

## Projet de recherche Afreth 2005/13

# Étude du potentiel chondroprotecteur d'éléments traces des eaux minérales et des dérivés thermaux (strontium et manganèse) sur culture de chondrocytes articulaires humains

---

### Investigateur principal : Pr Jean Cambar

Laboratoire de biologie cellulaire, EA 3672, Université Victor-Ségalen Bordeaux 2,  
146 rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux

Maîtres de conférences associés :

Dr Béatrice L'AZOU, Laboratoire de biologie cellulaire

Dr Christian TOUSSAINT, Institut du thermalisme

Dr Céline OHAYON-COURTÈS, Laboratoire d'Hydrologie-Environnement

## Résumé

Une étude antérieure réalisée par les demandeurs du projet a mis en évidence un passage transcutané préférentiel, chez l'homme (*in vitro*), du strontium et du manganèse à partir d'eaux minérales (Jonzac) et du cuivre et du zinc à partir de boues thermales (Dax et Rochefort). De par leur action sur les os et le cartilage, ces éléments semblent jouer un rôle chondroprotecteur et posséder des propriétés anti-arthrosiques. L'objectif de cette étude est de vérifier l'action du strontium, du manganèse et de leur association sur cultures de chondrocytes humains (celle du cuivre et du zinc sera évaluée ultérieurement).

Au préalable, des tests de cytotoxicité permettront de mesurer la sensibilité des chondrocytes et de déterminer les doses non cytotoxiques. Puis, ces chondrocytes seront traités par des milieux contenant du strontium et du manganèse, seuls ou en association, à des concentrations déterminées lors de l'étude du passage transcutané, dans le but d'étudier la prolifération cellulaire et d'appréhender les modulations de l'expression des constituants majoritaires de la matrice extracellulaire synthétisée (protéoglycannes, collagènes...). Cette étude préliminaire sur chondrocytes normaux doit permettre de valider le modèle choisi et de définir des marqueurs pertinents.

Dans une deuxième phase, cette étude sera poursuivie sur chondrocytes ostéoarthrosiques (ou chondrocytes sains exposés à des stimuli inflammatoires). En effet, il paraît nécessaire de mesurer l'effet du strontium et du manganèse sur la balance synthèse/dégradation des constituants de la matrice cartilagineuse, en présence de divers modulateurs comme IL 1. Cette approche expérimentale chez l'homme, *in vitro*, apparaît comme le pendant indispensable des études cliniques pour une évaluation rapide dans le domaine du thermalisme en rhumatologie.

**Mots Clés** - *Chondrocytes normaux et arthrosiques, matrice extra-cellulaire, culture cellulaire, éléments minéraux.*

## 1. Présentation du projet

L'arthrose, dont la prévalence est très élevée, fait aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches tant au point de vue de l'étude de sa physiopathologie que de son traitement. L'arthrose est caractérisée par des troubles dégénératifs au niveau des articulations, dont les facteurs étiologiques sont divers (obésité, traumatismes, troubles métaboliques, sénescence, hormones sexuelles, terrain génétique ou dérégulation immunitaire). Quelles qu'en soient les causes, le patient est particulièrement handicapé par les douleurs et les difficultés à se déplacer qu'elles génèrent. Il n'existe pas de traitement spécifique ou de méthode réparatrice permettant la régénération d'un cartilage articulaire fonctionnel, mais essentiellement des traitements palliatifs visant à réduire la douleur et l'incapacité. Le développement de thérapies à visée chondroprotectrice devient aujourd'hui une perspective raisonnable.

Un nombre croissant de maladies ostéo-articulaires sont soignées dans les stations thermales. Plus de 60 % des curistes en rhumatologie viennent pour des problèmes d'arthrose. Par rapport aux thérapies médicamenteuses, les soins à base d'eau thermale sont moins agressifs pour le corps humain et dépourvus d'effets secondaires. Ils entraînent et cela a été souvent étudié, une baisse de la douleur et de la consommation de médicaments après la cure [Constant et coll, 1995 ; N'guyen et coll, 1997 ; Queneau et coll, 2001]. Le thermalisme constitue ainsi un apport intéressant dans la lutte contre les douleurs chroniques ou récidivantes. Le rôle anti-inflammatoire et sédatif des applications de boues thermales a été confirmé par une étude qui a démontré que l'amélioration clinique et la diminution de la prise médicamenteuse sont significatives après application de boue thermale par rapport à une simple application de chaleur [Forestier et coll, 1997 ; Françon et coll, 2000].

Dans la littérature, les effets bénéfiques du thermalisme sur les maladies ostéo-articulaires et, en particulier l'arthrose, ont souvent été rapportés aux propriétés physiques des produits thermaux, aux techniques thermales et à la prise en charge globale des curistes. Cependant, même si une partie des effets des eaux thermales est attribuée à la composition chimique de l'eau, peu d'études en apportent directement la preuve [Elkayam et coll, 1991 ; Szucs et coll, 1989]. Pour autant, la présence de certains éléments contenus dans les eaux minérales et les dérivés thermaux donne à penser qu'ils pourraient leur conférer un rôle chondroprotecteur. En effet, des éléments traces, comme le strontium et le manganèse, contenus dans les eaux minérales et les boues thermales, de par leur tropisme pour les os et le cartilage, pourraient posséder des propriétés anti-arthrosiques. La démarche de notre équipe, pour la mise en évidence des propriétés anti-arthrosiques des eaux minérales et des boues thermales, a consisté, dans un premier temps, à étudier le passage transcutané de différents éléments *in vitro* chez l'homme. Cette étude préliminaire avait montré un passage préférentiel du strontium et du manganèse avec l'eau thermale de Jonzac et du cuivre et du zinc avec les boues thermales de Dax et de Rochefort. Ces résultats permettent de penser que le strontium, le manganèse, le cuivre

et le zinc accèdent aux tissus où ils s'accumulent progressivement et donc pourraient agir au niveau du cartilage.

La seconde étape, qui fait l'objet de cette demande, a pour objectif de vérifier si le strontium, le manganèse et leur association ont un rôle chondroprotecteur.

Bien que l'on ne connaisse toujours pas précisément les mécanismes, il a été montré que l'arthrose est le résultat d'un déséquilibre entre les phénomènes d'anabolisme et de catabolisme du cartilage articulaire, lié à un dysfonctionnement de la cellule constitutive du cartilage, le chondrocyte [Conrozier, 1998]. En effet, cette cellule est alors anormalement stimulée et dysrégulée et ses capacités de dégradation sont augmentées par rapport à celles observées dans un tissu sain. L'utilisation de cultures cellulaires de chondrocytes devient alors un modèle d'étude pertinent pour mieux connaître les modifications métaboliques survenant dans ce tissu.

Le plan d'étude proposé se décompose en 2 phases.

*La première phase* sera réalisée la première année et justifie le montant demandé. Elle permettra de valider le modèle de culture de chondrocytes choisi et de définir des marqueurs pertinents. Elle se décompose de la manière suivante :

- mise en culture de chondrocytes humains et amplification cellulaire,
- validation du modèle de culture cellulaire par étude de la redifférenciation cellulaire,
- étude des cytokines ou médiateurs impliqués dans la synthèse de la matrice extracellulaire et mise en évidence de la pertinence des biomarqueurs à étudier,
- étude de la cytotoxicité du strontium et du manganèse sur culture de chondrocytes normaux, afin de déduire des doses pharmacologiquement actives et d'évaluer l'action du strontium et du manganèse sur le métabolisme cartilagineux.

En fonction des résultats obtenus, cette étude sera poursuivie, dans une *deuxième phase*, sur chondrocytes ostéo-arthrosiques (ou chondrocytes sains exposés à des stimuli inflammatoires) et permettra de mesurer l'effet du strontium et du manganèse sur la balance synthèse/dégradation des constituants de la matrice cartilagineuse. Cette seconde phase sera entreprise en fonction des résultats obtenus lors de la première phase d'étude et fera l'objet d'une nouvelle demande de financement.

## **2. Justification de l'étude et hypothèse de l'activité des éléments minéraux (strontium et manganèse) des eaux minérales sur les cartilages**

De par leur origine profonde, leur durée de séjour à température élevée au contact des roches et leur circuit hydrothermal souvent complexe, les eaux minérales contiennent de nombreux éléments traces d'origine naturelle dont certains, les oligo-éléments, se retrouvent dans les composants biologiques de l'organisme où ils jouent un rôle important. Les eaux des stations du Sud-Ouest (Charente-Maritime, Gironde, Landes et Pyrénées-Atlantiques) n'échappent pas à la règle et nombreuses sont les eaux minérales de cette région qui contiennent des oligo-éléments en quantité appréciable comme par exemple [Canellas et coll, 1992] :

- le manganèse dans les eaux de Rochefort-sur-Mer (200 Ng/l) et, dans une moindre mesure, dans les eaux de Saubusse, Jonzac, Cambo-les-Bains (autour de 20 Ng/l) ;
- le strontium, présent dans toutes les eaux du Sud-Ouest, en quantités variables : Jonzac et Rochefort-sur-Mer (9 mg/l), Cambo-les-Bains (4,5 mg/l), Eugénie-les-Bains (3,5 mg/l), Saubusse-les-Bains et Préchacq-les-Bains (2,5 mg/l), Dax (1,2 mg/l).

Les données du Laboratoire d'Hydrologie - Environnement confirment ces valeurs dans les captages actuellement en exploitation dans ces stations thermales.

Les boues thermales, constituées d'un substrat argileux et d'eau minérale, sont aussi susceptibles de céder des éléments traces, mais peu de données analytiques sont disponibles sur leurs concentrations [Counilh et coll, 1982].

En partant de l'hypothèse que les éléments traces des eaux minérales peuvent être actifs sur divers organes ou processus physiologiques, il est, au préalable, indispensable de mettre en évidence leur passage transcutané. Suivant cette logique, JJ Dubarry et C Tamarelle [1971 et 1972] ont démontré que des traceurs radioactifs passaient la barrière cutanée et en ont déduit que les éléments contenus dans les eaux minérales pouvaient aussi être absorbés par la peau.

Plus récemment, des travaux rapportent un passage transcutané, après application de boues sur des patients présentant des pathologies rhumatismales, du bore, du baryum, du fer, du zinc et du strontium, alors que les niveaux sériques d'aluminium, de cuivre, de cobalt, de nickel et de manganèse restent inchangés [Sukenic et coll, 1992].

Notre équipe a réalisé deux types d'études du passage transcutané : par applications répétées de boues thermales (Dax et Rochefort) et d'eau minérale (Jonzac). Ces études ont été réalisées *in vitro* chez l'homme en utilisant des cellules de diffusion inspirées du modèle de Franz. Ces cellules comportent deux compartiments, un compartiment supérieur où est placé le produit à tester, maintenu à la température des soins thermaux, et un compartiment inférieur, dit receveur, maintenu à la température de la peau et qui contient du plasma humain. À l'interface de ces deux compartiments est introduit un prélèvement de peau humaine fraîche et entière (derme et épiderme) provenant de plastie abdominale. Les applications de boues ou d'eaux sont répétées 10 fois, entrecoupées d'une phase de repos d'une durée équivalente. Le passage transcutané est mesuré par dosage spectrométrique d'absorption ou d'émission atomiques des éléments traces directement dans le plasma de recueil.

Les études sur les boues thermales de Dax et de Rochefort ont mis en évidence, dans nos conditions expérimentales, le passage transcutané préférentiel du zinc et du cuivre sans pour autant démontrer celui du fer [Toussaint et coll, 1995 ; Ohayon-Courtès et coll, 1995].

Les études faites sur l'eau minérale de Jonzac, dans nos conditions expérimentales, ne révèlent aucune variation en fer, sodium, potassium, chlorure et calcium, quelque soit le temps d'application, alors que les concentrations en manganèse et en strontium sont significativement augmentées. Il existe donc pour ces deux éléments, un passage trans-

cutané *in vitro* chez l'homme [Toussaint C, Ohayon-Courtès C, Nguyen Ba C. Forage Beauregard, Jonzac (17) : étude du passage transcutané des éléments-traces. Rapport scientifique d'étude réalisée à la demande de la Mairie de Jonzac, 2001].

Du fait de leur affinité pour l'os et le cartilage, ces deux éléments pourraient concourir à l'effet des eaux minérales dans le traitement de l'arthrose.

Le strontium est un cation bivalent dont l'affinité pour l'os est connue de longue date. On estime que le strontium se substitue à un ion calcium sur dix au sein du cristal osseux. La mise en évidence d'une action originale du strontium sur le remodelage osseux a justifié la réalisation d'études cliniques, afin d'évaluer l'effet de cet agent pharmacologique dans l'ostéoporose [étude SOTI : Thomas, 2003].

Une étude ancienne, effectuée sur 36 patients, a mis en évidence un effet bénéfique du strontium sur le soulagement de la douleur osseuse [McCaslin et coll, 1959]. Des études, plus récentes, ont confirmé le rôle possible du strontium, administré par voie orale, dans l'amélioration de la douleur et la densité minérale de l'os chez l'homme [Skoryna et coll, 1981 ; Meunier et coll, 2002].

*In vitro*, l'hypothèse de l'effet bénéfique du strontium sur la dégradation du cartilage dans l'arthrose a été formulée. En effet, il a été montré que le strontium stimule la production de la matrice extracellulaire par le chondrocyte, par une production significative de protéoglycannes [Henrotin et al, 1985, 2001 ; Reinholt et al, 1985].

Le manganèse est un élément essentiel ; il joue un rôle de premier plan dans la constitution d'enzymes et de métalloenzymes. On a souligné son rôle dans le métabolisme des carbohydrates, des lipides et des stérols et dans la phosphorylation oxydative. Le manganèse entre dans le cycle de fabrication et de conservation des os [Missy et coll, 2000]. En effet, ce sont les os qui en retiennent le plus, soit environ 25% du total corporel. Il a été montré que l'association de la glucosamine et du manganèse permet d'optimiser la production des glycosaminoglycannes, et donc des protéoglycannes, un des constituants principaux du cartilage articulaire [Das et Hammad, 2000]. Des études *in vivo* confirment le rôle d'inhibiteur dans la perte de densité osseuse observée chez le rat [Rico et coll, 2000]. D'autre part, le manganèse augmente l'activité de la superoxyde dismutase à manganèse qui intervient dans les mécanismes de protection mettant en jeu la production de radicaux oxygénés. On peut considérer la manganèse-SOD comme une protéine de lutte contre l'inflammation. Mais très peu d'études de l'effet du manganèse sont disponibles sur culture cellulaire.

La mise en évidence d'un passage transcutané d'éléments traces spécifiques justifie l'utilité des essais expérimentaux complémentaires. Pour notre part, nous proposons des études *in vitro* sur cultures cellulaires. Par ailleurs, le passage transcutané étant préférentiel, il semble plus judicieux de tester des solutions simples des éléments intéressants plutôt que l'eau minérale elle-même dont la majorité de la minéralisation ne franchit pas la barrière cutanée. De plus, la complexité de la composition de l'eau minérale ne permettrait pas d'imputer les effets observés à une espèce chimique en particulier.

### 3. Justification du modèle proposé

Le cartilage est un tissu conjonctif avasculaire dont le rôle est d'assurer le glissement entre les surfaces articulaires et de supporter des charges compressives importantes. Le cartilage articulaire contient un seul type de cellules hautement spécialisées, les chondrocytes, incluses dans une matrice extracellulaire dense composée principalement de fibres de collagène de type II, IX et XI et de protéoglycannes sulfates. Les chondrocytes sont non seulement capables de produire la matrice extracellulaire, mais également les enzymes capables de la détruire [Chevallier et coll, 2005]. Le chondrocyte est donc capable de modifier l'équilibre synthèse/dégradation de la matrice extra-cellulaire du cartilage articulaire par production de cytokines et de facteurs de croissance qui vont réguler son propre métabolisme.

Dans le cas de l'arthrose, les chondrocytes peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires provoquant la destruction du cartilage par augmentation de la synthèse et de l'activité, notamment :

- des métalloprotéinases (stromélysine, gélatinase, collagénase),
- des hyaluronidases,
- et d'une ou des agrécannase(s).

Ces enzymes, sécrétées par le chondrocyte, sous formes inactives dans la matrice, vont avoir une activité excessive liée à une augmentation de leur synthèse et à un défaut de leur inhibition par les Tissue Inhibitors of Metalloproteases (TIMPs). De ce fait, les propriétés mécaniques du cartilage se détériorent, ce qui peut expliquer la dégénérescence arthrosique [Goldring, 2000 ; Wu et coll, 2002].

Ainsi, on a pu montrer que les chondrocytes arthrosiques produisent des protéoglycannes spécifiques, des protéines normalement peu exprimées (fibronectine, collagènes mineurs) ainsi que de grandes quantités de métalloprotéases dont les principales sont les collagénases 1 et 3 et les protéoglycannases. Ces enzymes responsables de la dégradation du réseau de collagène seraient responsables d'une hyperhydratation et d'un ramollissement du cartilage [Christgau et coll, 2004 ; Vignon, 2000].

La culture de cellules apporte les moyens essentiels pour l'étude de la physiologie cellulaire puisqu'elle permet de travailler sur des cellules isolées, débarrassées des effets locaux ou systémiques de l'organisme [L'Azou et coll, 1994, 2003]. La culture de chondrocytes articulaires permettra d'étudier la régulation de l'expression des protéines et de mettre en évidence directement l'action des facteurs de croissance et de redifférenciation.

L'objectif principal est d'étudier, dans un premier temps, les mécanismes impliqués dans la dégradation, afin d'étudier la réponse biologique du chondrocyte en terme de quantité de protéines matricielles néo-synthétisées. À partir de ces résultats, il nous sera possible d'étudier l'effet des éléments minéraux (strontium et manganèse) sur les processus de dégradation des articulations.

La mise en jeu des médiateurs et l'équilibre fonctionnel entre les médiateurs qui stimulent la dégradation et ceux qui stimulent la synthèse pourront ensuite être évalués en présence de ces éléments traces contenus dans les eaux minérales.

Notre approche expérimentale permettra, dans une deuxième phase, de mettre en évidence un éventuel effet chondroprotecteur des éléments des eaux minérales, chez l'homme, *in vitro*, ce qui apparaît comme le pendant indispensable des études cliniques pour une évaluation rapide dans le domaine du thermalisme en rhumatologie.

## 4. Moyens

### 4. 1. La culture cellulaire de chondrocytes sains

La culture cellulaire est censée répondre à deux exigences majeures : la production de cellules par prolifération et la préservation de fonctions spécialisées.

Le chondrocyte en culture présente une forme polygonale, exprime du collagène de type II (dans 80% des cellules), et montre une absence ou quasi-absence d'expression de collagène I et III. Cependant en culture monocouche, le chondrocyte a un phénotype instable. Dans un premier temps, il sera nécessaire de valider notre modèle de culture cellulaire et de vérifier la conservation du phénotype chondrocytaire pendant la période de culture.

Les modèles de culture sur plastique ont l'inconvénient majeur de ne pas permettre, à ce jour, de conserver les chondrocytes dans un état différencié stable, tout en permettant, cependant, une multiplication importante des cellules [Benya et coll, 1978, 1986]. Cette multiplication s'accompagne d'une production de collagène de type I de plus en plus importante ainsi que d'une diminution de la production du collagène de type II caractéristique du cartilage. À l'inverse, la culture en gel d'agarose ou de collagène de type I ou sur billes d'alginate permet aux chondrocytes de conserver un phénotype articulaire, bien que ne permettant pas la multiplication des cellules.

Notre approche méthodologique propose la multiplication des chondrocytes en monocouche avec perte du phénotype, puis restauration du phénotype dédifférencié par ajout de facteurs spécifiques. Les cellules seront obtenues à partir de chondrocytes articulaires de genou issus de femmes et amplifiés en culture monocouche. Ces cellules seront redifférenciées grâce à l'utilisation de milieux de culture spécifiques contenant des facteurs de croissance. Cette redifférenciation devra se traduire par une inhibition des synthèses des collagènes de type I, III et par la production de collagène, notamment de type II, et de protéoglycane agrécanne [Chambers et coll, 2002].

### 4.2. Identification des paramètres physiologiques des chondrocytes

Pour évaluer les mécanismes d'action du strontium et du manganèse, il sera indispensable de disposer au préalable de marqueurs biologiques spécifiques. Plusieurs molécules peuvent être proposées comme par exemple des composants matriciels (et/ou leurs produits de dégradation), des cytokines et des protéases (notamment les métalloprotéases matricielles -MMP- et leurs inhibiteurs -TIMPs).

Le cartilage normal exprime de l'IGF et les isoformes majeures du TGFP. Leurs effets principaux sont de stimuler la prolifération tissulaire, d'assurer la synthèse des protéo-

glycannes et du collagène II. D'autres cytokines comme les BMPs (bone morphogenetic proteins) ont été identifiées récemment dans le cartilage de tissus normaux. À l'inverse, les cytokines comme l'IL-1 et le TNF, qui stimulent la dégradation du cartilage, absents dans le tissu normal, sont exprimés dans le cartilage arthrosique [Vignon, 2000 ; Chevallier, 2005]. Ces facteurs de croissance sont d'importants régulateurs de la physiologie du cartilage (différenciation, migration, division, synthèse ou dégradation de la matrice).

### **4.3. Dosages du strontium et du manganèse**

Les dosages de strontium et de manganèse (ainsi que d'autres éléments-traces) seront effectués, dans les milieux de culture, par spectrométrie d'émission atomique. Il sera indispensable, avant d'envisager la supplémentation des milieux par ces deux éléments, de mesurer leur niveau basal. En effet, la composition des milieux de culture, de croissance et de redifférenciation n'est pas connue avec précision. Dans la mesure du possible, selon la densité cellulaire obtenue et la sensibilité, il sera intéressant d'évaluer la quantité de strontium et de manganèse dans le contenu intracellulaire.

## **5. Déroulement de l'étude**

### **5.1. Mise en culture de chondrocytes humains, amplification cellulaire**

Les cellules seront commandées auprès d'un fournisseur de cellules (PromoCell ou Cambrex). Nous avons choisi de travailler sur des chondrocytes humains normaux livrés en phase proliférative (500.000 cellules) et de les amplifier en monocouche dans un milieu de culture spécifique et adapté. À confluence et, selon les études programmées, les cellules seront redistribuées après repiquage dans des flasques ou boîtes de culture de format variable ou directement placées dans des plaques 96 puits pour les études de cytotoxicité ou sur plaques ELISA.

Le milieu de culture utilisé est un milieu complexe, spécifiquement mis au point pour la culture des chondrocytes (Chondrocyte Growth Medium), contenant des facteurs de croissance essentiels. Ce milieu est changé toutes les semaines pendant la durée de l'étude.

Un traitement par un agent inducteur (TGF $\beta$  ou l'utilisation d'un milieu de redifférenciation proposé par le fournisseur (Chondrocyte differentiation medium) seront réalisés sur les chondrocytes normaux afin de vérifier la modulation du phénotype.

Matériel et fournitures nécessaires : cellules et milieux de culture cellulaire : Cellules NHAC-Kn, milieux de croissance, milieu de redifférenciation. Consommables : Boîtes de culture, pipettes, cônes, tubes eppendorf, tubes stériles. Équipement demandé : Système photographique numérique (Digidoc) adaptable sur illuminateur et microscope inversé (Olympus IT2).

### **5.2. Validation du modèle de culture cellulaire par étude de la redifférenciation cellulaire**

L'évaluation du caractère différencié du chondrocyte sera réalisée en utilisant des méthodes, dans un premier temps qualitatives, par immunocytochimie. Celles-ci reposent sur la mise en évidence, par immunofluorescence, sur lames de verre, de l'expres-



sion des constituants majoritaires synthétisés par les chondrocytes, les collagènes (notamment collagène II). Il sera important de montrer que la culture ne synthétise pas de collagène de type I, synthèse signant la présence d'une population dédifférenciée de type fibroblastique.

Les études quantitatives des collagènes et le rapport collagène I/II seront obtenus par des tests ELISA en utilisant des plaques recouvertes par les anticorps spécifiques. La synthèse de collagène de type II et l'absence de collagène de type I donneront une bonne indication pour affirmer que les chondrocytes ont un phénotype articulaire normal.

L'expression des protéoglycannes sera quantifiée par spectrométrie sur plaque (96 ou 24 puits selon leur sensibilité). Après lavage et fixation, les cellules seront réhydratées et colorées au bleu d'alcan. Le bleu d'alcan est un colorant basique qui se fixe spécifiquement sur les groupements sulfates des protéoglycannes synthétisés. La réaction sera révélée par addition de guanidinium/HCl. L'absorbance sera lue à 595 nm. Le dosage des protéoglycannes sera effectué aussi bien sur lysat cellulaire que dans le milieu de culture. Les résultats seront alors exprimés en  $\mu\text{g}$  de glycosaminoglycannes relargués après dosage des protéines totales par test Biorad. Cette étude permettra d'évaluer le taux basal de protéoglycannes dans les cellules de chondrocytes normaux et servira de référence dans nos conditions expérimentales.

Consommables : Plaques 96 puits, plaques 24 puits, lames pour immunofluorescence Labteck, Réactifs : solution de bleu d'alcan, kit de dosage des protéines Biorad, guanidiniumHCl, collagène I, collagène II, facteur de croissance TGF $\beta$ .

Immunofluorescence : Anticorps collagène I, anticorps collagène II, anti-anticorps fluorescents.

### **5.3. Étude des cytokines ou médiateurs impliqués dans la synthèse de la matrice extracellulaire et mise en évidence de la pertinence de biomarqueurs à étudier**

Afin d'étudier les facteurs participant à l'équilibre de la balance synthèse/dégradation, il sera nécessaire d'exposer les cellules, d'une part à des facteurs anaboliques (comme par exemple le TGF $\beta$  et, d'autre part, à des facteurs cataboliques (comme par exemple IL-1 $\alpha$ ). Ainsi, il sera proposé de doser des métalloprotéases spécifiques comme MMP1 et MMP3 (stromelysine) dans ces modèles expérimentaux. Un dosage ELISA commercialisé permet de quantifier les taux de MMPs sécrétées (formes active et inactive).

Réactifs : Facteur IL-1,6, facteur de croissance TGF $\beta$ ,

Test ELISA : Plaque MMP1 ou MMP3 ou TIMPs.

### **5.4. Étude de la cytotoxicité du strontium et du manganèse sur culture de chondrocytes normaux**

Les analyses de cytotoxicité seront effectuées dans un premier temps, sur cellules dédifférenciées à fort potentiel de prolifération. Les éléments minéraux seront mis au contact de ces cellules pendant des temps relativement courts. De par l'abondance, dans les chondrocytes, d'organites lysosomiaux, nous avons choisi comme test pour évaluer la

cytotoxicité, le test colorimétrique du rouge neutre. Cette méthode, très sensible, utilise un colorant supravital spécifique des lysosomes, qui pénètre uniquement dans les cellules vivantes, dont la membrane est intègre. La quantité de colorant incorporé dans les cellules est donc proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Ce test sera nécessaire pour définir la durée d'exposition et les concentrations de strontium et de manganèse maximales pour lesquelles aucune mortalité cellulaire n'est observée, ainsi que les concentrations inhibitrices 50 (CI50), concentrations pour lesquelles le nombre de cellules vivantes présentes dans les puits est égale à 50% par rapport aux puits témoins.

Les cellules seront comptées et ensemencées dans des plaques 96 puits. À sub-confluence, les cellules seront mises en contact de différentes concentrations de strontium et de manganèse. Les cellules, après incubation avec une solution de rouge neutre, seront lavées (solution formol/calcium) puis lysées (solution acide acétique/éthanol). L'intensité de la coloration, proportionnelle au nombre de cellules vivantes, sera mesurée par spectrophotométrie. Les résultats seront exprimés en pourcentage de cellules mortes par rapport à la moyenne des puits témoins.

Les produits utilisés (strontium et manganèse) seront achetés directement en solutions étalonnées, puis dilués directement dans le milieu de culture adapté au type cellulaire.

Consommables plastiques : plaques 96 puits, cônes, pipettes, riptips, embouts pour distributeur répétitif,

Réactifs : Étalon strontium, Étalon manganèse, solution rouge neutre, solution de révélation (Acide acétique/éthanol, formol/calcium).

### **5.5. Évaluation de l'action du strontium et du manganèse aux doses physiologiquement actives sur le métabolisme cartilagineux.**

Il sera important de comparer les résultats obtenus lors des études de cytotoxicité à ceux observés dans les études préliminaires du passage transcutané, pour exposer les chondrocytes normaux à des doses physiologiques susceptibles d'être retrouvées chez l'homme lors des traitements thermaux.

L'action du strontium et du manganèse sera ainsi étudiée :

- par l'expression des marqueurs de redifférenciation, tels que définis par la validation (paragraphe 5.2),
- et par les modifications induites des marqueurs pertinents, précédemment définis (paragraphe 5.3).

Les techniques et le matériel mis en oeuvre dans cette étape du projet seront identiques à ceux exposés précédemment.

## **6. Conclusion**

Cette étude réalisée *in vitro* sur chondrocytes permettra :

- de disposer d'un modèle d'étude rapide des éléments minéraux contenus dans les produits thermaux,

- d'étudier la production locale des cytokines impliquées dans l'équilibre destruction/réparation du cartilage,
- de tester directement l'effet d'éléments minéraux sur la modulation de ces cytokines.

Selon les résultats de cette étude, des essais devront être repris sur un modèle de culture de chondrocytes traités par l'interleukine 1 (IL-1), médiateur majeur dans le processus de destruction du cartilage. Ce modèle est reconnu pour mimer in vitro le déséquilibre de la balance entre chondroformation et chondrorésorption observé in vivo dans les cartilages de sujets arthrosiques [Henrotin et al, 1985]. L'objectif principal de cette deuxième étude sera d'étudier si les éléments minéraux peuvent s'opposer aux effets de différentes métalloprotéases ou de cytokines pro-inflammatoires, ou directement stimuler les facteurs de croissance.

## **7. Rapports et Publications**

Un rapport confidentiel, reprenant l'ensemble des résultats obtenus, sera rédigé et remis à l'Afreth, à la fin de l'étude, soit 1 an après l'attribution du financement.

Selon les résultats, une publication scientifique sera proposée à diverses revues, comme par exemple ; *Journal of Orthopaedic Research* (impact factor 2,167), *Rheumatology International* (impact factor 1,337).