

La cataboline : une solution du problème arthrite ? *

Mark F. Brown ¹

Les infirmités dues aux rhumatismes articulaires sont causées par les lésions dont sont l'objet les articulations. Les recherches menées dans ce domaine impliquent la cataboline, un médiateur intercellulaire, découvert à Cambridge, qui ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude de cette maladie.

Le Strangeways Research Laboratory s'est consacré au problème des rhumatismes articulaires et des maladies associées, depuis sa fondation, en 1912, en tant qu'hôpital universitaire de Cambridge. Au début, on y accepta des patients. Mais les travaux cliniques furent transférés, en 1923, au St-Bartholomew Hospital, à Londres, et le laboratoire se consacra ensuite exclusivement à la culture des cellules et des tissus.

Cette technique, que l'on applique maintenant partout à l'étude contrôlée de la physiologie cellulaire et tissulaire, fut fortement développée par le Dr T.S.P. Strangeways, fondateur du Laboratoire, et par le Dr Dame Honor Fell, du même laboratoire. Bien que les toutes premières expériences de maintien en vie de cellules en culture, entreprises en Prusse par Roux, le fondateur de l'embryologie moderne, datent des années 1880, ce ne fut qu'en 1907 qu'on obtint des résultats satisfaisants, aux USA, avec des cultures dont les cellules continuèrent à se comporter normalement avec les explants de petites parcelles d'embryon de grenouille, faits par Ross Harrison dans de la lymphe de grenouille coagulée. Ces parcelles, conservées aseptiquement, survécurent et produisirent des fibres nerveuses, prouvant ainsi que l'expérience dépassait le stade d'une survie limitée.

Les premiers chercheurs tentèrent, toutefois, d'obtenir une croissance cellulaire la plus riche possible et ce, au détriment de toute organisation. L'idée de maintenir les parcelles de tissu dans l'état le plus proche de la normale fut émise, en 1914, par le Dr David Thompson de la Royal Society of Medicine de Londres, puis fut développée par Strangeways et Fell en mettant tout naturellement l'accent sur les tissus conjonctifs et les structures articulaires.

Il y a quelques années, nous avons créé un service de physiologie tissulaire pour l'étude spécifique des lésions articulaires à l'aide de modèles de culture tissulaire. Nous avons examiné les cellules de ces cultures et mesuré leur pouvoir de synthèse et de libération de métabolites ainsi que les substances produites lors de la désagrégation du tissu.

Le cartilage

Dans une jointure synoviale typée, les parties nécessaires à la mobilité sont constituées par les surfaces des cartilages articulaires, lubrifiées par le liquide synovial. Ce liquide est produit par la membrane synoviale ou synovie qui tapisse la capsule articulaire et qui forme souvent de petites protubérances appelées *villi* dans la cavité articulaire. Ces *villi* peuvent toutefois grossir en cas de maladie, lors d'une inflammation synoviale.

Le cartilage se compose de cellules, connues sous le nom de chondrocytes, dispersées dans une matrice qu'elles produisent. Cette matrice est un mélange de collagène, une protéine fibrillaire formant un réseau, et d'une substance connue sous le nom d'agrégat de protéoglycane se composant de chaînes de sulfate de chondroïtine et de sulfate de kératane, reliées à une masse centrale de nature protéique. Entre 10 et 30 de ces molécules interagissent avec une longue chaîne de résidus d'acide hyaluronique pour former un polymère qui, dans les cartilages est fortement hydraté et qui, par son gonflement, contrebalance la contrainte du collagène. Le résultat en est la résistance du cartilage aux efforts de traction et de compression imposés par le mouvement articulaire.

Une interaction

Dans les rhumatismes articulaires, il a été démontré, par analyse biochimique, qu'il y a perte de protéoglycane, puis de collagène. Au cours de sa désagrégation, le cartilage donne l'impression d'avoir été envahi par la synovie inflammatoire. Dans le passé, on en déduisit généralement que la désagrégation était due à la synovie qui sécrétait des enzymes protéolytiques, catalyseurs de l'hydrolyse de protéines en substances plus simples. Une explication aussi plausible serait qu'une modification dans le cartilage permet à la synovie d'y pénétrer.

La façon dont le cartilage et la synovie interagissent est actuellement étudiée à l'aide de techniques de culture d'organes.

¹ Strangeways Research Laboratory, Cambridge.

* De *Spectrum* n° 178; version française adaptée par M. Privat de Garilhe (C.N.A.M.)

Ces expérimentations débutèrent, en 1952, lorsque Fell et Mellanby étudièrent les effets de la vitamine A sur de petits fragments d'os de poulet embryonnaire et de souris foetale. A ce stade, c'est-à-dire avant leur durcissement, les os sont du cartilage pur. Une résorption marquée de matrice par la synovie fut constatée. En 1966, Fell et ses collègues purent prouver qu'un certain nombre d'autres agents avaient un effet similaire.

Des expériences semblables furent faites sur des tissus adultes, comprenant des cartilages articulaires humains, porcins et de lapin. Les résultats furent identiques. L'étape suivante fut l'étude des mécanismes enzymatiques de la dégradation du protéoglycane et du collagène. On a récemment découvert que la résorption pouvait être induite par l'addition de synovie ou de tissu conjonctif aux parcelles de cartilage des cultures. Pour approfondir l'étude de ce phénomène, Tell et le Dr Ronald Jubb, du service d'immunologie de l'Université de Cambridge, ont cultivé, en 1977, de la synovie de pied de porcelet hâchée avec des lamelles de cartilage articulaire. Il apparut que la synovie morte n'avait aucun effet sur l'aspect du cartilage ou sur le dégagement de protéoglycane. En revanche, la synovie vivante en contact avec le cartilage provoquait une libération de protéoglycane et une dégradation visible du cartilage. La séparation de la synovie du cartilage provoquait une dégradation de ce dernier lorsqu'il était vivant uniquement et non pas quand il était mort.

Il doit donc exister des mécanismes de dégradation séparés : puisque le cartilage mort se dégrade, la synovie doit dégager des enzymes protéolytiques et puisque cet effet n'intervient pas en cas de séparation de la synovie et du cartilage, les enzymes doivent être indiffusibles ou être désactivées dans le milieu de culture. Par conséquent, les enzymes ne peuvent être impliquées dans la dégradation du cartilage vivant et il faut donc trouver un autre mécanisme.

Puisqu'elle n'intervient que dans le cartilage vivant, la dégradation doit être le fait des chondrocytes, lesquels doivent être stimulés par une substance produite par la synovie. Bien qu'il puisse s'agir d'une modification non spécifique dans les résidus synoviaux, la notion d'un facteur catabolique spécifique est plus plausible. Après la suggestion de son existence, par le Dr J. T. Dingle de notre laboratoire, son identification devient une nécessité et nous y travaillons.

Des essais duplicatifs

A ce jour, la seule façon de détecter la présence de ce facteur inconnu est son effet sur le cartilage. Du fait de la difficulté d'obtenir de grandes quantités de parcelles équivalentes de cartilage articulaire, on a procédé à un essai basé sur la libération de sulfate de chondroïtine (proportionnel au total du protéoglycane) avec un cartilage nasal bovin. Le facteur présumé eut le même effet sur le cartilage nasal et la méthode d'essai fut donc adoptée. Le septum nasal qui sépare les naseaux des bovins est un gros bloc de cartilage, relativement homogène, pouvant être découpé en plusieurs centaines de disques en vue des essais répétitifs que nécessite la forte quantité de variations individuelles dans les essais biologiques.

Des coupes d'environ 1 mm d'épaisseur sont effectuées aseptiquement dans le bloc de cartilage nasal prélevé sur une vache fraîchement abattue. Les coupes sont maintenues stériles, lavées au fluide stérile et les disques découpés à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Ils sont mis en culture pendant huit jours avec un millilitre de milieu remplacé au bout de quatre jours. A la suite d'une récente modification de ce procédé, des disques de 2 mm sont cultivés pendant six jours consécutifs dans 0,35 ml de milieu. Le rapport tissu/milieu est ainsi plus élevé et on atteint donc une plus grande sensibilité. On est, en outre, à même de faire des essais plus précis puisque la quantité de milieu utilisée est moindre. Finalement, les disques et le milieu sont digérés séparément à l'aide de l'enzyme papaïne, puis le sulfate de chondroïtine est dosé au spectrophotomètre par une méthode colorimétrique.

Grâce à cet essai, Dingle et d'autres ont pu déterminer que le milieu synovial déclenchait le dégagement de quelque 80 % de protéoglycane. Ils ont découvert que la substance recherchée (en même temps qu'une grande partie des protéines contenues dans le milieu) pouvait être précipitée et retenue par une membrane de dialyse. Elle était inactivée par la chaleur et par hydrolyse avec certains enzymes, à savoir la chymotrypsine et l'élastase pancréatique.

Il était donc évident qu'un facteur spécifique existait, apparemment une protéine, que les chercheurs baptisèrent cataboline. Des recherches ultérieures, menées à l'aide de techniques telles que la filtration sur membrane, la chromatographie d'échange d'ions et l'électrofocalisation ont confirmé cette supposition. Il s'agit d'une protéine acide d'un poids moléculaire situé entre 18 000 et 20 000.

La purification de la cataboline, à laquelle on s'attaque en ce moment, s'avère difficile, car il semble que la substance agit à des concentrations inférieures à 10^{-10} molaire et il faudra donc des quantités considérables de matière première pour aboutir à une préparation s'approchant de la pureté.

La culture organotypique en cavités

Pendant ce temps, le Dr. Dingle et Timothy Dingle, qui travaillent également au laboratoire Strangeways, ont entrepris l'étude des sites de dégradation du cartilage pour déterminer si, en pratique, la dégradation induite par le chondrocyte est importante. A cette fin, ils ont découpé des blocs de cartilage nasal bovin de $13 \times 4 \times 4$ mm, comportant chacun une cavité pouvant être obturée à l'aide d'une vis en acier inoxydable. Ils ont ainsi obtenu des cavités fermées, limitées par du cartilage vivant. Ces cultures organotypiques en cavités ou cultures en niche d'organe furent maintenues dans des milieux dont certains contenaient du rétinol ou de la cataboline. Dans les cavités furent introduits des agrégats de protéoglycane radiomarqué, soit seuls, soit incorporés dans des perles de polyacrylamide pour éviter toute diffusion. Au terme de l'incubation, le contenu des cavités fut récupéré par centrifugation et la taille approximative des agrégats déterminée par filtration sur membrane. Les cultures en cavité furent ensuite digérées et analysées quant au sulfate de chondroïtine pour en mesurer la dégradation.

Comme on s'y attendait, on ne trouva qu'une faible libération de protéoglycane dans la cavité, moins de 20 % dans les cas de tissus morts ou non stimulés, mais presque totale dans ceux dont le milieu contenait de la cataboline. Les pertes étaient d'environ 60 % pour les milieux contenant du rétinol.

Ces résultats se reflétaient dans le schéma de dégradation des agrégats placés directement dans le bloc : le contenu des blocs stimulés à la cataboline subissait une dégradation rapide, celle des blocs stimulés au rétinol était plus lente et celle des blocs morts ou non stimulés presque nulle. Dans le cas des contenus enfermés dans les perles de polyacrylamide, la dégradation était très faible, que les cavités aient été stimulées ou non. Toutefois, les perles n'empêchent pas les protéases solubles d'agir sur les agrégats, ce qui prouve que ces protéases n'y sont pas impliquées. La dégradation d'agrégat de protéoglycane soluble dans les cavités stimulées est provoquée par sa diffusion vers les limites de la cavité, là où des chondrocytes sont responsables de la dégradation dans la zone entourant les limites cellulaires. Ce fait est confirmé par l'utilisation des enzymes immunofluorescentes qui, appliquées au cartilage, n'entrent en fluorescence que dans une étroite bande autour des chondrocytes.

Autres tissus

Depuis la découverte de la cataboline, nous avons entrepris des travaux pour déterminer si des tissus autres que la synovie en produisent. Nous avons trouvé, en peu de temps, que la cataboline

ou une substance comparable était produite par le tissu conjonctif et les tendons. Depuis, on a pu déterminer que cette activité était en rapport avec le tissu conjonctif des os, de l'aorte et des valvules cardiaques. On en a déduit que la cataboline ou « les catabolines » pourraient régir le cycle de reconstitution des tissus conjonctifs de tout le corps. Le Dr. Lynn Pilsworth, qui travaille avec nous, a démontré que la cataboline était produite par des fibroblastes mis en culture. Les fibroblastes sont des cellules à pouvoir ramifiant faisant partie du tissu conjonctif. Le phénomène intervient surtout lorsque les cellules sont au stade de prolifération. Il pourrait donc être lié au fait que la synovie rhumatoïde proliférante a une activité supérieure à la normale.

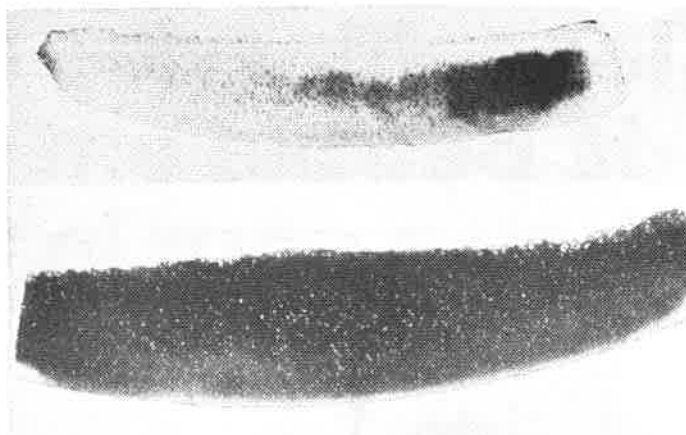
La cataboline n'agit pas que sur le cartilage. Des expériences faites par le Dr Dingle, et le Dr Robert Decker, un visiteur de Dallas, ont démontré qu'elle dégrade les matrices de la synovie, des valvules cardiaques et de l'aorte. Il est vraisemblable qu'elle intervient dans le fonctionnement des cycles de reconstitution des matrices d'un grand nombre de tissus conjonctifs, sinon de tous. Donc, si on peut influencer sur un quelconque événement par une certaine forme de thérapie, il y a des implications cliniques importantes.

La guérison des plaies

On a pu établir relativement tôt que de faibles doses de corticostéroïdes suffisent pour stopper la production de cataboline en culture. C'est probablement l'une des actions des stéroïdes dans le traitement des rhumatismes articulaires. On peut en déduire que, bien que de très fortes doses de cortisol soient généralement administrées, il serait tout aussi efficace de prescrire des doses faibles associées à un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien comme l'aspirine pour juguler l'inflammation. De tels soins pourraient fortement réduire les effets secondaires des stéroïdes administrés à forte dose et qui se traduisent par un œdème, de l'obésité et une mauvaise guérison des plaies.

La cataboline intervient sûrement dans la guérison des plaies. Si déjà elle est importante dans le cycle de reconstitution et de remodelage des tissus conjonctifs, il y a de fortes présomptions pour qu'elle soit nécessaire à la guérison puisque cette dernière est inhibée lorsque les stéroïdes empêchent la production de cataboline. Elle peut, en outre, être liée à l'obésité, pouvant jouer un rôle dans la reconstitution des tissus adipeux et provoquer, de par son absence, un emmagasinage de graisse. Des recherches sur le lien entre la guérison et la cataboline ont débuté au laboratoire sous l'autorité du Dr. Erjia Qi.

Toutefois, son lien avec les rhumatismes articulaires reste au premier plan de nos recherches. Une importante série de recherches entreprise récemment a pour but de déterminer si des médicaments administrés ont sur le corps des effets similaires à ceux observés sur les cultures de tissus. La forte production de cataboline dans les cultures est probablement due au « stress » propre à cette technique



Explants appariés de cartilage articulaire porcin. Il s'agit d'un fragment de cartilage prélevé et coupé en deux morceaux qui devraient répondre de façon similaire aux essais. Le fragment supérieur a été mis en culture dans un milieu contenant de la cataboline, puis coloré pour faire apparaître le protéoglycane, dégradé dans une large mesure. Le fragment inférieur a été cultivé dans le même milieu, mais avec adjonction de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de cortisol. Le cortisol a inhibé la dégradation du protéoglycane qui est fortement coloré. Un explant cultivé en milieu exempt de cataboline aurait la même apparence.

et il est vraisemblable que des quantités notables de cataboline ne sont produites dans le corps, que dans des conditions pathologiques, c'est-à-dire dans le cas de maladies arthritiques. On est donc en train d'élaborer un projet visant à en mesurer la production sur des échantillons de synovie prélevés sur les patients par arthroscopie. L'activité catabolique sera mise en corrélation avec l'état de l'articulation (état normal et aux différents stades de modification rhumatoïde) et avec le traitement médical.

Mais notre but principal reste la compréhension des lésions pathologiques, particulièrement dans le domaine des rhumatismes articulaires. Ce but sera sans doute atteint. A plus long terme, nous voulons atteindre la maîtrise de ces lésions. La suppression totale de la production de cataboline n'est toutefois pas souhaitable. A la rigueur, si l'on découvre des récepteurs spécifiques de cataboline sur les chondrocytes, il y aura lieu d'orienter les recherches vers un produit capable de les bloquer.

Quoi qu'il arrive, la découverte de la cataboline a ouvert une voie prometteuse dans l'étude des maladies arthritiques ce qui devrait fortement stimuler les travaux dans ce domaine.