hotte à flux laminaire jusqu'à l'incubateur ; 	<ul style="list-style-type: none"> • élimine la charge induite lors du transport de la chambre grâce à un <i>espaceur</i> qui empêche les tiges de compression d'être en contact avec les échantillons ;
<ul style="list-style-type: none"> • n'assure pas aux échantillons de demeurer sous la tige de compression en tous temps ; 	<ul style="list-style-type: none"> • assure aux échantillons d'être sous la tige de compression, par la configuration du fond des puits ;
<ul style="list-style-type: none"> • a un couvercle en deux parties et une tige qui ne sont pas faciles à manipuler de façon stérile lors du changement de l'échantillon. 	<ul style="list-style-type: none"> • facilite la manipulation stérile du couvercle et des tiges de compression.

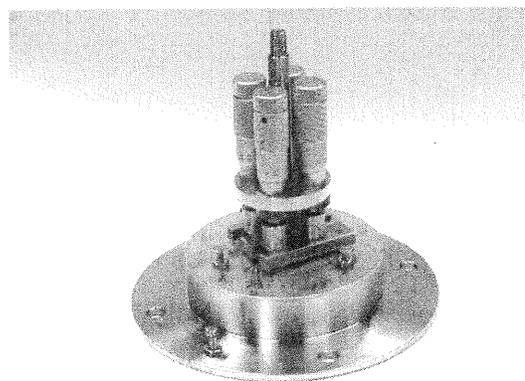
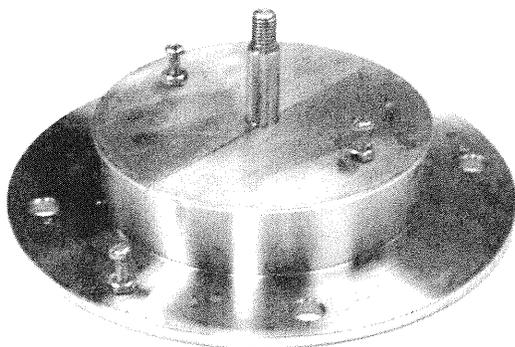


Tableau 4-I : Comparaison de la chambre initiale et de *Quattro*

4.2 Prédiction du modèle biphasique composite

Les compressions mécaniques en configuration non confinée induisent plusieurs phénomènes physiques à l'intérieur de l'explant. Ces phénomènes ont des distributions radiales variées, qui diffèrent selon les paramètres de compression utilisés (dont la vitesse de déformation axiale). La comparaison de ces distributions avec les patrons des réponses biologiques, suite aux stimulations mécaniques, permet d'avoir une idée des paramètres physiques qui influencent l'activité des chondrocytes.

Le modèle analytique développé par Soulhat J. et al. (1999) permet de prédire de façon théorique la charge totale à la surface, la pression relative du fluide, la vitesse relative du fluide, le déplacement radial ainsi que les déformations radiales et circonférentielles induites par les compressions non confinées lors d'un pas de relaxation de contrainte. Ce modèle considère le cartilage comme étant constitué de deux phases distinctes, incompressibles et non miscibles : une phase fluide et une phase solide (description biphasique). La phase solide est considérée comme étant une matrice isotrope et homogène emprisonnée dans un réseau de fibrilles, distribué de façon homogène sur le volume, qui n'a de résistance qu'en tension (structure composite).

En modifiant l'équation de déplacement axial utilisée par Soulhat J. et al. (1999), j'ai obtenu les équations qui prédisent les phénomènes physiques causés par les compressions utilisées dans mon projet : les compressions en dent de scie (figure 4.3).

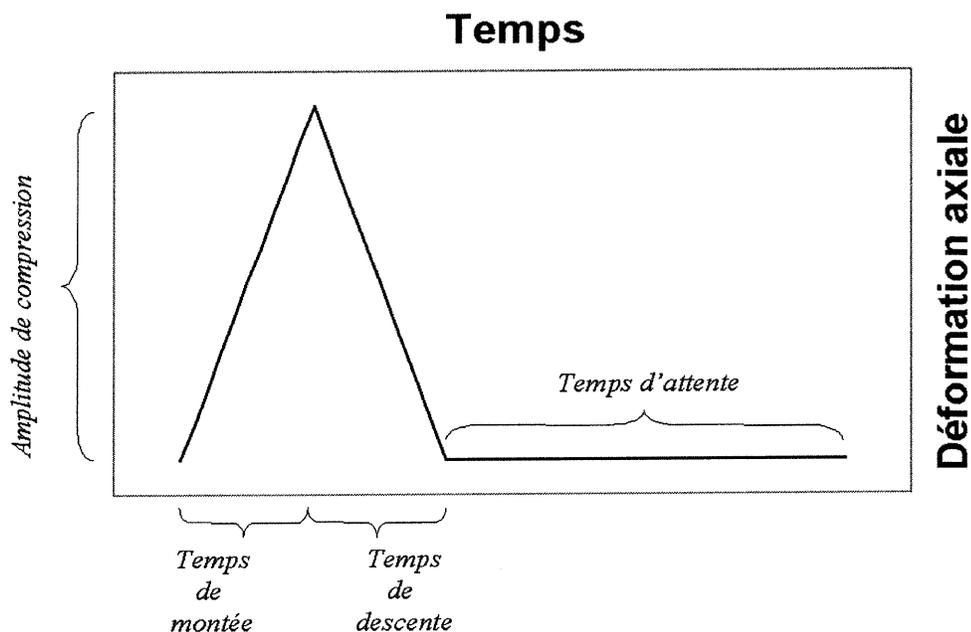


Figure 4.3 : Graphique de la déformation axiale en fonction du temps d'une compression en dent de scie

L'équation 1 représente la déformation axiale en dent de scie dans le domaine temporel, de temps de montée égal au temps de descente.

$$\varepsilon_z(t) = \begin{cases} \frac{\varepsilon_0 t}{t_0} & \text{si } 0 \leq t \leq t_0 \\ \frac{\varepsilon_0(2t_0 - t)}{t_0} & \text{si } t_0 \leq t \leq 2t_0 \\ 0 & \text{si } t \geq 2t_0 \end{cases}$$

Équation 1 : Déplacement axial d'une fonction en dent de scie, où t_0 est le temps de montée (et de descente) et ε_0 est l'amplitude maximale de la déformation, dans le domaine temporel

L'équation 2 représente la même fonction, mais dans le domaine de Laplace (obtenue par la transformée de Laplace de l'équation 1).

$$\varepsilon_z(s) = \frac{2\varepsilon_0}{s} (e^{-t_0 s} - e^{-2t_0 s}) + \frac{\varepsilon_0}{t_0 s^2} [1 + e^{-2t_0 s} (1 + 2t_0 s) - 2e^{-t_0 s} (1 + t_0 s)]$$

Équation 2 : Déplacement axial d'une fonction en dent de scie , où t_0 est le temps de montée (et de descente) et ε_0 est l'amplitude maximale de la déformation, dans le domaine de Laplace

La multiplication de l'équation 2 par les fonctions de transfert du modèle (rassemblées dans le tableau de l'annexe III), permet d'obtenir l'équation de chacun des paramètres physiques dans le domaine de Laplace. Une transformée inverse de Laplace fournit ces équations dans le domaine du temps (tableaux 4-II, 4-III et 4-IV).

σ_a est la contrainte moyenne à la surface, u_r est le déplacement radial, ε_r est la déformation radiale, ε_θ est la déformation circonférentielle, p est la pression relative du fluide et v_r est la vitesse relative du fluide dans la direction radiale. A , B et C sont des coefficients reliés à ν_m , E_m et E_f (relations en annexe III); ν_m est le coefficient de Poisson de la matrice, E_m est le module de Young de la matrice écoulee et E_f est le module de Young effectif du réseau de fibrilles. La perméabilité hydraulique est représentée par k , et α est le rapport du volume de solide sur le volume de fluide. E_{33} est le module de compression non confinée, S_{11} et S_{13} sont des éléments de la matrice de rigidité. Le rayon du disque est r_0 , le temps de montée (et de descente) est t_0 et l'amplitude de déformation axiale maximale est ε_0 . La fonction de Bessel d'ordre m est J_m , et a_n est la $n^{\text{ième}}$ racine de l'équation caractéristique suivante :

$$\left(\frac{a_n}{\sqrt{s_0}} \right) J_0 \left(\frac{a_n}{\sqrt{s_0}} \right) - A J_1 \left(\frac{a_n}{\sqrt{s_0}} \right) = 0. \quad (\text{Équation 3})$$

Pour avoir plus de détails sur le modèle, il suffit de se référer à l'article de Soulhat J. et al. (1999).

$$0 \leq t \leq t_0$$

Équation 4

$$\frac{\sigma_a(t)}{E_{33}\varepsilon_0} = \frac{1-B}{4(A-2)t_0} + \frac{t}{t_0} + \frac{(B-1)(1-2/A)}{t_0} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-a_n^2 t)}{a_n^2 (a_n^2/2A + A/2 - 1)}$$

Équation 5

$$\frac{u(t)}{\varepsilon_0 r_0} = \frac{r^3}{16(2/A-1)t_0} - \frac{r(4/A-1)}{16(1-2/A)^2 t_0} - \frac{r(A-1)}{(A-2)} \frac{t}{t_0} + \frac{A}{2t_0} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-a_n^2 t) J_1(a_n r)}{a_n^3 (a_n^2/2A + A/2 - 1) J_0(a_n)}$$

Équation 6

$$\frac{\varepsilon_r(t)}{\varepsilon_0} = -\frac{3r^2}{16(1-2/A)t_0} - \frac{(4/A-1)}{16(2/A-1)^2 t_0} - \frac{(A-1)}{(A-2)} \frac{t}{t_0} + \frac{A}{2t_0} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-a_n^2 t) [J_0(a_n r) - (1/a_n r) J_1(a_n r)]}{a_n^2 (a_n^2/2A + A/2 - 1) J_0(a_n)}$$

Équation 7

$$\frac{\varepsilon_\theta(t)}{\varepsilon_0} = -\frac{Ar^2}{16(A-2)t_0} - \frac{A(4-A)}{16(2-A)^2 t_0} - \frac{(A-1)}{(A-2)} \frac{t}{t_0} + \frac{A}{2t_0 r} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-a_n^2 t) J_1(a_n r)}{a_n^3 (a_n^2/2A + A/2 - 1) J_0(a_n)}$$

Équation 8

$$\frac{p(t)(1+\alpha)}{E_{33}\varepsilon_0} = \frac{S_{13} - S_{11}}{2E_{33}t_0} \left[-\frac{r^2 - 1}{2(2-A)} - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-a_n^2 t) [J_0(a_n r) - J_0(a_n)]}{a_n^2 (a_n^2/2A + A/2 - 1) J_0(a_n)} \right]$$

Équation 9

$$\frac{v_r(t)r_0}{(1+\alpha)kE_{33}\varepsilon_0} = \frac{S_{13} - S_{11}}{2E_{33}t_0} \left[-\frac{r}{(A-2)} - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-a_n^2 t) J_1(a_n r)}{a_n (a_n^2/2A + A/2 - 1) J_0(a_n)} \right]$$

Tableau 4-II : Expressions des paramètres physiques du modèle associés au déplacement axial en dent de scie, pour $0 \leq t \leq t_0$

$$t_0 \leq t \leq 2t_0$$

Équation 10

$$\frac{\sigma_a(t)}{E_{33}\varepsilon_0} = 2 + \frac{B-1}{4(A-2)t_0} - \frac{t}{t_0} + \frac{(B-1)(1-2/A)}{t_0} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-a_n^2 t) [1 - 2\exp(a_n^2 t_0)]}{a_n^2 (a_n^2 / 2A + A/2 - 1)}$$

Équation 11

$$\begin{aligned} \frac{u(t)}{\varepsilon_0 r_0} = & \frac{r^3}{16(1-2/A)t_0} - \frac{r(1-4/A)}{16(1-2/A)^2 t_0} + \frac{r(A-1)}{(A-2)} \frac{t}{t_0} - 2r \frac{(A-1)}{(A-2)} \\ & + \frac{A}{2t_0} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-a_n^2 t) [1 - 2\exp(a_n^2 t_0)] J_1(a_n r)}{a_n^3 (a_n^2 / 2A + A/2 - 1) J_0(a_n)} \end{aligned}$$

Équation 12

$$\begin{aligned} \frac{\varepsilon_r(t)}{\varepsilon_0} = & \frac{3r^2}{16(1-2/A)t_0} - \frac{(1-4/A)}{16(2/A-1)^2 t_0} + \frac{(A-1)}{(A-2)} \frac{t}{t_0} - \frac{2(A-1)}{(A-2)} \\ & + \frac{A}{2t_0} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-a_n^2 t) [1 - 2\exp(a_n^2 t_0)] [J_0(a_n r) - (1/a_n r) J_1(a_n r)]}{a_n^2 (a_n^2 / 2A + A/2 - 1) J_0(a_n)} \end{aligned}$$

Équation 13

$$\begin{aligned} \frac{\varepsilon_\theta(t)}{\varepsilon_0} = & \frac{Ar^2}{16(A-2)t_0} - \frac{A(A-4)}{16(A-2)^2 t_0} + \frac{(A-1)}{(A-2)} \frac{t}{t_0} - \frac{2(A-1)}{(A-2)} \\ & + \frac{A}{2t_0 r} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-a_n^2 t) [1 - 2\exp(a_n^2 t_0)] J_1(a_n r)}{a_n^3 (a_n^2 / 2A + A/2 - 1) J_0(a_n)} \end{aligned}$$

Équation 14

$$\frac{p(t)(1+\alpha)}{E_{33}\varepsilon_0} = \frac{S_{13} - S_{11}}{2E_{33}t_0} \left[\frac{r^2 - 1}{2(2-A)} - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-a_n^2 t) [1 - 2\exp(a_n^2 t_0)] [J_0(a_n r) - J_0(a_n)]}{a_n^2 (a_n^2 / 2A + A/2 - 1) J_0(a_n)} \right]$$

Équation 15

$$\frac{v_r(t)r_0}{(1+\alpha)kE_{33}\varepsilon_0} = \frac{S_{13} - S_{11}}{2E_{33}t_0} \left[\frac{r}{(A-2)} - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-a_n^2 t) [1 - 2\exp(a_n^2 t_0)] J_1(a_n r)}{a_n (a_n^2 / 2A + A/2 - 1) J_0(a_n)} \right]$$

Tableau 4-III : Expressions des paramètres physiques du modèle associés au déplacement axial en dent de scie, pour $t_0 \leq t \leq 2t_0$

$$2t_0 \leq t$$

Équation 16

$$\frac{\sigma_a(t)}{E_{33}\varepsilon_0} = \frac{(B-1)(1-2/A)}{t_0} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-a_n^2 t) [1 - \exp(a_n^2 t_0)]^2}{a_n^2 (a_n^2/2A + A/2 - 1)}$$

Équation 17

$$\frac{u(t)}{\varepsilon_0 r_0} = \frac{A}{2t_0} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-a_n^2 t) [1 - \exp(a_n^2 t_0)]^2 J_1(a_n r)}{a_n^3 (a_n^2/2A + A/2 - 1) J_0(a_n)}$$

Équation 18

$$\frac{\varepsilon_r(t)}{\varepsilon_0} = \frac{A}{2t_0} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-a_n^2 t) [1 - \exp(a_n^2 t_0)]^2 [J_0(a_n r) - (1/a_n r) J_1(a_n r)]}{a_n^2 (a_n^2/2A + A/2 - 1) J_0(a_n)}$$

Équation 19

$$\frac{\varepsilon_\theta(t)}{\varepsilon_0} = \frac{A}{2t_0 r} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-a_n^2 t) [1 - \exp(a_n^2 t_0)]^2 J_1(a_n r)}{a_n^3 (a_n^2/2A + A/2 - 1) J_0(a_n)}$$

Équation 20

$$\frac{p(t)(1+\alpha)}{E_{33}\varepsilon_0} = -\frac{S_{13} - S_{11}}{2E_{33}t_0} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-a_n^2 t) [1 - \exp(a_n^2 t_0)]^2 [J_0(a_n r) - J_0(a_n)]}{a_n^2 (a_n^2/2A + A/2 - 1) J_0(a_n)}$$

Équation 21

$$\frac{v_r(t)r_0}{(1+\alpha)kE_{33}\varepsilon_0} = -\frac{S_{13} - S_{11}}{2E_{33}t_0} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-a_n^2 t) [1 - \exp(a_n^2 t_0)]^2 J_1(a_n r)}{a_n (a_n^2/2A + A/2 - 1) J_0(a_n)}$$

Tableau 4-IV : Expressions des paramètres physiques du modèle associés au déplacement axial en dent de scie, pour $2t_0 \leq t$

Les graphiques suivants illustrent les résultats de modélisation des différents paramètres à leur valeur maximale, i.e. à la fin du temps de montée (à $t = t_0$). Les paramètres utilisés sont rassemblés dans le tableau 4-V.

Paramètre	Valeur
r_0	1.5 mm
E_m	0.3 MPa
E_f	14.8 MPa
ν_m	0.42
K	0.0015 mm ² /(MPa-sec)
E_{33}	1 MPa
α	1/3
ε_0	25 %

Tableau 4-V : Paramètres utilisés dans les équations pour la modélisation

La figure 4.4 montre comment varie la contrainte moyenne à la surface (force totale divisée par l'aire de la surface articulaire de l'explant) en fonction du temps de montée (équation 4 à $t = t_0$, pour différents t_0). Plus le temps de montée est court, plus la pression à la surface est grande.

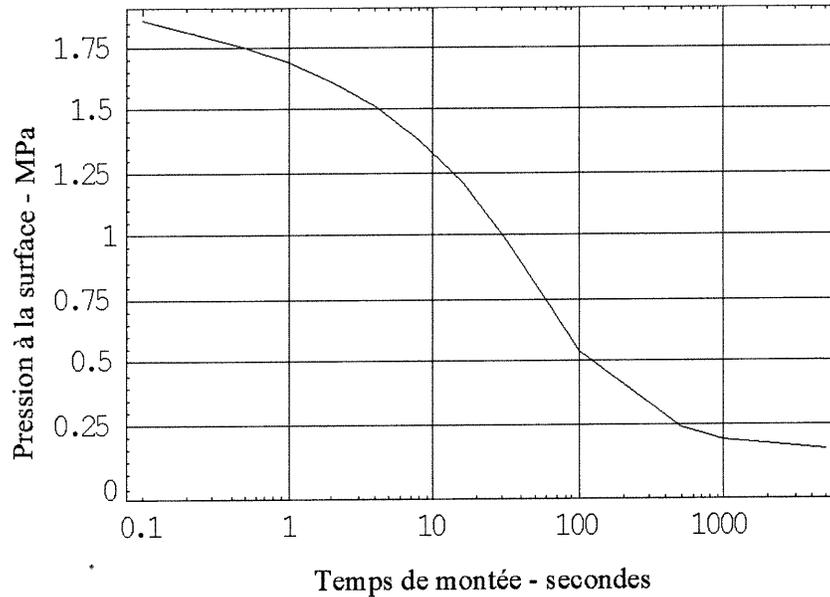


Figure 4.4 : Modélisation de la pression à la surface à $t = t_0$, pour différents temps de montée (paramètres du tableau 4-V, équation 4 du tableau 4-II)

NOTES :

- Les six prochains graphiques sont tridimensionnels. L'axe des x représente le temps de montée (t_0), l'axe des y est la position radiale ($r = 0$ est le centre du disque et $r = r_0 = 1.5$ mm est la périphérie pour un disque de 3 mm de diamètre), et l'axe des z représente la valeur du paramètre physique calculé à l'aide du modèle, au temps $t = t_0$.
- Le point d'observation des graphiques des figures 4.5, 4.9 et 4.10 diffère de celui des graphiques des figures 4.6, 4.7 et 4.8 ; ces points d'observations optimisent la visualisation des variations radiales.
- Le temps est en échelle logarithmique.

La figure 4.5 montre la distribution radiale de la pression relative du fluide en fonction du temps de montée (équation 8 à $t = t_0$, pour différents t_0). La pression semble homogène sur tout le rayon du disque (sauf à l'extrême périphérie, où la pression est nulle en tous temps) pour les vitesses de montée inférieures à 1 seconde. Pour les temps de montée compris entre 1 seconde et 10 secondes, la pression interne diminue près de la périphérie du disque, mais demeure élevée dans la partie centrale.

À partir d'un temps de montée supérieure à 10 secondes, elle décroît de façon évidente sur tout le rayon pour atteindre une faible valeur à $t_0 = 500$ secondes.

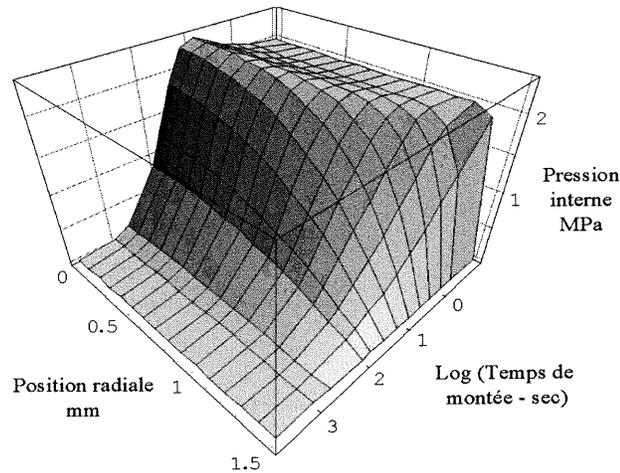


Figure 4.5 : Modélisation de la distribution radiale de la pression relative du fluide à $t = t_0$, pour différents temps de montée (paramètres du tableau 4-V, équation 8 du tableau 4-II)

La figure 4.6 montre la distribution radiale de la vitesse relative du fluide en fonction du temps de montée (équation 9 à $t = t_0$, pour différents t_0); elle représente la vitesse à laquelle la phase fluide se déplace par rapport à la phase solide. Le déplacement du fluide vers l'extérieur du disque est causé par le gradient de pression radial, et est maximal en périphérie du disque ; elle est très grande pour des temps de montée très court ($t_0 < 1$ seconde) et diminue dramatiquement jusqu'à $t_0 = 10$ secondes. Pour les temps de montée compris entre 10 et 100 secondes, le déplacement du fluide est lent mais s'effectue sur tout le rayon du disque (voir figure 4.7), sauf en plein centre du disque (où le déplacement moyen du liquide est toujours nul).

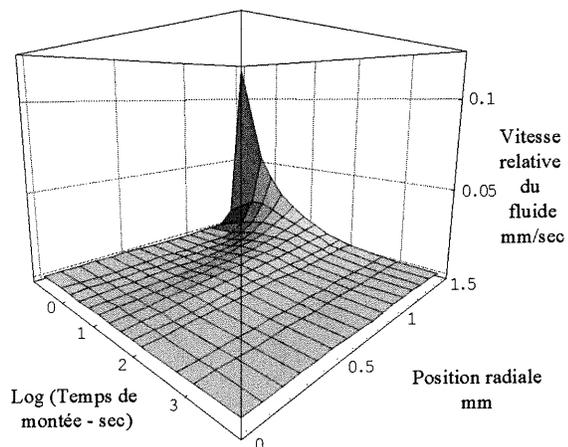


Figure 4.6 : Modélisation de la distribution radiale de la vitesse relative du fluide à $t = t_0$, pour différents temps de montée (paramètres du tableau 4-V, équation 9 du tableau 4-II)

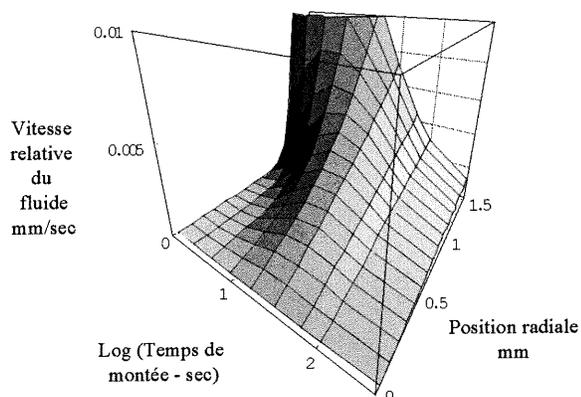


Figure 4.7 : Zoom de la modélisation de la distribution radiale de la vitesse relative du fluide à $t = t_0$, pour différents temps de montée (paramètres du tableau 4-V, équation 9 du tableau 4-II)

La figure 4.8 montre la distribution radiale du déplacement radial de la matrice solide en fonction du temps de montée (équation 5 à $t = t_0$, pour différents t_0). Il est élevé pour des temps de montée courts, et diminue de façon dramatique dans l'intervalle 10 secondes $< t_0 < 500$ secondes.

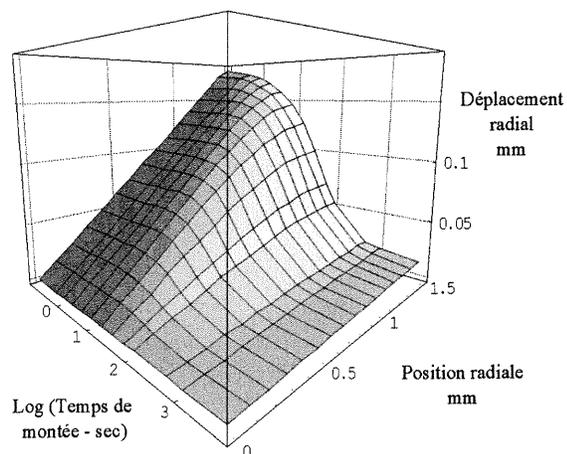


Figure 4.8 : Modélisation de la distribution radiale du déplacement radial à $t = t_0$, pour différents temps de montée (paramètres du tableau 4-V, équation 5 du tableau 4-II)

La déformation radiale (figure 4.9, obtenue de l'équation 6 à $t = t_0$, pour différents t_0) varie de la même façon que la pression interne (figure 4.5).

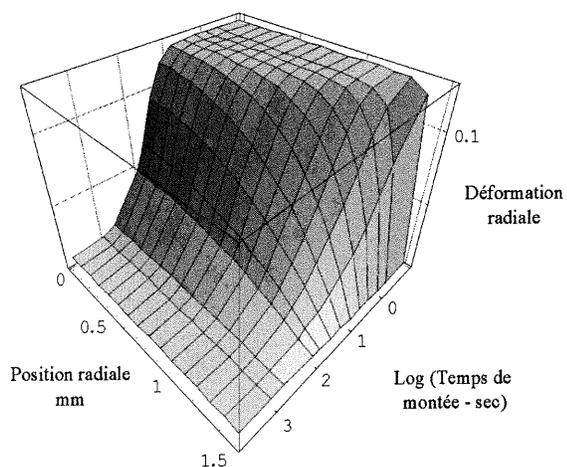


Figure 4.9 : Modélisation de la distribution radiale de la déformation radiale à $t = t_0$, pour différents temps de montée (paramètres du tableau 4-V, équation 6 du tableau 4-II)

La déformation circonférentielle varie très peu selon le rayon du disque (figure 4.10, obtenue de l'équation 7 à $t = t_0$, pour différents t_0), et chute pour un temps de montée supérieur à 10 secondes.

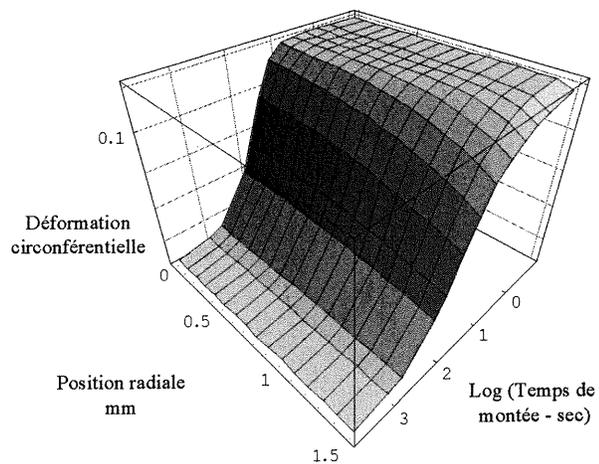


Figure 4.10 : Modélisation de la distribution radiale de la déformation circulaire à $t = t_0$, pour différents temps de montée (paramètres du tableau 4-V, équation 7 du tableau 4-II)

4.3 Sommaire du chapitre

La chambre a compression *Quattro* qui a été fabriquée présente deux avantages principaux : (1) elle permet de comprimer quatre échantillons en même temps, et (2) permet l'analyse des milieux de culture.

La modélisation à l'aide du modèle biphasique composite permet d'avoir une bonne idée des phénomènes physiques induits par les compressions non confinées. Les compressions rapides (temps de montée inférieur à dix secondes) induisent une pression relative du fluide et une déformation radiale maximales pour une déformation axiale donnée, mais presque sans gradient radial (sauf à la toute périphérie du disque) ; le déplacement du fluide n'est localisé qu'en périphérie. À des vitesses moyennes (temps de montée compris entre 10 et 100 secondes) les profils de pression relative du fluide et de déformation radiale démontrent un gradient radial sur presque tout le rayon ; la vitesse du fluide est beaucoup plus petite que pour les grandes vitesses de déformation axiale, mais le déplacement du fluide a lieu sur tout le rayon du disque (sauf en plein centre). Pour les vitesses lentes (temps de montée supérieur à 100 secondes), l'amplitude des phénomènes physiques est relativement faible et homogène sur tout le rayon.

Chapitre 5 : Le système d'explants cartilage/os : méthodes et analyses préliminaires du CPII

L'hypothèse à vérifier dans ce projet est que les compressions mécaniques peuvent moduler la synthèse du collagène type II (COLLII) dans le système d'explants bovins de cartilage/os. L'article de Dumont J. et al. (1999), dont je suis coauteur, démontre la stabilité de ce système, lors d'une culture maintenue pendant plus de trois semaines, aux points de vue de la masse du tissu, de la densité et de la viabilité cellulaire, du contenu en collagène total et en collagène dénaturé, ainsi que des propriétés mécaniques (dynamique et à l'équilibre). Le métabolisme des protéoglycanes (PG) atteint un état stable après cinq jours de culture, où le taux de diffusion des PG vers le milieu de culture est compensé par le taux de synthèse de nouveaux PG. Le contenu en propeptide C-terminal du COLLII (CPII) semble diminuer dans la première semaine de culture, pour atteindre un niveau stable après cette période.

Le CPII a un temps de demi-vie d'environ 16 heures dans le cartilage en culture ; sa concentration est donc le reflet du taux de synthèse du COLLII (Nelson F. et al., 1998). Un essai radioimmunologique, ou RIA (pour *radioimmuno assay*), a été mis au point par Hinek A. et al. (1987) pour doser de façon quantitative le CPII. Cet essai est l'outil de départ de ce projet pour l'analyse du taux de synthèse du COLLII, après compressions mécaniques. Les techniques d'immunofluorescence, d'électrophorèse (SDS-PAGE), de détection *Western Blot* et de détection par autoradiographie ont aussi été utilisées dans ce projet pour permettre une analyse plus détaillée des mécanismes reliés à la synthèse du COLLII.

5.1 Méthodes utilisées

5.1.1 Isolation et culture des explants

La méthode d'isolation des explants est décrite dans l'article de Dumont J. et al. (1999). Les différentes étapes sont brièvement décrites ci-dessous :

- la jointure d'épaule de bœuf (un à deux ans) ayant une membrane synoviale intacte est obtenue à l'abattoir (six à seize heures *post-mortem*) ;
- la jointure est ouverte à l'aide d'un bistouri et est constamment maintenue humide à l'aide de HBSS ;
- des cylindres (diamètre de 4 mm) sont formés à l'aide d'une perceuse standard munie d'une mèche au centre vide (l'axe centrale est orienté perpendiculairement à la surface articulaire) ;
- les cylindres sont détachés de l'articulation à l'aide d'un tailleur de plâtre électrique (scie oscillante) ;
- un montage muni d'une scie circulaire permet ensuite de couper, parallèlement à la surface articulaire, l'os subchondral (l'épaisseur des disques est d'environ 1.5 mm, dont 0.5 mm d'os et 1 mm de cartilage articulaire);
- un poinçon (diamètre de 3 mm) permet d'avoir des disques ayant une surface latérale bien définie ;
- les disques sont ensuite lavés (HBSS et antibiotique) et mis en culture (DME/F-12, antibiotique, BSA et acide ascorbique) ;
- pendant toute la culture des disques, le milieu de culture est changé quotidiennement.

NOTES :

- Le milieu de culture mentionné dans l'article de Dumont J. et al. (1999), i.e. SIGMA D 8900, a été remplacé par le milieu de culture SIGMA D 0547. Le

premier contient du HEPES, tandis que le second n'en contient pas. Poole C.A. et al. (1982) ont mis en garde l'utilisation de HEPES, un tampon qui induit la formation de vacuoles cytoplasmiques.

- Ultérieurement dans ce document, il sera mentionné lorsque d'autres conditions de culture ont été utilisées (absence d'acide ascorbique, remplacement du BSA par du FBS, ajout d'autres produits).

5.1.2 Extraction des protéines avec la chlorure de guanidine

La chlorure de guanidine (GuCl) est un agent chaotrope qui dénature les protéines (sans réduire les ponts disulfures). L'extraction à l'aide de ce produit permet la libération des PG et des protéines solubles. L'extraction passive est simple et nécessite peu de manipulations :

- mettre l'explant (d'environ 12 mg) dans 150 μ L de GuCl (4M dans 50 mM d'acétate de sodium ou de potassium, pH 5.8, 4°C) ;
- secouer pendant 24 heures à 4°C (sur un *vortex*, à vitesse moyenne) ;
- transférer la GuCl dans un tube et le préserver à -20°C ;
- remettre l'explant dans 150 μ L de GuCl, et secouer encore pendant 24 heures à 4°C ;
- récupérer le GuCl et le combiner avec le premier extrait ;
- l'extrait est prêt pour les étapes suivantes, qui dépendent de l'analyse ultérieure.

NOTES:

- Le disque peut ensuite être congelé dans l'azote liquide et pulvérisé en poudre. La récupération de cette poudre à l'aide de la solution RIPA (au moins 300 μ L) permet d'extraire les protéines liées aux membranes (plasmique, réticulum endoplasmique, etc.).
- Les portions de l'extrait GuCl qui ne sont pas utilisées immédiatement doivent être congelées à -80°C.

- La GuCl , étant dénaturante, inactive les protéases. Si elle est remplacée par une autre solution, l'ajout d'inhibiteurs de protéases (PMSF, iodoacétamide, EDTA, pepstatine A, etc.) minimisera la dégradation subséquente des protéines.
- La méthode d'extraction de l'essai multivalent développé par le Dr. Hoemann et ses collègues (annexe V) comporte plusieurs étapes d'extraction. Cette méthode demande plus de travail que l'extraction passive, mais permet d'analyser les protéines, les PG, l'ARNm et l'ADN d'un même échantillon.

5.1.3 Dialyse et précipitation à l'éthanol

Certaines analyses ne peuvent être effectuées en présence de GuCl . Une étape de dialyse ou de précipitation à l'éthanol est donc nécessaire dans ces cas. Si un grand nombre d'échantillons (non radioactifs) doit être dialysé, l'utilisation du microdialyseur est adéquate. Les échantillons radioactifs peuvent être dialysés à l'aide des *Microcons* (tubes de filtration par centrifugation de la compagnie Millipore). La dialyse peut être remplacée par une précipitation à l'éthanol (83% volumique, pendant huit heures à -80°C) ; cette technique nécessite cependant la resuspension du culot.

5.1.4 RIA

Le protocole utilisé pour l'exécution de cet essai est inséré à l'annexe IV. Dans cet essai d'inhibition, la liaison de l'anticorps polyclonal (R160) au ^{125}I -CPII (de concentration connue) fait compétition avec sa liaison au CPII des échantillons (de concentrations inconnues). Les complexes anticorps-CPII sont précipités à l'aide de la protéine-A, qui lie la chaîne lourde des anticorps de type globuline (IgG). Après centrifugation, le surnageant est aspiré afin d'enlever le ^{125}I -CPII qui n'est pas lié à l'anticorps. La mesure du rayonnement gamma provenant du culot permet d'obtenir la concentration en CPII des échantillons, en la comparant aux mesures de rayonnement de la courbe standard. Cette dernière présente une sigmoïde (lorsque l'échelle des concentrations est logarithmique) ; la partie centrale est donc linéaire et les extrémités

sont asymptotiques (exemple de courbe standard à la figure 5.1). Les échantillons doivent être dilués (ou concentrés) afin que leur concentration corresponde à la partie linéaire de la courbe standard.

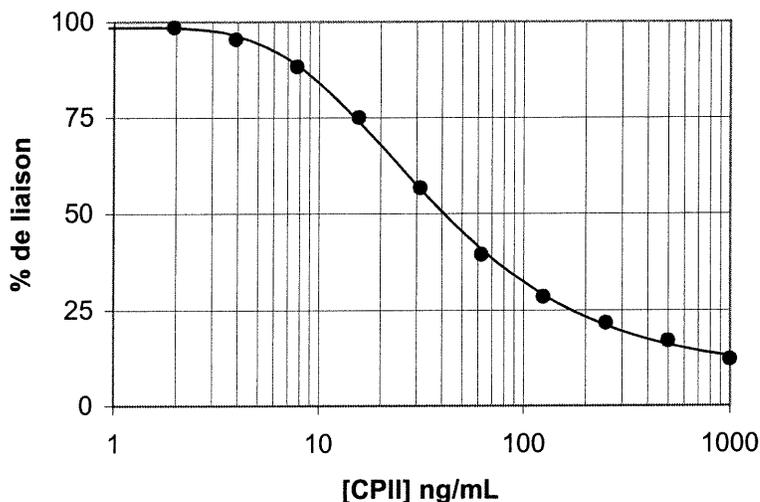


Figure 5.1 : Courbe standard typique du RIA anti-CPII

NOTE : La méthode de dialyse décrite dans le protocole du RIA (annexe IV) est celle utilisant les sacs à dialyse. Cette méthode n'est plus utilisée pour ce projet.

5.1.5 Immunofluorescence

La visualisation par immunofluorescence (IF) permet de localiser une protéine spécifique, selon l'anticorps primaire utilisé, par microscopie. L'utilisation de cette technique dans mon projet a pour but de trouver dans quelle(s) région(s) de l'explant se trouvent les variations induites (s'il y en a) par les compressions mécaniques ; surface articulaire vs zone profonde, centre vs périphérie, etc. À l'aide des prédictions du modèle théorique (section 4.2), on pourrait relier les variations biologiques à un (ou à des) paramètre(s) physique(s).

La détection du CPII par IF permet de localiser les précurseurs de COLLII contenant le CPII ainsi que le CPII clivé (sans distinction). Mais il faut être critique dans l'interprétation des résultats obtenus par IF. Par exemple, une préparation inadéquate du tissu peut induire une diffusion du CPII ; sa distribution lors de l'observation dans les sections coupées risque de ne pas être représentative de sa distribution réelle dans l'explant.

La figure 5.2 illustre un exemple de mauvaise préparation : on peut voir en (a) le marquage du CPII assez intense dans les cellules et dans la matrice de certaines régions, tandis qu'en (b) le CPII est exclusivement extracellulaire. La méthode de fixation en (b) précède la congélation et la coupe ; elle induit une diffusion du CPII vers l'extérieur des cellules et/ou elle fixe de façon excessive la matrice péricellulaire (empêchant l'anticorps primaire d'atteindre les épitopes de CPII de cette région).

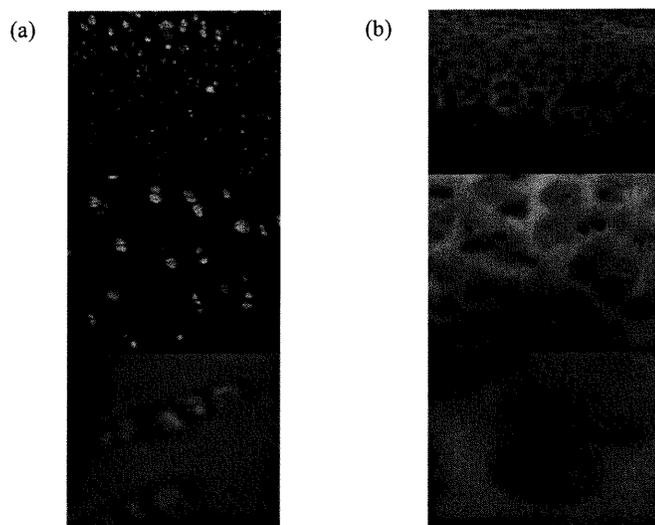


Figure 5.2 : Immunofluorescence anti-CPII : problème de fixation

Étapes de préparation : (a) congélation, coupe, fixation à la paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes à 20°C ; (b) fixation à la paraformaldéhyde 4% pendant 12 heures à 4°C, congélation, coupe. Marquage : anticorps primaire R160 (anti-CPII), anticorps secondaire FITC.

Il est nécessaire de ne fixer le tissu à la paraformaldéhyde qu'après la coupe. Pour fixer avant la coupe, il est préférable d'utiliser un mélange de paraformaldéhyde et de glutaraldéhyde dans une solution de cocadylate de sodium ; cependant, la glutaraldéhyde induit de l'autofluorescence qui doit être éliminée à l'aide de borohydrure de sodium.

Les coupes de la figure 5.2 ont une épaisseur d'environ 8 μm . Elles permettent d'obtenir des images en un plan, mais altèrent la morphologie des cellules et peuvent induire la perte d'éléments solubles (comme les PG et le CPII). Des coupes de 100 μm peuvent être utilisées afin de préserver la morphologie et limiter la diffusion, mais nécessite une étape de perméabilisation (pour rendre l'intérieur des cellules accessible aux anticorps). Pour avoir de belles images avec ces dernières coupes, il est préférable (mais pas essentiel) d'utiliser un microscope confocal.

Le protocole qui fut utilisé pour obtenir les images ultérieures de ce document est présenté à l'annexe VI.

5.1.6 SDS-PAGE

La séparation des protéines par poids moléculaire est effectuée par SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), et l'utilisation de β -mercaptoéthanol permet de réduire les ponts disulfures. Une fois l'électrophorèse terminée, les protéines doivent être fixées dans le gel ou transférées sur une membrane.

La fixation empêche la diffusion des protéines, qui peuvent être colorées afin de les observer directement sur le gel. Une fois fixé, le gel peut être séché pour être conservé, ou pour être exposé à une pellicule photographique (dans le cas ou des

isotopes radioactifs sont utilisés) afin d'observer les protéines nouvellement synthétisés.

Le transfert sur membrane (de nylon par exemple) permet la détection par immunobuvardage (*Western Blot*) ; dans cette technique, l'utilisation d'anticorps permet l'identification de protéines spécifiques. La membrane peut aussi être exposée à une pellicule photographique (dans le cas où des isotopes radioactifs sont utilisés) pour observer les protéines nouvellement synthétisés.

NOTE : Quand l'isotope utilisé est le tritium (^3H), il est préférable d'utiliser un liquide fluorographique (*Amplify*, de la compagnie Amersham) afin de réduire le temps d'exposition (quelques jours au lieu de quelques mois). Ce produit doit être imprégné au gel fixé, et n'est pas utilisable pour les protéines transférées sur une membrane. La détection rapide des protéines ayant incorporé du tritium ne s'effectue donc que par exposition du gel ayant baigné dans *Amplify*, et non de la membrane. Cependant, l'utilisation d'un *phosphorimager* permet de réduire le temps d'exposition sans utiliser de liquide fluorographique ; l'exposition de la membrane est ainsi possible (la détection par autoradiographie et par *Western Blot* d'une même membrane peut ainsi être effectuée). De plus, étant donné que cet appareil détecte les rayonnements de façon linéaire, il permet la quantification des différentes bandes obtenues.

5.2 Paires expérimentales

Pour tester l'effet des compressions mécaniques sur le contenu en CPII, des paires d'échantillons doivent être formées ; un échantillon sera le contrôle et l'autre échantillon subira les compressions mécaniques. Dans ce projet, comme dans beaucoup de projets scientifiques, il est important d'avoir une méthode expérimentale qui permet la détection de petites variations. Il est donc très important de former des paires d'échantillons qui ont, avant les compressions, des contenus en CPII semblables ; dans le cas contraire, les petites variations seront difficilement observables.

5.2.1 Variabilité du contenu en CPII

Des observations préliminaires ont soulevé l'hypothèse que le contenu en CPII varie entre les différents explants, selon leur provenance sur l'épaule.

Pour vérifier cette hypothèse, des explants ont été obtenues de deux épaules différentes. Les échantillons de la première épaule ont été congelés directement après l'isolation, tandis que les échantillons de la seconde épaule ont été mis en culture pendant cinq jours avant d'être congelés. Les contenus en CPII des extraits GuCl , dialysés contre du PBS, ont été mesurés par RIA.

Le contenu en CPII est nettement plus élevé dans les explants frais que dans les explants cultivés pendant 5 jours (voir figure 5.3). Dans les deux cas, il y a une grande variabilité ; cependant, cette variabilité est plus grande dans les explants frais (déviations standard = 63% de la moyenne) par rapport aux explants mis en culture (déviations standard = 55% de la moyenne).

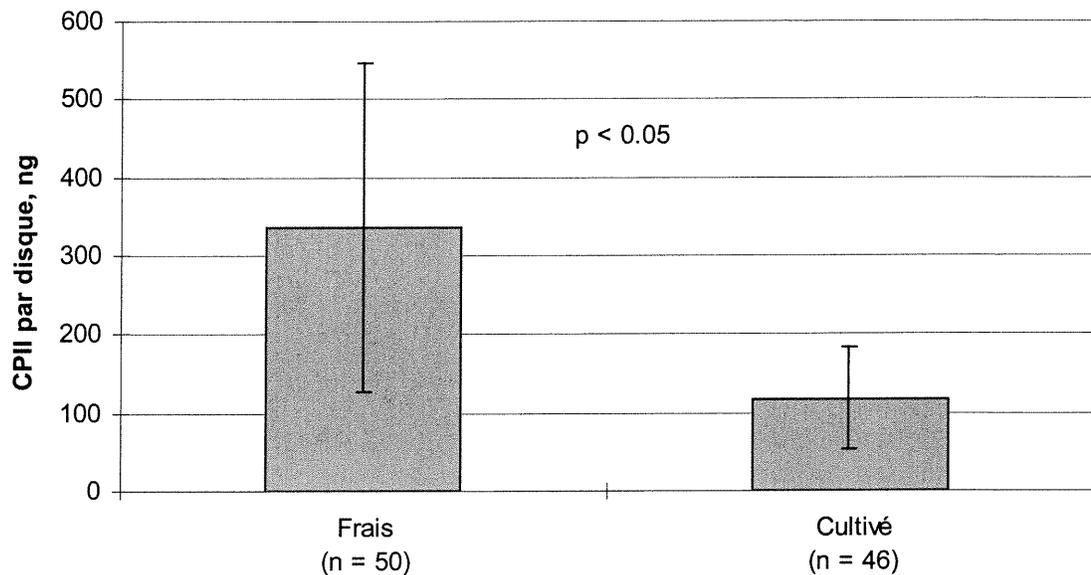


Figure 5.3 : Moyenne (et déviation standard) du contenu en CII des disques frais et cultivés pendant cinq jours

La diminution de la concentration en CII après cinq jours de culture peut-être due à une diminution de la synthèse du COLLI, ou à une facilité accrue du CII à diffuser hors du tissu (les explants offrent une plus grande surface pour la diffusion comparativement au cartilage articulaire *in vivo*).

Les variations entre les explants d'une même jointure peuvent être dues à plusieurs facteurs (variation de l'épaisseur du cartilage, variations des chargements mécaniques *in vivo*, pathologies, ...).

Dans le but de diminuer les écarts entre les explants d'une même paire, il vaut mieux attendre quelques jours de culture avant de commencer les compressions mécaniques (diminution de la variabilité).

5.2.2 CPII dans le milieu de culture

Nelson F. et al. (1998) ont montré une corrélation significative du contenu de CPII dans le cartilage avec celui du milieu de culture. Nous avons donc émis l'hypothèse que cette dernière corrélation est vraie dans notre système de culture d'explants.

Le contenu en CPII de sept explants, mis en culture pendant cinq jours, a été dosé par RIA. Le milieu de culture de chaque explant a été récupéré pour le dernier jour de culture, et a été dosé par RIA.

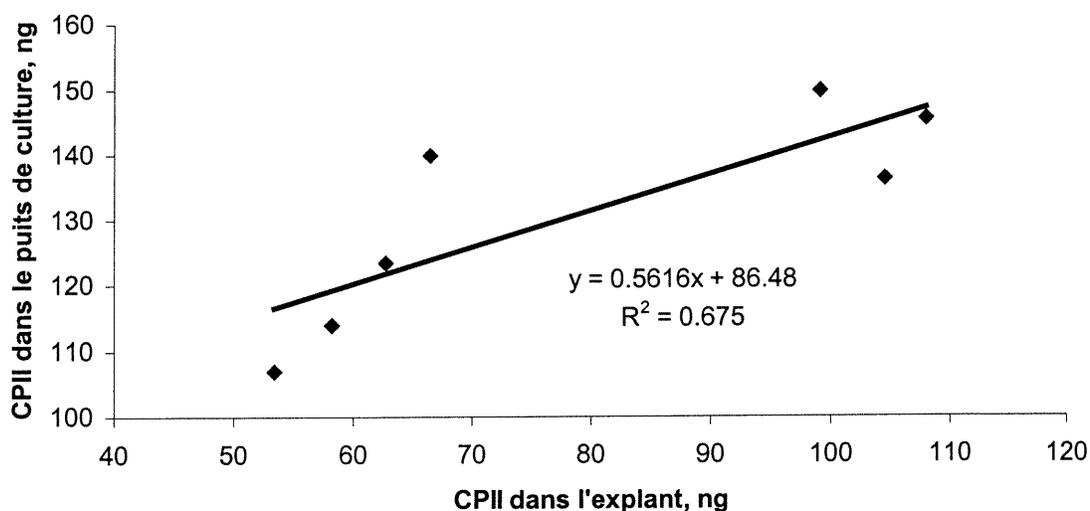


Figure 5.4 : Contenu en CPII relâché dans le milieu de culture en fonction du CPII extrait du tissu

On observe sur la figure 5.4 la tendance suivante : le contenu en CPII du milieu de culture augmente lorsque le contenu en CPII du tissu augmente. Une régression linéaire ne donne toutefois pas un facteur de détermination très élevé ($R^2 = 0.675$).

NOTES :

- Il faut être critique dans l'interprétation des résultats obtenus par ce RIA ; le caractère quantitatif (absolu) de cet essai est très discutable. Par exemple, différentes dilutions d'un même échantillon ne donneront pas la même concentration en CPII de cet échantillon (après avoir inclus le facteur de dilution).
- La régression linéaire qui ne passe pas par l'origine peut indiquer que l'anticorps utilisé (R160, anti-CPII) dans le RIA reconnaît d'autres protéines que le CPII dans le milieu de culture (autre que le BSA, car ce dernier est ajouté dans la courbe standard des milieux de culture).
- La régression linéaire qui a une pente inférieure à 1 peut indiquer l'existence d'une population résidante de CPII dans le tissu, qui n'est pas en équilibre avec le contenu de CPII présent dans le milieu de culture (hypothèses : CPII intracellulaire, CPII lié à la MEC, à la membrane cellulaire ou à l'os). La proportion de cette population (si elle existe) varie probablement selon la provenance de l'explant sur l'articulation.

Même si ces derniers résultats ne sont pas très rigoureux, ils suggèrent que le dosage du CPII relâché dans les milieux des premiers jours de culture puisse être utile pour former des paires d'échantillons ayant des contenus matriciels de CPII semblables. Les échantillons groupés de cette façon doivent par contre provenir de la même articulation, du même individu et avoir été placé dans les mêmes conditions de culture ; la proportion de CPII relâchée dans le milieu de culture varie probablement en fonction de plusieurs facteurs (âge, temps en culture, pathologie, ...). De plus, il est ainsi possible de détecter les échantillons qui ont un taux de synthèse du collagène type II anormalement bas ou élevé, et de les exclure de l'expérience.

5.3 Effet de la condition scorbutique

Posons l'hypothèse que le CPII diffuse facilement dans le cartilage, en se basant sur le fait qu'il se retrouve dans le milieu de culture (section 5.2). Si cette supposition est vraie, cela cause un problème pour localiser une variation du taux de synthèse du COLLII par dosage des différentes parties du disque ou par visualisation en immunofluorescence.

Il a été montré que la sécrétion du COLLII est diminuée en carence d'acide ascorbique (la vitamine C) (Sullivan T.A. et al., 1994). Ce dernier étant un cofacteur des prolyl-hydroxylases, son absence cause une sous-hydroxylation des chaînes de procollagène, et une rétention intracellulaire en découle.

En partant de ce concept, nous avons vérifié si la concentration de CPII dans le milieu de culture est diminuée en absence d'acide ascorbique ; ce phénomène refléterait une diminution de la sécrétion. En diminuant la sécrétion, et par le fait même la diffusion, nous pourrions localiser d'où origine le CPII. Ainsi, l'application de compressions mécaniques en absence d'acide ascorbique permettrait d'observer les variations intracellulaires du contenu en CPII.

Six paires d'explants ont été cultivés (avec ou sans acide ascorbique) pendant six jours. Les milieux de culture de la dernière journée ont été dosés par RIA (figure 5.5).

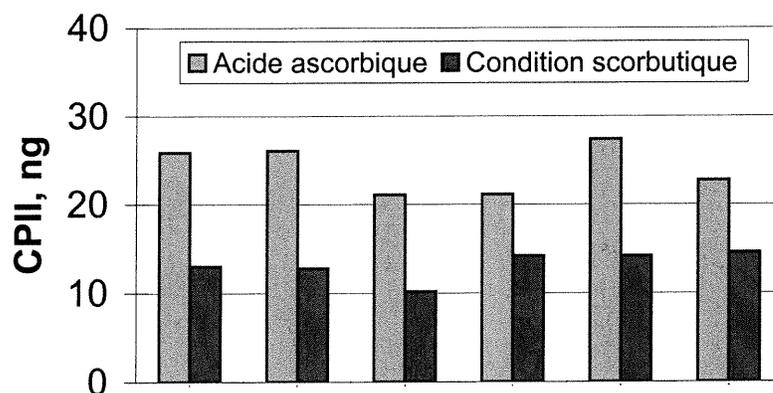


Figure 5.5 : Contenu en CPII dans le milieu de culture : présence et absence d'acide ascorbique

Le contenu en CPII du milieu de culture est effectivement diminué par l'absence d'acide ascorbique dans notre système d'explants.

Deux explants ont ensuite été mis en culture pendant deux jours (l'un en présence et l'autre en absence d'acide ascorbique). Ils ont ensuite été congelés, coupés en fines tranches (8 μm) et utilisés pour visualisation du CPII par immunofluorescence (le protocole d'immunofluorescence est celui de l'annexe VI).

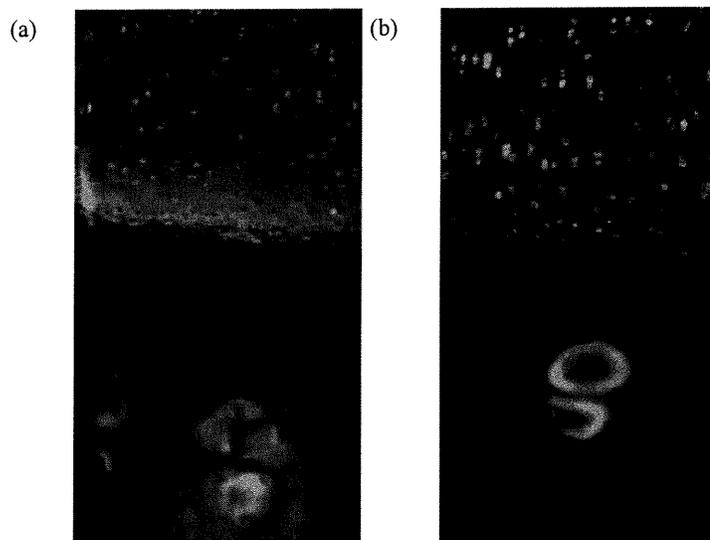


Figure 5.6 : Immunofluorescence du CII d'une coupe de 8 µm, cultivé en présence (a) ou en absence (b) d'acide ascorbique pendant deux jours

On peut remarquer à la figure 5.6 que le CII est détecté dans la MEC et dans les chondrocytes en présence d'acide ascorbique (a), tandis qu'il est presque essentiellement dans les cellules (ou dans la matrice pérécyclulaire) pour la condition scorbutique (b). S'il y avait du CII dans la MEC lors de l'isolation des explants, il semble avoir diffusé ; en effet, il ne reste que peu de CII dans l'espace extracellulaire de l'explant cultivé en absence d'acide ascorbique (b).

D'autres échantillons ont été mis en culture (avec ou sans acide ascorbique) pendant 7 et 21 jours. L'analyse par *Western Blot* (figure 5.7) nous dévoile les faits suivants:

- Milieu de culture : le CII diffuse moins le 7^{ème} jour que le 1^{er} jour de culture (piste 2 vs 1, piste 4 vs 3), démontrant une baisse de la synthèse du COLII ou une diffusion importante lors du premier jour de culture (due à la mise en culture) ;
- Milieu de culture : le CII diffuse moins en absence d'acide ascorbique (piste 4 vs 2), ce qui confirme les résultats présentés aux figures 5.5 et 5.6 (rétention intracellulaire du CII et diminution de la diffusion vers le milieu de culture) ;

- Extrait GuCl : le COLLII (reconnu par l'anticorps 3/4m) est diminué en absence d'acide ascorbique (piste 6 vs 5, piste 8 vs 7);
- Extrait GuCl : le CPII n'est pas influencé par l'absence d'acide ascorbique (piste 5 = piste 6, piste 7 = piste 8).

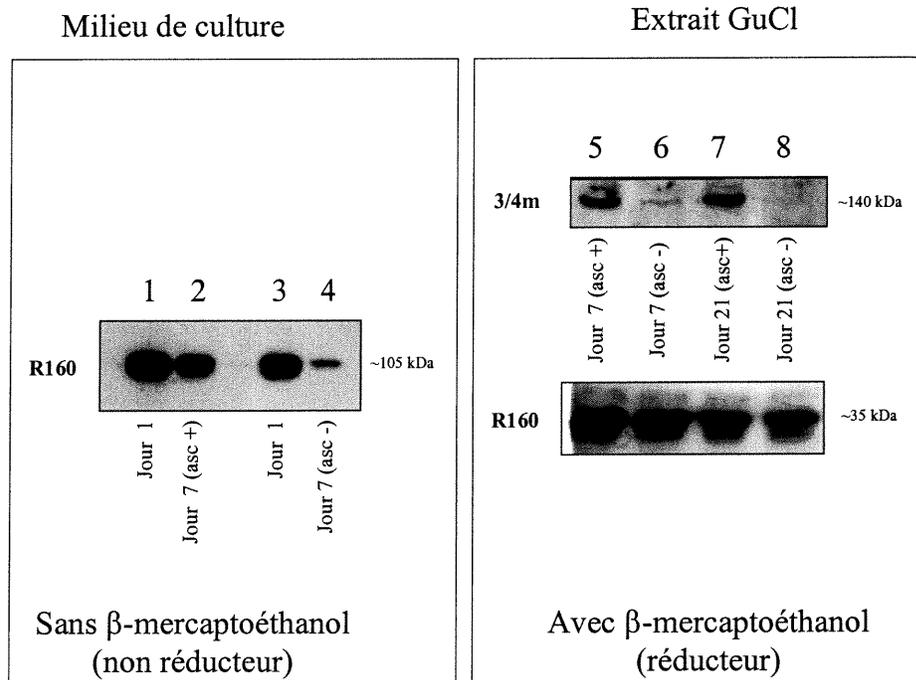


Figure 5.7 : Western Blot du milieu de culture et de l'extrait GuCl : présence et absence d'acide ascorbique

Les résultats de cette section proposent le processus suivant : l'absence d'acide ascorbique induit la rétention intracellulaire du CPII (figure 5.6), ce qui diminue la quantité de CPII qui diffuse dans le milieu de culture (figure 5.5 et figure 5.7, piste 4 vs piste 2). Le COLLII sous-hydroxylé est dégradé intracellulairement ou extracellulairement, tandis que le CPII correspondant n'est pas davantage dégradé (figure 5.7, pistes 6 et 8 vs pistes 5 et 7).

Il se peut que le COLLII sous-hydroxylé ne soit tout simplement pas reconnu par l'anticorps 3/4m (au lieu d'être dégradé, comme il a été proposé dans le

paragraphe précédent). Il se peut aussi que la concentration de CPII nouvellement synthétisé du tissu en condition scorbutique soit diminuée, mais que cette diminution soit masquée par la présence d'une population résidante importante de CPII.

5.4 Détection de HSP47

HSP47 est une chaperone spécifique aux collagènes (Nagata K., 1996), qui est augmentée sous différentes conditions anormales, mais aussi lorsqu'il y a hausse du taux de synthèse des collagènes. Nous avons pensé vérifier si elle peut être stimulée par des compressions mécaniques (pour démontrer un stress induit et/ou une hausse de synthèse du COLLI). Cette protéine est retenue dans le réticulum endoplasmique, ce qui contourne le problème de diffusion du CPII.

Nous l'avons tout d'abord localisée par immunofluorescence dans deux échantillons. Ces derniers ont été cultivés pendant 10 jours et l'un d'eux à terminé sa culture à 42°C pendant deux heures (contrôle positif de choc thermique). (Le protocole d'immunofluorescence est celui de l'annexe VI.)

Dans la situation contrôle (37°C), HSP47 est concentrée près du noyau cellulaire et le CPII semble occuper le réticulum endoplasmique. Sous choc thermique, HSP47 semble être en plus grande concentration et occupe un grand volume intracellulaire, tandis que le CPII semble être confiné près du noyau.

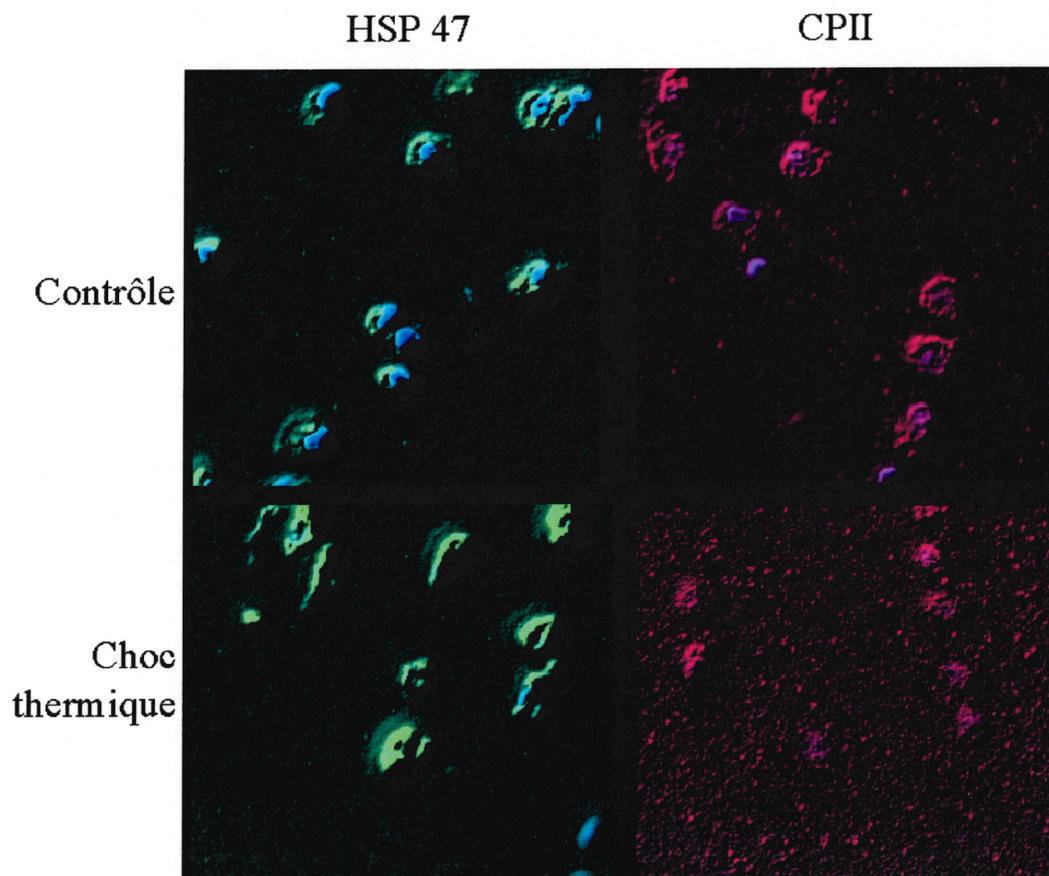


Figure 5.8 : Immunofluorescence anti-HSP47, anti-CPII et marquage nucléaire Hoescht : choc thermique et contrôle (image equalized et embossed)

Légende de couleurs:

- Bleu : marqueur nucléaire Hoescht
- Vert : Marquage de HSP47
- Rouge : Marquage du CPII

HSP47 a aussi été détectée par *Western Blot* dans des échantillons cultivés pendant 17 jours, avec des conditions de culture variées pendant la dernière journée (conditions de culture qui peuvent potentiellement être utilisées pendant les compressions ; n = 1 pour chaque condition). Les disques ont été extraits passivement à la GuCl (pour l'analyse du CPII), puis ont été pulvérisés et recueillis avec du tampon RIPA pour l'analyse des protéines de réticulum endoplasmique (dont HSP47).

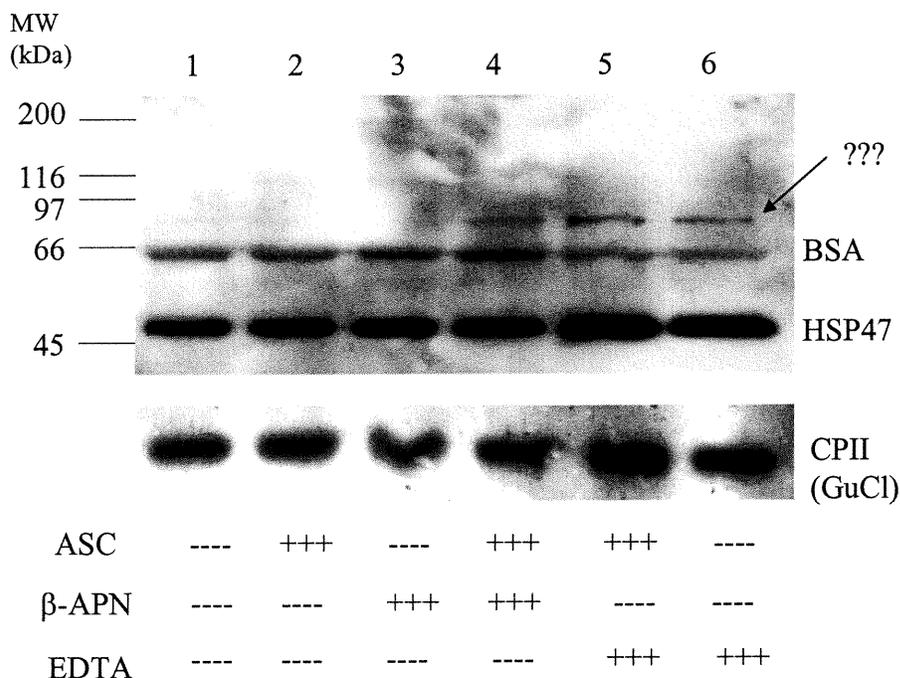


Figure 5.9 : Western Blot anti-HSP47 des extraits RIPA et comparaison avec le Western Blot anti-CPII des extraits GuCl : différentes conditions de culture

L'anticorps reconnaît HSP47, BSA et une autre bande inconnue (figure 5.9). HSP47 est augmentée lorsque l'acide ascorbique et l'EDTA sont présents (simultanément). Cette dernière condition aussi haussé le contenu en CPII dans l'extrait GuCl.

La bande inconnue (poids moléculaire apparent de 90 kDa) est présente en présence d'EDTA (en présence ou absence d'acide ascorbique) et en présence de β -APN et d'acide ascorbique (simultanément). L'identification de cette bande n'a pas encore été effectuée ; elle pourrait être HSP90, qui a un rôle potentiel dans la transduction de signaux (Pratt W.B., 1998).

HSP47 est présente dans les chondrocytes de notre système (du moins après 10 jours de culture) et semble être sensible à certaines conditions de culture, tout comme le CPII. Ces résultats demeurent cependant préliminaires.

5.5 Effet d'EDTA

Les résultats des sections 5.2.2 et 5.3 soulèvent la possibilité de la présence d'une population résidante de CPII dans le tissu ; cette population ne refléterait pas nécessairement le taux de synthèse du collagène nouvellement synthétisé. Si cette hypothèse est juste, la population résidante peut masquer les légères variations du contenu en CPII nouvellement synthétisé. Les expériences de cette section ont été effectuées pour évaluer la capacité de l'EDTA à empêcher le clivage du CPII du procollagène, permettant ainsi la distinction entre le CPII résidant (clivé) et le CPII nouvellement synthétisé (encore lié au COLLII) ; EDTA est un chélateur d'ions divalents, et peut donc inhiber les C- et N-protéinases (car elles sont des métalloprotéinases).

Huit explants ont été mis en culture pendant 7 jours, en ajoutant 2mM d'EDTA pendant la dernière journée à la moitié de ces explants. Ses effets ont été observés par analyse *Western Blot* à l'aide de différents anticorps (figure 5.10). Les échantillons contrôles ont été rassemblés (n = 4), tout comme les échantillons traités à l'EDTA (n = 4).

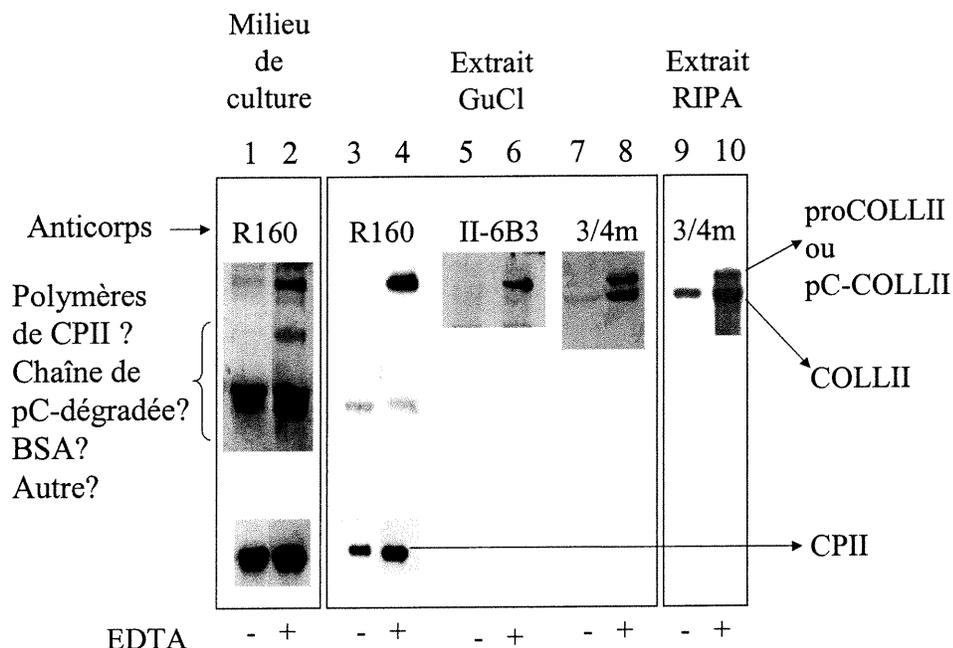


Figure 5.10 : Western Blot du milieu de culture, de l'extrait GuCl et de l'extrait RIPA : effet de la présence d'EDTA pendant la culture

Caractéristique des anticorps

- R160 reconnaît le CII (clivé ou non), il est polyclonal et lie fortement ses épitopes (il reconnaît aussi d'autres bandes, l'une semblant correspondre au BSA) ;
- 3/4m reconnaît un épitope linéaire dans la partie hydrophobe de la chaîne de COLLII (il ne reconnaît pas le collagène natif, l'épitope étant camouflé à l'intérieur de l'hélice triple), il est monoclonal et lie faiblement son épitope ;
- II-6B3 reconnaît le procollagène type II et probablement le pC-COLLII, i.e. le COLLII ayant son CII encore lié.

Le procollagène type II (proCOLLII) est augmenté par la présence d'EDTA dans le milieu de culture (piste 2), l'extrait GuCl (piste 4, 6 et 8) et dans l'extrait RIPA (piste 10) ; il se peut qu'il s'agisse du pC-COLLII au lieu du proCOLLII. Le COLLII est augmenté dans les extraits GuCl et RIPA (pistes 8 et 10) par l'EDTA ; il n'a pas été sondé dans le milieu de culture. Finalement, le CII est légèrement augmenté dans le milieu de culture (piste 2) et davantage dans l'extrait GuCl (piste 4) ; il n'a pas été sondé dans l'extrait RIPA.

L'augmentation du proCOLLII, du COLLII et du CPII peut-être le fruit de l'induction de processus cellulaires (mort cellulaire, bris de la membrane plasmique, altération des organelles, etc.) qui causent une augmentation de la synthèse du procollagène de type II (donc de COLLII et de CPII). Il se peut aussi que l'augmentation de chacune des trois bandes soit due à des processus différents ; l'EDTA augmente le proCOLLII en inhibant les N- et C-protéinases, augmente le COLLII en inhibant les MMP, et augmente le CPII en le libérant de la zone calcifiée par décalcification.

5.6 Sommaire du chapitre

La modulation du taux de synthèse du collagène type II peut être déterminée par la mesure de son propeptide C-terminal, le CPII.

Le CPII a une concentration plus élevée dans les explants frais que dans les explants mis en culture pendant cinq jours. Parallèlement, sa concentration dans le milieu de culture est plus importante lors du premier jour de culture que lors du septième jour. Ces observations démontrent une baisse de synthèse du collagène type II dans les premiers jours de culture, ou la présence de CPII accumulé *in vivo* dans le tissu qui est largué dans le milieu lors de la mise en culture.

Les explants d'une même épaule démontrent une grande variabilité, qui est plus importante dans les explants frais que dans les explants mis en culture.

La mesure du CPII dans les milieux de culture, pour les différents échantillons d'une même jointure, permet de former des paires expérimentales ayant des contenus semblables en CPII, donc des taux de synthèse du collagène type II semblables. Cette technique permet de minimiser les variations entre les explants d'une paire expérimentale et d'éliminer les explants ayant un taux de synthèse anormalement bas ou élevé.

La présence de CPII dans le milieu de culture suggère qu'il diffuse facilement, ce qui présente un obstacle pour la localisation de ses variations de concentration. La condition scorbutique est une solution potentielle à ce problème puisqu'elle induit la rétention intracellulaire du CPII.

HSP47 est présente dans notre système et est un indicateur potentiel du taux de synthèse des collagènes (en général) qui évite le problème de diffusion. Cependant, la hausse de son contenu peut indiquer la présence d'un stress cellulaire (thermique, chimique, mécanique, etc.), plutôt qu'une augmentation du taux de synthèse des procollagènes.

Finalement, certaines observations proposent la présence d'une population résidante de CPII dans le tissu, qui n'est pas en équilibre avec le CPII du milieu de culture ; cette population peut masquer les légères variations de CPII nouvellement synthétisé. L'utilisation d'EDTA a été proposée pour distinguer le CPII nouvellement synthétisé du CPII résidant en inhibant le clivage des propeptides. Cependant, l'ajout d'EDTA semble induire d'autres effets non prédits, et ne sera utilisé dans l'avenir que pour avoir un contrôle positif de procollagène type II.

Chapitre 6 : Compressions mécaniques et CPII

Ce chapitre présente les résultats de dosage du CPII, suite aux compressions mécaniques. Les compressions, dynamiques et statiques, ont été effectuées à l'aide de *Quattro*. Le milieu de culture des puits de compression a été recueilli, et les explants ont subi l'extraction passive à la GuCl. Les extraits GuCl ont tous été dialysés à l'aide du microdialyseur contre du PBS. Le dosage du CPII a été effectué par RIA, en utilisant le ^{125}I -CPII fourni par le Dr A. Robin Poole et son équipe.

6.1 Compressions dynamiques et CPII : protocoles dynamiques I, II et III

Le tableau 6-I contient les paramètres des protocoles utilisés pour la comparaison des contenues en CPII sous stimulations dynamiques.

Paramètre	Protocoles dynamiques				
	I (Hiver 1998)	II (Automne 1998)	III (Automne 1998)	IV (Hiver 1999)	V (Été 1999)
Nombre de jours de compression - jours	4	4	1	3	1
Nombre total de cycles - cycles	40	11 520	566	3240	4800
Temps de compression par jour - heures	1	16	22	3	20
Nombre de cycles par jour - cycles	10	2880	566	1080	4800
Amplitude de compression - μm	100	300	250	275	225
Vitesse de montée et de descente - $\mu\text{m}/\text{sec}$	5	40	25	100	45
Temps d'attente au sommet - sec	0	0	20	0	0
Temps d'attente après chaque cycle - sec	320	5	100	4.5	5
Temps total pour un cycle - sec	360	20	140	10	15
Contrainte moyenne au sommet - MPa	0.09	1.2	1.0	0.5	1.3
(\pm écart type)	± 0.03	± 0.4	± 0.1	± 0.1	± 0.3

Tableau 6-I : Paramètres des protocoles dynamiques utilisés pour comparaison des contenues en CPII

Avant de débiter un protocole de compression dynamique, le point de contact de chacun des quatre explants sous *Quattro* doit être déterminé. De plus, un cycle de compression est appliqué individuellement afin de connaître la charge maximale induite sur chacun de ces explants. Les micromètres sont ensuite ajustés, et le protocole de compression est appliqué aux quatre échantillons simultanément. Le graphique suivant (figure 6.1) présente la moyenne des ratios du C_{PII} des explants stimulés sur le C_{PII} des explants contrôles.

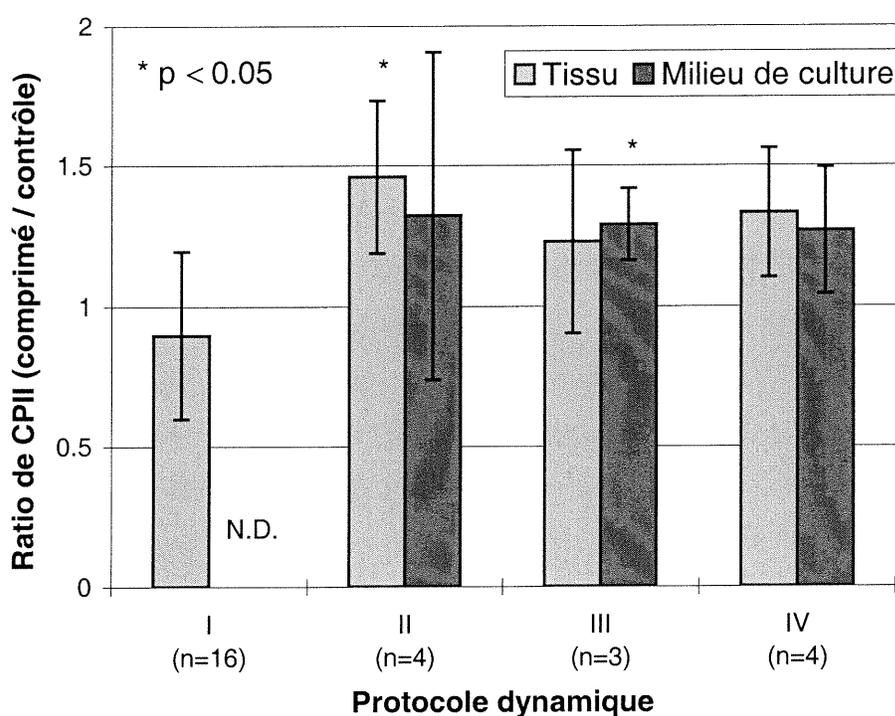


Figure 6.1 : Moyenne (et déviation standard) des ratios de C_{PII} (dynamique/contrôle)

Avec le protocole dynamique I, les disques sont comprimés pendant quatre jours consécutifs. Ils ne sont comprimés qu'une heure par jour (10 compressions par heure) et l'amplitude de compression est de 100 μm . Le C_{PII} mesuré fut le même pour les explants comprimés et les contrôles (la concentration des milieux de culture ne se trouvait pas dans la partie linéaire de la courbe standard du RIA).

Le protocole dynamique II a été lui aussi appliqué pendant 4 jours. Cependant, l'amplitude, la durée quotidienne et la vitesse de compression furent augmentées, et le temps d'attente entre deux compressions fut diminué. Le CPII fut augmenté par ce protocole dans l'extrait GuCl ($p = 0.04$, *Student t-test*), et dans le milieu de culture (de façon non-significative).

Le protocole dynamique III est semblable au protocole dynamique II, mais n'est effectué que pendant une journée. De plus, le temps d'attente après chaque cycle est augmenté pour minimiser la diminution de volume due à l'exsudation du fluide (le nombre total de cycles appliqués en une journée est ainsi diminué). Le CPII semble être augmenté dans le tissu, et est augmenté de façon significative ($p = 0.04$, *Student t-test*) dans le milieu de culture.

Le protocole dynamique IV est très semblable au protocole dynamique II, sauf que la durée quotidienne de compression est grandement diminuée (trois heures de compressions au lieu de 16 heures). Le CPII y est augmenté de façon presque significative dans le tissu et dans le milieu de culture ($p = 0.09$ et 0.07 , *Student t-test*).

6.2 Compressions statiques et CPII : protocoles statiques I, II et III

Comme il est bien accepté que les compressions statiques inhibent la synthèse des PG et des protéines en général dans les systèmes d'explants, elles ont été utilisées comme contrôle de la méthode ; on s'attend à ce que le contenu en CPII soit diminué par ces dernières.

Le tableau 6-II contient les paramètres des protocoles utilisés pour la comparaison des contenues en CPII sous compressions statiques. Avant de débiter un protocole de compression statique, le point de contact de chacun des quatre explants sous *Quattro* doit être trouvé. Après avoir ajusté les micromètres, la compression est appliquée et maintenue jusqu'à la fin du temps choisi. (Contrairement aux

compressions dynamiques, aucun cycle de compression n'est appliqué individuellement.)

Paramètre	Protocoles statiques			
	I (Automne 1998)	II (Automne 1998)	III (Hiver 1999)	IV (Été 1999)
Nombre de jours de compression - jours	4	1	3	1
Temps de compression par jour - heures	23	23	14	20
Amplitude de compression - μm	300	300	250	325
Vitesse de montée et de descente - $\mu\text{m}/\text{sec}$	10	35	5	5
Contrainte moyenne à l'équilibre - MPa	0.14	0.12	0.09	0.24
(il n'y a pas de déviation standard car la charge mesurée est celle des quatre explants comprimés en même temps sous <i>Quattro</i>)				

Tableau 6-II : Paramètres des protocoles statiques utilisés pour comparaison des contenus en CPII

Le protocole statique I consistait à soumettre les explants à des compressions de 300 μm pendant 23 heures, quatre jours consécutifs (la 24^e heure de la journée, sans compression, permettait le nettoyage et la stérilisation de la chambre à compression ainsi que le changement du milieu de culture).

Le protocole statique II était semblable au protocole statique I, sauf qu'il fut exécuté pendant une seule journée.

Le protocole statique III fut exécuté pendant trois journées consécutives et la vitesse de montée a été diminuée par rapport aux protocoles statiques I et II (afin de minimiser l'effet « dynamique » de la montée).

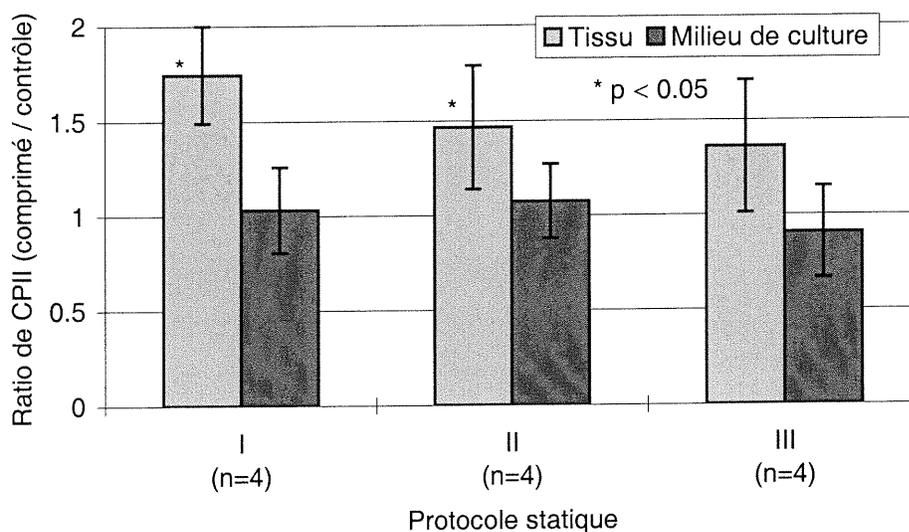


Figure 6.2 : Moyenne (et déviation standard) des ratios de CPII (statique/contrôle)

Le dosage du CPII a donné les résultats qui sont résumés dans le graphique précédent (figure 6.2). Les protocoles statiques I, II et III ont tous augmenté les contenus en CPII, extraits par GuCl , tel que mesurés par RIA ($p = 0.02, 0.04$ et 0.2 , *Student t-test*). Cependant, la quantité de CPII des milieux de culture n'a pas suivi la même tendance, si on se fie aux dosage par RIA. Il faut toutefois prendre garde aux résultats obtenus par RIA pour les milieux de culture ; les concentrations de CPII de ces derniers étaient basses et correspondaient à des concentrations à proximité du plateau, dans la partie gauche de la courbe standard (voir figure 5.1).

6.3 Distribution radiale et ajout de β -APN : protocoles dynamique V et statique IV

Le protocole dynamique V et le protocole statique IV ont été appliqués en présence de β -APN (inhibiteur de la lysyl oxidase, c.f. section 2.3) dans la moitié des échantillons. Suite aux compressions, le centre des disques a été séparé de l'anneau extérieur à l'aide d'un poinçon à biopsie ayant 2 mm de diamètre. De cette façon, les

contenus en CPII de la partie centrale et de la partie périphérique ont pu être analysés séparément.

NOTE : Le COLLII est séparé du CPII et du NPII après sécrétion dans la MEC. Avant d'être incorporé dans la MEC (par la lysyl oxidase), le COLLII est extractible par GuCl. Dans cette période du projet (été 1999), la détection du COLLII (extrait par GuCl) par *Western Blot* anti-3/4m était un outil complémentaire au dosage du CPII. L'ajout de β -APN pendant les compressions avait pour but d'empêcher l'incorporation du COLLII dans la MEC (permettant d'extraire par GuCl le COLLII nouvellement synthétisé) afin de vérifier si les compressions peuvent moduler son contenu. Cet outil a été délaissé par la suite, à cause de la disponibilité limitée de l'anticorps 3/4m.

Le graphique suivant (figure 6.3) présente les résultats obtenus. Les compressions dynamiques ont induit une hausse du contenu en CPII dans la partie extérieure des disques ; cette hausse semble avoir été inhibé par la présence de β -APN. Dans le cas des compressions statiques, la hausse induite est plutôt localisée dans la partie centrale des disques, et l'ajout de β -APN n'a eu aucun effet sur cette hausse. Ces hausses ne sont toutefois pas significatives ($p > 0.05$, *Student t-test*).

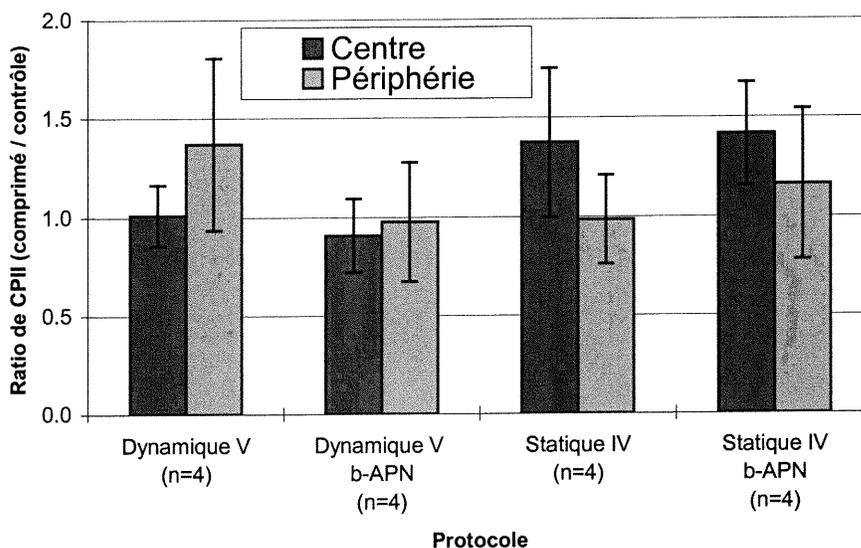


Figure 6.3 : Moyenne (et déviations standard) des ratios de CPlI (stimulés/contrôle) ; dépendance radiale et ajout de β -APN

Les milieux de culture ont été dosés par RIA, mais les concentrations étaient soit trop basses (dilution 1 : 4) ou trop élevées (dilution 1 : 2) pour se retrouver dans la partie linéaire de la courbe standard (entre 10 ng/mL et 100 ng/mL). Cet événement met en doute la fiabilité des concentrations absolues obtenues par cet essai. En effet, comme la dilution 1 : 4 se retrouve au-dessous de 10 ng/mL, la dilution 1 : 2 ne devrait pas se retrouver au-dessus de 20 ng/mL, or cette dernière s'est retrouvée au-dessus de 100 ng/mL. Les milieux de culture correspondants aux échantillons de la figure 6.3 ont donc été analysés par *Western Blot* afin de comparer les contenus en CPlI des échantillons comprimés et des échantillons contrôle (figure 6.4). Les milieux de culture avant les compressions ont aussi été analysés, dans le but de vérifier que les différences en contenu de CPlI ne sont pas la conséquence d'un mauvais pairage d'échantillons.

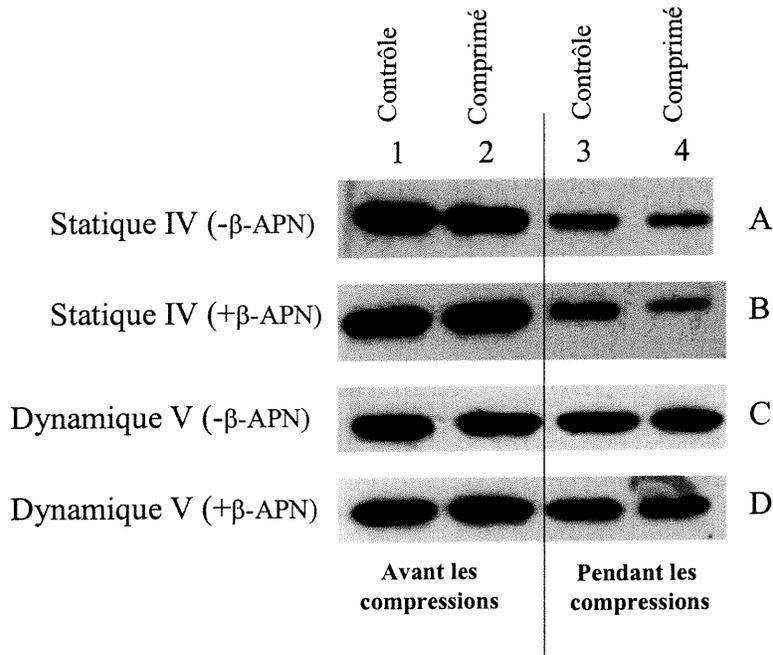


Figure 6.4 : *Western Blot* anti-CPII des milieux de culture (poolés, n = 4) des protocoles statique IV et dynamique V : absence et présence de β -APN, avant et pendant les compressions

Chaque condition est le poole de quatre échantillons. Avant les compressions, le contenu en CPII est semblable pour les contrôles (piste 1) et les échantillons comprimés (piste 2) ; le pairage paraît donc adéquat. Les compressions statiques causent une diminution du CPII dans le milieu de culture (pistes 4 et 3 des parties A et B) indépendamment de la présence de β -APN. Les compressions dynamiques ont augmenté le contenu en CPII des milieu de culture sans β -APN (pistes 4 et 3 de la partie C) mais n'ont eu aucun effet en présence de ce dernier (pistes 4 et 3 de la partie D). L'analyse du CPII des milieux de culture par *Western Blot* semble être plus appropriée que par RIA.

La détection de HSP47 par *Western Blot* n'a démontré aucune modulation induite par ces deux protocoles, mais a clairement indiqué que HSP47 est en plus haute concentration au centre qu'à la périphérie du disque. La bande inconnue au

poids moléculaire de 90 kDa (voir figure 5.9) a été induite par le protocole dynamique V. (Résultats préliminaires, non présentés ici.)

Il est bon de noter qu'il y a pratiquement autant de CPII dans les deux parties du disque (figure 6.5). Ces valeurs ont été obtenues en calculant la moyenne sur 32 échantillons.

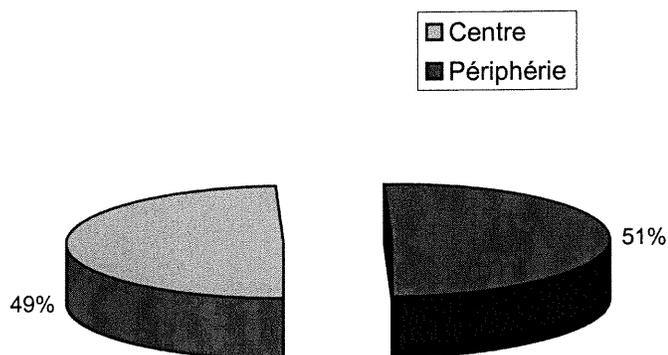


Figure 6.5 : Quantités relatives du contenu en CPII : centre et périphérie

6.4 Viabilité

Afin de vérifier si les compressions mécaniques induisent la mort des chondrocytes, un test de viabilité a été exécuté à la suite de l'application du protocole dynamique V (n = 4) et du protocole statique IV (n = 4). (L'inhibiteur β -APN fut ajouté au milieu de culture de la moitié des échantillons.)

Pour tous les échantillons (comprimés et contrôles), quelques couches de cellules mortes sont présentes près de la surface articulaire. Ni les compressions, ni le β -APN n'ont induit la mort de cellules supplémentaires.

6.5 Sommaire du chapitre

Le protocole dynamique I n'a eu aucun effet sur le contenu en CPII du tissu (aucune donnée n'est disponible pour les milieux de culture de ces échantillons). Dans le protocole dynamique II, la durée quotidienne, l'amplitude et la vitesse de compression ont été augmentées, tandis que le temps d'attente entre chaque compression fut diminué ; ces modifications causent l'augmentation du nombre total de cycles et de l'amplitude des contraintes induites dans le tissu. Ce second protocole a causé l'augmentation du contenu en CPII dans le tissu comme dans le milieu de culture. Le protocole dynamique III ne fut appliqué que pendant une journée (contrairement au deux premiers protocoles, qui ont été effectués pendant quatre journées), et a aussi causé l'augmentation du CPII dans le tissu et dans le milieu de culture. Il n'est donc pas nécessaire de comprimer les échantillons plus d'une journée pour observer des variations du contenu en CPII ; cette information permettra de sauver du temps lors d'études ultérieures. Le protocole dynamique IV ne fut appliqué que pendant trois heures par jour (contrairement au deuxième protocole, qui était effectué pendant seize heures par jour) durant trois jours consécutifs, et a aussi causé l'augmentation du CPII dans le tissu et dans le milieu de culture. Quelques heures de compressions par jour sont donc suffisantes pour induire une variation du contenu en CPII ; cette information indique que plusieurs protocoles de compression peuvent être appliqués (sur des échantillons différents) dans la même journée. Il serait bon de vérifier un autre protocole dynamique, effectué que pendant une journée, pendant trois heures seulement. Une hausse de CPII par ce dernier protocole indiquerait que la modulation du contenu en CPII, par les compressions dynamiques, est un processus assez rapide ; cela permettrait d'appliquer plusieurs protocoles, et ce en peu de temps, en variant individuellement chacun des paramètres des compressions en *dent de scie* (amplitude, vitesse de montée, vitesse de descente, temps de repos), ou en variant les conditions de culture (ajout de vitamines, facteurs de croissance, inhibiteurs, etc.). Le protocole dynamique V suggère que l'augmentation du CPII dans le tissu est localisée en périphérie du disque. De plus, cette hausse semble être inhibée par la présence de

β -APN, indiquant un effet couplé potentiel entre l'activité de la lysyl oxidase et la modulation du contenu en CPII par les stimulations dynamiques.

Les différents protocoles statiques (I, II, III et IV) ont induit une hausse du contenu en CPII du tissu, contrairement à ce que l'on s'attendait. Le contenu en CPII du milieu de culture n'est toutefois pas modulé par ces compressions, tel que mesuré par RIA. Le protocole statique IV suggère que la hausse est localisée au centre du disque, et l'analyse par *Western Blot* démontre qu'il y a une baisse du contenu en CPII dans les milieux de culture. L'ajout de β -APN n'a pas influencé ces derniers résultats.

Les compressions mécaniques effectuées, statiques comme dynamiques, modulent le contenu en CPII dans le cartilage articulaire, sans affecter la viabilité cellulaire. Cependant, les résultats obtenus suggèrent des mécanismes différents pour les deux types de compression. Les compression statiques semblent limiter la diffusion du CPII, ce qui augmente sa rétention au centre du disque et diminue sa présence dans le milieu de culture. Il se peut aussi que les compressions statiques induisent la rétention du CPII par un autre mécanisme, comme l'attachement du CPII à des protéines membranaires ou de la MEC, l'internalisation du CPII vers l'intérieur des chondrocytes, etc. Les compressions dynamiques, quant à elles, augmentent le contenu en CPII total des échantillons (tissu et milieu de culture), suggérant une hausse de synthèse du COLLII. Cette hausse étant localisée à la périphérie du disque, elle suggère un lien avec l'écoulement du fluide (cf. section 4.2) ; il faut toutefois être prudent dans les interprétations reliées à la localisation de la modulation, vue la capacité de diffusion du CPII. Il serait intéressant de répéter le même protocole (dynamique V), mais en condition scorbutique (pour éviter la diffusion du CPII dans les échantillons comprimés et contrôles, cf. section 5.3).

Avant de conclure avec certitude que les compressions dynamiques augmentent la synthèse du collagène type II dans les explants de cartilage articulaire, il faudrait le confirmer à l'aide d'une autre méthode de mesure. L'analyse du contenu en CPII à elle seule n'est pas suffisante ; par exemple, il est possible que les

compressions mécaniques dynamiques induisent le bris de certaines structure de la MEC, facilitant la diffusion du CPIO vers le milieu de culture et l'extraction par GuCl du CPIO du tissu (causant l'augmentation du CPIO mesuré, sans représenter une augmentation de synthèse). L'utilisation de la ^3H -proline a été choisie comme méthode alternative et est le sujet des trois prochains chapitres.

Chapitre 7 : Incorporation de ^3H -proline

Afin d'avoir un outil alternatif au dosage du contenu de CPII pour étudier la synthèse du COLLII, l'incorporation de ^3H -proline a été effectuée dans notre système d'explants.

Le marquage métabolique est un outil d'analyse important des protéines nouvellement synthétisées ; l'utilisation d'isotopes radioactifs permet la détection de l'incorporation d'acides aminés spécifiques dans les nouvelles chaînes polypeptidiques. L'acide aminé communément utilisé pour la caractérisation du collagène nouvellement synthétisé est la ^3H -proline ; la proline est très abondante dans les protéines collagéniques, comparativement aux protéines en général. Bien que la proline, un acide aminé non essentiel, subit la compartimentation de ses pools précurseurs, il en demeure une des meilleurs choix pour l'analyse de synthèse du collagène (Low R.B. et al., 1986).

L'hypothèse de départ, menant au désir de mettre au point cette technique pour l'utiliser dans notre système, est que la majorité de la ^3H -proline utilisée par les chondrocytes est incorporée lors de la synthèse du procollagène type II (proCOLLII). Le marquage métabolique à la ^3H -proline semble donc un bon outil pour analyser la synthèse du COLLII sous compressions mécaniques.

En prévision que plusieurs bandes seront présentes sur l'autoradiogramme (résultats préliminaires de Jean Dumont), qui correspondent au COLLII et à ses précurseurs, j'ai tenté de trouver différentes conditions de culture qui en permettront l'identification. Le but, pour ce projet, d'identifier les différentes bandes de COLLII et de ses précurseurs est le suivant : pouvoir détecter et reconnaître tous changements aux niveaux de la synthèse, du traitement protéolytique, de la sécrétion et de l'assemblage du COLLII, induits par les compressions mécaniques.

Une des conditions proposées est la condition scorbutique (absence d'acide ascorbique). Cette condition a inhibé la présence de COLLII soluble détectable par l'anticorps 3/4m (voir chapitre 5), elle pourrait donc éteindre la bande de COLLII sur l'autoradiogramme. De plus, l'absence d'acide ascorbique réduit l'hydroxylation des résidus proline (Kivirikko K.I. et Pihlajaniemi T., 1998), diminuant ainsi la stabilité des hélices triples ; la N-protéinase pourrait donc diminuer son activité (Prockop D.J. et Li S.W., 1998) et causer l'augmentation d'intensité de la bande de pN-COLLII, i.e. le COLLII avec son NPII encore lié.

Des inhibiteurs de la C-protéinase (BMP-1) nous ont été fournis et sont susceptibles de faire augmenter l'intensité de la bande de pC-COLLII, i.e. le COLLII avec son CPII (communication personnelle de Findel P., Fibrogen Corporation).

Il est évident que l'inhibiteur EDTA induit l'augmentation du contenu en proCOLLII dans le tissu et dans le milieu de culture (section 5.5). Son utilisation pendant le marquage radioactif hausse les possibilités d'augmenter l'intensité de la bande de proCOLLII.

Finalement, si l'agent β -APN (inhibiteur de la lysyl oxidase) diminue l'incorporation des molécules de COLLII dans la matrice, elle pourrait augmenter la quantité de COLLII soluble et ainsi augmenter l'intensité de sa bande sur l'autoradiogramme.

Les conditions de culture et les effets prédits sont résumés dans le tableau suivant.

Condition de culture	Effet(s) prédit(s)
<ul style="list-style-type: none"> Ajout d'EDTA (chélateur d'ions divalents) ; 	<ul style="list-style-type: none"> Inhiber les C- et N-protéinases, qui sont des métalloprotéinases (Fernandes R.J. et al., 1997 ; Prockop D.J. et al., 1998) ;
<ul style="list-style-type: none"> Absence d'acide ascorbique (cofacteur de la prolyl-hydroxylase) ; 	<ul style="list-style-type: none"> Inhiber la N-protéinase, qui ne clive que le NPII en conformation trimérisée (Prockop D.J. et al., 1998) et diminuer la sécrétion du procollagène ;
<ul style="list-style-type: none"> Ajout d'inhibiteurs de BMP-1 ; 	<ul style="list-style-type: none"> Inhiber la C-protéinase (BMP-1) ;
<ul style="list-style-type: none"> Ajout de β-APN (inhibiteur de lysyl oxidase). 	<ul style="list-style-type: none"> Inhiber la lysyl oxidase, qui catalyse la formation de liaisons covalentes intra et intermoléculaires, et augmenter la quantité de COLLII soluble.

Tableau 7-I : Effets prédits des différentes conditions de culture

7.1 Une journée avec les conditions de culture différentes

Les explants (deux échantillons par condition de culture) ont été mis en culture pendant deux jours (en absence d'acide ascorbique) avant d'être soumis aux différentes conditions de culture (en présence de ^3H -proline à 100 $\mu\text{Ci/mL}$) pendant 24 heures (voir les concentrations dans le tableau 7-II).

7.1.1 Autoradiogramme des extraits GuCl

Les explants ont été extraits passivement à la GuCl (sur *vortex* à 4°C, 2 fois pendant 24 heures dans 150 µL de GuCl), dialysés par *Microcons* contre du PBS. Les poeles de chaque condition (un huitième de chaque échantillon, n = 2) ont été soumis à l'électrophorèse (*SDS-PAGE* de 8%, réducteur). Le gel a été fixé, baigné dans *Amplify* pendant 50 minutes avant d'être séché, et a été mis sous exposition au film pendant 6 jours (à -80°C). L'autoradiogramme développé est présenté à la figure 7.1.

Les bandes ne sont pas très bien définies, ce qui probablement le résultat d'une mauvaise dialyse, donc de la présence de GuCl. Chaque piste qui représente une condition est précédée de sa piste contrôle (les échantillons ont été jumelés en paires par le contenu de GAG dans le milieu de culture et par leur localisation sur la surface articulaire) ; par exemple, la piste 1 est le contrôle de la piste 2, la piste 3 est le contrôle de la piste 4, etc. Les poids moléculaires sont déterminés par interpolation des marqueurs moléculaires.

La bande à 146 kDa est la plus intense, et représente fort probablement le COLLII. Il est difficile de se prononcer sur l'effet des conditions de culture sur l'intensité de cette bande (le gel n'est pas assez clair). La bande à 178 kDa est probablement un précurseur de COLLII. Comme elle semble être augmentée par EDTA (piste 4) et par un inhibiteurs de BMP-1 (piste 6), on peut poser l'hypothèse qu'elle représente le pC-COLLII, mais sans certitude. La différence entre les poids moléculaires apparents de ces deux bandes est de 32 kDa, ce qui correspond au poids moléculaire apparent du CPII (~35 kDa).

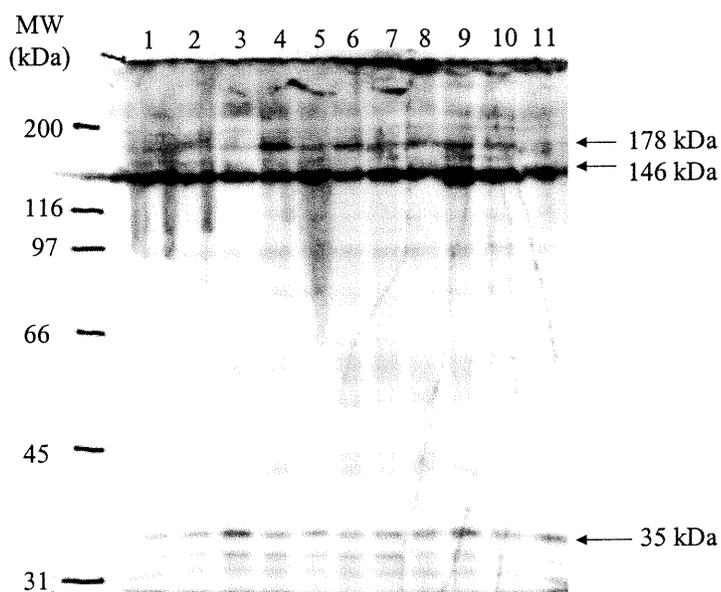


Figure 7.1 : Autoradiogramme des extraits GuCl (marquage à la ^3H -proline) : différentes conditions de culture pendant une journée

Piste	Condition
1	Contrôle (acide ascorbique 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
2	Condition scorbutique (pas d'acide ascorbique)
3	Contrôle (acide ascorbique 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
4	EDTA (acide ascorbique 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + EDTA 1mM)
5	Contrôle (acide ascorbique 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
6	Inhibiteur de BMP-1, Fibrogen-A (acide ascorbique 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + inhibiteur 100 nM / DMSO 1%)
7	Contrôle (acide ascorbique 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
8	Inhibiteur de BMP-1, Fibrogen-B (acide ascorbique 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + inhibiteur 1 μM / DMSO 1 %)
9	Contrôle (acide ascorbique 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
10	β -APN (acide ascorbique 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + β -APN1,95 nM)
11	DMSO (acide ascorbique 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + DMSO 1 %)

Tableau 7-II : Conditions de culture des échantillons des autoradiogrammes des figures 7.1 et 7.2

7.1.2 Autoradiogramme des milieux de culture

Le milieu de culture des échantillons a aussi été analysé. Les seules différences dans la méthode sont les suivantes : le dixième des échantillons (poolés, $n = 2$) a été analysé et l'exposition au film a duré 20 jours (une exposition plus courte n'a donné pratiquement aucun signal).

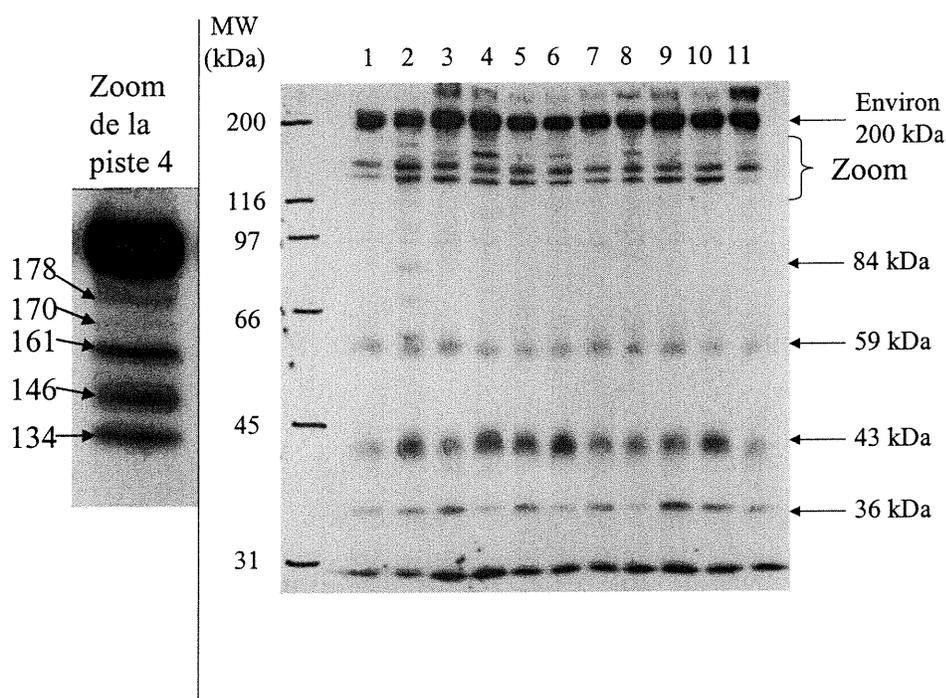


Figure 7.2 : Autoradiogramme des milieux de culture (marquage à la ^3H -proline) : différentes conditions de culture pendant une journée

Les pistes correspondent encore une fois aux conditions de culture du tableau 7-II.

La bande à 200 kDa est vraiment intense, mais il est difficile de se prononcer sur son identité. Elle ne semble pas être influencée par les différentes conditions de culture, mais semble varier selon la localisation sur l'épaule (car chaque paire est composée d'explants voisins sur l'articulation, et l'intensité de cette bande semble être

la même pour les deux explants de chaque paire). Cette bande ne se trouve pas sur l'autoradiogramme des extraits GuCl ; elle représente peut-être une protéine (ou une glycoprotéine) qui n'est exprimée que par les cellules se trouvant à proximité du milieu de culture, i.e. soit près d'un défaut (ici, la périphérie du disque qui a été coupée avec une poinçon), soit près de la surface articulaire. Elle peut aussi être une protéine qui est rapidement incorporée dans la matrice et qui ne s'extrait pas par GuCl. Son apparence diffuse suggère la présence de PG.

Les bandes aux poids moléculaires de 97 et 59 kDa ne sont pas identifiées et ne semblent pas être influencées par les différentes conditions de culture. La bande à 43 kDa n'est pas identifiée non plus, mais semble être augmentée par la condition scorbutique (piste 2), la présence d'EDTA et de β -APN (pistes 4 et 10). La condition scorbutique fait apparaître d'autres nouvelles bandes, aux poids moléculaires suivants : 116, 84, 71 et 62 kDa ; ces dernières ne sont pas identifiées.

La bande à 36 kDa semble bien être le CPII : elle est nettement moins intense en présence d'EDTA et des inhibiteurs de BMP-1 (piste 4, 6 et 8), démontrant une baisse de l'activité de BMP-1.

Les bandes qui sont zoomées correspondent probablement aux différents états du COLLII. La bande à 134 kDa est fort probablement le COLLII (la différence de migration par rapport à l'extrait GuCl est probablement due à la présence de BSA dans le milieu de culture, qui fraye un chemin aux protéines de haut poids moléculaire, et/ou la présence de GuCl dans les extraits GuCl). Selon les valeurs théoriques calculées des différents domaines du proCOLLII (figure 7.3), la bande à 146 kDa devrait correspondre au pN-COLLII ; son intensité est maximale pour la condition scorbutique (mais la différence est très légère). La bande à 161 kDa semble être le fruit de l'inhibition de la C-protéinase, puisqu'elle est augmentée par la présence d'EDTA et des inhibiteurs de BMP-1 (pistes 4, 6 et 8) ; elle correspond fort probablement au pC-COLLII. La bande à 178 kDa est induite par l'EDTA (piste 4) et semble être le proCOLLII ; la différence des poids moléculaires apparents de cette

bande et de celle associée au pN-COLLII (148 kDa) est de 33 kDa, poids moléculaire du CPII. Une bande supplémentaire est induite à 170 kDa par la condition scorbutique et l'EDTA (pistes 2 et 4) ; son identité demeure pour l'instant inconnue.

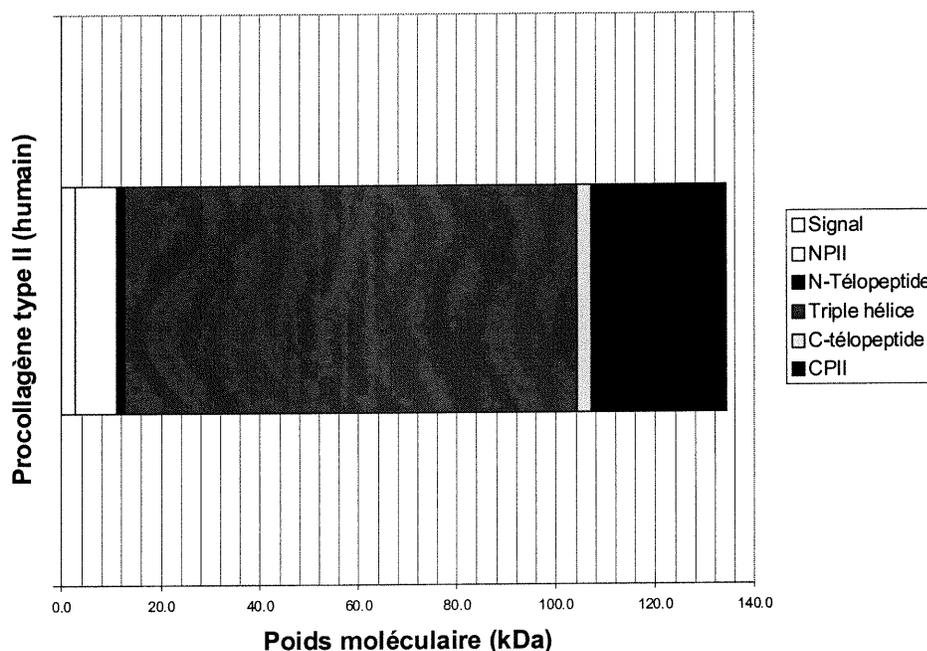


Figure 7.3 : Distribution du poids moléculaires des différents domaines du procollagène type II (humain), calculés à partir de la séquence LOCUS CA12_HUMAN

En multipliant les valeurs calculées des différents domaines du proCOLLII par un facteur 1.36, nous obtenons une distribution théorique des précurseurs du COLLII qui concorde bien (voir figure 7.4) avec les positions du COLLII, du pN-COLLII et du pro-COLLII mesurées sur l'autoradiogramme de la figure 7.2. Cependant, la position prédite du pC-COLLII (168 kDa) est supérieure à celle mesurée (161 kDa) ; cette dernière correspond peut-être au pC-COLLII ayant subi une dégradation. Il se peut que la bande mesurée à 170 kDa soit le pC-COLLII (son poids correspond au poids calculé), mais elle n'est pas du tout induite par les inhibiteurs de BMP-1.

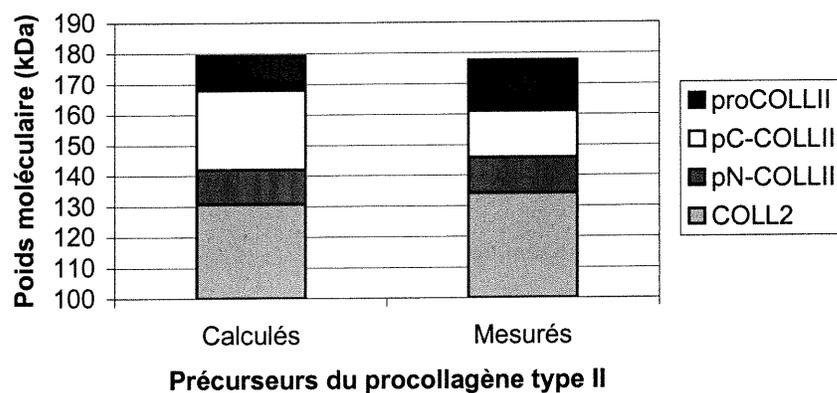


Figure 7.4 : Distribution du poids moléculaire des précurseurs du COLLI, calculée et mesurée

7.1.3 Digestions à la pepsine

La pepsine est une enzyme qui digère les protéines de façon non spécifique. Cependant, elle ne digère pas les domaines en hélice triple des collagènes.

Les échantillons de la condition scorbutique et ceux cultivé en présence d'EDTA ont été digérés à la pepsine pour vérifier le caractère collagèneux des différentes bandes. La digestion a eu lieu pendant 24 heures, à 4°C, sur *vortex*, à une concentration de 1 mg de pepsine par mg de protéines de l'échantillon, dans 0.5M d'acide acétique.

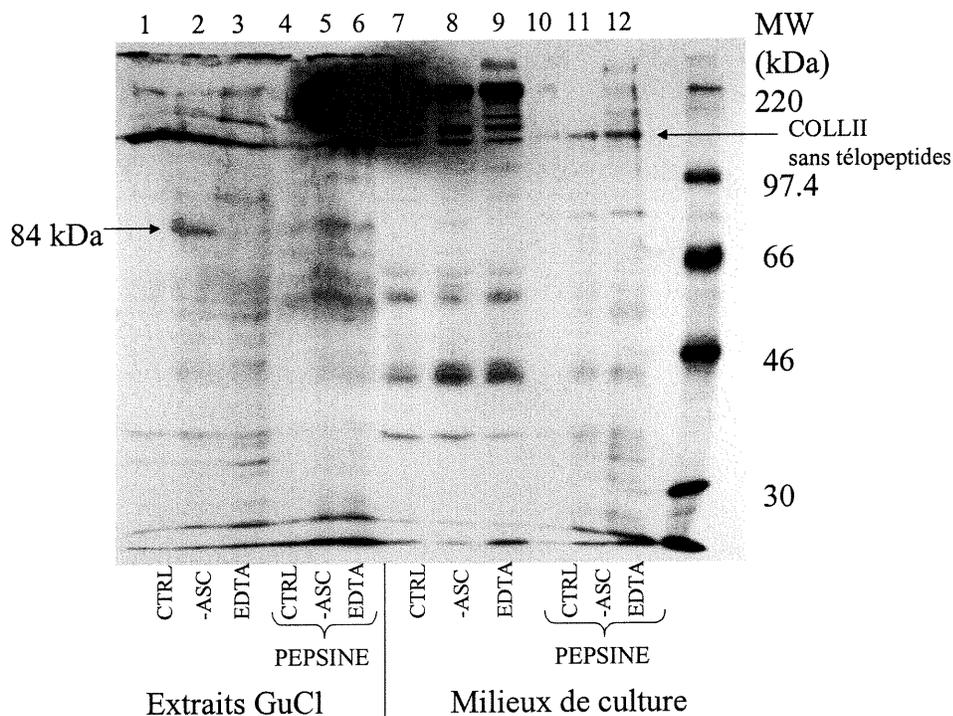


Figure 7.5 : Autoradiogramme de la digestion à la pepsine des extraits GuCl et des milieux de culture (marquage à la ^3H -proline) : absence d'acide ascorbique et présence d'EDTA

NOTE : Le choix d'une tension trop élevée (par distraction) a causé une mauvaise migration des extraits GuCl.

Il est très difficile d'observer l'effet de la digestion à la pepsine sur les extraits GuCl (pistes 4, 5 et 6). Cependant, l'effet est clair pour les milieux de culture ; la bande principale qui résiste à la pepsine (137 kDa, pistes 10, 11 et 12) correspond fort probablement au COLLII sans ses télépeptides. Bien que ce dernier est plus petit que le COLLII, il migre à un poids moléculaire supérieur (la digestion diminue la quantité totale de protéines, ce qui modifie la migration dans le gel). Il y a apparition de quelques autres bandes (une recherche de littérature et des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour les identifier).

Un détail est intéressant : une des bandes induites dans l'extrait GuCl et dans le milieu de culture de la condition scorbutique (84 kDa, pistes 2 et 8) semble être générée par la digestion à la pepsine des milieux de culture (84 kDa, pistes 11 et 12).

7.2 Plusieurs jours avec les conditions de culture différentes

Dans le but d'observer des effets plus marqués de la condition scorbutique, de l'addition d'EDTA ou des inhibiteurs de BMP-1, une expérience semblable à la précédente a été effectuée en augmentant la période pendant laquelle les différentes conditions de culture ont été appliquées.

Tous les échantillons ont été mis en culture pendant une semaine. Les explants de la condition scorbutique n'ont jamais eu d'acide ascorbique dans leur milieu de culture. L'EDTA et les inhibiteurs de BMP-1 ont été ajoutés pendant les deux dernières journées de culture. Le marquage à la ^3H -proline (100 $\mu\text{Ci/mL}$) a été effectué pendant les 24 dernières heures.

NOTE : Cette expérience a été effectuée plusieurs mois après la précédente. Les inhibiteurs de BMP-1 n'étaient peut-être plus actifs à ce moment.

7.2.1 Autoradiogramme de extraits GuCl

Les explants ont subi l'extraction passive à la GuCl , qui fut enlevée par précipitation à l'éthanol. Les échantillons ont été poolés ($n = 2$ pour chaque condition) et séparés par SDS-PAGE (8%, réducteur). Le gel fixé, baigné dans *Amplify* et séché fut exposé pour obtenir l'autoradiogramme de la figure 7.6. Les conditions de culture associées à chaque piste sont rassemblées dans le tableau 7-III.

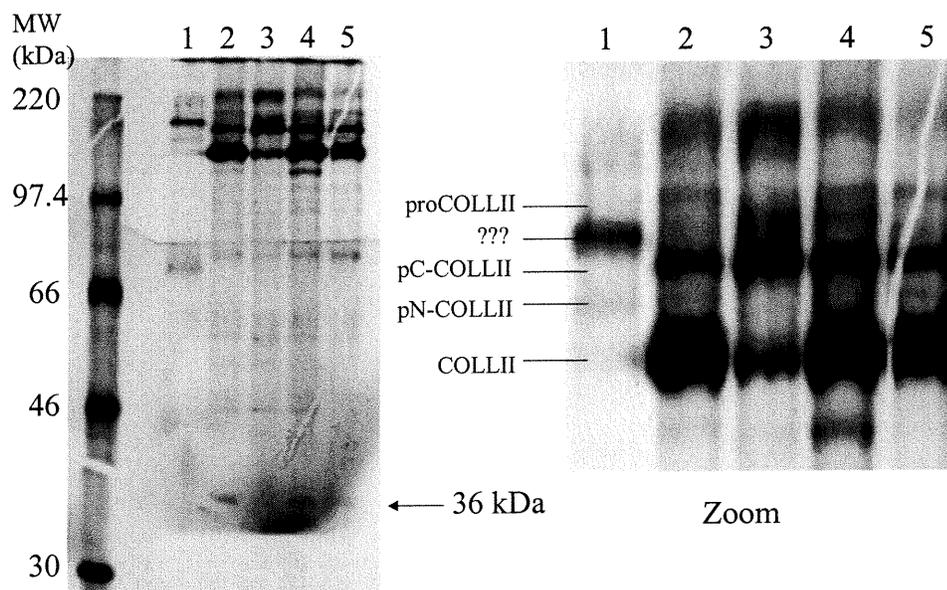


Figure 7.6 : Autoradiogramme des extraits GuCl (marquage à la ^3H -proline) : différentes conditions de culture pendant plus d'une journée

Piste	Condition
1	Condition scorbutique (pas d'acide ascorbique)
2	Contrôle (acide ascorbique 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$)
3	EDTA (acide ascorbique 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ + EDTA 1mM)
4	Inhibiteur de BMP-1, Fibrogen-A (acide ascorbique 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ + inhibiteur 100 nM / DMSO 1%)
5	Inhibiteur de BMP-1, Fibrogen-B (acide ascorbique 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ + inhibiteur 1 μM / DMSO 1%)

Tableau 7-III : Conditions de culture des échantillons des autoradiogrammes des figures 7.6 et 7.7

L'induction de la bande migrant entre le proCOLLII et le pC-COLLII par la condition scorbutique est évidente pour ces extraits GuCl (piste 1) ; cette condition cause aussi l'absence de proCOLLII et de pC-COLLII, accompagnée de la diminution de COLLII. L'ajout d'EDTA a diminué de façon évidente l'intensité de la bande de COLLII (piste 3), et augmenté l'intensité de la bande de pC-COLLII. Les inhibiteurs de BMP-1 n'ont eu aucun effet. La bande à 36 kDa est diminuée par la condition scorbutique et l'ajout d'EDTA ; il se peut bien qu'elle corresponde au CPII.

7.2.2 Autoradiogramme des milieux de culture

L'autoradiogramme des milieux de culture poolés est présenté à la figure 7.7. Les conditions de culture associées à chaque piste sont rassemblées dans le tableau 7-III.

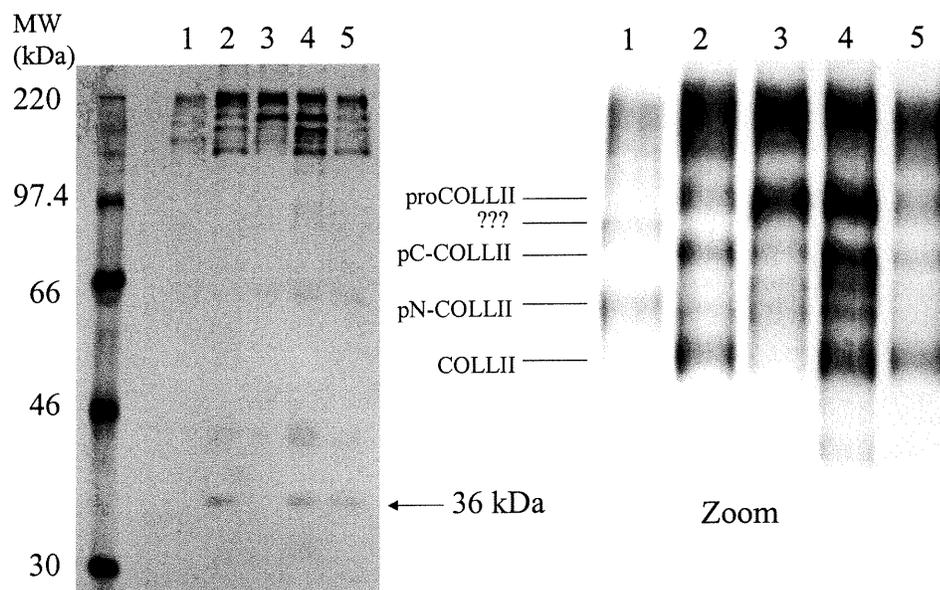


Figure 7.7 : Autoradiogrammes des milieux de culture (marquage à la ^3H -proline) : différentes conditions de culture pendant plus d'une journée

La condition scorbutique induit la bande entre le proCOLLII et le pC-COLLII dans les milieux de culture (piste 1), mais de façon beaucoup moins intense que dans les extraits GuCl ; elle cause l'absence de proCOLLII, de pC-COLLII et de COLLII. L'effet d'EDTA est évident (piste 3) : hausse de proCOLLII accompagnée d'une baisse de pC-COLLII et de COLLII. Les inhibiteurs de BMP-1 n'ont pas d'effet marqué sur la distribution des différentes bandes. La condition scorbutique et l'ajout d'EDTA ont causé, comme dans les extraits GuCl, la diminution d'intensité de la bande à 36 kDa.

7.3 Sommaire du chapitre

L'incorporation de ^3H -proline dans notre système mène à des autoradiogrammes différents pour les extraits GuCl et les milieux de culture. La bande principale de l'extrait GuCl correspond à la molécule de collagène type II, le tropocollagène II (figures 7.1 et 7.6). La bande principale des milieux de culture migre à un poids moléculaire supérieur à 200 kDa et n'est pas encore identifiée (figures 7.2 et 7.7). Le patron des autoradiogrammes semble aussi être différent selon le temps de la culture, ou selon l'épaule utilisée (première expérience vs deuxième expérience).

Les bandes correspondant aux précurseurs du collagène type II ont été identifiées. Le pN-COLLII peut-être augmenté par la condition scorbutique (figure 7.2, piste 2). Le pC-COLLII peut être augmenté par les inhibiteurs de BMP-1 (figure 7.1, piste 6 ; figure 7.2, pistes 6 et 8) et par l'EDTA (figure 7.1, piste 4 ; figure 7.2, piste 4 ; figure 7.6, piste 3). Le proCOLLII peut être augmenté par l'EDTA (figure 7.2, piste 4 ; figure 7.7, piste 3).

Une bande supplémentaire, migrant entre le proCOLLII et le pC-COLLII, peut être induite par la condition scorbutique (figure 7.2, piste 2 ; figure 7.6, piste 1 ; figure 7.7 piste 1) et par l'EDTA (figure 7.2, piste 4). Elle représente peut-être une forme de proCOLLII ayant subi une dégradation intracellulaire.

La bande migrant à 36 kDa est probablement le CPII. Il peut être diminué par l'EDTA (figure 7.2, piste 4 ; figure 7.6, piste 3 ; figure 7.7, piste 3), les inhibiteurs de BMP-1 (figure 7.2, pistes 6 et 8), et par la condition scorbutique (figure 7.6, piste 1 ; figure 7.7, piste 1).

Les poids moléculaires mesurés concordent assez bien avec ceux calculés à partir des séquences d'acides aminés (ajustés par un facteur multiplicatif) ; le pC-

COLLII migre toutefois à un poids légèrement inférieur à celui calculé, étant probablement le fruit d'une dégradation spécifique.

La digestion à la pepsine dévoile une bande principale résistante à la digestion à la pepsine (dans le milieu de culture), qui correspond fort probablement au COLLII sans ses télopeptides.

L'utilisation ultérieure d'un *phosphorimager*, en combinaison avec d'autres conditions (digestions avec différentes enzymes, électrophorèse en condition réductrice et non réductrice, précipitations successives au NaCl, cultures en présence d'inhibiteurs, etc.) confirmera l'identité des différentes bandes, en permettant la détection des protéines (marquées) par l'autoradiogramme et les *Western Blot* sur une même membrane.

Chapitre 8 : Effets du FBS sur la synthèse du collagène type II

L'ajout de FBS dans le milieu de culture augmente le taux de synthèse du collagène dans le cartilage mis en culture (Hascall V.C. et al., 1983; Low R.B. et al., 1985). De plus, il a été signalé que le promoteur du gène du collagène type XII a un domaine nécessaire à l'induction par le FBS et un domaine nécessaire à l'induction par l'étirement mécanique des fibroblastes (Chiquet M., 1999). Le FBS contient donc des éléments impliqués dans le contrôle de la synthèse des collagènes, et il est possible qu'il amplifie la modulation de la synthèse du collagène type II (COLLII) par les stimulations mécaniques, comme c'est le cas pour les protéoglycanes (PG) (Maroudas A. et al., 1999).

Nous avons vérifié l'effet du FBS dans notre système sur l'incorporation de ³H-proline. Des digestions à la collagénase ainsi qu'à la pepsine ont été effectuées afin de vérifier l'identité des bandes obtenues sur les autoradiogrammes. L'effet du FBS sur les ARNm de COLLII, d'aggrécane et de GAPDH a aussi été étudié.

Des précipitations successives au NaCl ont aussi été effectuées avec en tête l'hypothèse qu'elles permettent la séparation des différents types de collagènes.

Les échantillons ont été obtenus à partir de quatre épaules bovines différentes. La première journée de culture a été effectuée en absence d'acide ascorbique et de FBS. Pendant les quatre journées suivantes, les explants ont été mis en culture en présence d'acide ascorbique et sous différentes concentrations de FBS, provenant de 2 lots différents ; ³H-proline a été ajoutée pendant les 24 dernières heures, à une concentration de 100 µCi/mL.

Pour l'analyse d'ARNm, certains échantillons ont été congelés la journée même de l'isolation (congélation rapide avec de l'azote liquide). D'autres

échantillons ont été mis en culture selon les conditions décrites au paragraphe précédent, sans toutefois être mis en présence de ^3H -proline.

8.1 FBS et incorporation de ^3H -proline

À la fin du marquage, les explants ont été extraits passivement à la GuCl (sur *vortex* à 4°C, 2 fois pendant 24 heures, dans 150 μL de GuCl) et dialysés par *Microcons* contre du PBS. Le quart de chaque échantillon a été soumis à l'électrophorèse (*SDS-PAGE* de 8%, réducteur). Le gel a été fixé, baigné dans *Amplify*, séché, et mis sous exposition au film pendant 3 jours (à -80°C). L'autoradiogramme développé est présenté à la figure 8.1.

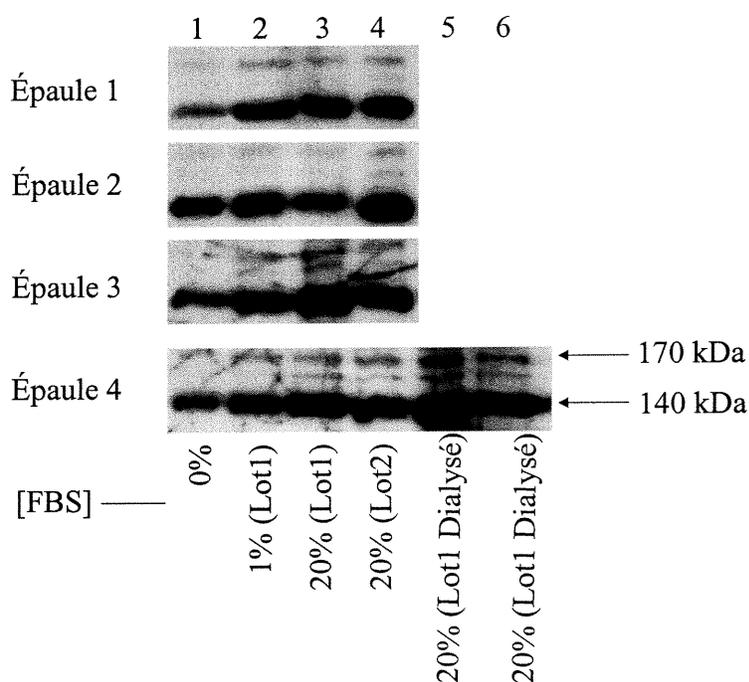


Figure 8.1 : Autoradiogramme des extraits GuCl (marquage à la ^3H -proline) : différentes concentrations de FBS

Pour les épaules 1, 3 et 4, l'augmentation du contenu en COLLII nouvellement synthétisé est évidente (poids moléculaire de 140 kDa). L'exposition des gels n'a pas été suffisamment longue pour détecter le CPII sur l'autoradiogramme.

Le test de viabilité effectué sur des échantillons de chaque épaule pendant la première journée de culture nous a révélé que la plupart des cellules étaient vivantes, sauf dans le cas de l'épaule 2. L'échantillon de l'épaule 2 qui a été mis en présence de 20% de FBS du lot1 semble être anormalement bas (piste 3, épaule 2) ; peut-être était-ce un échantillon contenant plusieurs cellules mortes.

8.1.1 Digestion à la collagénase

Les disques de l'épaule 1, après avoir été extraits à la GuCl, ont été congelés à nouveau (à -80°C) et pulvérisés en présence de la solution RIPA pour extraire le maximum de protéines nouvellement synthétisées ; le RIPA solubilise les membranes hydrophobes et permet d'extraire les protéines intracellulaires.

Les comptes radioactifs des milieux de culture, des extraits GuCl et des extraits RIPA ont été mesurés par scintillation, pour les différentes concentrations de FBS ajoutées, après avoir été précipités à l'éthanol froid (83% volumique) ; cette dernière technique permet de se débarrasser des acides aminés radioactifs non incorporés dans les macromolécules.

Les comptes radioactifs ont aussi été mesurés pour les mêmes extraits qui ont été digérés à la collagénase et précipités à nouveau à l'éthanol. Les comptes sont représentés dans le graphique suivant (figure 8.2). La digestion à la collagénase a eu lieu pendant 5 heures, à 37°C , sur *vortex* pendant quelques secondes après chaque heure, en présence de 20 unités de collagénase dans une solution de CaCl_2 0.36mM et Tris-HCl 50mM (pH 7.6).

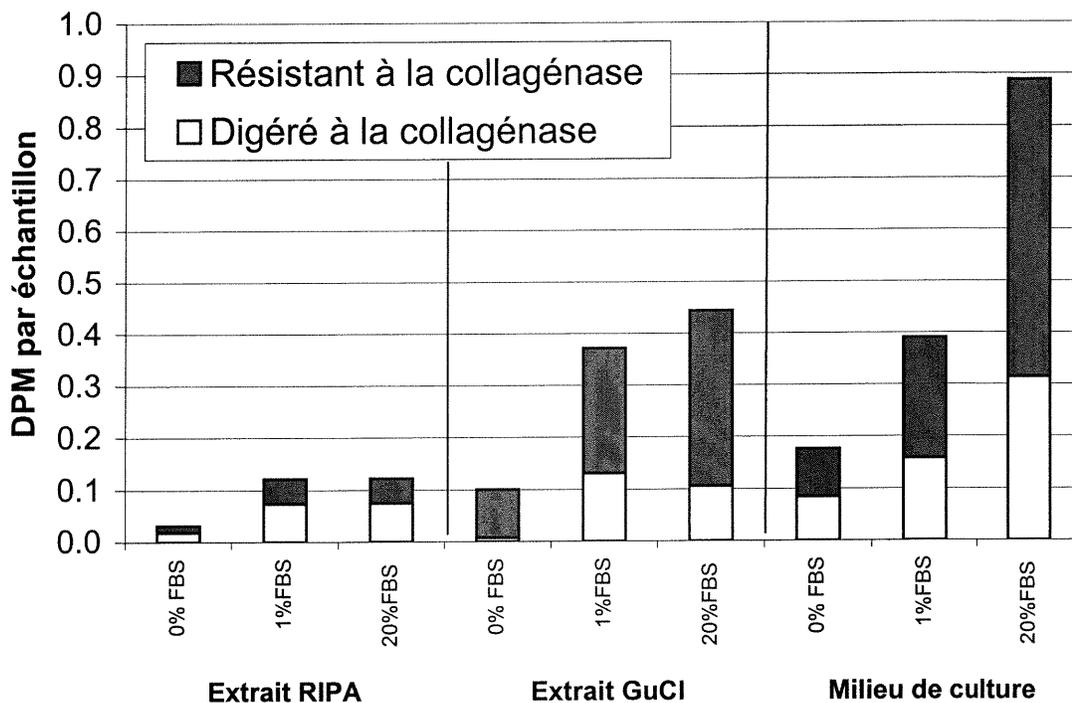


Figure 8.2 : Comptes en scintillation des extraits RIPA et GuCl, et du milieu de culture des échantillons de l'épaule 1 (marquage à la ^3H -proline) : différentes concentrations de FBS et digestion à la collagénase

La modulation des comptes totaux par le FBS est évidente dans le milieu de culture et dans l'extrait GuCl. Les comptes des protéines résistantes à la collagénase démontrent qu'une grande partie des comptes ne proviennent pas des collagènes, surtout dans le cas de l'extrait GuCl sans FBS, et dans le cas du milieu de culture à 20% de FBS. Des autoradiogrammes ont été générés afin de vérifier d'où venaient ces comptes (figure 8.3).

L'autoradiogramme A est le résultat de l'exposition d'un mini-gel *SDS-PAGE* (8 % d'acrylamide, réducteur, fixé, baigné dans *Amplify*, séché, exposé à -80°C pendant 10 jours) des extraits RIPA et GuCl, ainsi que des milieux de culture (15 % de chaque échantillon).

L'autoradiogramme B est le résultat de l'exposition d'un mini-gel *SDS-PAGE* (12 % d'acrylamide, réducteur, fixé, baigné dans *Amplify*, séché, exposé à -80°C pendant 7 jours) des mêmes échantillons que l'autoradiogramme A, mais qui ont subi la digestion à la collagénase (7 % de chaque échantillon). Le haut pourcentage d'acrylamide (12 %) a été choisi dans le but de pouvoir détecter les bandes représentant des fragments de collagène type II digéré. Un autre mini-gel (partie C sur la figure 8.3) a été effectué dans les mêmes conditions (mais avec 2 % de chaque échantillon seulement) pour l'analyse par *Western Blot* (après transfert sur une membrane) ; la détection du CPII par immunobuvardage se veut ici un contrôle (protéine résistante à la collagénase).

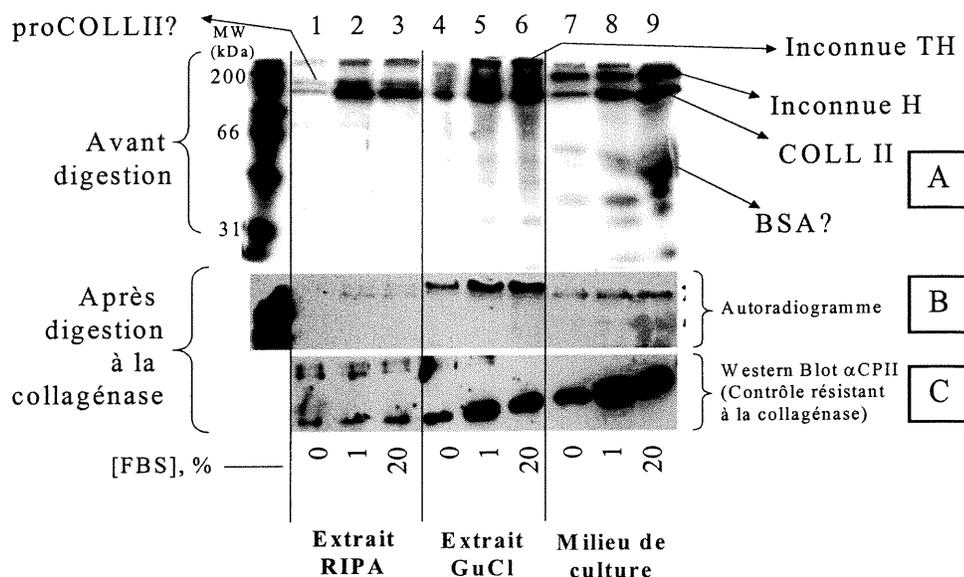


Figure 8.3 : Autoradiogrammes (de mini-gels) des échantillons de l'épaule 1 (marquage à la ^3H -proline) : différentes concentrations de FBS et digestion à la collagénase

NOTE : Ces résultats étant générés après séparation par mini-gels, il est difficile d'évaluer précisément le poids moléculaire des différentes bandes (les mini-gels ont une moins bonne résolution des poids moléculaires).

Observations de la partie C :

- La CPII n'a pas été digéré par la collagénase (il aurait toutefois fallu faire la même analyse pour ces échantillons avant la digestion à la collagénase, afin de comparer l'intensité des bandes);
- Il y a peu de CPII dans l'extrait RIPA (l'extraction passive à la GuCl semble avoir été efficace);
- Les contenus en CPII de l'extrait GuCl et du milieu de culture sont modulés par la présence de FBS (0 % vs 1 %), mais ne varient pas vraiment selon sa concentration (1 % vs 20 %).

Observations des parties A et B:

- Extrait RIPA : L'intensité du signal est faible en absence de FBS, mais est augmentée par sa présence (pas de variation selon sa concentration);
- Extrait RIPA : Les trois bandes les plus intenses sont (presque totalement) digérées par la collagénase, et correspondent probablement au COLLII (bande inférieure), à un précurseur de COLLII (bande intermédiaire), et à un polymère de COLLII (bande supérieure, très haut poids moléculaire)
- Extrait GuCl : L'intensité du signal est augmentée par la présence de FBS (pas de variation selon sa concentration), qui allume de nouvelles bandes;
- Extrait GuCl : De ces nouvelles bandes, l'une est résistante à la collagénase (Inconnue TH, pour très haut poids moléculaire);
- Milieu de culture : l'intensité des bandes est augmentée par le FBS 1 %, et est davantage augmentée par le FBS 20 %.
- Milieu de culture : une des bandes est probablement le COLLII, et celle au-dessus n'est pas identifiée (Inconnue H, pour haut poids moléculaire);
- Milieu de culture : il y a une bande qui n'est pas totalement dégradée par la collagénase.

Il est évident que les comptes par scintillation (avant et après digestion à la collagénase) ne reflètent pas exactement les résultats obtenus par les autoradiogrammes ; par exemple, les comptes du milieu de culture en présence de 20

% de FBS (figure 8.2, dernière colonne à droite) suggèrent une grande quantité de protéines non collagèneuses, tandis que les autoradiogrammes (figure 8.3, parties A et B, piste 9) suggèrent le contraire. Il est possible que l'éthanol précipite des petits fragments (petits peptides) contenant de la ^3H -proline, surestimant les comptes des macromolécules non digérées ; cet artefact pourrait être évité en dialysant le culot resuspendu (de la précipitation à l'éthanol) avec un *Microcon*. Il est aussi possible que des grosses protéines marquées, détectées par scintillation, ne réussissent pas à entrer dans les gels d'électrophorèse.

Dans le même ordre d'idées, un détail intrigant surgit quand on compare l'autoradiogramme des extraits GuCl de la figure 8.1 (gros gel) et celui de la figure 8.3 (mini-gels), partie A, pistes 4, 5 et 6 : il y a des bandes présentes dans le mini-gel qui sont absentes du gros gel, dont Inconnue TH. La seule hypothèse que j'entrevois est la suivante : certaines protéines de haut poids moléculaire entrent dans le mini-gel mais ne réussissent pas à entrer dans le gros gel, et demeurent au sommet du gel de séparation. Cette hypothèse semble être vérifiée dans la prochaine section.

8.1.2 Digestion à la pepsine

Un autoradiogramme des milieux de culture de l'épaule 1 (25 % des échantillons totaux) pour les différentes concentrations de FBS a été généré (SDS-PAGE 8%, réducteur). Un extrait GuCl (20 % de FBS) a été inclus pour comparer les patrons de bandes obtenus.

Le milieu de culture et l'extrait GuCl (20 % de FBS) ont aussi été digérés à la pepsine, pour observer quelles bandes résistent à cette digestion. La digestion a eu lieu pendant 24 heures, à 4°C, sur *vortex*, à une concentration de 1 mg de pepsine par mg de protéines de l'échantillon, dans 0.5M d'acide acétique.

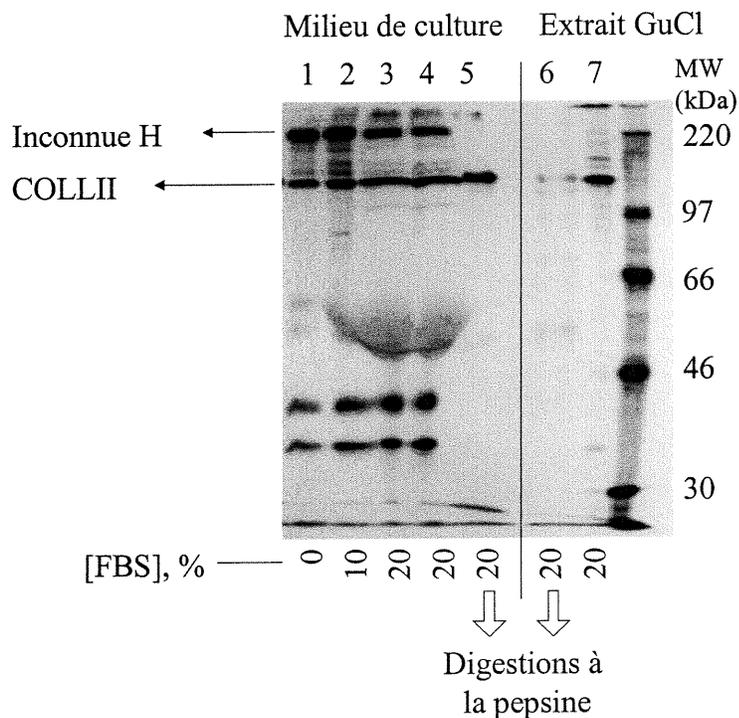


Figure 8.4 : Autoradiogramme (marquage à la ^3H -proline) des milieux de culture (sous différentes concentrations de FBS) et d'un extrait GuCl (20 % de FBS) : digestions à la pepsine

Le patron des bandes du milieu de culture sous différentes concentrations de FBS (figure 8.4, pistes 1, 2, 3 et 4) est le même que celui obtenu précédemment (figure 8.3, partie A, pistes 7, 8 et 9) ; l'identité des bandes comprises entre 30 et 46 kDa n'est pas déterminée (l'une correspond peut être au CPII). Le milieu de culture digéré à la pepsine ne présente qu'une bande principale ; elle semble correspondre au COLLII (piste 5).

En partant de l'hypothèse que la pepsine digère les télépeptides du COLLII, ce dernier devrait avoir un poids moléculaire inférieur après la digestion. Or, la bande après digestion migre à un plus haut poids moléculaire (piste 5) que la bande de COLLII avant digestion (piste 4). Deux explications paraissent vraisemblables : (1) la pepsine digère la plupart des protéines (dont le BSA), ce qui modifie la mobilité du COLLII dans le gel d'électrophorèse (le BSA peut en quelques sortes frayer un chemin au COLLII et le faire migrer plus rapidement), ou bien (2) la bande de

COLLII est digérée par la pepsine (parce qu'elle est dénaturée par exemple) et c'est la bande Inconnue H qui se retrouve au poids moléculaire de COLLII, après la digestion à la pepsine. Pour déterminer quelle explication est représentative de la réalité, il faudrait effectuer des précipitations successives au NaCl (pour séparer le COLLII et Inconnue H, section suivante), afin de digérer séparément les culots resuspendus. De cette façon, on pourrait déterminer si c'est COLLII ou Inconnue H qui migre à 140 kDa après avoir été digéré à la pepsine.

La digestion à la pepsine diminue de façon évidente l'intensité de la bande de COLLII de l'extrait GuCl (piste 6 comparée à la piste 7). La seule hypothèse vraisemblable est que l'extraction à la GuCl dénature le COLLII, qui devient alors sensible à la pepsine.

L'hypothèse émise à la section précédente sur le fait que des grosses protéines de l'extrait GuCl ne réussissent pas à entrer dans le gros gel est appuyée ici ; il y a marquage au sommet de la piste 7.

8.1.3 Précipitations au NaCl

Selon Diab. et al., (1996), on peut séparer les différents types de collagène par précipitations successives au NaCl. Selon eux, les collagènes types II, XI et IX précipitent respectivement à des concentrations de NaCl de 0.9M, 1.2M et 2.2M (dans 0.5M d'acide acétique). Le but de cette expérience était donc d'effectuer ces précipitations et d'en observer la séparation engendrée.

L'échantillon utilisé ici est le milieu de marquage (^3H -proline 100 $\mu\text{Ci/mL}$, pendant 24 heures) d'un explant mis en culture pendant une semaine en présence de 10% de FBS et d'acide ascorbique. Le résultat des précipitations successives est présenté à la figure 8.5).

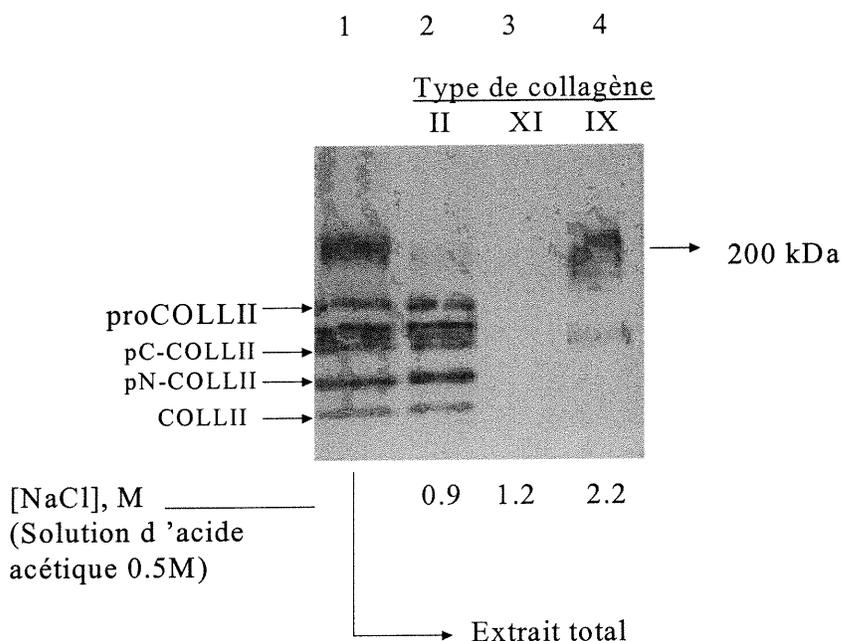


Figure 8.5 : Autoradiogramme des culots obtenus par précipitations successives au NaCl d'un milieu de culture (marquage à la ^3H -proline)

La piste 1 est l'extrait total ; on reconnaît les bandes associées précédemment au COLLII et à ses précurseurs, ainsi que la bande Inconnue H (200 kDa). La piste 2, selon l'hypothèse de départ, représente bien le COLLII (et ses précurseurs), confirmant nos spéculations précédentes ; les bandes comprises entre le proCOLLII et le pC-COLLII ne sont pas encore identifiées (l'une d'elles correspond peut-être à la bande induite par la condition scorbutique au chapitre précédent). La piste 3 ne dévoile aucune bande, suggérant l'absence de collagène type XI nouvellement synthétisé. La piste 4 nous incite à penser que la bande Inconnue H est une chaîne de collagène type IX, tout comme une bande diffuse au-dessous. Des confirmations à l'aide de détections *Western Blot* devront être apportées avant de conclure avec certitude sur les résultats de ces précipitations.

L'autoradiogramme (figure 8.6) du même échantillon (piste 1) en condition non réductrice (piste 2) nous démontre qu'il y a principalement trois bandes qui contiennent des ponts disulfures, puisqu'elles diminuent d'intensité sous condition non réductrice. La bande Inconnue H est l'une d'elles. Les autres sont probablement le

proCOLLII et le pC-COLLII ; ces dernières ont des ponts disulfures reliant (deux ou) trois chaînes par leur CPII. Parallèlement, trois bandes de très hauts poids moléculaires apparaissent en condition non réductrice. Il est bon de noter que l'une des deux bandes situées entre le pC-COLLII et le proCOLLII semble aussi diminuer son intensité en condition non réductrice.

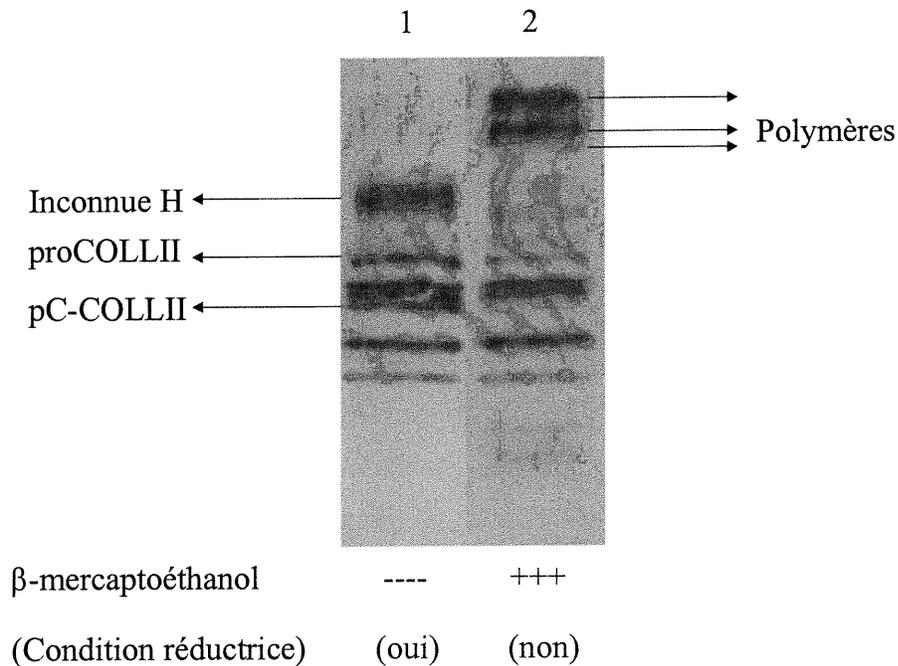


Figure 8.6 : Autoradiogramme du SDS-PAGE d'un milieu de culture (marquage à la ^3H -proline en présence de FBS) en conditions réductrice et non réductrice

NOTE : Les marqueurs moléculaires sont inutiles pour déterminer le poids moléculaire des polymères de la figure 6, car ces derniers sont au-dessus du marqueur le plus élevé (myosine, 200kDa).

Il serait bon de vérifier l'effet des précipitations au NaCl ainsi que de la condition non réductrice sur les extraits GuCl.

8.2 FBS et CPII

La modulation du CPII par le FBS a déjà été observée précédemment pour l'épaule 1 (figure 8.3, partie C). L'expérience a été répétée cette fois-ci pour les

quatre épaules, à partir d'un mini-gel de 8 % d'acrylamide. La détection par *Western Blot* est présentée à la figure 8.7.

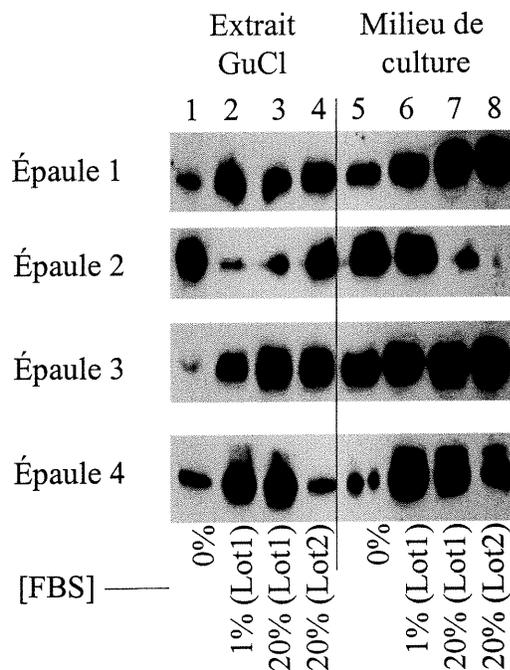


Figure 8.7 : *Western Blot* anti-CPII des extraits GuCl et des milieux de culture : différentes concentrations de FBS

NOTE : Il faudrait vérifier la quantité de CPII provenant du FBS lui-même.

On peut observer la tendance générale que le contenu en CPII est augmenté par le FBS, pour les extraits GuCl ainsi que les milieux de culture. L'épaule 2 fait exception à la règle (hypothèse de mort cellulaire, section 8.1). Le FBS du lot 2 semble n'avoir aucun effet sur le contenu en CPII de l'épaule 4 (épaule 4, pistes 4 et 8) ; cette observation est intrigante parce que le FBS du lot 2 a eu un effet sur l'incorporation de ^3H -proline (figure 8.1, piste 4).

8.3 FBS et ARNm du collagène type II, de l'aggrécane et de GAPDH

La comparaison des contenus en ARNm a été effectuée par la technique de protection de la ARNase, après une extraction selon le protocole de l'annexe V. Cette étape de l'expérience a été accomplie par le Dr Caroline Hoemann. Les résultats de l'autoradiogramme sont rassemblés dans la figure 8.8.

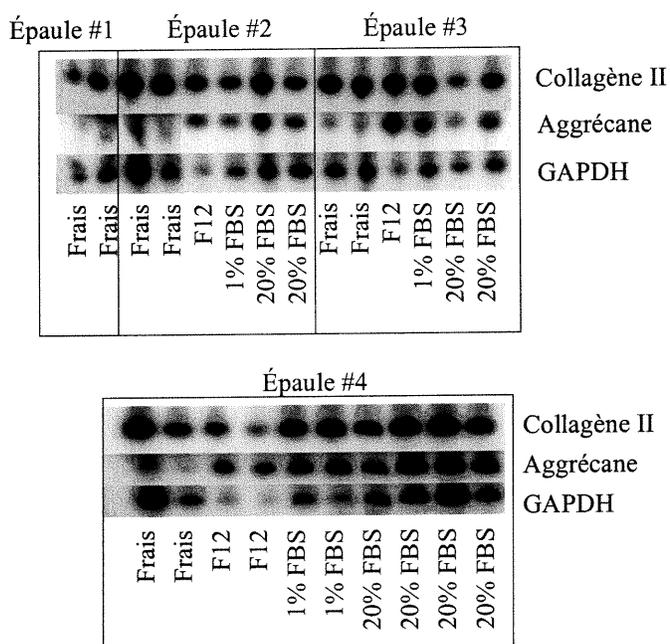


Figure 8.8 : Autoradiogramme de la protection de la ARNase pour les échantillons frais, et les échantillons cultivés en présence de différentes concentrations de FBS

L'ARNm du COLLII n'est pas constant, mais ces variations ne semblent pas être reliées à la culture (par rapport au tissu frais), ni à la présence de FBS. Nous avons précédemment observé que la mise en culture cause une baisse du contenu en CPII dans le tissu (section 5.2.1), et que le FBS cause une augmentation du contenu en COLLII nouvellement synthétisé (section 8.1). Comme l'ARNm semble être constant, on peut spéculer qu'il y a un important contrôle au niveau traductionnel ou au niveau post-traductionnel, mais pas au niveau transcriptionnel.

L'ARNm de l'aggrécane n'est pas influencé par la présence de FBS. Il a été mentionné que la synthèse des PG est augmentée par FBS (Hascall V.C. et al., 1983) ; comme dans le cas du COLLII, le contrôle par le FBS ne semble pas être au niveau de la transcription, mais bien aux niveaux traductionnel et/ou post-traductionnel. Mais, différemment du cas de COLLII, la mise en culture (en absence ou en présence de FBS) augmente la quantité d'ARNm de l'aggrécane. Une hypothèse est que la mise en culture induit la diffusion des PG vers le milieu de culture qui est ressentie par les chondrocytes (par un quelconque processus) ; ces derniers, pour remplacer cette perte, tentent d'augmenter la production par un contrôle transcriptionnel à la hausse. Cette hypothèse est en accord avec les résultats de Dumont J. et al. (1999).

Vu le niveau généralement constant de son ARNm, GAPDH est habituellement utilisé pour fins de normalisation. La mise en culture en absence de FBS diminue toutefois son ARNm.

8.4 Sommaire du chapitre

L'ajout de FBS dans le milieu de culture augmente de façon évidente l'incorporation de ^3H -proline en COLLII et ses précurseurs, et augmente aussi le contenu total en CPII (détecté par *Western Blot*). Une concentration élevée (20% vs 1%) ne semble toutefois pas nécessaire pour induire ces augmentations. Le FBS n'a pas augmenté le niveau d'ARNm du COLLII, suggérant que la modulation de la synthèse du COLLII par le FBS est au niveau post-transcriptionnel.

L'ARNm de l'aggrécane est augmenté par la mise en culture (probablement en réponse à la perte de protéoglycanes des premiers jours de culture), indépendamment de la présence de FBS, tandis que l'ARNm de GAPDH est diminué par la mise en culture en absence de FBS.

Le milieu de culture contient une bande radioactive autour de 200 kDa (bande observée dans le chapitre 7), et l'extrait GuCl en contient une de très haut poids moléculaire, résistante à la digestion à la collagénase (qui correspond peut-être à la fibronectine). La pulvérisation du disque (après l'extraction passive à la GuCl) suivie de la solubilisation avec la solution RIPA montre qu'il reste peu de CPII clivé dans le tissu après l'extraction à la GuCl, mais qu'il y a encore du COLLII et ses précurseurs (probablement intracellulaires ou liés à la membrane cellulaire).

La digestion à la pepsine dévoile une bande principale dans le milieu de culture (COLLII sans ses télépeptides) ; cette dernière est très faible dans l'extrait GuCl (l'extraction à la GuCl dénature probablement les trimères de COLLII, les rendants sensibles à la pepsine).

L'identification des bandes de proCOLLII et de pC-COLLII proposée au chapitre 7 est appuyée par un gel d'électrophorèse en absence de β -mercaptoéthanol ; l'intensité de ces deux bandes est fortement diminuée par la condition non réductrice, ce qui démontre la présence de ponts disulfures).

Quelques résultats suggèrent que la bande marquée de haut poids moléculaire du milieu de culture (migrant à environ 200 kDa) pourrait bien être le collagène type IX ; elle ne résiste ni à la pepsine, ni à la collagénase (le collagène type IX possède quatre domaines non collagèneux et trois domaines collagèneux), augmente de poids moléculaire en condition non réductrice (les chaînes de collagène type IX sont liées par des ponts disulfures), et précipite en présence de NaCl 2.2 M dans l'acide acétique 0.5 M (tel le collagène type IX, selon Diab M. et al., 1996). Les chaînes du collagène type IX ont des poids moléculaires calculés de 92.9, 65.1 et 63.7 kDa ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$), ce qui est nettement inférieure à 200 kDa ; toutefois, la chaîne $\alpha 2$ peut contenir une chaîne de glycosaminoglycanes (ce qui peut augmenter son poids moléculaire et influencer sa mobilité). La bande à 200 kDa peut aussi correspondre à une association de différentes chaînes α du collagène type IX et du collagène type II (des liaisons covalentes relient les molécules de collagène type IX entre elles, tout comme elles

relient le collagène type IX au collagène type II). La méthode suivante permettrait de savoir si cette bande est le collagène type IX : digérer le milieu de culture à la pepsine (pour séparer les trois domaines collagèneux), digérer ensuite à la chondroïtinase et à la kératanase afin d'enlever toutes chaînes de glycosaminoglycanes, et vérifier par autoradiographie (à partir d'un SDS-PAGE avec haut pourcentage d'acrylamide) en condition réductrice si les fragments correspondants au domaine COL1 des chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ sont ainsi générés (12, 10 et 16 kDa, selon Wu J.J. et al., 1991). On peut aussi vérifier si l'autoradiogramme d'un SDS-PAGE en condition non réductrice (après digestions à la pepsine, à la chondroïtinase et à la kératanase) dévoile les trimères de hauts poids moléculaires (type IX HMW, > 150 kDa), et celui de faible poids moléculaire (type IX LMW, ~35 kDa).

Tel qu'il a été mentionné dans le chapitre 7, l'utilisation ultérieure d'un *phosphorimager*, en combinaison avec d'autres conditions, permettra de confirmer l'identité des différentes bandes.

Chapitre 9 : Compressions mécaniques et incorporation de ³H-proline

Ce chapitre présente les résultats centrés vers l'effet des compressions mécaniques sur l'incorporation de ³H-proline. La majorité des compressions étaient des compressions dynamiques (4 protocoles différents), mais un protocole de compression statique a aussi été effectué. Quelques résultats portent sur l'incorporation de ³⁵S-méthionine, ainsi que sur le contenu en chondroïtine sulfate des milieux de culture.

Toutes les compressions ont été effectuées en géométrie non confinée, en présence d'acide ascorbique et de FBS (10%), sauf s'il est indiqué le contraire. Les paires ont été préalablement formées selon le contenu en CPII et en chondroïtine sulfate des milieux de culture, ainsi que la position sur l'articulation.

Suite aux compressions, les explants ont été extraits passivement à la GuCl. Par la suite, ces derniers, ainsi que les milieux de culture, ont été précipités à l'éthanol froid pour se débarrasser de la ³H-proline (ou de la ³⁵S-méthionine) non incorporée en macromolécules. Les comptes d'émissions radioactives des culots ont été mesurés par scintillation. Étant donnée que la ³H-proline est incorporée de façon non négligeable par d'autres protéines que le COLLII, les comptes des culots précipités par le NaCl 0.9M (dans 0.5M d'acide acétique) ont aussi été mesurés, afin d'analyser le COLLII spécifiquement (en se basant sur l'hypothèse de la section 8.1.3).

9.1 Compressions dynamiques et incorporation de ³H-Proline

Le tableau 9-I présente les paramètres des protocoles utilisés pour les compressions dynamiques. La numération débute au chiffre VI, pour suivre la

numération des protocoles dynamiques du chapitre 6. Les compressions ont été appliquées selon la méthode décrite dans la section 6.1.

Paramètre	Protocoles dynamiques		
	VI (Hiver 2000)	VII (Hiver 2000)	VIII (Hiver 2000)
Nombre de jours de compression - jours	1	1	1
Nombre total de cycles - cycles	576	480	5040
Temps de compression par jour - heures	16	16	14
Nombre de cycles par jour - cycles	576	480	5040
Amplitude de compression - μm	150	250	200
Vitesse de montée - $\mu\text{m}/\text{sec}$	300	25	100
Vitesse de descente - $\mu\text{m}/\text{sec}$	300	250	100
Temps d'attente après chaque cycle - sec	99	109	6
Temps total pour un cycle - sec	100	120	10
Contrainte moyenne au sommet - MPa	0.9	1.7	1.0
	± 0.4	± 1.1	± 0.9

Tableau 9-I : Paramètres des protocoles dynamiques utilisés lors de l'incorporation de ^3H -proline

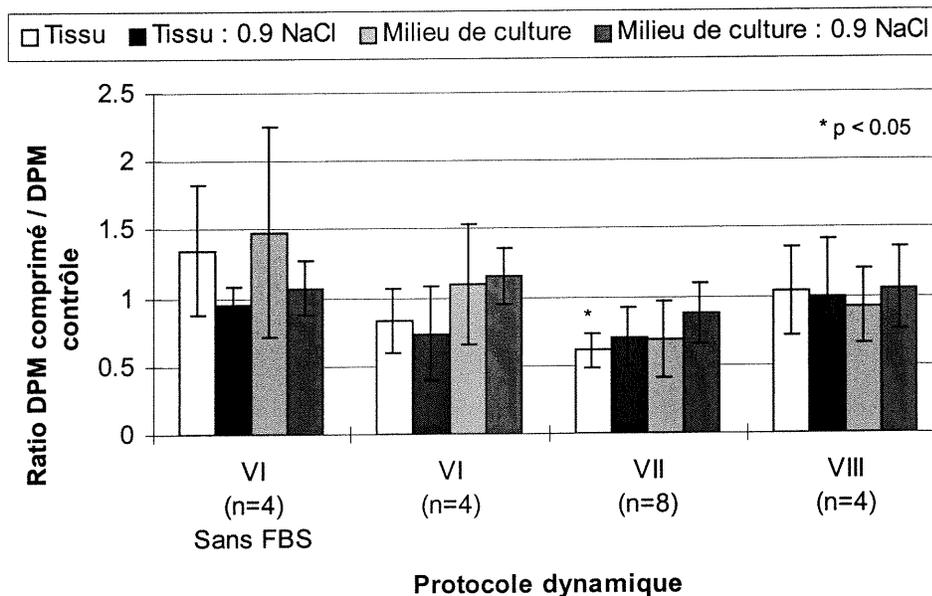


Figure 9.1 : Moyenne (et déviation standard) des ratios des comptes en scintillation (dynamique/contrôle)

9.1.1 Protocole dynamique VI

Ce protocole a été choisi en fonction des résultats obtenus par Wong M. et al. (1999) ; ces derniers suggèrent que la stimulation de la synthèse des protéines par les compressions mécaniques soit maximale pour une fréquence de 0.5 Hz (un demi-cycle de sinus par seconde, suivi d'une seconde de repos) lors de déformations axiales de 15 %. Le protocole dynamique VI effectue une *dent de scie* en une seconde (semblable à la moitié d'un cycle d'un sinus) et atteint une déformation axiale d'environ 15 %. Nous avons toutefois choisi un temps de repos de 99 secondes afin de permettre à l'explant de reprendre sa forme initiale entre chaque cycle, limitant ainsi la perte de volume due à l'exsudation du fluide. Le protocole a été appliqué selon deux conditions : en absence et en présence de FBS.

Absence de FBS

Les comptes totaux indiquent une augmentation (quoique non significative) par les compressions mécaniques dans le tissu (extrait GuCl) ainsi que dans le milieu de culture. Le précipité NaCl (culot de la précipitation NaCl 0.9M) n'indique aucune modulation due aux compressions. Ce résultat suggère qu'il y a une hausse de synthèse de protéines, autres que le COLLII.

Présence de FBS

Les comptes totaux suggèrent une baisse de synthèse (quoique non significative) dans le tissu, mais aucune modulation dans le milieu de culture. Le précipité NaCl dévoile les mêmes tendances.

Le protocole VI semble induire des réponses différentes selon la présence ou l'absence du FBS. Cependant, les modulations ne sont pas significatives et le nombre d'échantillons devrait être augmenté pour en tirer des conclusions.

9.1.2 Protocole dynamique VII

Ce protocole a été choisi en fonction de maximiser la différence de pression relative du fluide et de déformation radiale entre la partie centrale et la partie périphérique du disque (en choisissant un temps de montée de dix secondes, d'après les modélisations présentées dans les figures 4.5 et 4.9), tout en gardant une pression à la surface d'environ 1.25 MPa (en choisissant une déformation radiale de 25%, d'après la figure 4.4). À cette vitesse, le déplacement du fluide s'effectue sur tout le rayon du disque (sauf en plein centre, d'après la figure 4.7). Il est semblable au protocole dynamique III qui a augmenté le contenu en CPII extrait du tissu et du milieu de culture (voir figure 6.1)

Les comptes totaux du disque entier indique une baisse généralisée (dans le tissu et dans le milieu de culture, avant et après la précipitation au NaCl) de l'incorporation de ^3H -proline. Ce protocole paraît donc être inhibiteur de synthèse.

Distribution radiale et ajout de β -APN

La séparation des deux parties du disque (centrale et périphérique, à l'aide d'un poinçon de 2mm de diamètre) des explants du protocole VII n'indiquent aucune différence radiale remarquable de l'inhibition mécanique (figure 9.2). L'inhibition ne semble donc pas être reliée à la pression interne, ou à la déformation radiale, mais pourrait bien être reliée au déplacement du fluide.

L'ajout de β -APN pendant les compressions n'a pas eu d'influence sur le ratio, suggérant que le taux d'assemblage du COLLII nouvellement synthétisé dans la MEC n'est pas influencé par ce type de compression, et que l'inhibition n'est pas influencée par l'activité de la lysyl oxidase.

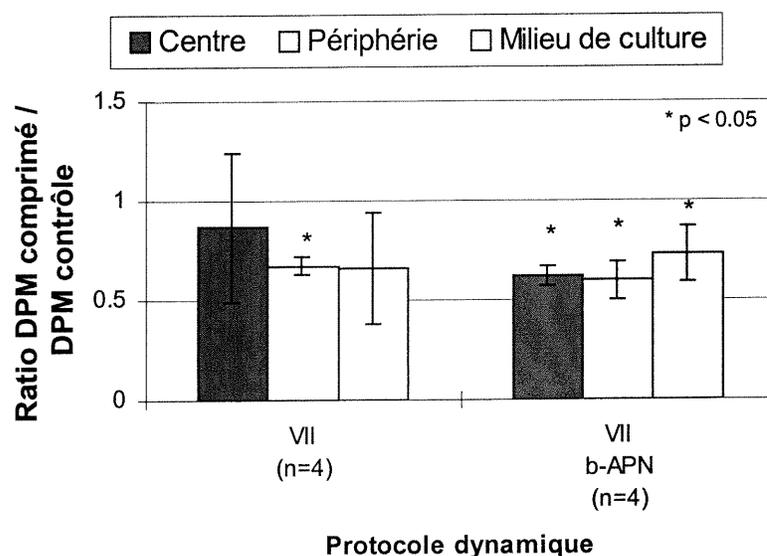


Figure 9.2 : Moyenne (et déviation standard) des ratios des comptes en scintillation (comprimé/contrôle) : dépendance radiale et ajout de β -APN

Il est intéressant de regarder la proportion de la ^3H -proline qui est incorporée dans le centre, dans la périphérie et dans le milieu de culture des disques (moyenne sur huit échantillons, figure 9.3). On s'aperçoit qu'il y a six fois plus de protéines marquées dans l'anneau extérieur du disque que dans sa partie centrale. De plus, il y a presque autant de protéines marquées dans le milieu de culture que dans l'anneau extérieur du disque.

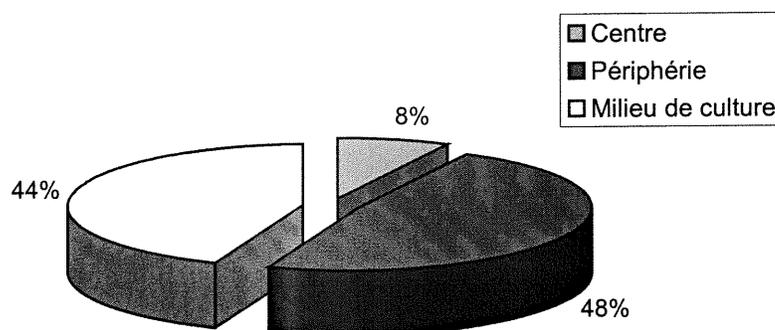


Figure 9.3 : Quantités relatives de protéines marquées : centre, périphérie et milieu de culture

9.1.3 Protocole dynamique VIII

Ce protocole est semblable au protocole dynamique IV, qui a augmenté le contenu en CPII extrait du tissu et du milieu de culture (voir figure 6.1) ; cependant, il ne dure que 16 heures au lieu de 3 heures, pendant une journée au lieu de trois jours. Aucune tendance n'a été induite par ces compressions sur l'incorporation de ^3H -proline.

9.2 Compression statique IV et incorporation de ^3H -Proline

Le protocole statique IV (tableau 9-II) a augmenté le contenu en CPII extrait du tissu (voir figure 6.3) et l'a diminué dans le milieu de culture. Il a donc été répété pour comparer son effet sur l'incorporation de ^3H -proline.

Paramètre	Protocole Statique (Hiver 2000) IV
Nombre de jours de compression - jours	1
Temps de compression par jour - heures	20
Amplitude de compression - μm	325
Vitesse de montée et de descente - $\mu\text{m}/\text{sec}$	5
Contrainte moyenne à l'équilibre - MPa	0.1
(il n'y a pas de déviation standard car la charge mesurée est celle des quatre explants comprimés en même temps sous <i>Quattro</i>)	

Tableau 9-II : Paramètres du protocole statique utilisé lors de l'incorporation de ^3H -proline

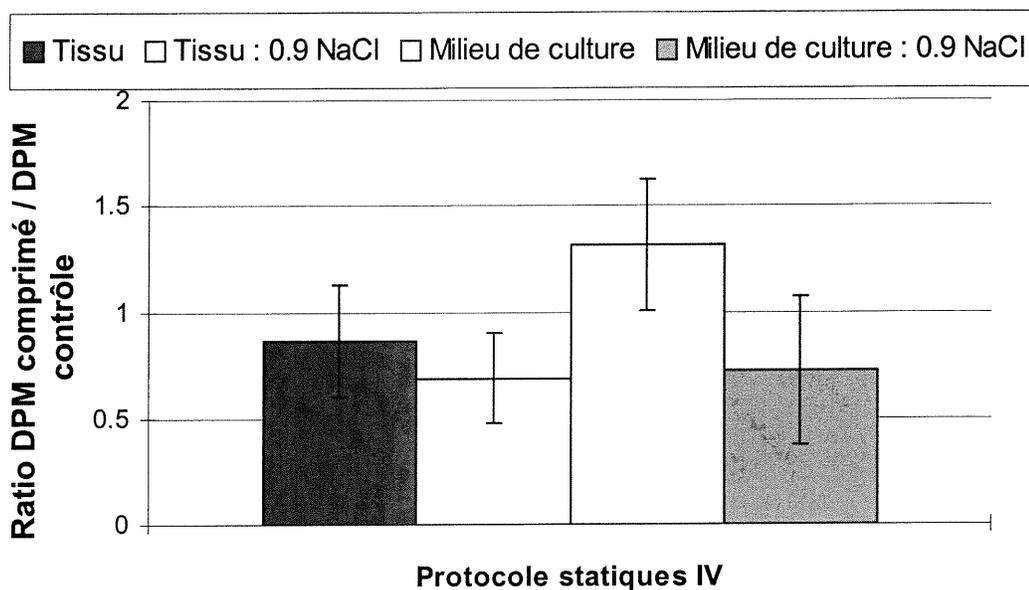


Figure 9.4 : Moyenne (et déviation standard) des ratios des comptes en scintillation (statique/contrôle)

La compression statique diminue l'incorporation de ^3H -proline dans le tissu, et davantage après précipitation au NaCl. Dans le milieu de culture, elle augmente les comptes totaux tandis qu'elle diminue les comptes après précipitation au NaCl. Ce résultat propose une inhibition de la synthèse du COLLI, mais l'augmentation d'une (ou de plusieurs) autre(s) protéine(s) dans le milieu de culture.

9.3 Protocole dynamique VII et incorporation de ^{35}S -méthionine

Le seul protocole dynamique ayant donné un effet marqué sur l'incorporation de ^3H -proline est le protocole dynamique VII. Ce protocole a été répété en changeant la ^3H -proline pour la ^{35}S -méthionine, afin de vérifier si cette inhibition est généralisée (la ^{35}S -méthionine n'est pas incorporée de façon préférentielle par le COLLI). Le résultat des comptes est présenté à la figure 9.5.

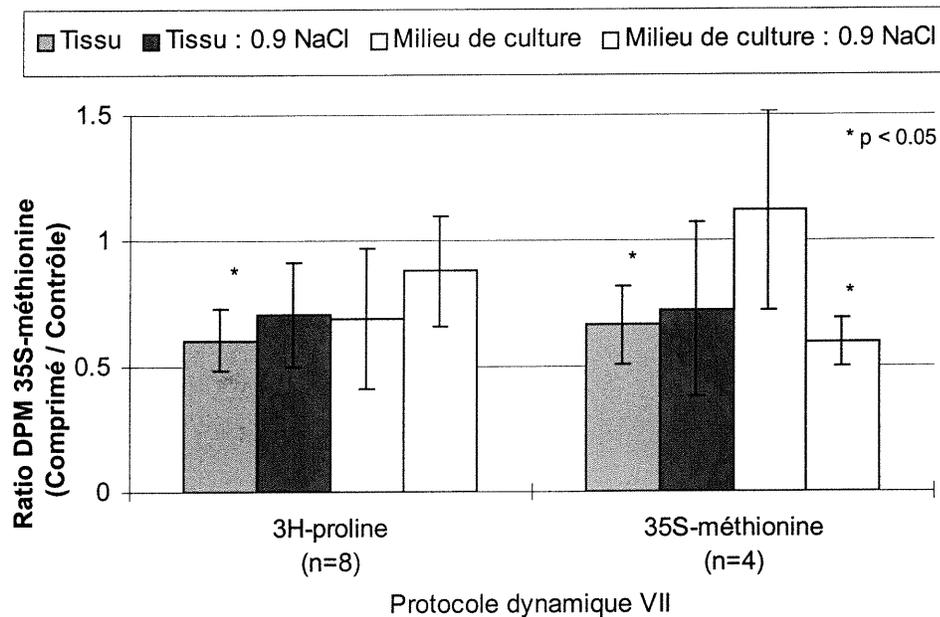


Figure 9.5 : Moyenne (et déviation standard) des ratios des comptes en scintillation (comprimé/contrôle) : ³H-proline vs ³⁵S-méthionine

Ce protocole semble induire une inhibition généralisée de la synthèse des protéines dans le tissu, d'après les résultats semblables pour les deux acides aminés. Cependant, cette inhibition n'est pas suggérée par les comptes totaux des milieux de culture de l'incorporation de ³⁵S-méthionine.

9.4 Compressions et GAG dans le milieu de compression

La concentration de chondroïtine sulfate dans le milieu de culture est facilement mesurable par l'essai DMMB (décrit dans Farndale R.W. et al., 1986). J'ai vérifié si la concentration de ce GAG dans le milieu de culture est influencée par les protocoles statique IV et dynamique VII (figure 9.6).

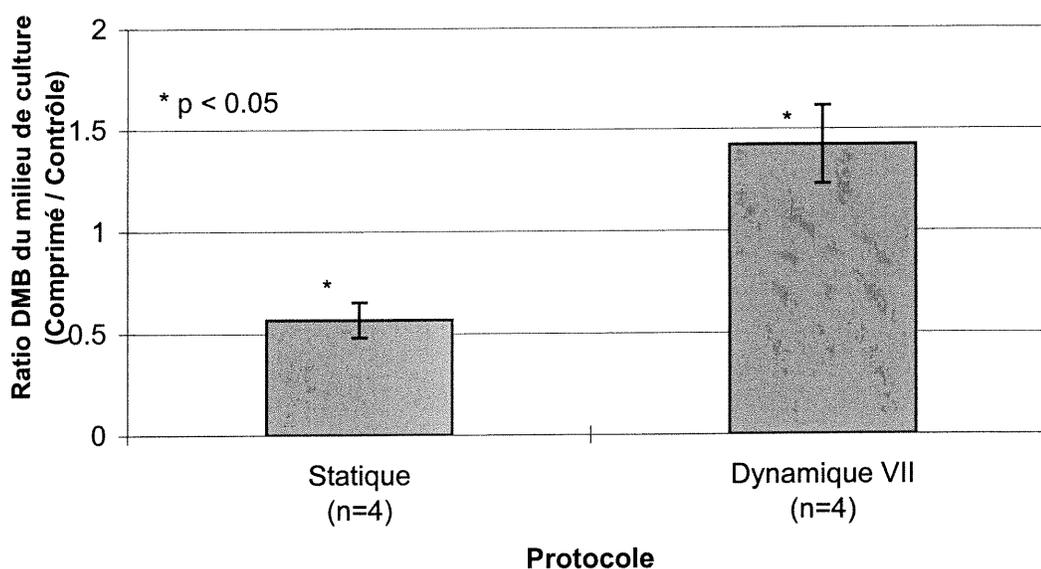


Figure 9.6 : Moyenne (et déviation standard) des ratios du contenu en chondroïtine sulfate dans les milieux de culture (comprimé/contrôle)

Des effets significatifs ont été induits par les deux protocoles. Le protocole statique IV a réduit presque de moitié le contenu en chondroïtine sulfate dans le milieu de culture, tandis que le protocole dynamique VII l'a presque augmenté de moitié.

9.5 Sommaire du chapitre

Il a été montré au chapitre 6 que le protocole statique IV augmente le contenu en CPII dans le centre du disque, et qu'il le diminue dans le milieu de culture. Ce même protocole a diminué l'incorporation de ^3H -proline en macromolécules (comptes totaux) dans le tissu, et en collagène type II (précipité 0.9M NaCl) dans le tissu et dans le milieu de culture. Cependant, cette diminution n'est pas observée pour les comptes totaux dans le milieu de culture ; il semble qu'une protéine (ou plusieurs protéines), autre que le collagène type II, y est augmentée. Aux chapitres 7 et 8, nous avons observé la présence d'une bande marquée de haut poids moléculaire (supérieur à 200 kDa) dans le milieu de culture ; il est bien possible que la compression statique

augmente la synthèse de cette protéine (ou de ce complexe glycoprotéique). Il est bon de noter que Wong M. et al. (1999) ont observé l'augmentation de la synthèse de fibronectine par la compression statique.

Il a été montré au chapitre 6 que les protocoles dynamiques IV et V augmentent le contenu en CPII du tissu et du milieu de culture. Un protocole semblable (dynamique VIII) n'a cependant montré aucune modulation de l'incorporation de ^3H -proline en macromolécules (comptes totaux) ou en collagène type II (précipité 0.9M NaCl), que ce soit dans le tissu ou dans le milieu de culture. La hausse de synthèse du collagène type II, proposée par les contenus mesurés de CPII, n'est pas confirmée par l'incorporation de ^3H -proline.

Le protocole dynamique VI utilise les paramètres optimaux pour augmenter la synthèse des protéines en général (spécifiquement la fibronectine et la COMP), selon Wong M. et al. (1999). L'incorporation de ^3H -proline en collagène type II (précipité 0.9M NaCl) ne semble pas avoir été influencée par ces compressions, tel que mesuré dans le tissu et dans le milieu de culture, en présence ou en absence de FBS. Cependant, les comptes totaux suggèrent que l'effet de ce type de compressions peut être dépendant de la présence de FBS : elles semblent induire une hausse de l'incorporation de ^3H -proline dans le tissu et dans le milieu de culture en absence de FBS, hausse qui n'a pas lieu en présence de FBS. Il faut tenir compte que les hausses observées (en absence de FBS) ont de très grands écarts type et ne sont pas significatives ; on ne peut donc tirer aucune conclusion sur la modulation de synthèse par ce protocole.

Le protocole dynamique VII est semblable au protocole dynamique III, qui a augmenté le contenu en CPII du tissu et du milieu de culture, et a un temps de montée supérieur aux autres protocoles dynamiques. Cette vitesse de montée permet de maximiser le gradient radial de pression relative du fluide et de déformation radiale. Ce protocole a clairement induit une baisse d'incorporation de ^3H -proline dans le tissu et dans le milieu de culture, tel que mesuré par les comptes totaux et les comptes des

précipités 0.9M NaCl. Cette baisse est semblable dans le centre et dans l'anneau périphérique du disque, et n'est pas influencée par l'ajout de β -APN dans le milieu de compression. L'effet de ces compressions est le même sur l'incorporation de ^{35}S -méthionine dans le tissu, proposant une inhibition pour les protéines en général. Cependant, l'incorporation de ^{35}S -méthionine en macromolécules du milieu de culture ne dévoile pas cette baisse de synthèse ; il y a peut-être une protéine sécrétée dont la synthèse est augmentée par ce protocole de compression.

Le protocole statique IV et le protocole dynamique VII induisent donc tous deux la baisse d'incorporation d'acides aminés radioactifs dans le tissu. Ces résultats suggèrent soit une diminution de synthèse, soit une diminution d'acides aminés disponibles aux cellules (baisse de diffusion ou changements au niveau de la compartimentation des pools précurseurs). Ces deux protocoles proposent toutefois l'augmentation de protéines nouvellement synthétisées, autre que le collagène type II, dans le milieu de culture. La modulation du contenu en chondroïtine sulfate dans le milieu de culture est différente pour les deux protocoles : le protocole statique IV l'a diminué tandis que le protocole dynamique VII l'a augmenté. Ces dernières modulations peuvent refléter des changements au niveau de la synthèse des protéoglycanes, ou tout simplement au niveau de leur diffusion (la compression statique peut diminuer le diamètre effectif des pores de la matrice et ainsi diminuer la diffusion libre, tandis que les compressions dynamiques peuvent causer l'exsudation du fluide, expulsant des protéoglycanes hors de la matrice) ; l'utilisation de ^{35}S -sulfate permettra de distinguer les deux phénomènes dans des expériences ultérieures.

NOTE : Le dosage de l'ARNm du COLLII et de l'aggrécane par protection de la ARNase (après extraction de l'ARNm selon l'essai multivalent , annexe V) n'a démontré aucune modulation significative par ces deux protocoles.

Il est bien possible que les modulations observées ne soient que le résultat de changements au niveau de la diffusion (acides aminés, nutriments, protéines et glycoprotéines sécrétées). Mais il se peut aussi qu'elles soient directement les

résultats de l'adaptation du cartilage articulaire, par mécanotransduction. Les trois prochains paragraphes ne sont que spéculatifs.

Hypothèses de mécanotransduction

Sous compression statique non confinée à déplacement axial contrôlé, la déformation axiale imposée à la MEC induit la déformation maintenue des cellules (diminution du rayon cellulaire dans la direction axiale, augmentation du rayon cellulaire dans les directions radiales et circonférentielles du disque) ainsi que des contraintes mécaniques dans l'environnement péricellulaire. Les chondrocytes répondent à ce changement d'environnement en diminuant la production de fibrilles de collagène et d'aggrégats de protéoglycanes. Cette baisse de formation de matrice (qui peut être accompagnée d'une augmentation de sa dégradation) réduit sa densité et sa rigidité, causant une diminution de la déformation cellulaire et des contraintes appliquées (pour un même déplacement axial du disque).

Sous compressions dynamiques non confinées au déplacement contrôlé, la pression hydrostatique engendrée peut atteindre des amplitudes dérangeantes pour les cellules. En diminuant la production de collagène, le réseau de fibrilles devient moins dense et moins rigide, permettant une expansion radiale accrue du gel de protéoglycanes. De cette façon, le volume de fluide qui doit être expulsé de la matrice lors de la compression est diminuée ; la pression hydrostatique est ainsi diminuée. En ajoutant à cette réponse une hausse de production des protéoglycanes, la matrice peut conserver une rigidité élevée.

Il est possible qu'il y ait aussi des réponses ayant pour but de rigidifier le chondron afin de réduire les contraintes subies par la cellule. Dans le même ordre d'idées, une réorganisation structurale du chondron peut permettre d'enrayer une déformation cellulaire maintenue. Ces adaptations au niveau du chondron nécessitent la hausse de synthèse de protéines spécifiques. Les modifications de l'architecture

péricellulaire présente toutefois un désavantage majeur : les stimulations mécaniques peuvent devenir moins perceptibles par les chondrocytes, diminuant la capacité d'adaptation du tissu.

Conclusion

Stimulations mécaniques

Le but principal de ce projet était de vérifier l'hypothèse que la synthèse du collagène type II peut être modulée, dans les explants de cartilage articulaire mature bovin, par des compressions mécaniques non confinées.

Les compressions statiques d'environ 25% de déformation axiale ont augmenté le contenu en CPII dans le centre des explants, et diminué ce contenu dans le milieu de culture. La hausse observée dans le tissu semble être causée par une baisse de diffusion vers le milieu de culture plutôt qu'une hausse de synthèse du collagène type II. Cette baisse de diffusion peut être induite par une diminution du diamètre effectif des pores de la matrice extracellulaire, ou par un autre phénomène de rétention ; par exemple, le CPII pourrait être réinternalisé par le biais d'une protéine membranaire afin de réguler, à la baisse, l'expression du gène des pro-chaînes α du collagène type II, tel qu'observé par Nakata K. et al. (1996).

Les compressions statiques ont d'ailleurs diminué l'incorporation de ^3H -proline en protéines nouvellement synthétisées, dont le collagène type II, dans le tissu. Cette baisse d'incorporation peut être la réponse des chondrocytes aux déformations et aux contraintes maintenues, mais peut aussi être le résultat de l'accessibilité réduite des acides aminés (causée par une baisse de diffusion), ou de la compartimentation des pools précurseurs de proline. Dans le milieu de culture, une baisse de collagène type II nouvellement synthétisé (compte en scintillation des précipités 0.9M en milieu acide) a aussi été observée, accompagnée d'une diminution du contenu en chondroïtine sulfate ; ces dernières réponses peuvent, encore une fois, être le résultat d'une réduction de la diffusion. Cependant, les comptes totaux des milieux de culture n'ont pas suivi cette tendance, et proposent l'augmentation de synthèse d'une protéine

autre que le collagène type II. D'après les autoradiogrammes obtenus des SDS-PAGE effectués dans les expériences préliminaires, une protéine marquée, de poids moléculaire d'environ 200 kDa, incorpore fortement la ^3H -proline ; il se pourrait bien que la synthèse de cette dernière soit augmentée par les compressions statiques.

Les compressions dynamiques, de déformation axiale maximale d'environ 25%, ont augmenté le contenu en CPII dans le tissu comme dans le milieu de culture. Cette hausse semble être préférentiellement localisée en périphérie du disque, et est peut-être influencée par l'activité de la lysyl oxidase (un effet couplé entre la lysyl oxidase et BMP-1 fait potentiellement partie d'un mécanisme de signalisation). Comme l'augmentation du contenu en CPII est observée dans le tissu et dans le milieu de culture, elle suggère la hausse du taux de synthèse du collagène type II. Par contre, l'incorporation de ^3H -proline par des compressions de déformation axiale semblable ne reflète pas cette hausse de synthèse proposée.

En fait, les compressions dynamiques à vitesse de montée rapide n'ont induit aucune modulation d'incorporation de ^3H -proline, ni dans le tissu, ni dans le milieu de culture. Les compressions dynamiques à vitesse de montée moyenne ont démontré une baisse d'incorporation de ^3H -proline et de ^{35}S -méthionine, proposant une diminution de synthèse généralisée des protéines. Cette dernière est reflétée dans le milieu de culture par les protéines ayant incorporée la ^3H -proline, et par les comptes de ^{35}S -méthionine du précipité 0.9M NaCl en milieu acide. Une fois de plus, ces modulations peuvent être causées par des changements au niveau de la diffusion et de la compartimentation des pools précurseurs d'acides aminés. Toutefois, les comptes totaux de ^{35}S -méthionine du milieu de culture ne démontrent pas de diminution causée par ces compressions, niant la baisse généralisée des protéines marquées. Contrairement au cas des compressions statiques, une augmentation du contenu en chondroïtine sulfate a été observée dans le milieu de culture de explants comprimés dynamiquement. Ce dernier résultat propose l'augmentation de synthèse des protéoglycanes, mais peut aussi être le fruit d'une expulsion causée par l'exsudation

du fluide ; l'utilisation ultérieure de ^{35}S -sulfate permettra de dissocier les deux phénomènes.

Étant donné que la hausse du contenu en CPII n'est pas appuyée par une hausse d'incorporation d'acides aminés radioactifs en molécules de collagène type II, l'hypothèse suivante est proposée : les compressions mécaniques détruisent certaines structures de la matrice extracellulaire et facilitent l'extraction à la chlorure de guanidine du CPII. Dans ce cas, la hausse de CPII mesurée ne démontrerait pas une hausse de synthèse du collagène type II.

Malgré les artefacts potentiels, les compressions mécaniques semblent avoir induit des changements métaboliques qui suggèrent des réponses adaptatives des chondrocytes, suite à des changements de leur environnement mécanique. Toutefois, les effets sur la synthèse du collagène type II ne sont pas encore clairs, et des expériences supplémentaires sont nécessaires à l'élaboration de conclusions solidement fondées.

FBS

Il est bon de noter que les compressions reliées aux mesures de CPII ont été effectuées en absence de FBS, tandis que celles reliées à l'incorporation d'acides aminés radioactifs ont été appliquées en présence de FBS. Nous avons observé que le FBS induit une hausse d'incorporation de la ^3H -proline et du contenu en CPII, démontrant une augmentation de la synthèse du collagène type II ; cette induction n'est toutefois pas accompagnée d'une modulation de son ARNm. Parallèlement, l'ARNm de l'aggrécane n'a pas été modulé par le FBS, mais a été augmenté par la mise en culture, tandis que l'ARNm de GAPDH a été diminué par la mise en culture en absence de FBS. Le FBS contient donc des composantes qui régulent la synthèse des protéines à différents niveaux, et est peut être important dans l'induction de réponses aux stimulations mécaniques. Ces résultats ont été obtenus après avoir

accompli les travaux en rapport avec le CPII, c'est pourquoi le FBS n'a pas été ajouté dans le milieu lors des compressions pour le dosage du CPII.

Facteurs physiques

Les tentatives de relier les modulations de synthèse du collagène type II à des facteurs physiques comportent certains obstacles.

Premièrement, le CPII semble diffuser facilement ; la localisation de sa hausse dans une région ne démontre pas nécessairement une hausse de synthèse par les chondrocytes de cette région. Pour contourner ce problème, la condition scorbutique fut proposée puisqu'elle diminue la diffusion du CPII vers le milieu de culture, probablement par rétention intracellulaire. Cependant, l'absence d'acide ascorbique ne diminue pas la quantité de CPII clivé dans le tissu, et induit l'augmentation d'une nouvelle bande sur les autoradiogrammes obtenus par SDS-PAGE après incorporation de ³H-proline ; les phénomènes de calcification et de différenciation sont peut-être reliés à ces observations. Cette bande peut correspondre à une forme de dégradation spécifique du procollagène type II sous-hydroxylé, ou à un autre type de collagène (collagène type XI par exemple). Une autre hypothèse de l'induction de cette bande est que la condition scorbutique induit la réexpression du procollagène type IIA. Ce dernier est assemblé dans la matrice sans subir le clivage de son NPII (Zhu Y. et al., 1999), qui possède un domaine riche en cystéines (absent du procollagène type IIB). La présence de ces cystéines suggère la présence de ponts disulfures supplémentaires, qui peuvent stabiliser la triple hélice et compenser pour l'instabilité induite par une sous-hydroxylation des prolines. Comme la condition scorbutique semble induire d'autres phénomènes qu'une simple rétention intracellulaire, une autre option a été proposée pour évaluer le taux de synthèse du collagène type II en évitant le problème de diffusion : l'étude de HSP47. Cette dernière agit comme chaperone spécifique des collagènes ; il a été proposé qu'elle corrèle avec le taux de synthèse des collagènes et qu'elle peut être augmentée sous conditions de stress (Nagata K., 1998). Comme

elle est intracellulaire, sa localisation contourne le problème de diffusion et peut ainsi nous indiquer quelles cellules réagissent aux compressions mécaniques. À ce jour, nous n'avons observé (par *Western Blot*) aucune modulation de HSP47 sous compressions, même si ces dernières avaient augmenté le contenu en CPII.

Un deuxième facteur rendant difficile toute corrélation entre les modulations biochimiques et les facteurs physiques est que les conditions expérimentales ne correspondent pas vraiment aux conditions supposées dans la modélisation. Par exemple, le modèle utilisé ne tient pas compte de la base osseuse des explants, qui limite l'expansion latérale. Il ne tient pas compte non plus des hétérogénéités liées à la profondeur (surface articulaire vs zone profonde) et à la proximité des cellules (chondron vs matrice interterritoriale), ni du comportement non linéaire de la rigidité des fibrilles de collagène. De plus, il est difficile de générer des explants ayant des surfaces parallèles ; la majorité ont des variations d'épaisseur supérieures à 10%. Les contraintes et les déformations prédominent donc en périphérie du disque, là où l'épaisseur est maximale, plutôt qu'en plein centre, tel que prédit par le modèle. Ces problèmes seront minimisés par l'élaboration de modèles numériques, qui permettent l'intégration des hétérogénéités et des phénomènes non linéaires, en combinaison avec le test de compression par indentation, qui applique la charge en plein centre de la surface articulaire du disque. Une prédiction plus juste des phénomènes physiques permettra de savoir quels sont ceux qui influencent réellement le métabolisme des chondrocytes.

Système d'explant

Certaines différences radiales ont été observées en rapport avec la synthèse du collagène type II dans notre système. Bien que le contenu en CPII est comparable dans le centre et dans l'anneau périphérique des explants (en absence de FBS), des résultats préliminaires démontrent clairement un contenu supérieur en HSP47 dans les cellules du centre. Inversement, l'incorporation de ^3H -proline est largement

supérieure dans l'anneau périphérique (en présence de FBS). De plus, des variations semblent être reliées au temps de culture, à la provenance des explants sur l'articulation, et à la jointure elle-même. Il faut donc être conscient que le contrôle de la synthèse du collagène type II est un phénomène complexe, et que son étude sous compressions mécaniques ne génère pas des résultats triviaux.

Le système d'explants bovins matures de cartilage/os utilisé dans ce projet peut être utilisé à d'autres fins que l'étude des stimulations mécaniques. Il permet entre autres de tester l'effet d'inhibiteurs, de médicaments, de différents facteurs, de vitamines, d'enzymes, de conditions de stress, etc., sur le métabolisme du cartilage mature. De plus, l'interface créée (la paroi du cylindre) à l'aide du poinçon peut simuler un défaut, et induire un processus de réparation par les chondrocytes de la périphérie de l'explant. En identifiant les protéines du milieu de culture qui ne sont pas présentes dans le tissu, on peut trouver des indices sur les mécanismes de tentative de régénération. Les protéines du milieu de culture peuvent toutefois être synthétisées par les chondrocytes près de la surface articulaire, plutôt que par celles à proximité du défaut. On peut différencier les deux processus par différentes configurations de culture : on peut enlever une couche de cartilage à la surface articulaire (elle devient donc une surface à défaut), on peut cultiver les explants dans des puits à fond plat avec la surface articulaire vers le bas (pour limiter les échanges entre le milieu de culture et les cellules de la surface articulaire), etc. Dans cet ordre d'idées, nous avons observé sur différents autoradiogrammes qu'une protéine du milieu de culture incorpore fortement la ^3H -proline (poids moléculaire de 200 kDa), alors qu'elle est à peine détectée dans le tissu. Son identification pourra nous éclairer sur différents aspects du comportement des chondrocytes.

Nouvelles directions de l'étude des stimulations mécaniques

Pour conclure sur l'étude des effets induits par les stimulations mécaniques, je présente les stratégies qui pourraient maximiser l'obtention de résultats intéressants.

Premièrement, l'utilisation de cartilage immature augmentera les possibilités d'obtenir des modulations ; la plupart des études publiées à ce jour sur la mécanotransduction ont été effectuées à l'aide de cartilage provenant de jeunes animaux. De plus, plusieurs études récentes démontrent que les hétérogénéités dues aux chargements mécaniques *in vivo* s'établissent pendant la croissance, et sont conservées à l'âge adulte.

Deuxièmement, l'utilisation d'un *phosphorimager* en combinaison avec l'incorporation de ^3H -proline permettra d'observer tous changements aux niveaux de la synthèse, des modifications post-traductionnelles et de l'assemblage du collagène type II, suite aux compressions mécaniques. Des modulations de synthèse des autres types de collagènes pourront aussi être étudiées ; des variations de ratio des différents types de collagène indiqueraient le contrôle de la composition des fibrilles par les chondrocytes, donc de leur diamètre.

Troisièmement, le marquage à la ^{35}S -méthionine suivi de l'analyse par gel bidimensionnel (point isoélectrique et poids moléculaire) permettra de détecter les changements de synthèse de toutes les protéines (détectables) en même temps, causés par les chargements mécaniques.

Quatrièmement, les études au niveau de la synthèse des protéines pourront être accompagnées de l'analyse des ARNm, afin de vérifier s'il y a contrôle au niveau transcriptionnel.

Cinquièmement, l'étude spécifique du chondron pourra nous indiquer comment les cellules adaptent l'architecture péricellulaire suite à des changements d'environnement mécanique.

Sixièmement, comme il a été mentionné précédemment dans ce chapitre, les compressions par indentation combinées à des modèles numériques sophistiqués

permettront de bien prédire les phénomènes physiques induits réellement lors des compressions. Les modifications ont déjà été effectuées sur *Quattro*, avec l'aide de Mathieu Charlebois, pour permettre le test d'indentation.

De façon générale, l'étude des voies de signalisation intracellulaires de mécanotransduction pourront aider la compréhension de phénomènes impliqués dans d'autres tissus, dans certaines pathologies, et dans la différenciation des cellules pendant la morphogenèse.

Je termine en soulignant la pertinence d'étudier en profondeur le cartilage articulaire, afin de mieux comprendre son fonctionnement normal ainsi que ses pathologies dégénératives. L'élaboration de différentes stratégies pour le régénérer permettra de soulager plusieurs milliers d'individus de notre société vieillissante, qui souffrent de façon chronique. Pour accélérer l'atteinte de ce but, les connaissances de tous les domaines de la science doivent être rassemblées. Par exemple, l'utilisation de l'intelligence artificielle pourrait nous aider à classer, à relier et à prédire les différents mécanismes reliés à ce système très complexe qu'est le cartilage articulaire.

Références

AKESON, W. H., S. L. WOO, D. AMIEL, R. D. COUTTS, AND D. DANIEL. 1973. The connective tissue response to immobility: biochemical changes in periarticular connective tissue of the immobilized rabbit knee. Clin Orthop 93: 356-62.

ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, AND J. D. WATSON. 1989. Adhérence cellulaire, jonctions cellulaires et matrice extracellulaire. Biologie moléculaire de la cellule New York: 791-837.

AROKOSKI, J., I. KIVIRANTA, J. JURVELIN, M. TAMMI, AND H. J. HELMINEN. 1993. Long-distance running causes site-dependent decrease of cartilage glycosaminoglycan content in the knee joints of beagle dogs. Arthritis Rheum 36: 1451-9.

AYDELOTTE, M. B. AND K. E. KUETTNER. 1995. Heterogeneity of cartilage chondrocytes and cartilage matrix. Joint Cartilage Degradation New York: 37-66.

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

BATEMAN, J. F., J. J. PILLOW, T. MASCARA, S. MEDVEDEC, J. A. RAMSHAW, AND W. G. COLE. 1987. Cell-layer-associated proteolytic cleavage of the telopeptides of type I collagen in fibroblast culture. Biochem J 245: 677-82.

BONASSAR, L. J., A. J. GRODZINSKY, A. SRINIVASAN, S. G. DAVILA, AND S. B. TRIPPEL. 2000. Mechanical and physicochemical regulation of the action of insulin-like growth factor-I on articular cartilage. Arch Biochem Biophys 379: 57-63.

BRAMA, P. A., J. M. TEKOPPELE, R. A. BANK, A. BARNEVELD, AND P. R. VAN WEEREN. Functional adaptation of equine articular cartilage: the formation of regional biochemical characteristics up to age one year. Equine Vet J 32[3], 217-21. 2000.

- BROWN, D. C. AND K. G. VOGEL. 1989. Characteristics of the in vitro interaction of a small proteoglycan (PG II) of bovine tendon with type I collagen. Matrix 9: 468-78.
- BRUCKNER, P. AND M. VAN DER REST. 1994. Structure and function of cartilage collagens. Microsc Res Tech 28: 378-84.
- BUCKWALTER, J. A. AND H. J. MANKIN. 1998. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. Instr Course Lect 47: 477-86.
- BULLEID, N. J., R. R. WILSON, AND U. LAD. 1998. A cautionary note when using pepsin as a probe for the formation of a collagen triple helix. Matrix Biol 17: 233-6.
- BURTON-WURSTER, N., M. VERNIER-SINGER, T. FARQUHAR, AND G. LUST. 1993. Effect of compressive loading and unloading on the synthesis of total protein, proteoglycan, and fibronectin by canine cartilage explants. J Orthop Res 11: 717-29.
- BUSCHMANN, M. D., Y. A. GLUZBAND, A. J. GRODZINSKY, AND E. B. HUNZIKER. 1995. Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture. J Cell Sci 108 (Pt 4): 1497-508.
- BUSCHMANN, M. D., E. B. HUNZIKER, Y. J. KIM, AND A. J. GRODZINSKY. 1996. Altered aggrecan synthesis correlates with cell and nucleus structure in statically compressed cartilage. J Cell Sci 109 (Pt 2): 499-508.
- BUSCHMANN, M. D., Y. J. KIM, M. WONG, E. FRANK, E. B. HUNZIKER, AND A. J. GRODZINSKY. 1999. Stimulation of aggrecan synthesis in cartilage explants by cyclic loading is localized to regions of high interstitial fluid flow. Arch Biochem Biophys 366: 1-7.
- BUSCHMANN, M. D., J. SOULHAT, A. SHIRAZI-ADL, J. S. JURVELIN, AND E. B. HUNZIKER. 1998. Confined compression of articular cartilage: linearity in ramp and sinusoidal tests and the importance of interdigitation and incomplete confinement. J Biomech 31: 171-8.

CHANO, T., M. TANAKA, S. HUKUDA, AND Y. SAEKI. 2000. Mechanical stress induces the expression of high molecular mass heat shock protein in human chondrocytic cell line CS-OKB. Osteoarthritis Cartilage 8: 115-9.

CHEN, C. T., N. BURTON-WURSTER, G. LUST, R. A. BANK, AND J. M. TEKOPPELE. 1999. Compositional and metabolic changes in damaged cartilage are peak- stress, stress-rate, and loading-duration dependent. J Orthop Res 17: 870-9.

CHIQUET, M. 1999. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. Matrix Biol 18: 417-26.

COSTELL, M., E. GUSTAFSSON, A. ASZODI, M. MORGELIN, W. BLOCH, E. HUNZIKER, K. ADDICKS, R. TIMPL, AND R. FASSLER. 1999. Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. J Cell Biol 147: 1109-22.

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

DONOHUE, J. M., D. BUSS, T. R. OEGEMA JR, AND R. C. THOMPSON JR. 1983. The effects of indirect blunt trauma on adult canine articular cartilage. J Bone Joint Surg [Am] 65: 948-57.

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

FARNDAL, R. W., D. J. BUTTLE, AND A. J. BARRETT. 1986. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. Biochim Biophys Acta 883: 173-7.

FERNANDES, R. J., T. M. SCHMID, M. A. HARKEY, AND D. R. EYRE. 1997. Incomplete processing of type II procollagen by a rat chondrosarcoma cell line. Eur J Biochem 247: 620-4.

FUJISAWA, T., T. HATTORI, K. TAKAHASHI, T. KUBOKI, A. YAMASHITA, AND M. TAKIGAWA. 1999. Cyclic mechanical stress induces extracellular matrix degradation in cultured chondrocytes via gene expression of matrix metalloproteinases and interleukin-1. J Biochem (Tokyo) 125: 966-75.

GADHER, S. J., D. R. EYRE, V. C. DUANCE, S. F. WOTTON, L. W. HECK, T. M. SCHMID, AND D. E. WOOLLEY. 1988. Susceptibility of cartilage collagens type II, IX, X, and XI to human synovial collagenase and neutrophil elastase. Eur J Biochem 175: 1-7.

GOMEZ, S., S. BERNSTORFF, M. ROMANELLO, H. AMENITSCH, M. RAPPOLT, R. RIZZO, AND F. VITTUR. 2000. Collagen fibrils are differently organized in weight-bearing and not- weight-bearing regions of pig articular cartilage. J Exp Zool 287: 346-52.

GRAY, M. L., A. M. PIZZANELLI, A. J. GRODZINSKY, AND R. C. LEE. 1988. Mechanical and physiochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. J Orthop Res 6: 777-92.

GRAY, M. L., A. M. PIZZANELLI, R. C. LEE, A. J. GRODZINSKY, AND D. A. SWANN. 1989. Kinetics of the chondrocyte biosynthetic response to compressive load and release. Biochim Biophys Acta 991: 415-25.

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

HASCALL, V. C., C. J. HANDLEY, D. J. MCQUILLAN, G. K. HASCALL, H. C. ROBINSON, AND D. A. LOWTHER. 1983. The effect of serum on biosynthesis of proteoglycans by bovine articular cartilage in culture. Arch Biochem Biophys 224: 206-23.

HATTORI, T., T. FUJISAWA, K. SASAKI, Y. YUTANI, T. NAKANISHI, K. TAKAHASHI, AND M. TAKIGAWA. Isolation and characterization of a rheumatoid arthritis-specific antigen (RA-A47) from a human chondrocytic cell line (HCS-2/8). Biochem Biophys Res Commun 245[3], 679-83. 1998.

HEDBOM, E. AND D. HEINEGARD. 1989. Interaction of a 59-kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. J Biol Chem 264: 6898-905.

HEINEGARD, D. AND A. OLDBERG. 1989. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. FASEB J 3: 2042-51.

HELSETH, D. L. JR AND A. VEIS. 1984. Cathepsin D-mediated processing of procollagen: lysosomal enzyme involvement in secretory processing of procollagen. Proc Natl Acad Sci U S A 81: 3302-6.

HINEK, A., A. REINER, AND A. R. POOLE. 1987. The calcification of cartilage matrix in chondrocyte culture: studies of the C-propeptide of type II collagen (chondrocalcin). J Cell Biol 104: 1435-41.

HIRATA, H., I. YAMAMURA, K. YASUDA, A. KOBAYASHI, N. TADA, M. SUZUKI, K. HIRAYOSHI, N. HOSOKAWA, AND K. NAGATA. Separate cis-acting DNA elements control cell type- and tissue-specific expression of collagen binding molecular chaperone HSP47. J Biol Chem 274[50], 35703-10. 1999.

HODGE, W. A., R. S. FIJAN, K. L. CARLSON, R. G. BURGESS, W. H. HARRIS, AND R. W. MANN. 1986. Contact pressures in the human hip joint measured in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 83: 2879-83.

HUNG, C. T., D. R. HENSHAW, C. C. WANG, R. L. MAUCK, F. RAIA, G. PALMER, P. H. CHAO, V. C. MOW, A. RATCLIFFE, AND W. B. VALHMU. 2000. Mitogen-activated protein kinase signaling in bovine articular chondrocytes in response to fluid flow does not require calcium mobilization. J Biomech 33: 73-80.

ISHIGURO, N., T. ITO, H. ITO, H. IWATA, H. JUGESSUR, M. IONESCU, AND A. R. POOLE. 1999. Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover: analyses of synovial fluid from patients with osteoarthritis. Arthritis Rheum 42: 129-36.

JONES, I. L., A. KLAMFELDT, AND T. SANDSTROM. 1982. The effect of continuous mechanical pressure upon the turnover of articular cartilage proteoglycans in vitro. Clin Orthop 283-9.

JORTIKKA, M. O., J. J. PARKKINEN, R. I. INKINEN, J. KARNER, H. T. JARVELAINEN, L. O. NELIMARKKA, M. I. TAMMI, AND M. J. LAMMI. 2000. The role of microtubules in the regulation of proteoglycan synthesis in chondrocytes under hydrostatic pressure. Arch Biochem Biophys 374: 172-80.

JURVELIN, J., I. KIVIRANTA, A. M. SAAMANEN, M. TAMMI, AND H. J. HELMINEN. 1990. Indentation stiffness of young canine knee articular cartilage--influence of strenuous joint loading. J Biomech 23: 1239-46.

KAMBE, K., A. YAMAMOTO, T. YOSHIMORI, K. HIRAYOSHI, R. OGAWA, AND Y. TASHIRO. Preferential localization of heat shock protein 47 in dilated endoplasmic reticulum of chicken chondrocytes. J Histochem Cytochem 42[7], 833-41. 1994.

KESSLER, E. AND R. ADAR. 1989. Type I procollagen C-proteinase from mouse fibroblasts. Purification and demonstration of a 55-kDa enhancer glycoprotein. Eur J Biochem 186: 115-21.

KIM, Y. J., A. J. GRODZINSKY, AND A. H. PLAAS. 1996. Compression of cartilage results in differential effects on biosynthetic pathways for aggrecan, link protein, and hyaluronan. Arch Biochem Biophys 328: 331-40.

KIM, Y. J., R. L. SAH, A. J. GRODZINSKY, A. H. PLAAS, AND J. D. SANDY. 1994. Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior: physical stimuli. Arch Biochem Biophys 311: 1-12.

KIRALY, K., M. M. HYTTINEN, J. J. PARKKINEN, J. A. AROKOSKI, T. LAPVETELAINEN, K. TORRONEN, I. KIVIRANTA, AND H. J. HELMINEN. 1998. Articular cartilage collagen birefringence is altered concurrent with changes in proteoglycan synthesis during dynamic in vitro loading. Anat Rec 251: 28-36.

KIVIRANTA, I., J. JURVELIN, M. TAMMI, A. M. SAAMANEN, AND H. J. HELMINEN. 1987. Weight bearing controls glycosaminoglycan concentration and articular cartilage thickness in the knee joints of young beagle dogs. Arthritis Rheum 30: 801-9.

KIVIRANTA, I., M. TAMMI, J. JURVELIN, A. M. SAAMANEN, AND H. J. HELMINEN. 1988. Moderate running exercise augments glycosaminoglycans and thickness of articular cartilage in the knee joint of young beagle dogs. J Orthop Res 6: 188-95.

KIVIRIKKO, K. I. AND T. PIHLAJANIEMI. 1998. Collagen hydroxylases and the protein disulfide isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 72: 325-98.

KOBAYASHI, T., Y. YOSHIHARA, A. SAMURA, H. YAMADA, M. SHINMEI, H. ROOS, AND L. S. LOHMANDER. 1997. Synovial fluid concentrations of the C-propeptide of type II collagen correlate with body mass index in primary knee osteoarthritis. Ann Rheum Dis 56: 500-3.

KORVER, T. H., R. J. VAN DE STADT, E. KILJAN, G. P. VAN KAMPEN, AND J. K. VAN DER KORST. 1992. Effects of loading on the synthesis of proteoglycans in different layers of anatomically intact articular cartilage in vitro. J Rheumatol 19: 905-12.

KUBOKI, T., T. HATTORI, T. MIZUSHIMA, M. KANYAMA, T. FUJISAWA, A. YAMASHITA, AND M. TAKIGAWA. Detection of specific antibodies against human cultured chondrosarcoma (HCS-2/8) and osteosarcoma (Saos-2) cells in the serum of patients with osteoarthritis of the temporomandibular joint. Arch Oral Biol 44[5], 403-14. 1999.

LARSSON, T., R. M. ASPDEN, AND D. HEINEGARD. 1991. Effects of mechanical load on cartilage matrix biosynthesis in vitro. Matrix 11: 388-94.

LEE, D. A., T. NOGUCHI, S. P. FREAN, P. LEES, AND D. L. BADER. 2000. The influence of mechanical loading on isolated chondrocytes seeded in agarose constructs. Biorheology 37: 149-61.

LEE, E. R., C. E. SMITH, AND R. POOLE. 1996. Ultrastructural localization of the C-propeptide released from type II procollagen in fetal bovine growth plate cartilage. J Histochem Cytochem 44: 433-43.

LEFKOE, T. P., A. M. NALIN, J. M. CLARK, R. A. REIFE, J. SUGAI, AND L. J. SANDELL. 1997. Gene expression of collagen types IIA and IX correlates with ultrastructural events in early osteoarthrosis: new applications of the rabbit meniscectomy model. J Rheumatol 24: 1155-63.

LEROUX, M. A., J. AROKOSKI, T. P. VAIL, F. GUILAK, M. M. HYTTINEN, I. KIVIRANTA, AND L. A. SETTON. 2000. Simultaneous changes in the mechanical properties, quantitative collagen organization, and proteoglycan concentration of articular cartilage following canine meniscectomy. J Orthop Res 18: 383-92.

LINSENMEYER, T. F. 1991. Collagen. Cell Biology of Extracellular Matrix New York: 7-44.

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

LITTLE, C. B., P. GHOSH, AND C. R. BELLENGER. 1996. Topographic variation in biglycan and decorin synthesis by articular cartilage in the early stages of osteoarthritis: an experimental study in sheep. J Orthop Res 14: 433-44.

LOW, R. B., J. N. HILDEBRAN, P. M. ABSHER, W. S. STIREWALT, AND J. ARNOLD. 1986. Comparison of the use of isotopic proline vs leucine to measure protein synthesis in cultured fibroblasts. Connect Tissue Res 14: 179-85.

MAROUDAS, A., D. RIGLER, AND R. SCHNEIDERMAN. 1999. Young and aged cartilage differ in their response to dynamic compression as far as the rate of glycosaminoglycan synthesis is concerned. Transactions Orthopaedic Research Society 24: 170.

MASUDA, H., N. HOSOKAWA, AND K. NAGATA. Expression and localization of collagen-binding stress protein Hsp47 in mouse embryo development: comparison with types I and II collagen. Cell Stress Chaperones 3[4], 256-64. 1998.

MATSUI, Y., K. NAKATA, E. ADACHI, T. KIMURA, N. TSUMAKI, N. YASUI, E. KATAOKA, Y. FUJITA, Y. YAMADA, AND T. OCHI. 2000. The type II collagen c-propeptide : in vivo functional analysis using transgenic mice. Transactions Orthopaedic Research Society 25: 110.

MAYNE, R. AND BREWTON R.G. 1995. Extracellular matrix of cartilage : Collagen. Joint Cartilage Degradation New York: 81-109.

MCLAUGHLIN, S. H. AND N. J. BULLEID. 1998. Molecular recognition in procollagen chain assembly. Matrix Biol 16: 369-77.

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

MILLWARD-SADLER, S. J., M. O. WRIGHT, H. LEE, H. CALDWELL, G. NUKI, AND D. M. SALTER. 2000. Altered electrophysiological responses to mechanical stimulation and abnormal signalling through $\alpha 5 \beta 1$ integrin in chondrocytes from osteoarthritic cartilage. Osteoarthritis Cartilage 8: 272-8.

MIOSGE, N., K. FLACHSBART, W. GOETZ, W. SCHULTZ, H. KRESSE, AND R. HERKEN. 1994. Light and electron microscopical immunohistochemical localization of the small proteoglycan core proteins decorin and biglycan in human knee joint cartilage. Histochem J 26: 939-45.

MIYAISHI, O., K. SAKATA, M. MATSUYAMA, AND S. SAGA. Distribution of the collagen binding heat-shock protein in chicken tissues. J Histochem Cytochem 40[7], 1021-9. 1992.

MOULD, A. P., D. J. HULMES, D. F. HOLMES, C. CUMMINGS, C. H. SEAR, AND J. A. CHAPMAN. 1990. D-periodic assemblies of type I procollagen. J Mol Biol 211: 581-94.

MULLER, F. J., L. A. SETTON, D. H. MANICOURT, V. C. MOW, D. S. HOWELL, AND J. C. PITA. Centrifugal and biochemical comparison of proteoglycan aggregates from articular cartilage in experimental joint disuse and joint instability. J Orthop Res 12[4], 498-508. 1994.

NAGATA, K. Expression and function of heat shock protein 47: a collagen-specific molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. Matrix Biol 16[7], 379-86. 1998.

NAKATA, K., S. MIYAMOTO, S. BERNIER, M. TANAKA, A. UTANI, P. KREBSBACH, C. RHODES, AND Y. YAMADA. 1996. The c-propeptide of type II procollagen binds to the enhancer region of the type II procollagen gene and regulates its transcription. Ann N Y Acad Sci 785: 307-8.

NATSUME, T., T. KOIDE, S. YOKOTA, K. HIRAYOSHI, AND K. NAGATA. Interactions between collagen-binding stress protein HSP47 and collagen. Analysis of kinetic parameters by surface plasmon resonance biosensor. J Biol Chem 269[49], 31224-8. 1994.

NELSON, F., L. DAHLBERG, S. LAVERTY, A. REINER, I. PIDOUX, M. IONESCU, G. L. FRASER, E. BROOKS, M. TANZER, L. C. ROSENBERG, P. DIEPPE, AND A. ROBIN POOLE. 1998. Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. J Clin Invest 102: 2115-25.

OLAH, E. H. AND K. S. KOSTENSZKY. 1972. Effect of altered functional demand on the glycosaminoglycan content of the articular cartilage of dogs. Acta Biol 23: 195-200.

PALMOSKI, M., E. PERRICONE, AND K. D. BRANDT. 1979. Development and reversal of a proteoglycan aggregation defect in normal canine knee cartilage after immobilization. Arthritis Rheum 22: 508-17.

PALMOSKI, M. J. AND K. D. BRANDT. 1984. Effects of static and cyclic compressive loading on articular cartilage plugs in vitro. Arthritis Rheum 27: 675-81.

PARKKINEN, J. J., J. IKONEN, M. J. LAMMI, J. LAAKKONEN, M. TAMMI, AND H. J. HELMINEN. 1993. Effects of cyclic hydrostatic pressure on proteoglycan synthesis in cultured chondrocytes and articular cartilage explants. Arch Biochem Biophys 300: 458-65.

PARKKINEN, J. J., M. J. LAMMI, H. J. HELMINEN, AND M. TAMMI. 1992. Local stimulation of proteoglycan synthesis in articular cartilage explants by dynamic compression in vitro. J Orthop Res 10: 610-20.

PICKVANCE, E. A., T. R. OEGEMA JR, AND R. C. THOMPSON JR. 1993. Immunolocalization of selected cytokines and proteases in canine articular cartilage after transarticular loading. J Orthop Res 11: 313-23.

POOLE, A. R., I. PIDOUX, A. REINER, H. CHOI, AND L. C. ROSENBERG. 1984. The association of a newly discovered protein, called chondrocalcin, with cartilage calcification. Acta Biol Hung 35: 143-9.

POOLE, A. R., I. PIDOUX, A. REINER, H. CHOI, AND L. C. ROSENBERG. 1984. Association of an extracellular protein (chondrocalcin) with the calcification of cartilage in endochondral bone formation. J Cell Biol 98: 54-65.

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

POOLE, C. A., H. C. REILLY, AND M. H. FLINT. 1982. The adverse effects of HEPES, TES, and BES zwitterion buffers on the ultrastructure of cultured chick embryo epiphyseal chondrocytes. In Vitro 18: 755-65.

PRATT, W. B. 1998. The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. Proc Soc Exp Biol Med 217: 420-34.

PROCKOP, D. J., A. L. SIERON, AND S. W. LI. 1998. Procollagen N-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that are essential for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling. Matrix Biol 16: 399-408.

RADIN, E. L., D. B. BURR, B. CATERSON, D. FYHRIE, T. D. BROWN, AND R. D. BOYD. 1991. Mechanical determinants of osteoarthritis. Semin Arthritis Rheum 21: 12-21.

RADIN, E. L., R. B. MARTIN, D. B. BURR, B. CATERSON, R. D. BOYD, AND C. GOODWIN. 1984. Effects of mechanical loading on the tissues of the rabbit knee. J Orthop Res 2: 221-34.

RAGAN, P. M., A. M. BADGER, M. COOK, V. I. CHIN, M. GOWEN, A. J. GRODZINSKY, AND M. W. LARK. 1999. Down-regulation of chondrocyte aggrecan and type-II collagen gene expression correlates with increases in static compression magnitude and duration. J Orthop Res 17: 836-42.

ROMANO, P. R., J. WANG, R. J. O'KEEFE, J. E. PUZAS, R. N. ROSIER, AND P. R. REYNOLDS. HiPER1, a phosphatase of the endoplasmic reticulum with a role in chondrocyte maturation. J Cell Sci 111 [Pt 6], 803-13. 1998.

RONZIERE, M. C., J. FARJANEL, A. M. FREYRIA, D. J. HARTMANN, AND D. HERBAGE. 1997. Analysis of types I, II, III, IX and XI collagens synthesized by fetal bovine chondrocytes in high-density culture. Osteoarthritis Cartilage 5: 205-14.

SAH, R. L., Y. J. KIM, J. Y. DOONG, A. J. GRODZINSKY, A. H. PLAAS, AND J. D. SANDY. 1989. Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression. J Orthop Res 7: 619-36.

SALTER, R. B., D. F. SIMMONDS, B. W. MALCOLM, E. J. RUMBLE, D. MACMICHAEL, AND N. D. CLEMENTS. 1980. The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage. An experimental investigation in the rabbit. J Bone Joint Surg [Am] 62: 1232-51.

SANDBERG, M. AND E. VUORIO. 1987. Localization of types I, II, and III collagen mRNAs in developing human skeletal tissues by in situ hybridization. J Cell Biol 104: 1077-84.

SCHNEIDERMAN, R., D. KERET, AND A. MAROUDAS. 1986. Effects of mechanical and osmotic pressure on the rate of glycosaminoglycan synthesis in the human adult femoral head cartilage: an in vitro study. J Orthop Res 4: 393-408.

SHINMEI, M., K. ITO, S. MATSUYAMA, Y. YOSHIHARA, AND K. MATSUZAWA. 1993. Joint fluid carboxy-terminal type II procollagen peptide as a marker of cartilage collagen biosynthesis. Osteoarthritis Cartilage 1: 121-8.

SLOWMAN, S. D. AND K. D. BRANDT. 1986. Composition and glycosaminoglycan metabolism of articular cartilage from habitually loaded and habitually unloaded sites. Arthritis Rheum 29: 88-94.

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

SMITH, R. L., J. LIN, M. C. TRINDADE, J. SHIDA, G. KAJIYAMA, T. VU, A. R. HOFFMAN, M. C. VAN DER MEULEN, S. B. GOODMAN, D. J. SCHURMAN, AND D. R. CARTER. 2000. Time-dependent effects of intermittent hydrostatic pressure on articular chondrocyte type II collagen and aggrecan mRNA expression. J Rehabil Res Dev 37: 153-61.

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

STEINMEYER, J. AND B. ACKERMANN. 1999. The effect of continuously applied cyclic mechanical loading on the fibronectin metabolism of articular cartilage explants. Res Exp Med (Berl) 198: 247-60.

STEINMEYER, J., B. ACKERMANN, AND R. X. RAISS. 1997. Intermittent cyclic loading of cartilage explants modulates fibronectin metabolism. Osteoarthritis Cartilage 5: 331-41.

STEINMEYER, J. AND S. KNUE. 1997. The proteoglycan metabolism of mature bovine articular cartilage explants superimposed to continuously applied cyclic mechanical loading. Biochem Biophys Res Commun 240: 216-21.

SULLIVAN, T. A., B. USCHMANN, R. HOUGH, AND P. S. LEBOY. 1994. Ascorbate modulation of chondrocyte gene expression is independent of its role in collagen secretion. J Biol Chem 269: 22500-6.

TAKAHASHI, K., T. KUBO, R. S. GOOMER, D. AMIEL, K. KOBAYASHI, J. IMANISHI, R. TESHIMA, AND Y. HIRASAWA. Analysis of heat shock proteins and cytokines expressed during early stages of osteoarthritis in a mouse model. Osteoarthritis Cartilage 5[5], 321-9. 1997.

THOMPSON, R. C. JR, T. R. OEGEMA JR, J. L. LEWIS, AND L. WALLACE. Osteoarthrotic changes after acute transarticular load. An animal model. J Bone Joint Surg [Am] 73[7], 990-1001. 1991.

TORZILLI, P. A., R. GRIGIENE, C. HUANG, S. M. FRIEDMAN, S. B. DOTY, A. L. BOSKEY, AND G. LUST. 1997. Characterization of cartilage metabolic response to static and dynamic stress using a mechanical explant test system. J Biomech 30: 1-9.

URBAN, J. P. AND M. T. BAYLISS. 1989. Regulation of proteoglycan synthesis rate in cartilage in vitro: influence of extracellular ionic composition. Biochim Biophys Acta 992: 59-65.

VALHMU, W. B., E. J. STAZZONE, N. M. BACHRACH, F. SAED-NEJAD, S. G. FISCHER, V. C. MOW, AND A. RATCLIFFE. 1998. Load-controlled compression of articular cartilage induces a transient stimulation of aggrecan gene expression. Arch Biochem Biophys 353: 29-36.

VAN DER KRAAN, P. M., E. L. VITTERS, T. H. MEIJERS, A. R. POOLE, AND W. B. VAN DEN BERG. 1998. Collagen type I antisense and collagen type IIA messenger RNA is expressed in adult murine articular cartilage. Osteoarthritis Cartilage 6: 417-26.

VAN DER REST, M., L. C. ROSENBERG, B. R. OLSEN, AND A. R. POOLE. 1986. Chondrocalcin is identical with the C-propeptide of type II procollagen. Biochem J 237: 923-5.

VISSER, N. A., M. H. DE KONING, M. J. LAMMI, T. HAKKINEN, M. TAMMI, AND G. P. VAN KAMPEN. Increase of decorin content in articular cartilage following running. Connect Tissue Res 37[3-4], 295-302. 1998.

VISSER, N. A., G. P. VANKAMPEN, M. H. DEKONING, AND J. K. VANDERKORST. 1994. The effects of loading on the synthesis of biglycan and decorin in intact mature articular cartilage in vitro. Connect Tissue Res 30: 241-50.

VISSER, N. A., G. P. VANKAMPEN, M. H. DEKONING, AND J. K. VANDERKORST. 1994. Mechanical loading affects the synthesis of decorin and biglycan in intact immature articular cartilage in vitro. Int J Tissue React 16: 195-203.

WILSON, R., J. F. LEES, AND N. J. BULLEID. 1998. Protein disulfide isomerase acts as a molecular chaperone during the assembly of procollagen. J Biol Chem 273: 9637-43.

WONG, M., M. SIEGRIST, AND X. CAO. 1999. Cyclic compression of articular cartilage explants is associated with progressive consolidation and altered expression pattern of extracellular matrix proteins. Matrix Biol 18: 391-9.

WU, J. J., M. W. LARK, L. E. CHUN, AND D. R. EYRE. 1991. Sites of stromelysin cleavage in collagen types II, IX, X, and XI of cartilage. J Biol Chem 266: 5625-8.

WU, Q. Q. AND Q. CHEN. 2000. Mechanoregulation of chondrocyte proliferation, maturation, and hypertrophy: ion-channel dependent transduction of matrix deformation signals. Exp Cell Res 256: 383-91.

XU, Z., M. J. BUCKLEY, C. H. EVANS, AND S. AGARWAL. 2000. Cyclic tensile strain acts as an antagonist of IL-1 beta actions in chondrocytes. J Immunol 165: 453-60.

YOUNG, R. D., P. A. LAWRENCE, V. C. DUANCE, T. AIGNER, AND P. MONAGHAN. 2000. Immunolocalization of collagen types II and III in single fibrils of human articular cartilage. J Histochem Cytochem 48: 423-32.

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

Annexe I : Exemple de calcul du poids moléculaire d'une protéine à partir de la séquence en acides aminés, à l'aide du logiciel *Mathematica*

```
(* Lecture des "packages" contenant les fonctions nécessaires *)

<< Statistics`DataManipulation`;
<< Graphics`Graphics`;

(* Lecture de la séquence en acides aminés *)
(* NOTE : Le fichier lu doit ne doit contenir aucun espace entre les différentes
lettres de la séquence *)

listecoll = Characters[ToString[Read["U:\\alpha1type9.cgi"]]];

(* Détermination de la fréquence de chaque acide aminé et représentation graphique *)

freq = Frequencies[listecoll];
BarChart[freq, PlotRange -> All]

(* Attribution du poids moléculaire de chaque résidu *)

amacletter = Array[letter, 20];
letter[1] = "G"; letter[2] = "A"; letter[3] = "V"; letter[4] = "L"; letter[5] = "I";
letter[6] = "M"; letter[7] = "P"; letter[8] = "F"; letter[9] = "W"; letter[10] = "S";
letter[11] = "T"; letter[12] = "N"; letter[13] = "Q"; letter[14] = "Y"; letter[15] = "C";
letter[16] = "K"; letter[17] = "R"; letter[18] = "H"; letter[19] = "D"; letter[20] = "E";

amacmass = Array[aamass, 20];
aamass[1] = 57; aamass[2] = 71.1; aamass[3] = 99.1; aamass[4] = 113.2; aamass[5] = 113.2;
aamass[6] = 131.2; aamass[7] = 97.1; aamass[8] = 147.2; aamass[9] = 186.2; aamass[10] = 87.1;
aamass[11] = 101.1; aamass[12] = 114.1; aamass[13] = 128.1; aamass[14] = 163.2;
aamass[15] = 103.1; aamass[16] = 128.2; aamass[17] = 156.2; aamass[18] = 137.1; aamass[19] = 115.1;
aamass[20] = 129.1;

(* Calcul du poids moléculaire total de la protéine*)

masstotal = 0;
For[i = 1, i < 21, i++,
  mass[i] = Count[listecoll, letter[i]] * (aamass[i]);
  masstotal = masstotal + mass[i];
];
Print[masstotal / 1000 " kDa"]
```

Annexe II : Dessin d'assemblage de *Quattro*

NO.	DESCRIPTION	QTE	DESSIN
A	BASE		
B	FOND 8 PUIITS	1	1
C	COUVERCLE	1	2
D	TIGE	4	3
E	SUPPORT	1	4
F	RONDELLE	4	5
G	MICROMETRE		
H	EXPLANT		

ÉCOLE POLYTECHNIQUE montréal	titre: QUATTRO dessiné par: N. TRAN-KHANH
	date: 25/07/97 échelle: ASSEMBLAGE

**Annexe III : Expressions du modèle composite biphasique dans le
domaine de Laplace (Soulhat J. et al., 1999)**

$\sigma_a(s) = \frac{\bar{\sigma}_a(s)}{E_{33}}; u(s) = \frac{\bar{u}(s)}{r_0}; p(s) = \frac{\bar{p}(s)(1+\alpha)}{E_{33}};$ $v_r(s) = \frac{\bar{v}_r(s)r_0}{k(1+\alpha)E_{33}}; r = \frac{\bar{r}}{r_0}; s = \frac{\bar{s}}{s_0}; s_0 = \frac{kS_{11}}{r_0^2};$ <p style="text-align: right;">Eq a</p>	$A = \frac{(2\nu_m - 1)(1 + R + R\nu_m)}{R\nu_m + \nu_m - R - 1 + 2R\nu_m^2}; C = A + 2(B - 1);$ $B = \frac{(-1 - R + R\nu_m + 2R\nu_m^2)(3 + R + R\nu_m)}{2(-1 - \nu_m - R + R\nu_m^2)}; R = \frac{E_f}{E_m}$ <p style="text-align: right;">Eq b</p>
$\frac{\sigma_a(s)}{\bar{\varepsilon}_z(s)} = \frac{BI_0(\sqrt{s}) - C \frac{I_1(\sqrt{s})}{\sqrt{s}}}{I_0(\sqrt{s}) - A \frac{I_1(\sqrt{s})}{\sqrt{s}}}$ <p style="text-align: right;">Eq c</p>	$\frac{u(s)}{\bar{\varepsilon}_z(s)} = -\frac{1}{2}r \left[1 - \frac{\frac{I_1(r\sqrt{s})}{r\sqrt{s}}}{\frac{1}{A}I_0(\sqrt{s}) - \frac{I_1(\sqrt{s})}{\sqrt{s}}} \right]$ <p style="text-align: right;">Eq d</p>
$\frac{\bar{\varepsilon}_r(s)}{\bar{\varepsilon}_z(s)} = -\frac{1}{2} \left[1 - \frac{I_0(r\sqrt{s}) - \frac{I_1(r\sqrt{s})}{r\sqrt{s}}}{\frac{1}{A}I_0(\sqrt{s}) - \frac{I_1(\sqrt{s})}{\sqrt{s}}} \right]$ <p style="text-align: right;">Eq e</p>	$\frac{\bar{\varepsilon}_\theta(s)}{\bar{\varepsilon}_z(s)} = -\frac{1}{2} \left[1 - \frac{\frac{I_1(r\sqrt{s})}{r\sqrt{s}}}{\frac{1}{A}I_0(\sqrt{s}) - \frac{I_1(\sqrt{s})}{\sqrt{s}}} \right]$ <p style="text-align: right;">Eq f</p>
$\frac{p(s)}{\bar{\varepsilon}_z(s)} = \frac{S_{11}}{2E_{33}} \left[\frac{I_0(r\sqrt{s}) - I_0(\sqrt{s})}{\frac{1}{A}I_0(\sqrt{s}) - \frac{I_1(\sqrt{s})}{\sqrt{s}}} \right]$ <p style="text-align: right;">Eq g</p>	$\frac{v_r(s)}{\bar{\varepsilon}_z(s)} = -\frac{S_{11}}{2E_{33}} \left[\frac{\sqrt{s}I_1(r\sqrt{s})}{\frac{1}{A}I_0(\sqrt{s}) - \frac{I_1(\sqrt{s})}{\sqrt{s}}} \right]$ <p style="text-align: right;">Eq h</p>

Table 2.1: Composite model expressions in the Laplace domain. Dimensional quantities have overbars. s is the Laplace variable, r the radial position in the disk, r_0 the peripheral disk radius, and α the solid to fluid volume fraction (solid-volume/fluid-volume). $\bar{\varepsilon}_z(s)$ is the Laplace transform of the surface-to-surface axial deformation (change-in-thickness/original-thickness vs. time). The average surface stress $\bar{\sigma}_a(s)$, the radial displacement $\bar{u}(s)$, the fluid pressure $\bar{p}(s)$, and the relative fluid velocity $\bar{v}_r(s)$ are normalized to E_{33} , r_0 , $\frac{E_{33}}{(1+\alpha)}$, $\frac{k(1+\alpha)E_{33}}{r_0}$ respectively. Radial and circumferential strains, $\bar{\varepsilon}_r(s)$ and $\bar{\varepsilon}_\theta(s)$, are also shown. I_m is the modified Bessel function of order m .

Annexe IV : Protocole du RIA de CII

CII Radioimmunoassay (Jean Dumont)

Background Information

The collagens of fibrillar type are secreted as higher molecular weight promolecules by chondrocytes. The procollagen molecule contains peptides located at its N and C terminal ends, which will subsequently be cleaved by specific proteolytic activity when the triple helix collagen fibril is excreted to the extracellular matrix. The C and N-propeptides assist in the formation of the triple helix in the endoplasmic reticulum while the proline residues of the collagen molecule are being hydroxylated. The C-propeptide (CII) is composed of three identical 35 KDa subunits. Since CII has a relatively short half-life (~ 15 hrs) it is possible to use it as a marker of collagen type II rate of synthesis.

The evaluation of CII content is accomplished by performing a **solution phase inhibition assay** in which the binding of a rabbit antibody to radiolabeled CII is competed for by known amounts of unlabeled CII (standard curve) or an unknown amount of CII (to be assayed). A known amount of labelled CII is then added to the tubes so as to form a complex with the remaining free antibody. This complex is separated from the free labelled antigen by precipitation after addition of protein-A. Protein-A is synthesized by staphylococcal bacteria and binds very strongly to the heavy chain of globulin type antibodies (IgG). This protein is present on the capsule of the bacteria, and may be used in the form of a killed *S. aureus* suspension, allowing for the easy recovery of antibody-protein-A complex after centrifugation. The labelled CII in the pellet can then be detected by means of gamma radiation measurements.

As a first step, the samples and the known amounts of CII (standards) are incubated with the specific monoclonal rabbit antibody directed against CII. The dilution of the antibody is adjusted so that in absence of any antigen in the inhibition phase, all the available antibody will bind 50% of the labelled CII (to be added after the first incubation). Therefore, the more antigen there is present during the inhibition phase, the less antibody will be available to bind the labelled CII. Since it is the labelled CII which is detected, low gamma counts will be interpreted as high assayed CII content. In the second step, 15000 cpm of labelled CII are added per tube. In the event of low concentrations of antigen close to the resolution limit, this will give a count of approximately 7500 cpm which is high enough to be accurately evaluated using 2 min. counts/tube. After this incubation, anti-IgG protein-A is added allowing the precipitation of labelled and unlabelled antigen-antibody complex by centrifugation. After determination of the amount of gamma radiation present in the pellet, a standard curve can be plotted and the concentration of CII present in the samples can be determined using it.

The standard curve will be sigmoidal with a central linear and curved asymptotic segments at low and high antigen concentrations. In order to be of any significant value, the cpm reading of the diluted samples must fall within the linear range of the curve.

Reagents:	CHAPS Buffer (concentrated stock)	25 mL
	1% CHAPS (Calbiochem)	250 mg
	2M NaCl	2,92 g
	0,4M EDTA (Tetrasodium salt)	3,8 g
	0,4M Potassium Acetate Solution pH 7,40	0,982 g
	CII RIA Buffer	1 L
	0,15M KH ₂ PO ₄	1,03 g
	0,15M Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	38,57 g

0,05% NaN ₃	0,5 g
0,25% BSA (RIA grade)	2,5 g
0,25% Nonidet 40 or Igepal	2,5 mL
0,5% Deoxicholic Acid	5 g
Solution pH 8,10	

CPII Standards (from Poole)

CPII stock in Tris buffered saline is stored frozen in small aliquots. The standards (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9, 2, 1 and 0.5 ng/mL) are prepared by serial dilutions, using the CHAPS buffer diluted 1:4.

Antibody Rabbit anti-CPII (from Poole)

The working dilution is determined from a binding curve (See BINDING.DOC).

¹²⁵I CPII

Prepared using the Chloramine T method (see IODINE.DOC). The iodinated CPII is diluted in CPII RIA buffer, to obtain 15000 cpm/50µL

Normal Rabbit Serum

Only used with sera samples, otherwise use protein-A.
Diluted 1:16 with CPII RIA Buffer.

Zysorbin (Protein-A)

Dilute solution 1:2 to 1:3 with CPII RIA Buffer. A maximum binding curve should be plotted using different amounts of Protein-A to determine the working dilution to avoid reagent waste and optimize precipitation.

Outline	Reagent	NSB ¹	MB ²	Standards	Unknowns
Standard		--	--	100 µL	--
Samples		--	--	--	75 µL
CHAPS buffer (stock)		25 µL	25 µL	--	25 µL
CP II RIA buffer		125 µL	75 µL	--	--
Ab Rabbit vs CPII(diluted)		--	50 µL	50 µL	50 µL
Incubation overnight at room temperature					
¹²⁵ I-CPII (15000 cpm/tube)		50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Incubation overnight at room temperature					
Zysorbin (protein-A)		50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Incubation 2 hours at room temperature					
CPII RIA buffer		2 mL	2 mL	2 mL	2 mL

Centrifuge 20 min at 3000 rpm
Aspirate the supernatant
Count the tubes in a gamma counter for 1 min each

¹ Non specific Binding

² Maximum Binding**Protocol**

A) Sample extraction

1. If not ready, prepare stock solutions of the following protease inhibitors:

- PMSF (Sigma P7626) 100mM stock in propanol
17,42 mg PMSF/mL propanol
- Iodoacetamide (Sigma I6125) 100mM stock
18,50 mg IAA/mL RIA buffer
- EDTA (tetra-sodium salt, Sigma ED4SS) 200mM stock in H₂O
- Pepstatin A (Sigma P4265) #1mg/mL stock in 95% EtOH

The inhibitors can be kept at -20°C for later use.

2. Blot samples dry, then Weigh on an analytical balance and transfer in eppendorf tubes. The most accurate way to perform this operation is to weigh the eppendorf tube alone, then place the sample inside and weigh again. The net weight is obtained by subtraction.
3. Precisely add about 1mL of extraction buffer per 50 mg of cartilage to each sample. The mean weight of all the samples can be used to calculate the amount of buffer to be added. Correct this volume by accounting for the total volume of the inhibitors to be added subsequently (see example below). Extraction buffer consists of 4M guanidium chloride (GuCl) in 50mM sodium or potassium acetate, pH 5.8.
4. To each sample, add the protease inhibitors to the following final concentrations: 1mM EDTA, 1mM Iodoacetamide, 1mM PMSF and 5µg/mL of Pepstatin A.
5. Place the samples in a refrigerated room (-4°C) for 48 hrs. Samples should be placed on a rocker during this process.
6. Transfer the samples to a dialysis membrane, and dialyse extensively against 10mM PBS, pH 7.4. As a first step, the samples may be dialysed against water for a day, followed by an overnight PBS step, and a final dialysis wash in fresh acetate buffer for about 8 hours. All dialysis solutions should be autoclaved and cooled to 4C prior to use.
7. Transfer samples from the dialysis bag to eppendorfs. During this step, weigh a 150 µL aliquot from each sample to determine it's density. Then weigh the total mass of each sample to determine it's accurate volume using it's density (see example 2).
8. The samples are stored at -20°C until ready to be assayed.

Note : If there is a large number of samples, the dialysis can be performed with the microdialyser

B) CPII RIA

Before carrying out this assay, a binding curve must be performed to determine the proper antibody dilution to be used in the assay (see file binding.doc).

Each determination is performed in duplicate (for both standards and unknowns). Polypropylene tubes are used (CPII binds to glass).

1. Prepare the following concentrations of standard CPII: 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9, 2.0, 1.0 and 0.5 ng/mL. The stock solution should be around 2 - 2.5 mg/mL and should be diluted using the CHAPS buffer.
2. Dilute the samples (normally 1 :2 - 1 :6) using RIA buffer, so that the concentration of CPII will fall inside the linear range of the standard curve.
3. Dilute the antiserum with RIA buffer according to results obtained with the binding curve.

Prepare polypropylene tubes in duplicates for NSB, MB, each standard CPII concentration and each individual samples.

4. Add 25 μ L of CHAPS buffer 4X to NSB, MB and the samples tubes.
5. Add 125 μ L of RIA buffer to NSB and 75 μ L to MB.
6. Add 100 μ L of standard CPII dilutions to the standard tubes.
7. Add 75 μ L of sample to the sample tubes.
8. Add 50 μ L of anti-CPII antibody to all tubes (except NSB) and vortex all the tubes.
9. Incubate overnight at room temperature.
10. Add 50 μ L labelled CPII to each tube and incubate overnight at room temperature.
11. Add 50 μ L of properly diluted protein-A to all tubes and incubate 2 hours at room temperature.
12. Add 1.5 or 2 ml of RIA buffer to all tubes to assist precipitation and centrifuge tubes at 3000 rpm for 20 min.
13. Aspirate supernatant with a vacuum pump connected to a radioactive waste disposal trap.
14. Measure gamma counts at a 2 min reading time per tube.

In short:

- | | | |
|---|---|-------------|
| 1. Standards | | 100 μ L |
| 2. Unknown samples | 75 μ L | |
| 3. CHAPS buffer (stock) - only to unknown samples | | 25 μ L |
| 4. Antibody Rabbit vs CPII diluted in RIA buffer | | 50 μ L |
| | Incubation overnight at room temperature | |
| 5. ¹²⁵ I-CPII diluted in RIA buffer (15000 cpm/50 μ L) | | 50 μ L |
| | Incubation overnight at room temperature | |
| 6. Zysorbin | | 75 μ L |
| | Incubation at least 2 hours at room temperature | |
| 7. CPII RIA buffer | 2 mL | |

Centrifuge for 20 minutes at 3000 rpm

Aspirate the supernatant

Count tubes for 1 minute in gamma counter

Calculation of Results

$$\% \text{ Binding} = \frac{\text{cpm} - \text{NSB}}{\text{cpm total} - \text{NSB}} \times 100$$

where

cpm = counts of primary Ab (anti CPII) dilution

NSB = counts of non-specific binding

cpm total = counts of the iodinated antigen/tube (approx. 15000 cpm/tube).

Obtained by calculating the average counts for all tubes 12-24h after addition of the ^{125}I -CPII, just before addition of the protein-A.

% Binding refers to binding of anti-CPII to ^{125}I -CPII. Inhibition of this binding will occur in presence of antigen in the samples (unmarked CPII). Alternatively, results can be plotted as % Inhibition (% Inhibition = 100 % - % Binding).

References

Linsenmayer, T. F. (1991) Collagen in cell biology of the extracellular matrix 2nd ed., Elizabeth D. Hayed., Plenum press, New York, Chap.1 p.7-13.

Nelson, F. et al. Cartilage content of C-propeptide of type II collagen is an index of synthesis of this molecule which is decreased in osteoarthritis, in preparation.

Hinek, A., Reiner, A., Poole R.A. The calcification of cartilage matrix in chondrocyte culture: studies of the C-propeptide of type II collagen (chondrocalcin). *Journal of Cell Biology*, 104, 1435-1441 (1987).

Parker, C.W. (1976) Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds. Prentice-Hall Inc., New Jersey, Chap. 7.

Annexe V : Protocole d'extraction pour l'essai multivalent

(extrait de Hoemann C. et al., in preparation)

Protocol BIO-5 : Multivalent assay : sample extraction in guanidinium salt solutions

Required reagents:

C. Hoemann

9/2000

4M guanidine hydrochloride/ 50 mM Tris pH 7.5

4M guanidine isothiocyanate/ 50 mM Tris pH 7.5

8M urea

liquid Nitrogen

biopulverizer

RNase-free microfuge tubes

Microfuge at 4°C

Special precautions :

Wear gloves at all times, to avoid contaminating samples with skin nucleases and proteases. Use gloved hands to procure eppendorf tubes from a new bag, and rack pipet tips only with gloved hands. Wash pipetmen before a series of extractions.

This protocol is useful for extracting proteins, nucleic acids, and glycosaminoglycans from 5 to 30 mg samples. The insoluble pellet can be digested with papain, to determine collagen content as well as other insoluble or cross-linked material. Samples should be flash-frozen in liquid nitrogen, and at NO TIME EVER allowed to thaw before biopulverizing and coming in contact with guanidine salt solution. It is therefore preferrable to rapidly weigh the sample prior to flash-freezing in liquid nitrogen, to avoid a weigh step that may cause the sample to thaw. If however, the sample weight is unknown, take the frozen sample in its microfuge tube directly from the -80°C freezer, weigh the tube with sample, then rapidly transfer the sample to the pre-cooled biopulverizer before it thaws. Then weigh the empty tube to obtain sample weight.

Procedure :

1. Pre-weigh a 1.5 ml eppendorf tube with screw-cap, and then weigh again with a fresh cultured or dissected sample to obtain sample weight. Make sure to wick off extra media from the sample before weighing. Immediately flash-freeze the sample in liquid nitrogen, and store at -80°C until ready to use. The rule of thumb is : 20 mg cartilage or tissue for 1 ml of extraction buffer#1 (4 M

GuCl/50 mM Tris), and any other quantity of sample proportional to this ratio. Since vortex mixing is not efficient for volumes above 1 ml, the optimal sample size is between 5 and 20 mg for 1.5 ml tubes, and up to 30 mg for 2 ml tubes.

2. Place a clean and dry biopulverizer with the piston in the small thermos, and add liquid Nitrogen. Allow to cool until the Nitrogen stops boiling (a few minutes).
3. Transfer a pre-weighed, frozen sample to the biopulverizer. Biopulverize by striking the steel piston with a hammer a few times, then pivot the piston and strike several more times. Repeat one more time. (*Note : strike as hard as you can, as inadequate pulverisation can drastically affect the %DNA extracted*). Do not lift the piston up and down, as this action may cause an air flux that causes the sample powder to disperse out of the chamber.
4. With one hand, carefully lift the piston (do not shake off any powder stuck to it) and add 4 M GuHCl/50 mM Tris pH 7.5 to the open barrel with a p1000 pipetman : for add 1000 μ l to a 20 mg sample, or a proportionate amount for any other sample weight. The buffer will freeze instantly. Try to pipet the solution straight to the bottom, so that you can place the piston back into the biopulverizer. This way, the powder on the piston will thaw in the presence of GuHCl.
5. Allow the GuHCl solution to thaw completely, you can speed this up by carefully placing the biopulverizer in a shallow water bath. *The buffer once thawed will flood above the pulverizer hole, this is desirable, since any powder that escaped the hole will come in contact with the extraction buffer.*
6. To transfer the extract to an eppendorf screw-cap tube, cut the end off of a blue pipet tip (for a p1000 pipetman) with a clean razor blade, and use the cut-off tip to withdraw the sample crumbs. Even better, use a p1000 tip that has been silicone-treated, washed, and autoclaved.
7. Remove the solution first floating on the top of the biopulverizer unit to a clean screw-cap microfuge tube. Then remove the piston, and try to scrape any large sample crumbs from it. Do not rinse the piston with the extract inside the biopulverizer, since this tends to deposit even more sample fragments on the piston. Using a swirling motion, remove the GuHCl extract and all of the pulverized sample to the microfuge tube. Vortex the extract and sample crumbs for 30 minutes at 4°C in the HPLC refrigerator.
8. Microfuge the sample 10 minutes at 10,000Xrpm at 4°C.
9. If the sample did not pellet correctly, that is, if there is a large, viscous cellular mass at the bottom of the tube (over 300 μ l volume) this means that the sample contained a lot of cells, and there is probably too much DNA to pellet. If this is the case (and only if) add an additional 1 ml GuHCl to the original sample, vortex, and re-spin for 15 minutes. Remove the supernatant to a fresh tube (=GuCl_{sup}).
10. This step solubilizes RNA which remains in the pellet after GuCl extraction. To the pellet, add an amount of 4M GITC/50 mM Tris pH 7.5 that equals $\frac{1}{4}$ volume of 4M GuCl used (250 μ l, if 1 ml GuCl was used) to the pellet. Vortex, and if necessary (especially for cells grown in hydrogels), use

- a pipet tip to disperse the pellet completely. Vortex for 30 minutes at 4°C. Re-microfuge the sample 10 minutes at 10,000Xrpm at 4°C. Remove the supernatant to a fresh tube (=GITCsup).
11. To the pellet, add ¼ volume 4M GITC/50 mM Tris pH 7.5 to the pellet. Proceed as the previous step, and vortex the dispersed pellet for 30 minutes at 4°C. Spin for 15 minutes at 21,000xg.
 12. Add the supernatant to the tube (=GITCsup), and mix well. Store the two supernatants at -80°C until ready to analyze.
 13. Process the pellet further : rinse with 75% ethanol to get rid of GITC salt :add 500 µl -20°C, 75% ethanol to the pellet, vortex for 30 seconds, microfuge 5 minutes at 21,000xg, and discard supernatant. Flash-spin the pellet and remove every last drop with a yellow pipet tip. Repeat. Especially after removing the supernatant of the second wash, flash-spin, and remove residual ethanol with a yellow pipet tip. Allow to air dry for 10 to 15 minutes at room temperature. (*Note : incomplete washing will result in GITC contamination of the pellet, which negatively interferes with the hydroxyproline assay*).
 14. Resuspend the pellet in a volume of papain digestion buffer, pH 7.5, that is equal to half the volume of the GuCl extract used (500 µl if 1000 µl GuCl was used). Digest between 18 and 24 hours at 60°C, until complete, in a gasket-sealed screw-cap tube. (*Note : Make sure the tube is screwed completely shut, to avoid evaporation*). After digestion, microfuge the digest for 5 minutes at 10,000xg at room temperature to pellet any remaining debris. Store supernatant at -80°C until ready to analyze. Analyze aliquots of cleared supernatant by DMB assay (for cross-linked matrix GAG), and Hydroxyproline assay (for insoluble collagen).

Sample preparation for various analyses :

1. Hoechst assay : use duplicate aliquots of 5 µl and 20 µl of GuCl_{sup} against a standard curve containing the same amount of GuCl, and duplicate aliquots of 10 µl or 40 µl of GITC_{sup} against a standard curve containing the same amount of GITC.
2. RNase protection assay : combine 10 µl GuCl_{sup} with 10 µl GITC_{sup}. Add 25 µl Direct protect buffer from the Ambion Direct Protect kit. Add radioactive antisense RNA probes, and proceed as suggested by the kit instructions.
3. Protein analysis : Can analyze GuCl_{sup} and GITC_{sup} separately, or together. To 100 µl guanidine extract (either GuCl_{sup} or GITC_{sup}, or 50µl each sup combined) add 500 µl -20°C ethanol. Place at -80°C overnight to fully precipitate all proteins. Spin at 21,000Xg for 15 minutes at 4°C. Carefully remove supernatant. Add 250 µl -20°C 75% ethanol (to wash residual guanidine salts away) and re-spin 5 minutes at 21,000Xg. Carefully remove supernatant, and invert to drain on a clean kim-wipe. Can remove the last bit of ethanol with a yellow pipet tip (careful not to touch the pellet). When the ethanol has pretty much evaporated (takes about 15 minutes), re-suspend the pellet in 50 µl 8M urea with thorough pipetting (room temperature). Once the pellet is resuspended

place immediately on ice to avoid degradation of proteins. For Western Blot analysis, load about 10 to 20 μ l per minigel lane: mix the 10 or 20 μ l aliquot in a new tube with an equal volume 2X or 3X laemmli loading buffer. Ice at all times. Boil the samples 3 minutes in a dry heat block, and ice.

4. DMMB assay : analyze 2 μ l to 10 μ l in regular ELISA plate assay, with the same amount of GuCl or GITC in the standard curve.
5. HPR assay : Use supernatant of papain-digested GITC-insoluble pellets. To hydrolyze, mix 1 :1 with concentrated HCl.

Annexe VI : Protocole d'immunofluorescence pour les cryosections

Faire les coupes à l'aide du cryostat.

Préparation des lames (les sortir du congélateur, délimiter rapidement les sections à l'aide du *Pap Pen*).

(Note : les solutions PBS et TBS sont à un pH de 7.4)

Etape	Solution	Temps	Température
Fixer	Paraformaldéhyde (4% / PBS)	10 min	T pièce
Rincer	TBS (NaCl 150mM ; Tris-HCl 10mM)	3 x 5 min	T pièce
Digérer	Chondroïtinase ABC (200 mU/mL) + BSA 0.01% (TBS dig. : NaCl 100mM ; Tris-HCl 100 mM)	1 h 30	37 °C
Rincer	PBS	3 x 5 min	T pièce
Saturer	BSA (1% / PBS) (Après, enlever surplus avec pipette)	30 min	T pièce
Incuber	Anticorps 1° (BSA 0.1% / PBS)	1 heure	T pièce
Rincer	PBS / BSA 0.1 %	3 x 5 min	T pièce
Saturer	BSA (1% / PBS) (Après, enlever surplus avec pipette)	15 min	T pièce
ATTENTION	PROCHAINES ÉTAPES DANS LE	NOIR	IMPORTANT
Incuber	Anticorps 2° (BSA 0.1% / PBS)	1 heure	T pièce
Rincer	PBS	3 x 5 min	T pièce
Antifade	GOC (Solution stock diluée 1 :10)	5 min	T pièce

Fixer avec une goutte de Mowiol et une lamelle.

Laisser 24 heures à la T pièce.