

Université de Montréal

Caractérisation de la dégénérescence des disques intervertébraux chez la souris selon
l'âge

Par

Assia Ejjaouani

Faculté de Médecine

Travail présenté dans le cadre du cours MMD1091

Initiation à la recherche

Octobre 2024

Introduction

Les disques intervertébraux sont des structures fibro-cartilagineuses qui se trouvent entre les vertèbres. Ils permettent à la colonne vertébrale d'être flexible, absorbent les chocs et évitent l'effritement des vertèbres entre elles (1). Ils sont composés de deux parties : l'anneau fibreux et le noyau pulpeux. La première forme la partie extérieure du disque et est composée de collagène et de protéine organisés en lamelles. La deuxième, comme son nom l'indique, constitue le centre gélatineux du disque. Elle est composée de fibres de collagène, d'eau et de protéines (2).

Avec l'âge, ces disques subissent des modifications qui peuvent mener à une dégénérescence. Par exemple, chez les humains, on note notamment une diminution de la quantité d'eau dans le noyau pulpeux (3). Ces changements entraînent des douleurs et des dysfonctionnements comme la lombalgie, la principale raison d'invalidité physique dans le monde (4). Ainsi, il est pertinent de se pencher sur leur physiopathologie.

Pour étudier cette dégradation, le modèle murin peut être utilisé. En effet, il est plus facile d'analyser des tissus de souris dû notamment à leur courte durée de gestation, leurs portées généreuses et des basses dépenses nécessaires pour s'occuper d'eux (5). De plus, la structure de leur colonne vertébrale est similaire à celle des humains et elle est également dégradée à travers le temps (6). Il s'agit donc d'un point de départ pertinent pour l'analyse de ce phénomène.

L'objectif de cette expérience est de caractériser les changements structurels dans les disques intervertébraux de la souris selon l'âge. En utilisant des approches histologiques, cette recherche vise à mieux comprendre les mécanismes biologiques responsables de la dégradation des DIV et leur impact potentiel sur l'arthrose et les douleurs lombaires.

Matériel et méthodes

Souris

La manipulation des animaux est faite en accord avec des normes éthiques strictes visant leur bien-être. En effet, le CRCHUM possède un certificat de conformité aux bonnes pratiques animales délivré par le Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) (7).

Les disques intervertébraux sont extraits de 4 souris mâles. Une jeune (souris 1) de 2 mois, une adulte (souris 2) de 14 mois et deux autres (souris 3 et 4) de 20 mois. Les souris sont toutes Wildtype, c'est-à-dire qu'elles n'ont pas été génétiquement modifiées.

Sacrifice

Pour prélever les colonnes, il faut que les souris ne soient pas vivantes. Pour se faire, elles sont euthanasiées à l'aide de monoxyde de carbone. Une fois inertes (environ 5

minutes dans une boîte que l'on remplit continuellement de ce gaz), on peut éteindre la source de ce gaz et procéder à la suite de l'expérience. Pour éviter de les stresser, il est conseillé d'éviter les mouvements brusques, ne pas les manipuler excessivement et de les laisser dans leur cage. En plus de raisons éthiques concernant leur bien-être, les souris relaxées avant l'euthanasie fournissent des colonnes plus droites grâce à leur posture détendue.

Prélèvement des colonnes

Le prélèvement est optimal peu de temps après l'euthanasie. Les souris sont couchées sur leur ventre, puis massées jusqu'à ce que leur colonne soit droite. Leurs pattes sont épinglées le plus loin possible de leur corps. L'utilisation d'un scalpel permet de faire des coupes précises et d'éviter d'abîmer la colonne vertébrale. L'utilisation d'un ciseau de dissection a été limitée au dépiautage ainsi qu'à la séparation de la colonne du crâne et des côtes.

Fixation des tissus

Pour éviter la putréfaction des tissus prélevés à travers le temps, ceux-ci sont plongés dans une solution appelée *TissueFix* (10% de formaldéhyde) pendant 24h. Elle inhibe les enzymes, incluant celles responsables de la dégradation des tissus, et empêche la croissance bactérienne (9).

Décalcification des tissus

Pour faciliter la fine coupe des tissus, leur décalcification est réalisée en les plongeant dans une solution appelée *RDO* pendant 2h. Ainsi, ils deviennent assez mous et ne s'effritent pas à la coupe.

Déshydratation des tissus

Afin de faciliter l'adhérence de la paraffine aux tissus et la coloration histologique, ils sont traités dans une machine de circulation. À l'intérieur, ils sont notamment soumis à des courants d'alcool, pour déshydrater, et de xylène, pour retirer l'alcool des tissus, car la paraffine est soluble dans le xylène (10). Ils y restent pendant environ 12 h.

Inclusion dans la paraffine

Afin de fournir un support aux tissus et ainsi pouvoir procéder à leur coupe à l'aide du microtome, les morceaux de colonnes vertébrales sont submergés dans des moules contenant de la paraffine. Ces moules sont ensuite refroidis puis décollées des blocs nouvellement créés.

Coupe

Les blocs sont coupés à une épaisseur de 5 microns à l'aide d'un microtome. Les coupes sont délicatement transférées sur des lames de microscopes. Puis, elles sont incubées à 37°C pendant environ 12 h pour les déshydrater et faciliter leur coloration.

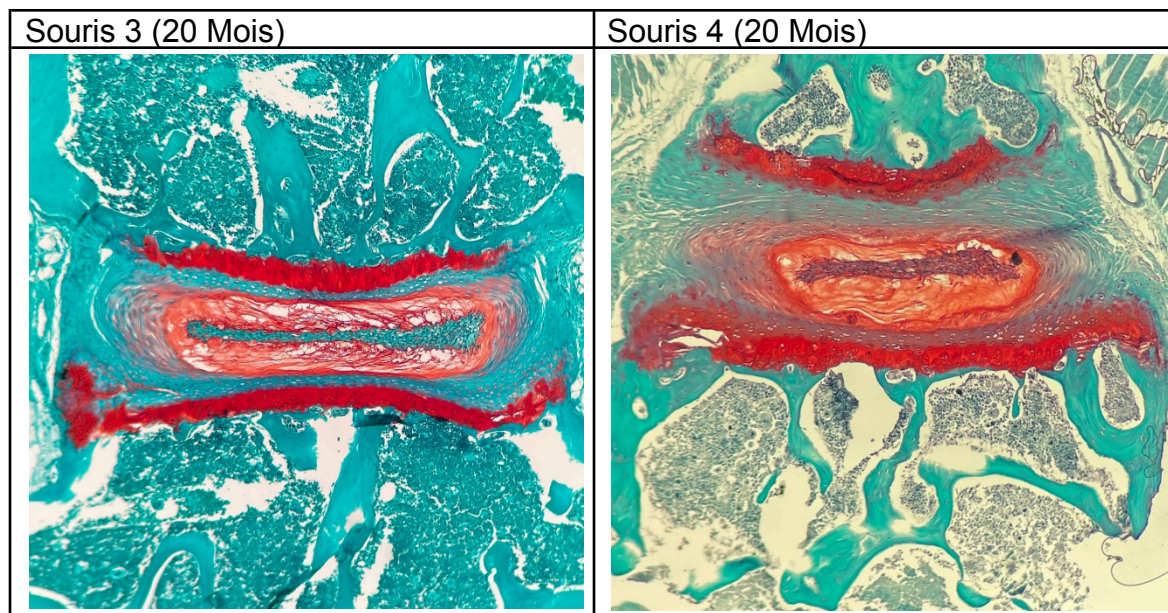
Coloration

Trois colorants sont utilisés pour différencier les structures des tissus à l'analyse. L'*hématoxylin&Eosin*, un colorant très utilisé en histologie, est composé de deux pigments. Il met en évidence à la fois les noyaux cellulaires (avec l'hématoxyline) et les structures cytoplasmiques ainsi que la matrice extracellulaire (avec l'éosine) (11). *Fast*

Green est un colorant polyvalent utilisé pour colorer les protéines et les fibres de collagène du cartilage osseux (12). *Safranine O* colore les protéoglycanes en rouge, des composants importants de la matrice extracellulaire du cartilage et leur diminution est souvent un signe de dégénérescence, notamment dans les cas d'arthrose (13)

Résultats

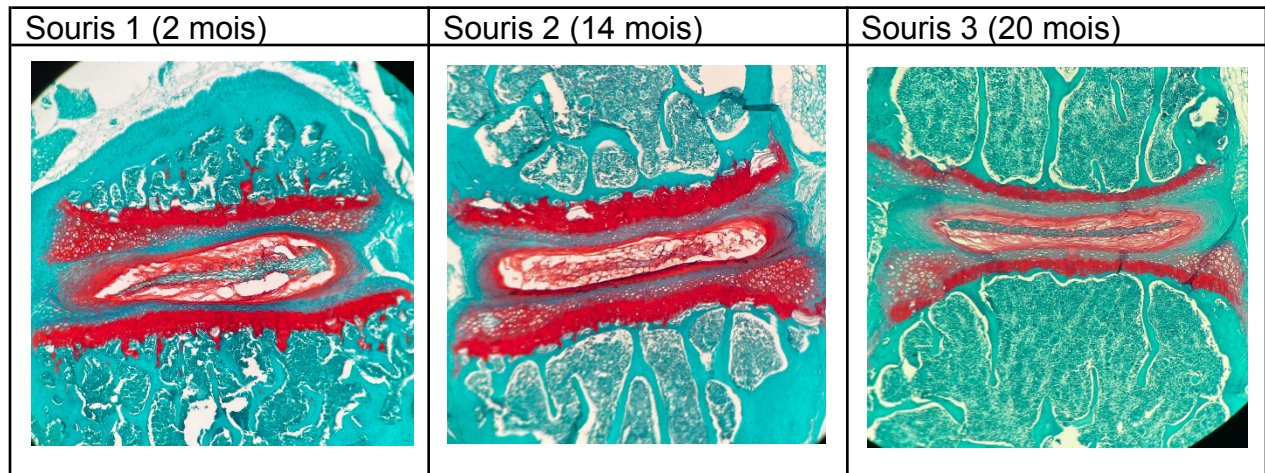
Vertèbres cervicales



Ces deux souris montrent des signes de vieillissement. Le disque de la Souris 3 est lui aussi comprimé entre les deux vertèbres : on constate un affaissement du disque. L'anneau fibreux est très mince au niveau des extrémités supérieures et inférieures. Le disque de la Souris 4 est plus compact et semble avoir un espace réduit, ce qui peut indiquer une plus grande dégradation. De plus, les lamelles de collagène de l'anneau

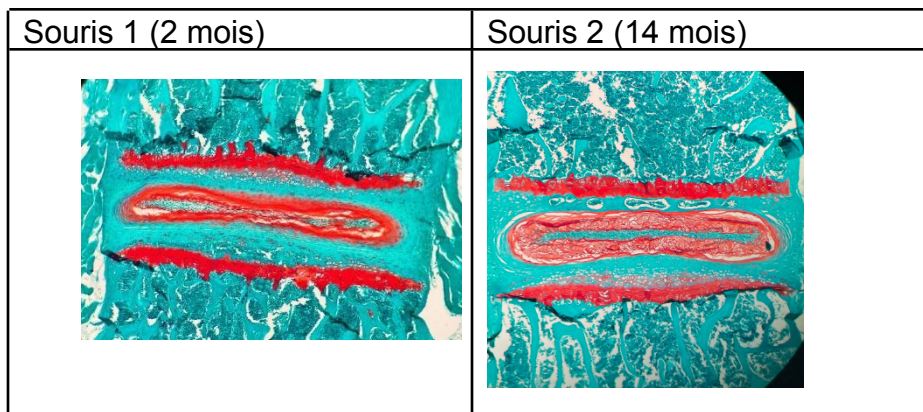
fibreux des deux souris semblent désorganisées; elles ne forment pas de cercles concentriques caractéristiques des lamelles d'un *annulus fibrosus* sain.

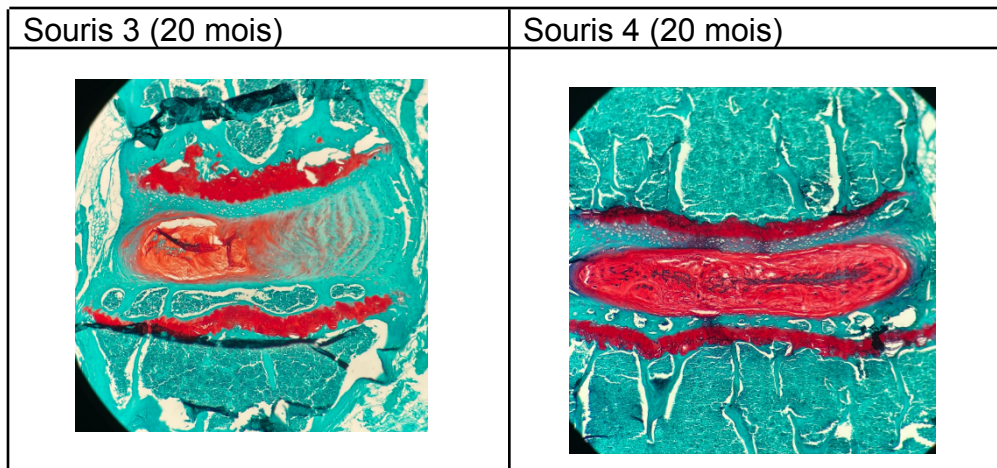
Vertèbres thoraciques



L'aplatissement des noyaux pulpeux ainsi que la perte des cellules à l'intérieur des noyaux pulpeux à travers l'âge sont des signes de dégénérescence. Le volume du noyau pulpeux diminue aussi.

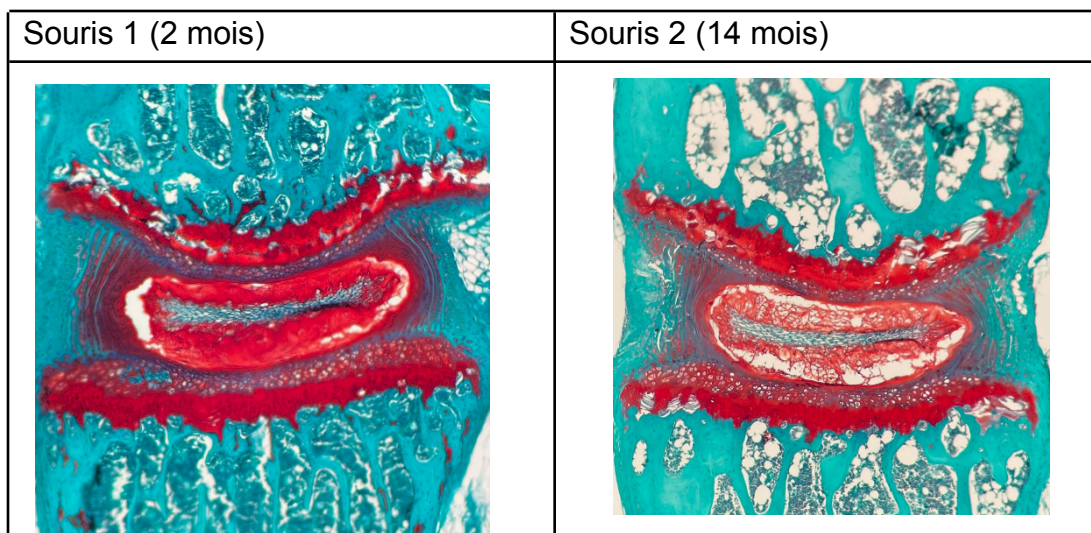
Vertèbres lombaires

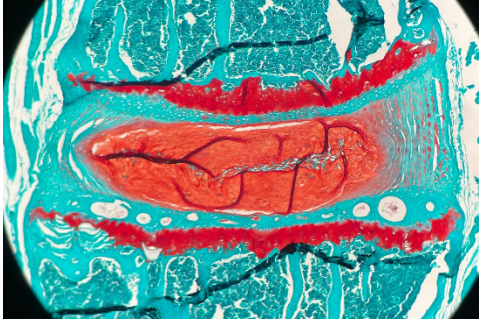
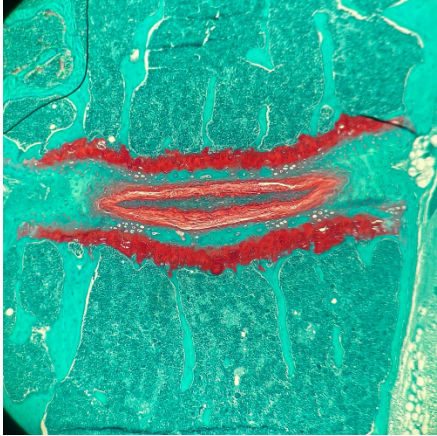




Ici aussi, les cellules situées à l'intérieur du *nucleus pulposus* disparaissent au fur et à mesure que l'âge des souris augmente. L'*annulus fibrosus* semble se comprimer et se déformer également lorsqu'on observe son épaisseur à ses extrémités supérieures et inférieures. À contrario, la souris 1 présente une structure plus homogène (épaisseur uniforme tout au long de l'anneau fibreux).

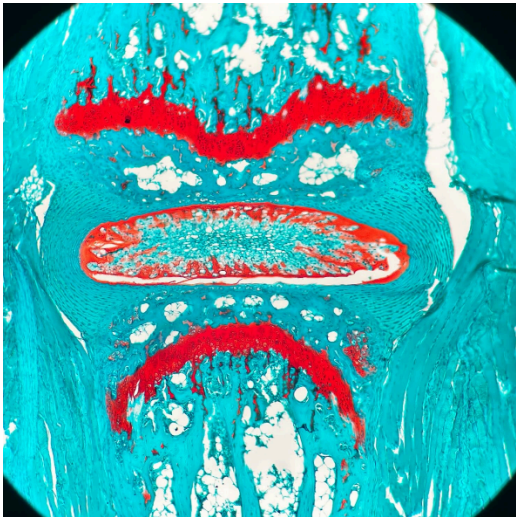
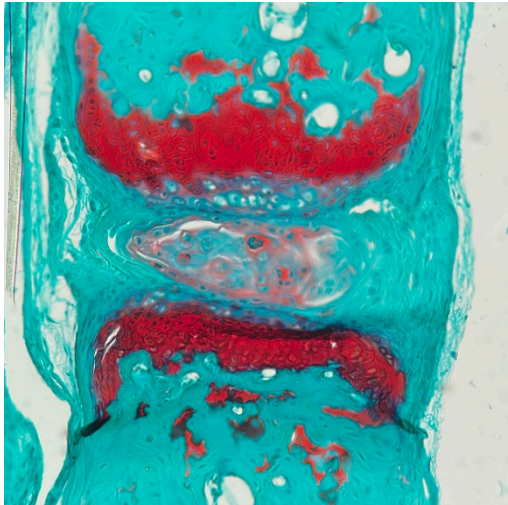
Vertèbres sacrales



Souris 3 (20 mois)	Souris 4 (20 mois)
	

Pour observer la dégénérescence, on peut observer la structure de plus en plus désorganisée de l'anneau fibreux, la diminution de volume du noyau pulpeux, la perte progressive des cellules vivantes en son centre, et une diminution globale de l'épaisseur du disque.

Vertèbres caudales

Souris 1 (2 mois)	Souris 2 (14 mois)
	

La Souris 1 présente un disque intervertébral sain, avec des lamelles de collagène de l'*annulus fibrus* bien définies et uniformes. Le *nucleus pulposus* ne semble pas comprimé (forme d'un disque biconvexe, surtout à l'extrémité supérieure). Il regorge également de cellules en son centre, ce qui, montre qu'elles ont pu survivre dans ce milieu pas encore dégénéré. La Souris 2 présente un *annulus fibrus* plus désorganisé (forme moins définie, lamelles de collagènes organisées en lignes ondulées plutôt que cercles concentriques). Le *nucleus pulposus* n'est pas apparent, car la coupe est trop superficielle pour l'apercevoir.

La souris 1 est probablement porteuse d'une délétion du gène ALX/FPR2. Lorsqu'absent, ce gène ne peut médier l'inflammation et pourrait causer une dégénérescence précoce des disques intervertébraux. Cependant, les DIVs de la souris 1 semblent encore en bon état, avec un *nucleus pulposus* bien hydraté et un *annulus fibrosus* organisé en couches concentriques. Cela suggère qu'à ce stade précoce, la délétion d'ALX/FPR2 n'a pas encore eu d'impact significatif observable sur la structure des disques.

Toutefois, l'absence de signes visibles de dégénérescence ne signifie pas que la délétion n'a pas d'effet. Il est possible que les effets de la délétion d'ALX/FPR2 se manifestent plus tard, à un âge où les mécanismes de réparation tissulaire et de régulation inflammatoire deviennent plus importants pour maintenir l'intégrité des disques.

Bibliographie

1. Chan A, Yoo J, Knight K, Hampton L, Diab AM, Lowe R, et al. Intervertebral disc. Physiopedia [En ligne]. URL: https://www.physio-pedia.com/Intervertebral_disc
2. Sonsa.org. Intervertebral discs [Internet]. [Cité le 2 octobre 2024]. URL: <https://www.sonsa.org/spine-surgery/spine-anatomy/intervertebral-discs/>
3. Zhao, J., Wang, J., Xu, H. et al. (2024). Intervertebral Disk Degeneration and Bone Mineral Density: A Bidirectional Mendelian Randomization Study. *Calcif Tissue Int*, 114, 228–236. <https://doi.org/10.1007/s00223-023-01165-1>
4. Organisation mondiale de la Santé. Lombalgie [Internet]. [Cité le 2 oct 2024]. URL : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/low-back-pain>
5. Brendler, J., Winter, K., Lochhead, P., Schulz, A., & Ricken, A. M. (2022). Histological differences between lumbar and tail intervertebral discs in mice. *Journal of anatomy*, 240(1), 84–93. <https://doi.org/10.1111/joa.13540>
6. Vincent, K., Mohanty, S., Pinelli, R., Bonavita, R., Pricop, P., Albert, T. J., & Dahia, C. L. (2019). Aging of mouse intervertebral disc and association with back pain. *Bone*, 123, 246–259. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.03.037>
7. CHUM. Animalerie - CRCHUM [Internet]. [Cité le 3 oct 2024]. URL: <https://www.chumontreal.qc.ca/crchum/plateformes-services/animalerie>
8. Kretschmer D, Gleske AK, Rautenberg M, et al. (2010). Human formyl peptide receptor 2 senses highly pathogenic Staphylococcus aureus. *Cell Host Microbe*. 7(6):463-473. doi:10.1016/j.chom.2010.05.012
9. Unity Health Toronto. Tissue fixation and fixatives [Internet]. [cité le 3 oct 2024]. URL : <https://research.unityhealth.to/staff-services/research-facilities/facilities/histology-core/tissue-fixation-and-fixatives/>
10. Alturkistani, H. A., Tashkandi, F. M., & Mohammedsaleh, Z. M. (2015). Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Global journal of health science*, 8(3), 72–79. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v8n3p72>
11. Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH protocols*, 2008, pdb.prot4986. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>
12. Sigma-Aldrich. Fast Green FCF [Internet]. [cité le 2 oct 2024]. URL : <https://www.sigmaaldrich.com/CA/en/product/sial/f7258>

13. MilliporeSigma. Safranin O Staining Solution [Internet]. [cité le 2 oct 2024].
URL :
https://www.emdmillipore.com/CA/en/product/Safranin-O-Staining-Solution,MM_NF-TMS-009-C