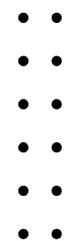




EXPERIMENTATION ANIMALE



Projet Méthotrexate

Alexia LELOIX / François ROBIN / Patricia LEROYER /
Frédéric DERBRE / Olivier LOREAL



Ostéopathie liée au Méthotrexate

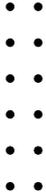
Méthotrexate = traitement médicamenteux utilisé

- Oncologie : doses **élevées** par voie IV pendant plusieurs semaines/mois
- Rhumatologie : doses **faibles** par voie SC/PO en traitement de fond

Activité anti-métabolite avec plusieurs **toxicités connues** (hépatique, hématologique, rénale ou pulmonaire).

Toxicité moins connue = **Atteinte osseuse** en population oncologique et rhumatologique.





Introduction

Triade “Douleurs mécaniques + **Fractures atypiques** + Ostéoporose”

Caractéristiques :

- Traumatismes répétés de basse intensité : “Stress” ou “Fatigue”
- Localisation **aux membres inférieurs** : Tibia distal ++
- **Multiples** / Bilatérales
- Diagnostic par IRM / Scintigraphie

Evolution favorable **après arrêt du MTX.**

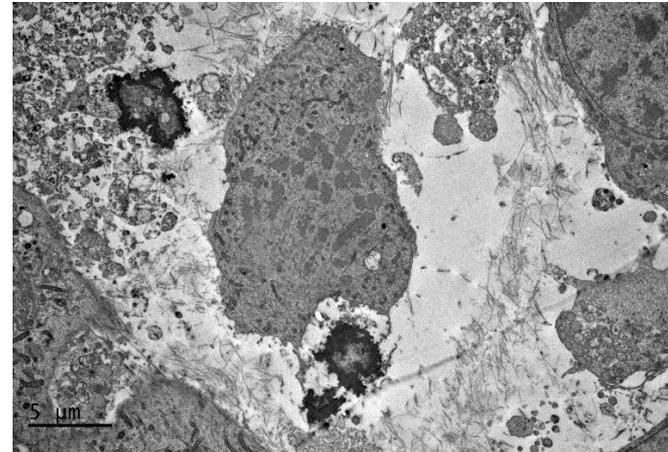
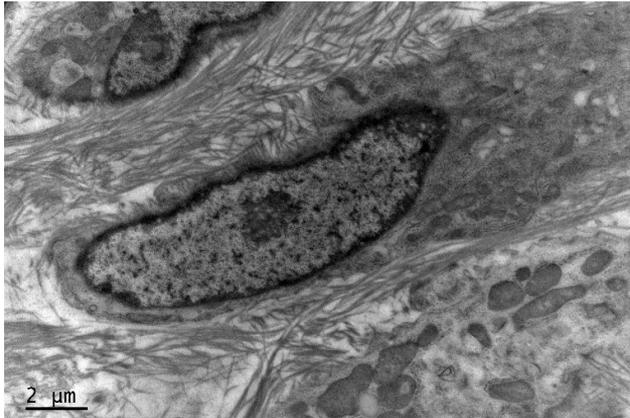


Mécanismes ?



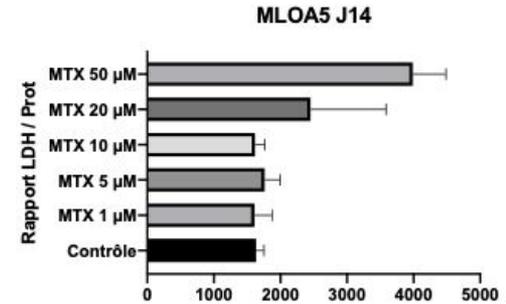
Modèles cellulaires

- Cultures cellulaires de **MC3T3** (ostéoblastes) et **MLOA5** (ostéocytes) responsables de la production de la matrice osseuse.
- Ajout de **Méthotrexate** à doses variables : 1 μM (dose rhumatologique), 10 μM (dose oncologique)



Modèles cellulaires

- • • • • • • • • •
- Absence d'impact négatif significatif sur la **viabilité** cellulaire à dose < 20 μM



- Diminution **quantitative** (uniquement) précoce de la minéralisation

- Diminution **qualitative** de la minéralisation ?



- • • • • • • •

Modèles cellulaires

- Expression de gènes de la minéralisation modifiée plus particulièrement chez MLOA5

Acteurs **positifs** de minéralisation

- Collagène de type 1
- Phosphatase alcaline
- BSP
- PHEX
- DMP1



Acteurs **négatifs** de minéralisation

- Ostéocalcine
- Ostéopontine
- FGF23



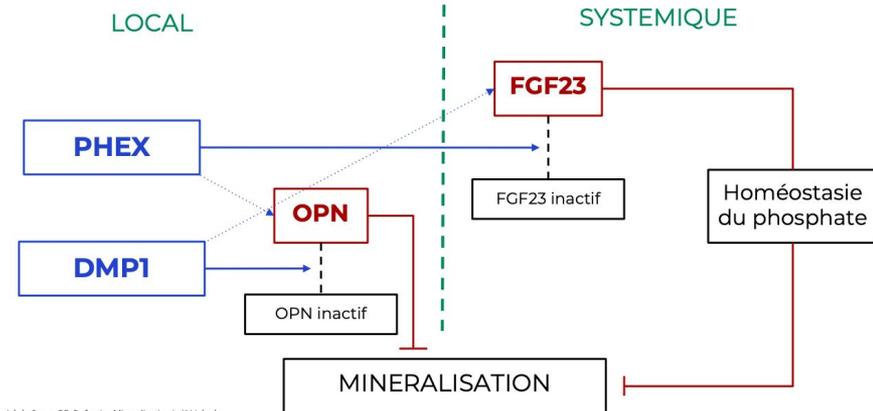
HYPOTHESES

-
-
-
-
-
-
-

Altération **qualitative** de la minéralisation par le MTX par diminution des régulateurs positifs de la minéralisation (PHEX, DMP1) et des composants de la matrice (Phosphatase alcaline, Collagène Type 1) ?

Accumulation des substrats de ces régulateurs :

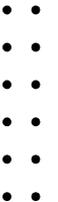
- **FGF23** de manière systémique
- **Ostéopontine (OPN)** dans la matrice





En attente

- MEPE / E11 / SOST
 - Dosage FGF23/OPN dans milieu de culture
 - Immunofluorescence OPN
 - Spectroscopie Raman
 - MEB (microscopie à balayage)
- 
- 



Etude in vivo

Modèle Animal

20 souris mâles **C57BL/6J**.

Hébergement au sein du laboratoire M2S "Mouvement, Sport, Santé" du Campus de Ker Lann / ENS Rennes à Bruz.

9 injections du **02/09 au 28/10** :

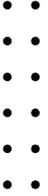
- Injections hebdomadaires à partir de 8 semaines de vie pendant 8 semaines.
- Sacrifice prévu le **06/11**.

10 souris : Méthotrexate (+ PBS) à 3 mg/kg par semaine

10 souris : Solution saline (+ PBS)

Par voie intra-péritonéale





Conditions expérimentales

Cages **individuelles** depuis l'arrivée au laboratoire.

Alimentation **standard et non quantifiée**.

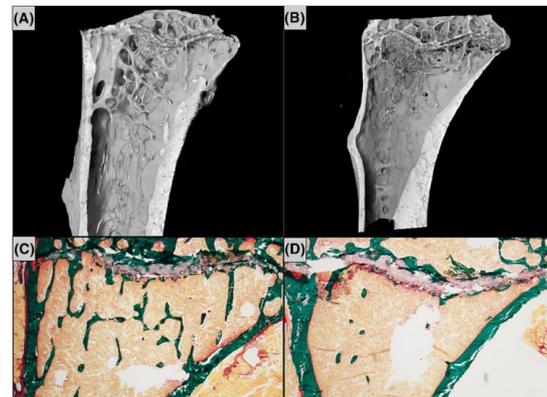
Activité physique **standard et non quantifiée**.



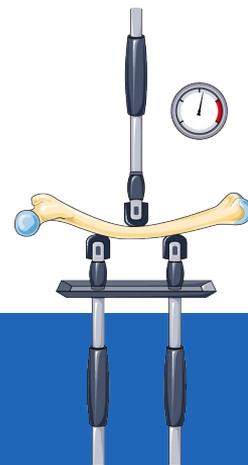
Etude in vivo

Objectifs = étude de l'atteinte osseuse in vivo à dosage rhumatologique

- Etude de la **microarchitecture osseuse** par Micro-CT (Angers, Dr Mabillean)
- Etude **histologique** avec coloration du tissu ostéoïde non minéralisé



- Etude de la **résistance mécanique osseuse** (test des 3 points)
- Dosages sanguins de **FGF23** et OPN



Differences in bone microarchitecture between genetic and secondary iron-overload mouse models. Robin and al, 2023

Échantillons

- Fémur / Tibia / Vertèbre
- Muscles
- Foie / Rate
- Tête et griffe (+/-)
- Ponction intra-cardiaque :
 - Hémoglobine
 - Bilan hépatique : ASAT, ALAT, PAL, GGT
 - Calcium, Phosphate
 - FGF23
 - OPN



Merci pour votre attention !

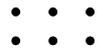


Table I. Effect of MTX on physiological and biological parameters.

	Vehicle	MTX
Body weight (g)	222 ± 4	227 ± 4
SBP (mm Hg)	107 ± 6	110 ± 13
DBP (mm Hg)	72 ± 5	70 ± 10
Heart ate (bpm)	261 ± 12	273 ± 18
Total cholesterol (g/L)	0.99 ± 0.03	0.89 ± 0.05
Triglycerides (g/L)	0.47 ± 0.04	0.48 ± 0.04
Blood glucose (g/L)	1.11 ± 0.04	1.09 ± 0.04
TNF- α (pg/mL)	41.5 ± 5.2	22.3 ± 2.1**
IL-1 β (pg/mL)	102.5 ± 14.5	48.5 ± 4.9**
BMP-4 (pg/mL)	5.19 ± 0.69	8.11 ± 1.46*
Homocysteine (nmol/mL)	1.67 ± 0.25	1.20 ± 0.10

All parameters were measured in AIA rats at day 33 post-immunisation after 21 days of treatment (s.c) with saline (vehicle) or methotrexate (1 mg/kg/week). SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure. Values are expressed as means \pm SEM (n=8 to 15 rats per group), * p <0.05, ** p <0.01,

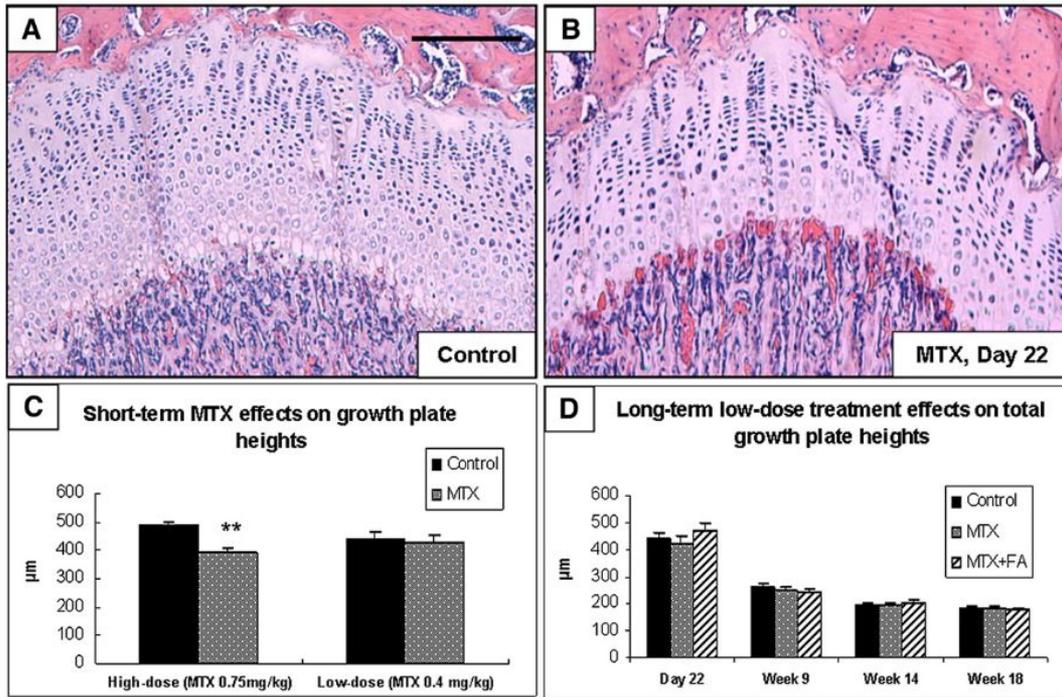
1 mg/kg/sem SC chez rat
Bordy et al, 2019

Table 1. Serum and urine analyses in control and methotrexate-treated nonovariectomized rats*

	Control group (n = 10)	Methotrexate group (n = 11)
Creatinine (μ moles/liter)	42.70 \pm 5.34	46.51 \pm 9.91
Calcium (mmoles/liter)	2.44 \pm 0.09	2.23 \pm 0.13
Phosphorus (mmoles/liter)	1.93 \pm 0.28	1.76 \pm 0.23
Albumin (gm/liter)	31.3 \pm 3.7	27.4 \pm 6.6
PTH (pg/ml)	65.3 \pm 0.7	65.7 \pm 1.0
1,25(OH) ₂ D ₃ (pg/ml)	41.87 \pm 5.40	45.39 \pm 5.11
Urinary calcium (μ moles/day)	24.60 \pm 1.36	26.32 \pm 4.33
Urinary creatinine (μ moles/day)	567.5 \pm 97.8	494.9 \pm 96.2

* Values are the mean \pm SD. PTH = parathyroid hormone; 1,25(OH)₂D₃ = 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

3 mg/kg/sem pdt 16
semaines - rats
May and al, 1994



Fan et al 2019

Fig. 1. Effects of MTX alone or with supplementary folic acid (FA) on total growth plate thickness. H&E staining of growth plate of a normal rat (A) and a rat 22 days after MTX treatment (0.75 mg/kg) (B). Effects on growth plate heights were shown for short-term MTX treatment (C) and long-term low-dose treatment (D). Scale bar in panel A=250 µm and applies to B.