

Métabolisme et activité du 25-hydroxycholécalférol dans les chondrocytes en culture

par Michèle GARABEDIAN, Marie-Thérèse CORVOL, Thi Minh NGUYEN, Sonia BALSAN.

Unité INSERM 30 et Equipe de Recherche CNRS 126,
Hôpital des Enfants Malades 149, rue de Sèvres, 75015 Paris.

Summary. Metabolism and activity of 25-hydroxycholecalciferol in chondrocyte culture.

Chondrocytes isolated from the articular and growth plate cartilage of prepubertal rabbits were grown in culture to study the metabolism of 25-(OH) D₃. A polar derivative of 25-(OH) D₃ was detected by Sephadex LH 20 chromatography of the cell chloroform extracts as early as 15 min after 25-(OH) D₃ addition. This derivative comigrated with synthetic 24,25-(OH)₂D₃ on Sephadex LH 20 and high-pressure liquid chromatographies. Both substances were sensitive to periodate oxydation. The 25-(OH) D₃ cartilage polar derivative as well as the synthetic 24,25-(OH)₂D₃ stimulated the incorporation of ³⁵SO₄ into cells and medium proteoglycans at very low concentrations (3.10⁻¹³ to 3.10⁻¹¹ M). 25-(OH) D₃ was active on the same system ; however, one thousand times higher concentrations (3.10⁻⁹ to 3.10⁻⁸ M) were required to obtain that biological effect. These data suggest the ability of cartilage cells to transform 25-(OH) D₃ into 24,25-(OH)₂D₃ and their possible sensitivity to the action of this dihydroxyderivative.

Le métabolisme du 25-hydroxycholécalférol (25-(OH)D₃) a été étudié *in vivo* tant chez l'homme que chez l'animal. Ces études ont montré que le 25-(OH)D₃ se transforme en 24,25-dihydroxycholécalférol (24,25-(OH)₂D₃) et en 1,25-dihydroxycholécalférol (1,25-(OH)₂D₃) dans le rein (Deluca, 1976). Cependant la présence de 24,25-(OH)₂D₃ dans le sang de sujets anéphriques (tabl. 1) ainsi que la transformation

TABLEAU 1

Concentrations sériques en 25-(OH) D₃ et 24, 25-(OH)₂ D₃ chez l'enfant

	25-(OH) D ₃ ng/ml	24,25-(OH) ₂ D ₃ ng/ml
Enfants normaux (15 cas) ...	19,5 ± 2,6	1,53 ± 0,20
Enfants anéphriques (11 cas)	37,4 ± 5,5	0,83 ± 0,06

Après extraction par un mélange chloroforme-méthanol de 0,5 ml de sérum, les dérivés de la vitamine D contenus dans la phase chloroformique ont été séparés par chromatographie sur gel de Sephadex LH 20. Les concentrations en 25-(OH) D₃ et en 24,25-(OH)₂ D₃ ont été séparément déterminées par liaison compétitive sur une protéine sérique de rat carencé en vitamine D (Preece *et al.*, 1974).

du 25-(OH)D₃ en 24,25-(OH)₂D₃ chez les patients (Gray *et al.*, 1974) et chez les rats néphrectomisés (Garabedian *et al.*, 1974) laissent supposer l'existence d'une 25-(OH)D₃-24-hydroxylase extra-rénale. Cette hydroxylase a été recherchée par l'incubation *in vitro*, en présence de 25-(OH)D₃ tritié, de divers tissus prélevés sur des lapins au sevrage : rein, foie, muscles des membres inférieurs, corticale des diaphyses tibiales et cartilage de croissance et articulaire. Parmi ces tissus, seuls le rein et le cartilage (quel que soit son type), sont capables de transformer le 25-(OH)D₃ en un dérivé migrant dans la région du 24,25-(OH)₂D₃ lors de chromatographie sur gel de Sephadex LH 20 (Garabedian *et al.*, 1976). La présente investigation a été menée pour rechercher si les cellules cartilagineuses en culture possédaient la même capacité que le tissu cartilagineux entier. De plus, ce système de chondrocytes en culture présente l'intérêt de permettre l'étude *in vitro* de l'action de substances sur le métabolisme du cartilage. La publication de travaux sur l'activité *in vitro* de la vitamine D₃ sur le métabolisme du cartilage étant pratiquement inexistante, le système des chondrocytes en culture a donc été utilisé pour tester l'éventuelle action biologique du cholécalférol du 25-(OH)D₃ et du 24,25-(OH)₂D₃. Cet effet a été mesuré par la stimulation de l'incorporation de soufre marqué dans les protéoglycannes sécrétés par les chondrocytes.

Matériel et méthodes.

1. Matériel biologique.

Des chondrocytes ont été isolés à partir de cartilage de croissance de lapin et mis en culture (Corvol, Dumontier et Rappaport, 1975). Après 20 jours de culture, les cellules ont cessé de se multiplier, elles se sont empilées en colonnettes reproduisant la morphologie des chondrocytes de cartilage de croissance *in vivo* et elles synthétisent les protéoglycannes soufrés spécifiques de ce type cellulaire. On peut étudier ainsi sur ces chondrocytes vivants la synthèse protéique globale par la mesure de l'incorporation d'un acide aminé marqué tel la leucine ¹⁴C. La mesure de la synthèse protéique spécifique de ces cellules se fait après incorporation de soufre radioactif dans les cellules. Les protéoglycannes soufrés sont alors isolés et purifiés dans le milieu de culture et dans les chondrocytes.

Des fibroblastes isolés à partir de fragments de peau ont été mis en culture de la même manière.

2. Métabolites de la vitamine D₃.

a) Pour l'étude du métabolisme, le [25,26-³H]25-(OH)D₃ (the Radiochemical Centre, Amersham, England, 10 Ci/mM) a été ajouté au milieu de culture des chondrocytes dans 0,02 ml d'éthanol ;

b) Pour l'étude de l'activité biologique, la vitamine D₃, le 25-(OH)D₃ et le 24,25-(OH)₂D₃ synthétiques ont été ajoutés au milieu de culture dans 0,02 ml d'éthanol en utilisant des concentrations de 10⁻¹⁴ M à 10⁻⁷ M. L'activité de ces produits sur l'augmentation *in vivo* de la calcémie de rats carencés en calcium et en vitamine D a été vérifiée avant l'incubation.

Des quantités suffisantes du dérivé du 25-(OH) D_3 ont pu être produites au cours d'incubation de cartilage. L'activité biologique de ce dérivé a été testée après purification à l'aide des systèmes chromatographiques décrits plus loin et après vérification de sa sensibilité au traitement par le périodate de sodium.

3. Etude du métabolisme.

Les cellules ont été incubées à 37 °C, pendant 15 mn à 6 h, sous 95 p. 100-5 p. 100 Air-CO₂ en présence de 8.10⁻⁹ M de ³H-25-(OH) D_3 . Les cellules ont été récupérées par grattage à la fin de l'incubation, puis lavées du milieu dans du sérum physiologique et homogénéisées. Après extraction dans un mélange chloroforme-méthanol, la phase chloroformique, contenant le 25-(OH) D_3 et ses dérivés solubles dans le chloroforme a été chromatographiée sur Sephadex LH 20 pour en dissocier les constituants. Les comportements chimiques et chromatographiques des éventuels dérivés formés du 25-(OH) D_3 ont été comparés à ceux des dérivés connus de cette molécule : 24,25 et 1,25-dihydroxycholécalficérol, 1,24,25-trihydroxycholécalficérol. Le matériel migrant dans la région du 24,25-(OH) D_3 a été repris et chromatographié sur un appareil Dupont de Nemours, modèle 841, en utilisant une colonne ODS-Permaphase et un gradient d'éluion de 80 à 100 p. 100 de méthanol dans l'eau. La chromatographie en phase liquide à haute pression a été répétée deux fois encore avant l'étude de la sensibilité de ce produit au traitement par le périodate de sodium selon la technique décrite (Knutson et Deluca, 1974).

Résultats.

1. Métabolisme du 25-(OH) D_3 .

Après incubation des chondrocytes, il est possible d'isoler par chromatographie divers dérivés tritiés du 25-(OH) D_3 . L'un des produits de transformation comigre avec du 24,25-dihydroxycholécalficérol synthétique dans deux systèmes de chromatographie :

- le gel de Sephadex LH 20 avec comme éluant un mélange de chloroforme et d'hexane 65 : 35 ;
- la chromatographie en phase liquide à haute pression.

Nous avons vérifié que ce dérivé n'apparaît en aucun cas lorsque le 25-hydroxycholécalficérol est incubé dans le milieu seul, ce qui rend difficile l'hypothèse d'une dégradation du 25-hydroxycholécalficérol en son produit plus polaire pendant l'incubation. De plus, ce produit plus polaire n'apparaît pas lors des incubations du 25-hydroxycholécalficérol en présence de fibroblastes en culture. Dans les chondrocytes, il apparaît dès la 15^e minute d'incubation du 25(OH) D_3 dans les cellules et sa formation atteint un plateau vers la 60^e minute (fig. 1).

La sensibilité de ce dérivé à l'oxydation par le périodate de sodium est comparable (80 p. 100) à celle du 24,25-(OH) D_3 synthétique.

2. Activité des métabolites de la vitamine D.

Une activité biologique du 25-(OH) D_3 peut être mise en évidence sur la synthèse des protéines soufrées spécifiques dans les chondrocytes de lapins en culture. La vita-

mine D_3 ne semble avoir aucune activité dans ce système ; par contre le $24,25-(OH)_2D_3$ synthétique a une activité 100 à 1 000 fois plus grande que le $25-(OH)D_3$. La dose active pour le $24,25-(OH)_2D_3$ se situe entre 0,1 et 10 pg par ml de milieu de culture (tabl. 2). Dans le même système, le produit isolé à partir des incubations de tissu carti-

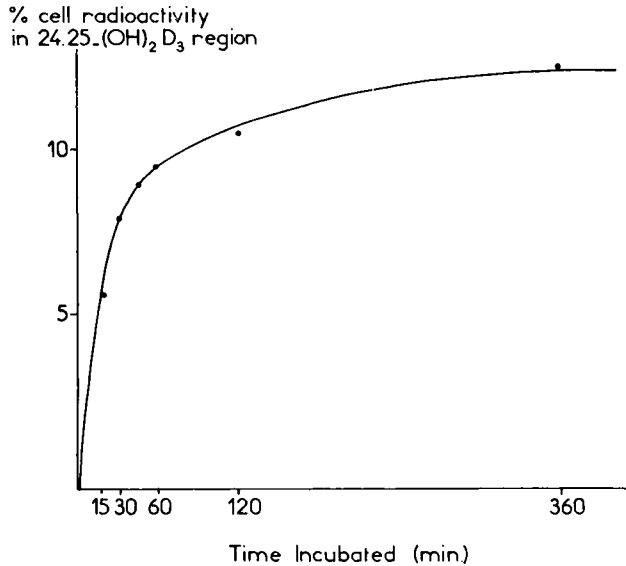


FIG. 1. — Pourcentage de la radioactivité cellulaire migrant dans la région du $24,25-(OH)_2D_3$ en fonction du temps d'incubation (en min.). Les chondrocytes en culture ont été incubés en présence de $[25,26-^3H]$ $25-(OH)D_3$ ($8.10^{-9}M$) pendant 15 à 360 mn. Après extraction des cellules dans un mélange chloroforme-méthanol, la phase chloroformique a été chromatographiée sur gel de Sephadex LH 20.

TABLEAU 2

Effets de la vitamine D_3 et de ses métabolites sur l'incorporation de $^{35}SO_4$ dans la fraction non dialysable du milieu de culture des chondrocytes

Concentrations (Molarité)	Vitamine D_3	$25-(OH)D_3$	$24,25-(OH)_2D_3$	Dérivé du $25-(OH)D_3$ du cartilage
Témoins	3.08 ± 0.18 ⁽¹⁾	2.35 ± 0.24	2.35 ± 0.24	2.35 ± 0.24
2.5×10^{-14}	3.12 ± 0.18	2.44 ± 0.20	2.38 ± 0.18	2.33 ± 0.18
2.5×10^{-13}	—	2.31 ± 0.25	3.63 ± 0.18 **	3.59 ± 0.20 **
2.5×10^{-12}	2.91 ± 0.24	2.50 ± 0.18	3.91 ± 0.20 **	3.93 ± 0.20 ***
2.5×10^{-11}	—	2.52 ± 0.20	3.84 ± 0.17 ***	3.81 ± 0.18 **
2.5×10^{-10}	—	2.50 ± 0.18	2.41 ± 0.20	2.36 ± 0.22
2.5×10^{-9}	2.92 ± 0.18	2.45 ± 0.20	2.52 ± 0.19	2.35 ± 0.20
2.5×10^{-8}	3.05 ± 0.25	3.05 ± 0.20 *	2.45 ± 0.21	2.28 ± 0.24
2.5×10^{-7}	3.07 ± 0.20	2.54 ± 0.19	2.51 ± 0.20	2.32 ± 0.18

(¹) Moyenne \pm SD de 5 flacons de culture, exprimée en dpm $\times 10^{-4}/\mu g$ DNA.

Les valeurs significativement différentes de celles des contrôles sont notées : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

lagineux, possède une activité biologique comparable à celle du 24,25-(OH)₂D₃, bien supérieure à celle du précurseur 25-hydroxycholécalférol.

Discussion.

Ces résultats montrent que les cellules cartilagineuses *in vitro* sont capables de transformer le 25-hydroxycholécalférol en un métabolite plus polaire qui a pu être isolé, en un seul pic, dans deux systèmes de chromatographie. Trois séries de faits arguent en faveur de l'identité de ce produit avec le 24,25-dihydroxycholécalférol :

- un comportement identique dans deux systèmes chromatographiques, maintenant classiques pour les métabolites de la vitamine D ;
- une sensibilité semblable à l'oxydation par le périodate de sodium ;
- une activité biologique comparable sur l'incorporation de soufre marqué dans les protéines soufrées sécrétées par les chondrocytes en culture.

Les cellules du tissu cartilagineux pourraient donc posséder un système enzymatique capable de transformer le 25-(OH)D₃ en 24,25-(OH)₂D₃ et le cartilage serait un des lieux de formation du 24,25-(OH)₂D₃ retrouvé chez les patients anéphriques. Chez ces malades, la présence de quantités circulantes de 24,25-(OH)₂D₃, même faibles, montre que l'activité de la 25-(OH)D₃-24-hydroxylase extra-rénale n'est pas négligeable. Son importance dans le métabolisme de la vitamine D reste cependant à préciser.

Les chondrocytes ne semblent pas être seulement le siège d'une transformation du 25-(OH)D₃, ils sont peut-être aussi un site d'action du dérivé formé. En effet, le 24,25-(OH)₂D₃ possède *in vitro* une grande activité sur la stimulation de l'incorporation du soufre marqué dans les protéoglycannes. Quelle qu'en soit la signification, l'effet *in vitro* du 24,25-(OH)₂D₃ sur le métabolisme des chondrocytes est retrouvé pour des concentrations très faibles de ce métabolite (de l'ordre du picogramme par millilitre de milieu).

Le 25-(OH)D₃ est également actif dans ce système, mais les concentrations requises pour obtenir cet effet sont mille fois plus élevées, de l'ordre du nanogramme par millilitre de milieu. L'observation de sa transformation *in vitro* en un dérivé beaucoup plus actif laisse supposer que cette transformation est un préalable nécessaire à l'activité du 25-(OH)D₃ sur l'incorporation du ³⁵SO₄ dans les protéoglycannes.

Le rôle physiologique du 24,25-(OH)₂D₃ est encore inconnu. Jusqu'à présent, aucun test n'a permis de démontrer une activité du 24,25-(OH)₂D₃ plus grande que celle du 25-(OH)D₃ (Deluca, 1976). L'incorporation du soufre par les chondrocytes *in vitro* pourrait donc fournir un test sensible d'activité biologique pour le 24,25-(OH)₂D₃.

Références

- CORVOL M. T., DUMONTIER M. F., RAPPAPORT R., 1975. Culture of chondrocytes from the proliferative zone of epiphyseal growth plate cartilage from prepubertal rabbits. *Biomedicine*, **23**, 101-107.
- DELUCA H. F., 1976. Recent advances in our understanding of the vitamin D endocrine system. *J. Lab. clin. Med.*, **87**, 7-26.
- GARABEDIAN M., PAVLOVITCH H., FELLOTT C., BALSAN S., 1974. Metabolism of 25-hydroxyvitamin D₃ in anephric rat : a new active metabolite. *Proc. nat. Acad. Sci., USA*, **71**, 554-557.
- GARABEDIAN M., PEZANT E., CORVOL M. T., BAILLY DU BOIS M., BALSAN S., 1976. The cartilage tissue : role in vitamin D metabolism. Abstr. 2nd int. workshop on Calcified Tissues. *Israel J. med. Sci.*, **12**, 22.
- GRAY R. W., WEBER H. P., DOMINGUEZ J. H., LEMANN J., 1974. The metabolism of vitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃ in normal and anephric humans. *J. clin. Endocr. Metab.*, **39**, 1045-1056.
- KNUTSON J. C., DELUCA H. F., 1974. 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase. Subcellular localisation and properties. *Biochemistry*, **13**, 1543-1548.
- PREECE M. A., O'RIORDAN J. L. H., LAWSON D. E. M., KODICEK E., 1974. A competitive protein-binding assay for 25-hydroxycholecalciferol and 25-hydroxyergocalciferol in serum. *Clin. chim. Acta*, **54**, 235-242.
-