

NAZAIRE MBOUITI

**FACTEURS PLASMATIQUES LIBERES SOUS
L'EFFET DES CRISTAUX D'URATE
MONOSODIQUE**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Microbiologie-Immunologie
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

RHUMATOLOGIE-IMMUNOLOGIE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2008

Résumé

Les cristaux d'UMS sont connus comme agents étiologiques de la goutte et au cours de l'accès goutteux, le neutrophile est une des premières cellules immunitaires à s'accumuler en grand nombre au site inflammatoire dans les cavités articulaires. Durant l'inflammation, le plasma traverse les vaisseaux sanguins et transporte les protéines vers le site enflammé. Plusieurs protéines plasmatiques peuvent alors servir à recruter le neutrophile, comme les composants du complément (C_{5a}), les kinines (bradykinine ou agonistes du récepteur B_1) et bien d'autres. Au début de l'inflammation, initialement les cristaux interagissent probablement avec le plasma et ses protéines recouvrent les cristaux.

Cependant, nous savons que le plasma ayant servi à l'opsonisation des cristaux d'urate monosodique subit des changements conduisant à l'activation du système du complément. Ainsi, les objectifs de ce mémoire étaient de confirmer la libération du facteur C_{5a} et de la bradykinine dans le plasma humain activé par les cristaux d'urate monosodique et de déterminer les effets de ces facteurs plasmatiques sur l'activité du neutrophile.

La chimiotaxie a été étudiée en réponse au plasma activé par les cristaux, mettant en évidence la présence de facteurs du complément, en particulier le C_{5a} qui est majoritairement responsable de cette chimiotaxie. Le plasma activé provoque aussi une mobilisation de calcium par l'intermédiaire du C_{5a} et certainement par d'autres facteurs qui ne sont pas encore identifiés. Les résultats obtenus ont aussi montré que l'agoniste du récepteur B_1 des kinines induisait la migration des neutrophiles.

En revanche, nous n'avons pas réussi à identifier la bradykinine dans le plasma ayant servi à l'opsonisation des cristaux d'UMS.

Les résultats de notre travail serviront de base pour des études subséquentes sur le plasma activé par les cristaux d'UMS.

Avant-Propos

J'aimerais remercier le Dr Marc Pouliot pour m'avoir donné l'opportunité de faire la maîtrise dans son laboratoire sous une atmosphère de support et de fraternité.

Durant l'exécution du projet, il m'a beaucoup donné de liberté tout en préservant la rigueur scientifique. Chaque fois lorsque je rencontrais un problème au cours de l'évolution du projet, il intervenait énergiquement en proposant avec humilité des idées pour me sortir de l'impasse.

J'aimerais remercier chaleureusement Mireille St-Onge qui a été une source de savoir incontournable pour mon projet. Elle était toujours disponible et nous avons travaillé très étroitement pour mon projet.

Je tiens aussi à remercier Andrée-Anne Dusseault qui m'a beaucoup aidé à assimiler certaines techniques de laboratoire. Merci aussi à Cynthia, Annick, Patrick, Jordanne qui m'ont soutenu durant mon projet, témoignant ainsi de la dynamique et l'unité de notre équipe.

Je voudrais remercier entre autre tous les membres de l'équipe du Dr Paul Naccache pour l'entraide qui existe entre nos équipes. Je remercie en particulier la Dre Caroline Gilbert qui m'a aidé respectivement dans la préparation de mon premier séminaire, la conception de certaines manipulations de mes expériences et de son implication dans la correction d'une grande partie de mon mémoire. Elle a été pour moi un guide essentiel.

Table des matières

Résumé du projet.....	i
Avant propos	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux et des figures.....	iv
Abréviations utilisées dans ce mémoire	v
I.Introduction.....	1
1.La goutte.....	1
1.1.Définition.....	1
1.2.Étiologies.....	1
1.3.Manifestations cliniques.....	3
1.3.1.Goutte aiguë	3
1.3.2.Goutte chronique.....	4
1.4.Formation des cristaux d'UMS et les cellules impliquées dans la phase initiale d'une crise de goutte.....	4
2.Le neutrophile.....	5
2.1.Généralités.....	5
2.2.Fonctions principales du neutrophile	7
2.2.1.Migration des neutrophiles.....	7
2.2.2.Réponse du neutrophile aux agents chimiotactiques.....	9
2.2.3.Phagocytose.....	10
2.2.4.Dégranulation.....	10
2.2.5.Explosion oxydative.....	13
3.Interactions entre neutrophile et cristaux d'UMS	13
3.1.Interactions directes.....	13
3.2.Interactions indirectes.....	14
4.Activation du plasma humain par les cristaux d'UMS.....	15
4.1.Le plasma humain	15
4.2.Génération du fragment de complément C _{5a}	16
4.3.Génération de la bradykinine (BK)	19
II.Problématique.....	21
1.Hypothèse.....	21
2.But.....	21
3.Matériels et méthodes.....	21
III.Résultats	25
1. Effet chimiotactique du fragment de complément C _{5a} sur le neutrophile humain	25
2. Détermination de la concentration minimale des cristaux d'UMS susceptible d'activer le plasma.....	26
3. Effet du facteur C _{5a} sur la mobilisation du calcium à l'intérieur du neutrophile.....	27
4. L'activation du récepteur B ₁ de la bradykinine induit la chimiotaxie de neutrophiles humain	27
5. Figures et légende.....	29
IV.Discussion	35
V.Conclusions et perspectives.....	39
VI.Bibliographie.....	41

Liste des tableaux et figures

Schéma 1. Étapes de la migration du leucocyte des vaisseaux sanguins vers le site inflammatoire

Schéma 2. Voies d'activation du système du complément

Figure 1. Effet du plasma activé par les cristaux d'UMS sur la chimiotaxie

Figure 2. Le complément est responsable de la chimiotaxie des neutrophiles

Figure 3. Détermination de la concentration minimale des cristaux d'UMS capable d'activer le plasma humain

Figure 4. Effet du plasma activé par les cristaux d'UMS sur la mobilisation du calcium

Figure 5. Effet du facteur de complément C5a sur la mobilisation du calcium

Figure 6. Effet de l'agoniste du récepteur B₁ sur la chimiotaxie de neutrophiles

Abréviations utilisées dans ce mémoire

ADN	Acide désoxyribonucléique
Apo	Apolipoprotéines
ARN	Acide ribonucléique
BK	Bradykinine
C5a	Fragment 5a du complément
C3bi	Fragment 3bi du complément
CPM	Carboxypeptidase M de la membrane cellulaire
CPN	Carboxypeptidase N plasmatique
fMLP	formyl Methionine-Leucine-Phenylalanine
G-CSF	Granulocyte- colony- stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HBSS	Solution saline balancée de Hank
ICAM	Molécule d'adhésion intercellulaire
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
KHPM	Kininogène de haut poids moléculaire
KBPM	Kininogène de bas poids moléculaire
KD	Kallidine
LPS	Lipopolysaccharides
LTB4	Leucotriene B ₄
MIP	Macrophage inflammatory protein
MRP	Myeloid Related Proteins
PAF	Platelet-activating factor
PGE2	Prostaglandine E ₂
PKC	Protéine kinase C
PLA	Phospholipase A
PMA	Phorbol myristate acétate
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand 1
TCR	Récepteur des cellules T
TNF	Tumor necrosis factor
UMS	Urate monosodique
VCAM	Molécule d'adhésion des cellules vasculaires

I. Introduction

1 . LA GOUTTE

1.1. Définition

La goutte est une maladie inflammatoire caractérisée par une augmentation d'acide urique dans le sang, appelée hyper uricémie (chez les hommes: >70mg/L et chez les femmes : >60 mg/L).

Cette hyper uricémie peut aboutir à des précipitations uraciques sous forme de cristaux d'urate de sodium (UMS), d'abord dans les articulations responsable d'une réaction inflammatoire aiguë ou crise de goutte puis à terme, dans les tissus mous et le rein, entraînant la goutte chronique.

1.2. Étiologies

Le dépôt rapide de l'acide urique sous forme de cristaux d'UMS à l'intérieur des articulations d'une part et dans les tissus mous d'autre part, est la cause principale du déclenchement et du développement de la goutte. L'acide urique est une substance issue de la dégradation des purines et ne possède pas de rôle physiologique particulier. L'espèce humaine est dépourvue d'enzyme de dégradation de l'acide urique (uricase) et présente d'énormes difficultés pour maintenir l'équilibre sérique de l'acide urique [1],[2].

L'alimentation du « pool » d'acide urique s'effectue suivant trois voies d'entrée: le catabolisme des acides nucléiques cellulaires, la dégradation des acides nucléiques alimentaires et la purinosynthèse dite « *de novo* » au niveau du foie qui se fait à partir de ribose-5-phosphate. L'acide urique formé est éliminé principalement par les reins dans les urines.

La filtration glomérulaire rénale, puis la réabsorption tubulaire proximale et la sécrétion tubulaire distale de l'acide urique représentent 2/3 de l'urico-élimination. Pour un régime normal, la quantité d'urate éliminé par 24 heures est d'environ 4/5 (soit 800 mg).

Quant à l'uricolyse intestinale, elle prend en charge le 1/5 (soit 200 mg) restant [3].

L'augmentation de l'uricémie coïncide avec la puberté chez l'homme et avec la ménopause chez la femme. C'est pourquoi la goutte est rare chez l'homme de moins de 30 ans et chez la femme pré-ménopausique.

L'hyper uricémie joue donc un rôle majeur dans la physiopathologie de la goutte, mais ne conduit pas inévitablement à la maladie.

L'ambiguïté entre l'hyper uricémie et la goutte s'explique par l'implication de facteurs capables de moduler la cristallisation de l'urate de sodium, d'une part en l'inhibant, et

d'autre part, en la favorisant. Par exemple, les facteurs génétiques et environnementaux entraînent une hyperuricémie et une goutte en diminuant l'excrétion de l'acide urique et/ou en augmentant sa production. Plus de 75 % des goutteux présentent un défaut génétique d'excrétion fractionnelle d'urate, ce qui entraîne une incapacité à augmenter l'excrétion d'acide urique en réponse à une charge en purines [4, 5].

La production accrue d'acide urique est, au moins en partie, responsable de l'hyperuricémie de 20-25% des goutteux. En l'absence d'atteinte rénale significative, ces patients produisent de façon accrue de l'acide urique. Les déficits enzymatiques spécifiques représentent environ 2 % des cas et doivent être suspectés en cas de présentation atypique.

Les facteurs impliqués dans la précipitation des cristaux d'UMS dans l'articulation et les raisons pour lesquelles les cristaux se déposent préférentiellement dans les jointures sont complexes et encore imparfaitement compris.

Cependant, la saturation du liquide synovial en urate monosodique est une condition nécessaire, mais pas suffisante, au développement d'une crise de goutte. Certaines substances spécifiques contenues dans le liquide synovial pourraient favoriser la formation des cristaux d'UMS.

Ainsi, les gammaglobulines et le collagène de type I induisent la cristallisation de l'urate monosodique « *in vitro* » [6, 7]. Les endroits les plus souvent concernés, comme la synoviale, le cartilage, les tendons, la peau et le tissu interstitiel rénal, sont particulièrement riches en tissu conjonctif, ce qui suggère l'intervention de certaines protéines de la matrice extra-cellulaire comme le collagène de type I dans les mécanismes de cristallisation. La température locale basse, la présence de protéoglycanes, une diminution du pH, un traumatisme et l'âge sont d'autres facteurs pouvant influencer le dépôt des cristaux d'UMS [8].

1.3. Manifestations cliniques

La goutte est décrite comme une maladie hétérogène, en quatre phases cliniques, si elle n'est pas traitée convenablement : 1. Hyperuricémie asymptomatique : le taux sérique d'acide urique élevé sans symptômes ; 2. arthrite goutteuse aiguë ; 3. période inter-critique :

période entre les crises aiguës; 4. goutte chronique tophacée: développement synovial, sous-cutané, et sous-chondral de dépôts des UMS.

1.3.1. Goutte aiguë

Les manifestations précoces de l'arthrite goutteuse aiguë sont essentiellement monoarticulaires. L'articulation métatarso-phalangienne (gros orteil) est la première articulation atteinte chez plus de 50 % des patients.

Les articulations des membres inférieurs sont plus souvent touchées que celles des membres supérieurs.

La crise de goutte débute le plus souvent en fin de nuit, réveillant le patient.

Ainsi, l'articulation touchée est extrêmement douloureuse, chaude, rouge et gonflée (quatre points cardinaux de l'inflammation aiguë). L'érythème et le gonflement péri-articulaire peuvent diffuser localement. Une crise goutteuse peut également survenir dans un site non articulaire comme la bourse olécranienne, la bourse pré-patellaire ou le long du tendon d'Achille.

Si elle n'est pas traitée, la crise se resorbe spontanément en 3 à 10 jours. Une desquamation cutanée en regard de l'articulation touchée signe souvent la résolution de la crise. Un traumatisme, une consommation excessive d'alcool, une infection, une intervention chirurgicale, l'initiation d'un traitement hypo-uricémiant ou encore la prise d'un médicament hyper-uricémiant, restent les facteurs déclenchant souvent décelés [9].

1.3.2. Goutte chronique

La goutte chronique est caractérisée par le développement de nodules de cristaux uratiques (tophi) enchâssés dans une matrice constituée de lipides, de protéines et de débris calciques. Ces nodules prennent le nom de « *tophi* ». Ces tophi surviennent très souvent après dix à trente années chez les patients dont la maladie a été incorrectement prise en charge.

On peut les retrouver dans les tissus des organes comme le cœur, l'œil, l'oreille; mais aussi dans l'anthélix, la bourse olécranienne, les bourses séreuses du genou, la face dorsale des articulations métacarpo-phalangiennes et le tendon d'Achille [10, 11]. Il n'y a pas de

réaction inflammatoire au niveau des tophi. Ils sont indolores sauf en cas de compression nerveuse. Les tophi peuvent s'ulcérer à la peau, laissant un matériel crayeux jaunâtre. En cas d'atteinte ostéoarticulaire, on parle alors «d'arthropathie uratique». Dans les stades avancés de la goutte, les dépôts des cristaux d'UMS au niveau des épiphyses osseuses finissent par produire des déformations permanentes avec réduction de mouvements articulaires [12].

1.4. Formation des cristaux d'UMS et les cellules impliquées à la phase initiale d'une crise de goutte

L'hypersaturation du liquide synovial en cristaux d'UMS est une condition nécessaire, mais non suffisante, au développement d'une crise de goutte car il y a certains facteurs tels que la température locale et le pH qui sont aussi capable d'influencer le dépôt intra-articulaire des cristaux d'UMS [13].

La présence des débris dans la cavité synoviale peut fournir un premier noyau nécessaire au développement précoce des cristaux d'UMS [14]. En outre, la formation de noyau des cristaux d'UMS pourrait être stabilisée par l'albumine et l'immunoglobuline deux protéines abondantes dans le liquide synovial en situation de crise de goutte [14, 15].

Ainsi, la nature et la quantité des protéines couvrant les cristaux pourraient affecter leur capacité à induire une réaction aiguë.

Les propriétés phlogistiques des cristaux sont influencées par les propriétés physiques des protéines adsorbées à leur surface. Les cristaux recouverts par des IgG sont les plus susceptibles d'induire une puissante réaction inflammatoire alors que, inversement, les cristaux adsorbés par des apolipoprotéines A (apo A) sont peu inflammatoires [16, 17]. La réaction inflammatoire commence avec l'activation, par les cristaux eux-mêmes, des synoviocytes (macrophages et fibroblastes), qui relâchent des facteurs pro-inflammatoires, dont font partie des cytokines comme l'Il-1 β et le TNF α . Les facteurs inflammatoires activent les cellules endothéliales pour favoriser l'afflux de leucocytes, essentiellement des neutrophiles.

Des études antérieures ont montré qu'un examen histologique de la membrane synoviale d'un patient souffrant de la goutte aiguë, montre une infiltration préférentielle des

neutrophiles [18]. Le dépôt des cristaux d'UMS dans la cavité articulaire et leur interaction avec les neutrophiles joueraient un rôle déterminant dans le développement de la goutte [19].

De plus, il a été proposé par Phelps et son équipe qu'une arthrite expérimentale provoquée par les cristaux d'UMS chez le chien est nettement supprimée après élimination des neutrophiles par injection d'anticorps anti-polymorphonucléaires leucocytes [20].

2 . LE NEUTROPHILE

2.1. Généralités

Le neutrophile est une cellule importante de l'immunité innée. C'est un granulocyte comme les basophiles et les éosinophiles. Il représente 50% à 70% des leucocytes dans le sang et c'est le type leucocytaire le plus abondant dans la circulation sanguine. Comme granulocytes, les neutrophiles représentent à eux seul plus de 95% de cette population cellulaire, par rapport aux éosinophiles et basophiles, qui eux représentent respectivement 4% et 1% des granulocytes.

Plus de 100 milliards de neutrophiles entrent et quittent la circulation sanguine chaque jour. Les neutrophiles en circulation et en périphérie ont une durée de vie relativement courte.

Une fois passés de la moelle osseuse à la circulation sanguine, ils patrouillent environ 7 à 12 heures. Par contre, dans un contexte inflammatoire, ils peuvent survivre jusqu'à quelques jours afin d'accomplir leur fonction [86].

En effet, le neutrophile est formé dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche hématopoïétique. Cette cellule souche se différencie et devient une cellule progénitrice myéloïde, grâce aux facteurs de croissance présents dans le milieu (GM-CSF et G-CSF). Sa différenciation aboutie à la formation des monocytes, des macrophages et des neutrophiles [21].

La présence simultanée de GM-CSF (Granulocyte-Macrophage-Colony- Stimulating Factor) et d'interleukine-3 (IL-3) favorise la différenciation de la lignée myéloïde et l'addition d'interleukine-6 (IL-6) conduit la cascade jusqu'au progéniteur des granulocytes/macrophages.

En présence de GM-CSF et G-CSF, la cellule progénitrice subit quelques étapes de maturation supplémentaires pour finalement donner un neutrophile prêt à passer dans la circulation sanguine et à défendre l'organisme [21]. Il faut noter qu'à chaque étape de la différenciation du neutrophile, il a acquis successivement différents types de granules, que sont les granules azurophiles, spécifiques, gélatinase, puis dans le neutrophile mature, les vésicules de sécrétion. Chaque type de granule contient des protéines particulières, qui sont spécialisées dans ses fonctions effectrices. Au cours de son activation, le neutrophile va mobiliser de façon contrôlée ses différents types de granules spécialisés dans un type de réponse.

Lors d'une inflammation, plusieurs cellules immunitaires convergent vers la partie lésée où chacune d'elles joue un rôle spécifique. Le neutrophile est le premier leucocyte à s'accumuler en grand nombre au niveau du site inflammatoire ; il participe ainsi dans l'évolution de la réponse immunitaire initiale en phagocytant les agents infectieux et en libérant des médiateurs tels que l'IL-8, l'IL-1, le MIP-1 α

[22, 23], des formes réactives de l'oxygène ainsi que les agents cytolytiques contenus dans les granules. Une réponse adéquate du neutrophile est nécessaire pour résoudre rapidement l'inflammation.

Cependant, une réaction exacerbée peut être la cause du développement des maladies auto-immunes et inflammatoires, telles que diverses formes d'arthrite, dont l'arthrite goutteuse.

Dans ces différentes maladies, les produits sécrétés par le neutrophile pour combattre l'inflammation, deviennent des substances nuisibles pouvant causer des dommages aux tissus environnants et engendrer une réponse excessive [24].

2.2. Fonctions principales du neutrophile

Le neutrophile est connu pour sa rapidité à se rendre au site inflammatoire, où ses principales fonctions de défense sont la phagocytose, la dégranulation et l'explosion oxydative.

Le neutrophile assure une réponse efficace dans les premières heures du traumatisme et relâche des cytokines, des chimiokines, des médiateurs lipidiques et des « Myeloid Related Proteins » (MRP) [22], [25, 26].

Les messagers relâchés serviront à activer diverses cellules, favorisant l'expression des molécules et les récepteurs spécifiques, jouant un rôle important dans la résolution de l'inflammation.

2.2.1. Migration des neutrophiles

La migration des neutrophiles vers le site inflammatoire commence par leur passage à travers une barrière de cellules endothéliales. Cette migration trans-endothéliale s'effectue en quatre étapes successives : La capture, le roulement, l'adhésion cellulaire et la diapédèse.

Suite à la capture, la vitesse du neutrophile diminue de $4000\mu/\text{sec}$ à $40\mu/\text{sec}$ et commence à rouler. Ceci est rendu possible grâce à des molécules de la famille des sélectines (P et E selectines présentent à la surface des neutrophiles) et à leur ligand (PSGL-1, présent à la surface des cellules endothéliales).

Les neutrophiles et les cellules endothéliales interagissent faiblement et de manière réversible. Pendant le roulement, si les neutrophiles entrent en contact avec des produits bactériens tels que les peptides formylés (fMLP), lipopolysaccharides (LPS) ou bien d'autres produits pro-inflammatoires tels que le leucotriène B₄ (LTB₄) l'interleukine-8 (IL-8), le facteur du complément C_{5a} (le C_{5a}); ils s'activent : c'est la deuxième étape de la migration [21 , 86].

Après l'activation, les neutrophiles et les cellules endothéliales expriment à leur surface, de nouvelles molécules, respectivement les intégrines et les molécules de la superfamille des immunoglobulines.

Ainsi, lorsque par exemple LFA-1 (*Leucocyte Function associated Antigen*) se lie à son ligand ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule*), le leucocyte se fixe fermement à la paroi du vaisseau sanguin: c'est l'adhésion ferme (l'étape 3 de la migration). Enfin, les neutrophiles réorganisent leur cytosquelette pour passer à travers la couche de cellules endothéliales, guidé par un gradient de concentration de chimioattractant (LTB₄, C_{5a}, IL-8, fMLP) : c'est la migration transendothéliale ou la diapédèse [86].

Le schéma ci-dessous illustre les étapes de la migration du leucocyte.

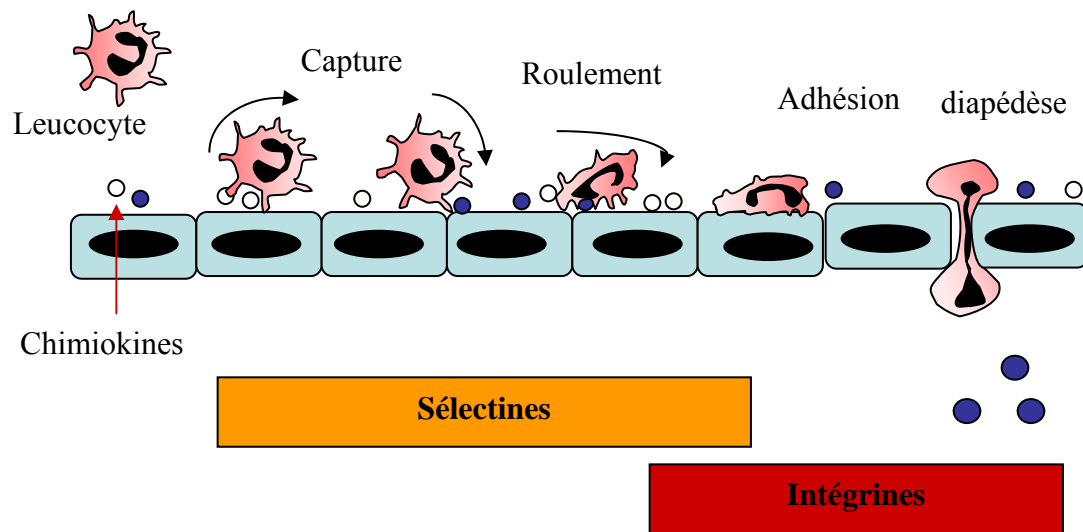


Schéma 1. Étapes de la migration du leucocyte des vaisseaux sanguins vers le site inflammatoire.

(Muller, W.A. and G.J. Randolph, Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukoc Biol*, 1999. 66(5): p. 698-704).

2.2.2. Réponse du neutrophile aux agents chimiotactiques

Une fois parvenu dans l'espace sous-endothélial, les neutrophiles poursuivent leur migration à travers le tissu. Cette migration est guidée par l'existence d'un gradient de chimiokines interstitiel. À partir d'un site de production, qui correspond en général à une cellule immunitaire activée, les chimiokines diffusent dans le tissu interstitiel.

Mais, cette diffusion est vite limitée par la fixation des chimiokines sur la matrice extracellulaire. La concentration des chimiokines fixées à cette matrice est d'autant plus élevée que l'on se trouve à proximité du site de production. Le leucocyte est capable de reconnaître ce gradient et de migrer par étapes successives jusqu'au site de production de la chimiokine. Ceci définit le chimiotactisme.

Ainsi, les neutrophiles sont donc attirés au site inflammatoire par des facteurs du complément tels que le C_{5a} , des peptides bactériens (fMLP), des chimiokines (IL-8, Nap2) [27] des médiateurs lipidiques (PAF, LTB_4) ou encore des MRP [28, 29].

En plus d'orienter la cellule, ces signaux serviront à augmenter l'adhésion cellulaire, provoquer l'expression de récepteurs et de protéines nécessaires à l'activation cellulaire et dans certains cas, à retarder l'apoptose [30, 31].

Parmi ces substances, l'IL-8 et le LTB₄ représentent les signaux intermédiaires, c'est-à-dire ceux qui ne se retrouvent pas directement au site inflammatoire mais qui seront produits par des cellules de l'hôte pour attirer des cellules effectrices, tandis que le fMLP et le C_{5a} représentent les agents terminaux, c'est-à-dire ceux retrouvés au site inflammatoire [32]. Les neutrophiles migrent de façon préférentielle vers des agents terminaux plutôt que les agents intermédiaires, permettant ainsi de continuer à s'orienter vers le site inflammatoire malgré la présence de plusieurs agents chimiotactiques dans le milieu. Le C_{5a} et le fMLP désensibilisent la mobilisation de calcium en réponse à l'IL-8 [33]-[34]. En outre, une migration préférentielle a été observée en réponse au fMLP et C_{5a} par rapport à l'IL-8 et le LTB₄ [35, 36].

2.2.3. Phagocytose

La phagocytose consiste en l'ingestion et la digestion des débris cellulaires, virus et les bactéries par des cellules. Les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes, les monocytes, les éosinophiles, les basophiles, les lymphocytes B, les ostéoblastes, les fibroblastes et les neutrophiles en sont capables.

Les cellules phagocytaires font partie de la réponse non-spécifique aux infections. Les macrophages se servent aussi de cette capacité afin d'éliminer les cellules en apoptose.

La liaison entre le phagocyte et sa cible peut se faire directement avec les lipopolysaccharides (LPS) provenant des bactéries Gram négatif par le CD14, les molécules d'adhésion ou indirectement par l'intermédiaire d'anticorps et du complément qui servent à opsoniser les particules. La phagocytose implique généralement une interaction entre les deux types de réponse du système immunitaire: les réponses innée et acquise. Les particules sont recouvertes de compléments tel que le facteur C_{3bi} ou d'anticorps (par exemple IgG) facilitant leur ingestion par les phagocytes.

Les neutrophiles phagocytent les particules enrobées d'IgG en fixant les parties Fc de ces anticorps, grâce aux récepteurs Fc γ localisés à sa surface [37]-[38]. Le même phénomène se

produit pour les particules opsonisées par les facteurs du complément (par exemple C3b_i), car le phagocyte possède également les récepteurs liant ces facteurs.

Une fois que le corps à détruire se trouve à l'intérieur du phagosome, des granules contenant des enzymes de dégradation viennent se fusionner à celui-ci, afin de dégrader complètement son contenu [40-41].

2.2.4. Dégranulation

Selon leur contenu, les granules du neutrophile sont classés en quatre types : les granules azurophiles, encore appelés granules primaires, sont rarement secrétés à l'extérieur de la cellule, puisqu'ils fusionnent plutôt avec le phagosome afin de détruire les microorganismes ou autres corps étrangers (cristaux d'UMS par exemple) ingérés.

Ils les détruisent à l'aide de la myéloperoxydase, des élastases, des défensines, des lysosymes et de l'azurocidine qu'ils contiennent [39, 40].

Les autres granules sont dits spécifiques (ou secondaires). Ces granules ne contiennent pas de myéloperoxydase, mais sont riches en substances antimicrobiennes, libérées dans le milieu extracellulaire beaucoup plus facilement que les substances des azurophiles [40, 41].

Les granules gélatinases ou granules tertiaires et les vésicules sécrétoires apparaissent un peu plus tard, voir à la fin de la maturation du neutrophile [39]. Les gélatinases entreposent les enzymes servant à la dégradation de la matrice extracellulaire tout en étant une réserve de récepteurs membranaires utiles à la surface pour la diapédèse du neutrophile. Ces granules sont donc d'une grande importance pour une migration efficace vers le site inflammatoire.

Enfin, les vésicules sécrétoires, les premières à être libérées en réponse à des stimuli inflammatoires, possèdent une variété de récepteurs membranaires nécessaires aux étapes précoces d'activation du neutrophile et à l'adhésion ferme sur l'endothélium activé, comme la β_2 -intégrine, le récepteur du fMLP, du LPS (CD14) et le récepteur Fc γ III [40].

Tableau 1 : Composants des granules du neutrophile

Azurophil granules	Specific granules	Gelatinase granules	Secretory vesicles
Membrane	Membrane	Membrane	Membrane
CD63	CD11b	CD11b	Alkaline phosphatase
CD68	Cd15 antigens	Cytochrome b ₅₅₈	CR1
V-type H ⁺ -ATPase	CD66	Diacylglycerol-deacylating enzyme	Cytochrome b ₂₂₀
	CD67	FMLP-R	CD11b
	Cytochrome b ₅₅₈	SCAMP	CD14
	FMLP-R	Urokinase-type plasminogen activator-R	CD16 ^a
	Fibronectin-R	VAMP-2	FMLP-R
	G-protein subunit	V-type H ⁺ -ATPase	SCAMP
	Laminin-R		Urokinase-type plasminogen activator-R
	NB-1 antigen		V-type H ⁺ -ATPase
	19-kd protein		VAMP-2
	155-kd protein		CD10, CD13, CD45 ^a
	Rap1, Rap2		C1q-receptor ^a
	SCAMP		DAF ^a
	Thrombospondin-R		
	TNF-R		
	Urokinase-type plasminogen activator-R		
	VAMP-2		
	Vitronectin-R		
Matrix	Matrix	Matrix	Matrix
Acid β-glycerophosphatase	β ₂ -Microglobulin	Acetyltransferase	Plasma proteins (including albumin and tetranectin)
Acid mucopolysaccharide	Collagenase	β ₂ -Microglobulin	
α ₁ -Antitrypsin	Gelatinase	Gelatinase	
α-Mannosidase	hCAP-18	Lysozyme	
Azurocidin/CAP37/heparin-binding protein	Histaminase		
Bactericidal permeability increasing protein	Heparanase		
β-Glycerophosphatase	Lactoferrin		
β-Glucuronidase	Lysozyme		
Cathepsins	NGAL		
Defensins	Urokinase-type plasminogen activator		
Elastase	Sialidase		
Lysozyme	SGP28		
Myeloperoxidase	Vitamin B ₁₂ -binding protein		
N-acetyl-β-glucosaminidase			
Proteinase-3			
Sialidase			
Ubiquitin-protein			

^aThis localization is based on kinetics of upregulation in response to stimulation with inflammatory mediators but has not yet been demonstrated by subcellular localization by immunocytochemistry.

Tiré du livre *Inflammation : Basic principles and clinical correlates*, 3e édition, par John I. Gallin et Ralph Snyderman, 1999, chapitre 2, page19

2.2.5. Explosion oxydative

Pour éliminer les pathogènes ou certains corps étrangers, les neutrophiles produisent entre autre des formes réactives de l'oxygène à partir des anions superoxydes. Ces anions sont produits par le complexe multimérique de la NADPH oxydase, qui est localisé à la membrane cytoplasmique ou à la membrane du phagosome où ils sont libérés.

Ainsi, les ions peuvent à la fois agir à l'extérieur du neutrophile comme à l'intérieur du phagosome, puisque la face externe de la membrane plasmique se retrouve à l'intérieur du phagosome lors de l'invagination phagocytaire. L'anion superoxyde est le précurseur de plusieurs autres formes de l'oxygène fortement réactives et plus toxiques pour le pathogène: le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH) et l'oxygène singulet (O_2). Le peroxyde d'hydrogène peut être transformé en acide hypochloreux (HOCl), un composé bactéricide très ressemblant à l'eau de Javel, par la myéloperoxydase libérée dans le phagosome [42, 43]. Si ces produits sont libérés de manière exagérée dans le milieu extracellulaire, ils peuvent engendrer des dommages tissulaires provoqués par la peroxydation lipidique, causant ainsi une désorganisation membranaire [43].

3. Interactions entre neutrophiles et cristaux

3.1. Interactions directes

Le dépôt des cristaux d'UMS dans les cavités articulaires va activer via les récepteurs « *Toll-like* » [44] les cellules déjà présentes, telles que les mastocytes, les monocytes, les macrophages, etc. L'interaction des cristaux d'UMS avec ces cellules impliquées dans l'immunité innée et en particulier avec les neutrophiles, amplifie la réaction inflammatoire au cours d'une crise de goutte, associée à la libération des molécules pro-inflammatoires comme le $TNF\alpha$, l'IL-1, l'IL-8 [45].

Cette interaction peut avoir lieu avec les cristaux d'UMS nus ou bien avec des cristaux recouverts par diverses protéines plasmatiques, les immunoglobulines en majorité les IgG, le fragment du complément C_{3bi} et le fibrinogène [46-48].

Le mécanisme de ces interactions (surtout avec les cristaux nus) se fait principalement par la formation des liaisons hydrogène entre les cristaux et les phospholipides présents à la membrane cellulaire et la rupture de ces liaisons favoriserait la lyse de la membrane cytoplasmique, conduisant à la dégranulation cellulaire et même à la mort de la cellule.

Il a été aussi proposé que cette interaction avec les neutrophiles activés peut se faire directement grâce à des récepteurs spécifiques exprimés à leur surface [45], tels que le récepteur Fc γ RIII (CD16) qui reconnaît et lie les IgG enrobant les cristaux d'UMS ou les cristaux d'UMS non enrobés. Le récepteur permettant l'interaction des neutrophiles avec des cristaux d'UMS est resté inconnu jusqu'à ce que l'utilisation d'anticorps bloquants suggèrent une implication du CD16b et une participation du complexe CD11b/CD18 [49]. Les conséquences de l'interaction des neutrophiles avec les cristaux sont la synthèse et la libération des médiateurs tels que la PGE₂ [50], le LTB₄ [51], l'IL-1 [52] et l'L-8 [53], qui eux sont promoteurs de la vasodilatation, d'œdème et de douleur. Les cristaux d'UMS phagocytés par les neutrophiles à l'issue de cette interaction peuvent aussi perforer les vacuoles et libérer ainsi les protéases et d'autres constituants lysosomaux dans le cytosol, provoquant par la suite la mort de la cellule et peuvent amplifier l'inflammation [47].

Malgré ces réponses fortes et variées, seule une faible proportion (15%) de neutrophiles phagocytent les cristaux d'UMS dans les mêmes temps et cette proportion n'augmente qu'à 40-50% après 30-60 minutes d'incubation avec les cristaux d'UMS [54].

3.2. Interactions indirectes

D'une façon générale, dans le milieu biologique, les cristaux d'UMS sont opsonisés, c'est-à-dire recouverts de substances très variées.

Par exemple, durant la crise de goutte, la plus grande partie des cristaux d'UMS sont recouverts par des protéines plasmatiques, des immunoglobulines (en particulier les IgG), les fragments du complément et le fibrinogène [48].

Ainsi, lorsque les IgG se fixent sur les cristaux d'UMS, ils favorisent une très forte activation des neutrophiles qui reconnaissent et phagocytent les cristaux conduisant par la suite à une vive réaction inflammatoire.

En effet, d'autres cellules telles que les monocytes peuvent aussi phagocyter les cristaux d'UMS et provoquer la production de $\text{TNF-}\alpha$, d' $\text{IL-1}\alpha$ et d' IL-8 , alors que la phagocytose des cristaux d'UMS par les macrophages n'engendre pas de production d'agents pro-inflammatoires mais plutôt du $\text{TGF-}\beta$ qui inhibe le recrutement cellulaire provoqué par les cristaux d'UMS dans un modèle de poche d'air de rat [54].

De plus, durant l'évolution de l'inflammation, l'accumulation des IgG diminue au profit de celle des apolipoprotéines E et B sur les cristaux d'UMS: celles-ci bloquent l'interaction des neutrophiles avec les cristaux et favorisent la résolution de la crise de goutte [16]. L'auto-résolution de la crise de goutte se poursuit aussi grâce à la phagocytose et l'élimination par les macrophages des neutrophiles apoptotiques [54].

4. Activation du plasma humain par les cristaux d'UMS

4.1. Le plasma humain

Le plasma est une composante du sang, un surnageant jaunâtre que l'on observe après une centrifugation du sang total. Il sert à transporter les cellules sanguines et les hormones à travers le corps. Le plasma est composé de 90% d'eau et d'environ 10% d'une grande variété de solutés, tels que les sels minéraux, les gaz respiratoires, les substances organiques et les protéines.

Les protéines plasmatiques constituent un groupe très hétérogène, pouvant servir à l'opsonisation. Certaines protéines ont été retrouvées sur les cristaux d'UMS présents dans le liquide synovial de patient goutteux. On compte environ 300 différentes protéines contenues dans le plasma humain; mais les plus représentées en proportion sont: l'albumine (protéine majoritaire), les anticorps (essentiellement les IgG), la fibrinogène, les facteurs du complément dont le C_{5a} , les globulines, la transferrine et les lipoprotéines.

Outre le transport des molécules, les protéines plasmatiques assurent aussi le maintien de la pression oncotique (pression osmotique causée par les protéines) dans les vaisseaux sanguins, la coagulation sanguine et la défense immunitaire humorale.

L'augmentation de la perméabilité vasculaire, suite à la libération des médiateurs lipidiques et protéiques, favorise le passage des molécules plasmatiques vers le site inflammatoire, favorisant ainsi l'opsonisation des cristaux d'UMS par les protéines.

Mais, durant l'évolution de la réaction inflammatoire les molécules pro-inflammatoires contenues dans le plasma diminuent au profit des protéines plasmatiques anti-inflammatoires telles que les apolipoprotéines E, B, A et le TGF- β , qui elles vont donc favoriser la résolution de l'inflammation [54, 55].

Au cours d'une crise de goutte, le déclenchement et le développement de cette inflammation est causée non seulement par des médiateurs libérés par les neutrophiles, mais c'est aussi une conséquence de l'interaction entre les cristaux d'UMS et les protéines plasmatiques.

Par ailleurs, au contact du plasma ou du liquide synovial, les cristaux d'UMS ont aussi la capacité de déclencher la biosynthèse de fragments du complément (tels que le C_{5a} et C_{3a}) [56-58], de la bradykinine [59].

4.2. Génération du fragment de complément C_{5a}

Au cours de la réponse immune, le complément est un des premiers effecteurs à être activé. Les éléments du complément présents, sous une forme inactive, peuvent être activés rapidement pour assister la réponse innée et spécifique [60]. Ainsi, dans le liquide synovial des patients atteints de crise de goutte, l'activité du système du complément est précocement accrue [61].

Le simple contact de cristaux d'UMS (négativement chargés à la surface) avec du plasma ou du liquide synovial déclencherai l'activation de la voie alterne du système du complément tandis que la voie classique est activée lorsque les cristaux et les immunoglobines forment un complexe antigène anticorps [62].

L'activation de ces deux voies conduit à l'hydrolyse spontanée de la C₃, qui est une composante majeure du complément présente dans le plasma. Le clivage et l'activation de C₃ est à la base de la formation des fragments C_{5a} et C_{3a}.

Le C_{3a} comme le C_{5a} sont des anaphylatoxines [63], qui provoquent une réaction anaphylactoïde (réponse violente lors d'un premier contact avec un produit allergisant) en se fixant sur des récepteurs des mastocytes et des polynucléaires basophiles.

Le fragment C_{5a} qui est aussi connu comme un puissant chimioattractant pour les neutrophiles, provoque la dégranulation, la production de réactifs d'oxygène et l'adhésion des granulocytes (neutrophiles, basophiles, éosinophiles), de monocytes et de macrophages [64]-[65]. Le C_{5a} augmente l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales augmentant ainsi la perméabilité vasculaire.

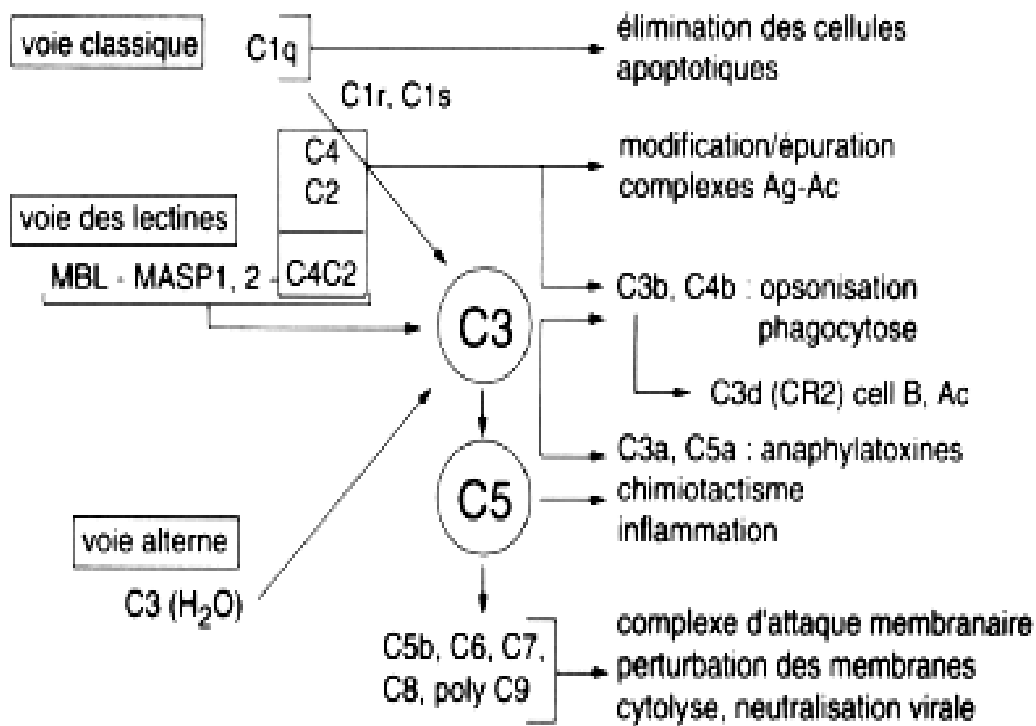


Schéma 2. Voies d'activation du système de complément

L'opsonisation des pathogènes par des molécules du complément facilite la phagocytose et la destruction des pathogènes par l'intermédiaire des récepteurs du complément [66]. Le CD35 (CR1) exprimé par les globules rouges, les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes et les cellules dendritiques folliculaires spécialisées, est un récepteur pour le C_{3b} et le C_{4b} [60]. Le CD21 (CR2), présent sur les lymphocytes et des cellules dendritiques, reconnaît le C_{3d} alors que le complexe CD11b/CD18 (CR3), principalement exprimé sur les monocytes, des macrophages et de neutrophiles, lie le iC_{3b}.

Plusieurs composantes du complément s'associent ensemble (C_8 , C_9 et C_{5b} , C_6 , C_7) pour former le complexe d'attaque.

Ce complexe possède une face externe hydrophobe qui s'associe avec la couche lipidique et un canal interne hydrophile par lequel les sels et l'eau peuvent s'échapper tout en permettant l'introduction d'enzymes de dégradation dans la cellule.

Le complexe d'attaque permet ainsi de percer des trous dans les membranes des pathogènes, de briser leur homéostasie et de faciliter leur destruction.

4.3. Génération de la bradykinine (BK)

La BK est une kinine appartenant à la famille des nonapeptides elle peut-être synthétisée dans le plasma ou les tissus. La formation de BK est amorcée par l'auto activation du facteur de Hageman (facteur XII de la coagulation) en facteur XIIa lorsque le sang entre en contact avec des surfaces possédant des charges négatives telles que les composantes de la matrice cellulaire (collagène, protéoglycanes et héparine) ou d'autres particules chargées négativement, comme les cristaux d'UMS [67]. La pré-kallicréine plasmatique est associée au kininogène de haut poids moléculaire (KHPM, 110 kDa), est convertie par le facteur de Hageman activé en kallicréine. Le clivage du KHPM par la kallicréine ainsi activée libère la BK. Dans les tissus, des enzymes protéolytiques activent la kallicréine tissulaire qui agit sur le kininogène de bas poids moléculaire (KBPM, 70 kDa) pour former la kallidine (KD), sauf chez le rat où la BK et non la KD est produite [68].

Après sa formation, la BK subit une dégradation métabolique rapide par des amino-carboxy-endopeptidases appelées kininases, trouvées dans le sang, les tissus et les liquides biologiques, qui aboutit à la production de plusieurs métabolites actifs et inactifs. La demi-vie de la BK est inférieure à 30 secondes dans le plasma [69]. Les enzymes les plus importantes dans le métabolisme des kinines sont les kininases I et II. La kininase I est représentée par la carboxypeptidase N plasmatique (CPN) et la carboxypeptidase M de la membrane cellulaire (CPM), qui clivent l'arginine en position carboxy-terminale pour produire la desArg⁹-BK. Ces enzymes sont particulièrement importantes, car elles produisent les métabolites de la BK ayant une activité biologique significative.

La bradykinine active les cellules endothéliales et induit la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la stimulation de terminaisons nerveuses sensorielles et sympathiques (qui provoque la douleur) et la contraction de muscles lisses par l'activation de deux types de récepteurs, B₁ et B₂ [70].

Le récepteur B₁ est inductible, participe à la phase chronique de la réponse inflammatoire et de la douleur [71] et le B₂ R est ubiquitaire et constitutif, responsable de la majorité des réponses pharmacologiques des kinines observées dans la phase aiguë de l'inflammation et de la douleur [72].

Les effets pro-inflammatoires du récepteur B₁ incluent également la stimulation de la migration des leucocytes sanguins. Outre les récepteurs B₁, les kalicrines et les kininogènes sont retrouvés à la surface des neutrophiles circulants et dans liquide synovial, et représentent une façon efficace de délivrer les kinines aux sites d'inflammation [73].

L'activation du récepteur B₁ induit les trois phases du processus de recrutement des leucocytes: roulement, adhérence et migration des cellules. Il semble que les agonistes du récepteur B₁ agissent directement sur les neurones sensoriels pour libérer la substance P (SP) et le CGRP (*calcitonine-gene related peptide*), lesquels influencent à leur tour la chimio-attraction des neutrophiles *via* des récepteurs peptidiques de l'endothélium. La SP et le CGRP induisent l'expression rapide des molécules d'adhérence des cellules endothéliales vasculaires (E-sélectine, P-sélectine et la molécule d'adhérence intercellulaire-1 ou ICAM-1), lesquelles jouent un rôle fondamental dans le roulement et l'adhérence des neutrophiles circulants [72].

Dans la maladie inflammatoire aiguë tel qu'un accès goutteux, la bradykinine jouerait un rôle important, car les études menées chez les rats dépourvus de kininogène de haut poids moléculaire et pauvres en kalicrine ont montré que la réponse inflammatoire provoquée par les cristaux d'UMS est réduite. Dans la même étude, les antagonistes des récepteurs de la bradykinine suppriment la réponse inflammatoire provoquée par les cristaux d'UMS [74].

II. Problématique

Bien que initialement les cristaux interagissent probablement avec le plasma, la problématique actuelle est que la littérature est déficiente pour les études montrant les effets directs du plasma activé par les cristaux sur les neutrophiles.

Cependant, nous savons que le plasma ayant servi à l'opsonisation des cristaux d'UMS subit des changements conduisant à l'activation du système du complément.

1. Hypothèse

Notre hypothèse de travail était de vérifier si seulement si l'interaction entre les cristaux d'UMS et le plasma génère du C_{5a} et de la bradykinine ces deux substances pourraient influencer les réponses fonctionnelles du neutrophile.

2. Objectif

C'est de confirmer la libération du facteur C_{5a} et de la bradykinine dans le plasma humain activé par les cristaux d'UMS et déterminer les effets de ces facteurs plasmatiques sur l'activité du neutrophile.

3. Matériels et méthodes

3.1. Réactifs

Le dextran T-500 a été acheté chez Pharmacia (Baie d'Urfé, Québec, Canada); le Ficoll-Paque et le HBSS (Solution saline balancée de Hank) provenaient de Wisent Canadian laboratory (St-Bruno, Québec, Canada). Le fura-2/AM (traceur cellulaire, provenait de Invitrogen). Le fMLP et le $TNF\alpha$ provenaient de Sigma Aldrich (Oakville, ON). Le fragment du complément C_{5a} a été acheté chez Sigma. La Lys-des-Arg⁹-Bradykinine (agoniste du récepteur B_1), des-Arg⁹-Leu⁸-Bradykinine (antagoniste du récepteur B_1), l'interleukine-1 β tous provenaient de Sigma. Le RPMI 1640 et le FBS (sérum fœtal de bovin) ont été achetés chez GIBCO (Grand Island,

NY). L'isotype du type IgG2a, a été généreusement offert par l'équipe du Dr. Naccache.

3.2. Cristaux d'urate monosodique (UMS)

Les cristaux d'UMS, obtenus par dissolution de quantités équimolaires d'acide urique et d'hydroxyde de sodium avec du chlorure de sodium pour accélérer et uniformiser la cristallisation puis par filtration sur un filtre Acropor 3 μ m ont été fournis par les Drs. R. de Médicis et A. Lussier (Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada) et préparés comme antérieurement décrit [75]. Les cristaux d'UMS présentent les caractéristiques de morphologie triclinique.

3.3. Anticorps

L'anticorps anti-C_{5a} est un anticorps monoclonal, que nous avons utilisé pour les expériences de mobilisation du calcium intracellulaire, il provenait de Hycult biotechnology (Hollande).

3.4. Isolement des neutrophiles

Les neutrophiles ont été isolés à partir du sang veineux de donneurs sains. Une centrifugation (400 g pendant 10 minutes à température ambiante) a permis l'élimination du plasma riche en plaquettes. La sédimentation des globules rouges a été faite par addition de Dextran 2%. Le surnageant, riche en leucocytes, a été recueilli et déposé sur un coussin de Ficoll-Paque. Après centrifugation (20 minutes à 1400 rpm à température ambiante), le culot contenant les neutrophiles a été récupéré et les globules rouges contaminants ont été lysés à l'eau pendant 20 secondes. Les neutrophiles ont été récupérés par centrifugation puis comptés et re-suspendus à la concentration désirée dans du HBSS avec ca²⁺ 1.6 mM. La viabilité des cellules a été évaluée avec une coloration au bleu de trypan.

3.5. Plasma déplaqueté

Le plasma a été isolé à partir du sang veineux de donneurs sains. Une centrifugation douce (400g pendant 10 minutes à température ambiante) a permis d'obtenir du plasma riche en plaquettes.

Par la suite, on centrifuge ce plasma à la vitesse de 13000g durant 15 minutes ; les plaquettes sanguines et d'autres débris se déposent au fond, puis on prélève le surnageant qui est du plasma déplaqueté.

3.6. Activation du plasma par les cristaux d'UMS

Le plasma déplaqueté a été incubé avec différentes concentrations de cristaux d'UMS pendant 60 minutes à 37°C. Par la suite nous avons centrifugé et récupéré le surnageant qui est du plasma activé.

3.7. Stimulation des neutrophiles

Les neutrophiles à 10^7 cellules/ml ont été stimulés avec différents stimuli (plasma activé, IL-1 β et l'antagoniste du récepteur B₁) à 37°C pour différents temps.

La stimulation avec l'IL-1 β a été effectuée par l'ajout de l'IL-1 β (1ng/ml finale) à une suspension de neutrophiles puis incubé pendant 30 minutes à 37°C. Après l'incubation des cellules avec l'IL-1 β , les cellules sont par la suite traitées durant 30 minutes avec de la calceine afin de les rendre fluorescentes.

Le même principe de stimulation a été effectué avec l'antagoniste du récepteur B₁.

Concernant les essais de mobilisation du calcium intracellulaire, la stimulation des cellules par le plasma s'est effectuée en ajoutant à une suspension des cellules 10^6 cellules/ml du plasma activé (dilution 1/10).

3.8. Chimiotaxie

Les neutrophiles ont été resuspendus dans le RPMI 1640 additionné à 10% FBS (sérum fœtal de bovin) à 10^7 cellules/ml et ont été pré-incubées avec $5\mu\text{g/ml}$ calcéine-AM (Eugene, Etats-Unis) à 37°C pendant 30 minutes à l'abri de la lumière et sous agitation constante. Les cellules ont été par la suite lavées deux fois et resuspendues dans la solution RPMI/FBS à 5×10^6 cellules/ml à 37°C . La migration des neutrophiles a été effectuée en utilisant les plaques chemoTX à 96 puits (NeuroProbe, Gaithersburg, MD, Etats-Unis).

La fluorescence des cellules dans les puits a été mesurée avec un lecteur de fluorescence (FL600, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, Etats-Unis); des longueurs d'onde d'excitation et d'émission 485 et 530 nm respectivement). La fluorescence d'un nombre connu de neutrophiles a été obtenue en les plaçant dans la chambre inférieure du système.

Les résultats sont exprimés en nombre de cellules qui ont pu traverser les filtres.

3.9. Mobilisation du calcium intracellulaire

Une suspension de neutrophiles (10^7 cellules/ml) a été incubée avec $1\mu\text{M}$ de fura-2/AM (Molecular probes, Eugene, OR, USA) pendant 30 minutes à 37°C . Les cellules sont par la suite lavées et resuspendues à 5×10^6 cellules/ml, puis transférées dans le compartiment à cuvette du spectrofluorimètre (Amino-Bowman serie 2, SLM-amino, Urbana, IL). L'agoniste a été injecté dans la suspension de neutrophiles à 10 seconde et la fluorescence a été mesurée pendant 300 secondes. La fluorescence a été calibrée selon les longueurs d'ondes d'excitation de 340 nm et d'émission de 510 nm. La mesure de la fluorescence a été convertie en concentration du calcium intracellulaire selon la formule suivante : $224 ((Y-F_{\text{min}})/(F_{\text{max}}-Y))$, avec Y comme mesure de fluorescence, F_{min} la fluorescence minimale et F_{max} la fluorescence maximale.

III. Résultats

1. Effet chimiotactique du fragment de complément C_{5a} sur le neutrophile humain

Les cristaux d'UMS au contact du plasma ou du liquide synovial peuvent déclencher la biosynthèse de fragments du complément (tels que le C_{5a} et C_{3a}) [56-58], de la bradykinine [59]. Ainsi, nous avons en premier vérifié l'activité chimiotactique du plasma humain activé par les cristaux d'UMS sur les neutrophiles (fig.1).

Pour vérifier cela, nous avons effectué une expérience de chimiotaxie en utilisant une suspension de neutrophiles qui est placée sur un filtre de polycarbonate ayant des pores de 8µm, ce filtre est ensuite placé sur la partie supérieure de la plaque à 96 puits. Dans les puits de la plaque on a placé différentes dilutions du plasma humain activé avec des cristaux d'UMS (3mg/ml) et le plasma non activé. Nous avons laissé migrer les cellules vers le plasma pendant 60 minutes. La suite de l'expérience s'est réalisée comme décrite dans la section Matériel et Méthode.

Nous avons remarqué une activité chimiotactique significative en réponse aux différentes dilutions de plasma activé par les cristaux d'UMS. On observe une augmentation progressive de la migration de neutrophiles à partir du plasma activé non dilué pour atteindre le maximal à la dilution 1/4, où on évalue à 55% de la quantité de cellules ayant migrées. Par la suite cette migration s'affaiblit progressivement avec la dilution. Comparé au plasma activé, le plasma humain non activé provoque une très faible chimiotaxie estimée entre 0 et 10% de cellules.

Après avoir vérifié que le plasma humain activé avec les cristaux d'UMS attirait les neutrophiles, il était donc nécessaire de déterminer le ou les facteurs générés dans le plasma responsable de la chimiotaxie. Dès le début du projet nous avons pensé à deux candidats potentiels : le facteur du complément C_{5a} et la bradykinine. Ainsi, nous avons d'abord commencé par mettre en évidence la présence du C_{5a} généré par le plasma activé par les cristaux d'UMS. Pour cela, nous avons réalisé une fois de plus l'expérience de chimiotaxie. Afin de répondre à cette question, du plasma décomplémenté ou un anticorps neutralisant le C_{5a} a été utilisé.

Nous avons donc placé la suspension des cellules sur le filtre de polycarbonate la plaque et différents agonistes : le plasma non activé, le plasma activé par les cristaux d'UMS, le plasma activé par les cristaux d'UMS puis dé-complémenté (comme décrit dans les Matériels et méthodes), le plasma dé-complémenté puis activé par la suite avec des cristaux d'UMS et du plasma activé par les cristaux d'UMS puis incubé avec l'anticorps anti-C_{5a} ont été placés dans les puits de la plaque à différentes dilutions.

Nous avons observé que le plasma activé et le plasma activé puis dé-complémenté ont engendré une chimiotaxie des cellules laquelle augmente progressivement à partir de l'état pur pour atteindre la migration maximale à la dilution 1/4 (voir fig.2). La migration maximale est évaluée à 70% des cellules. Cette chimiotaxie diminue progressivement avec la dilution. En revanche, le plasma non activé dilué et le plasma dé-complémenté puis activé dilué n'ont presque rien provoqué. Un anticorps neutralisant son action a été utilisé et la migration a été totalement inhibée, suggérant que le C_{5a} est majoritairement responsable de cette chimiotaxie (fig.2).

2. Détermination de la concentration minimale des cristaux d'UMS susceptible d'activer le plasma

Pour confirmer le rôle chimiotactique du facteur de complément C_{5a}, nous avons réalisé un autre test fonctionnel, soit la mobilisation intracellulaire de calcium puisque le C_{5a} est connu pour mobiliser le calcium.

La mobilisation de calcium est impliquée dans plusieurs voies de signalisation et dans l'activation du neutrophile. Cette activation peut se faire via les récepteurs Fc ou par le récepteur du fMLP entraînant rapidement une augmentation du niveau de calcium cytoplasmique libre.

Nous avons pré-incubé la suspension des neutrophiles avec de Fura-2/AM (un marqueur ratiométrique nécessaire à doser le calcium) pendant 30 minutes puis stimulé les cellules avec le plasma humain activé par différentes concentrations de cristaux d'UMS (0.01 ; 0.03 ; 0.1 ; 0.3 ; 1 ; 3 et 10 mg/ml) et les niveaux de calcium intracellulaire libre ont été alors mesurés comme décrit dans les Matériels et Méthodes (le ratio est calculé par la distribution de la concentration du calcium libre indépendamment de la concentration de l'indicateur).

Comme le montre la figure 3, la plus importante mobilisation de calcium cytoplasmique libre au cours de cette expérience est engendrée par le plasma activé avec 3mg/ml de cristaux d'UMS; alors que la plus faible est obtenue par du plasma activé avec 0.1 mg/ml de cristaux.

Ce résultat suggère que la plus petite concentration capable d'activer le plasma est 0.1 mg/ml; mais dans la suite de nos expériences, nous avons utilisé 1 mg/ml, qui est la concentration intermédiaire pouvant provoquer une activité appropriée.

3. Effet du facteur C_{5a} sur la mobilisation du calcium à l'intérieur du neutrophile

Nous savons que le C_{5a} est principalement responsable de la chimiotaxie des neutrophiles; mais nous ne savons pas encore la contribution à la mobilisation de calcium induite par le plasma activé. C'est pourquoi nous avons stimulé une suspension de neutrophiles (préalablement incubée avec du fura-2/AM pendant 30 minutes) respectivement avec du plasma activé par les cristaux d'UMS (1 mg/ml), du plasma non activé et du plasma dé-complémenté.

La figure 4 nous montre que le plasma activé provoque une mobilisation de calcium cytoplasmique importante, alors que le plasma non activé induit une mobilisation similaire de celle engendrée par le plasma de-complémenté qui est non significative. La mobilisation initiée par le plasma activé est par ailleurs inhibée par l'anticorps anti-C_{5a} ; mais cette inhibition n'est qu'environ de 30%, ceci laisse croire que le C_{5a} n'est pas le seul facteur généré par le plasma activé par les cristaux qui soit responsable de la mobilisation du calcium à l'intérieur du neutrophile (voir fig.5).

4. L'activation du récepteur B₁ de la bradykinine induit la chimiotaxie de neutrophiles humains

Nous savons que dans le plasma humain activé par les cristaux d'UMS il y a en plus de l'activation du système du complément une biosynthèse de kinines, en particulier la bradykinine. En rappel, la bradykinine est un peptide biologiquement actif et un puissant médiateur cellulaire impliqué au cours de l'inflammation.

Elle induit entre autre la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la douleur d'où son implication dans l'inflammation aigue.

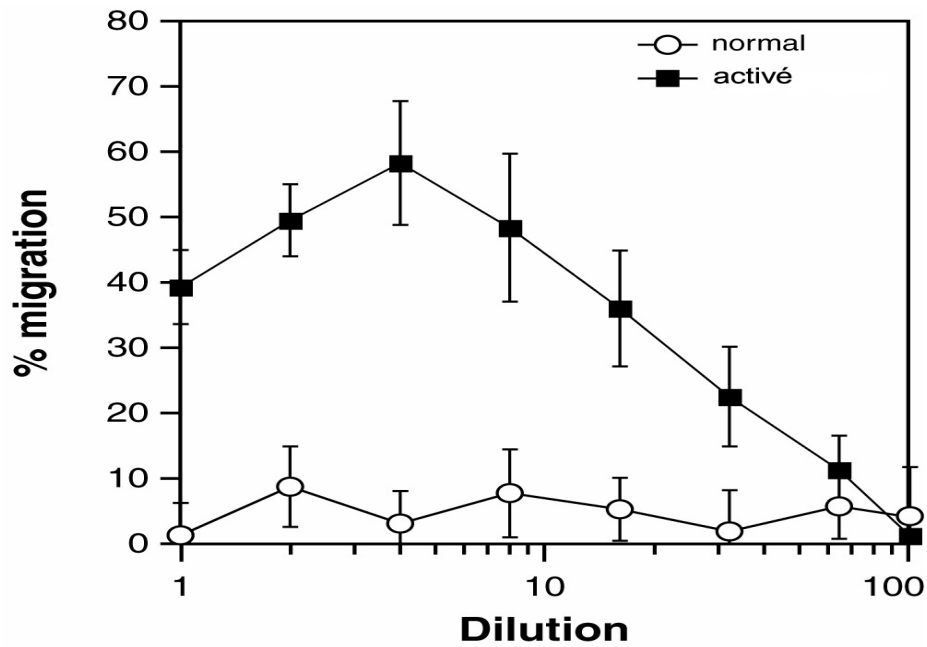
Dans le cadre de ce projet, nous avons d'abord vérifié les résultats de Erenfeld [76] et son équipe, qui ont analysé l'effet chimiotactique des agonistes du récepteur B₁ des kinines et nous avons étudié par la suite l'effet chimiotactique de la bradykinine généré dans le plasma sur les neutrophiles humains.

Nous avons utilisé une suspension de neutrophiles qu'on a incubé avec la calceine-AM (5 µg/ml finale) pendant 30 minutes, puis pré-traitée avec de l'IL-1β afin d'activer l'expression à la surface cellulaire les récepteurs B₁ de la bradykinine. Cette suspension de neutrophiles est ensuite placée sur le filtre de polycarbonate doté des petits pores de l'ordre de 8 µm que l'on place sur la partie supérieure d'une plaque à 96 puits et dans lesquels ont été placés les différents agonistes : la Lys-des-Arg⁹-Bradykinine (agoniste du récepteur B₁, 10⁻¹⁰ M) ; la des-Arg⁹-Leu⁸-Bradykinine (antagoniste du récepteur B₁, 10⁻⁸ M finale) et le fMLP (control positif).

Suite à une stimulation avec l'IL-1β, les résultats présentés à la figure 6 montre que l'agoniste du récepteur B₁ augmente la migration des cellules et ce à partir de la concentration 10⁻⁴M, la migration maximale est obtenue à des concentrations de 10⁻¹²M et 10⁻¹⁰M. L'antagoniste de B₁ inverse cette augmentation. Cependant, cet agoniste n'augmente que de 30% la migration des neutrophiles, suggérant certainement un rôle secondaire de la bradykinine ou des agonistes du récepteur B₁ dans la chimiotaxie des neutrophiles humains.

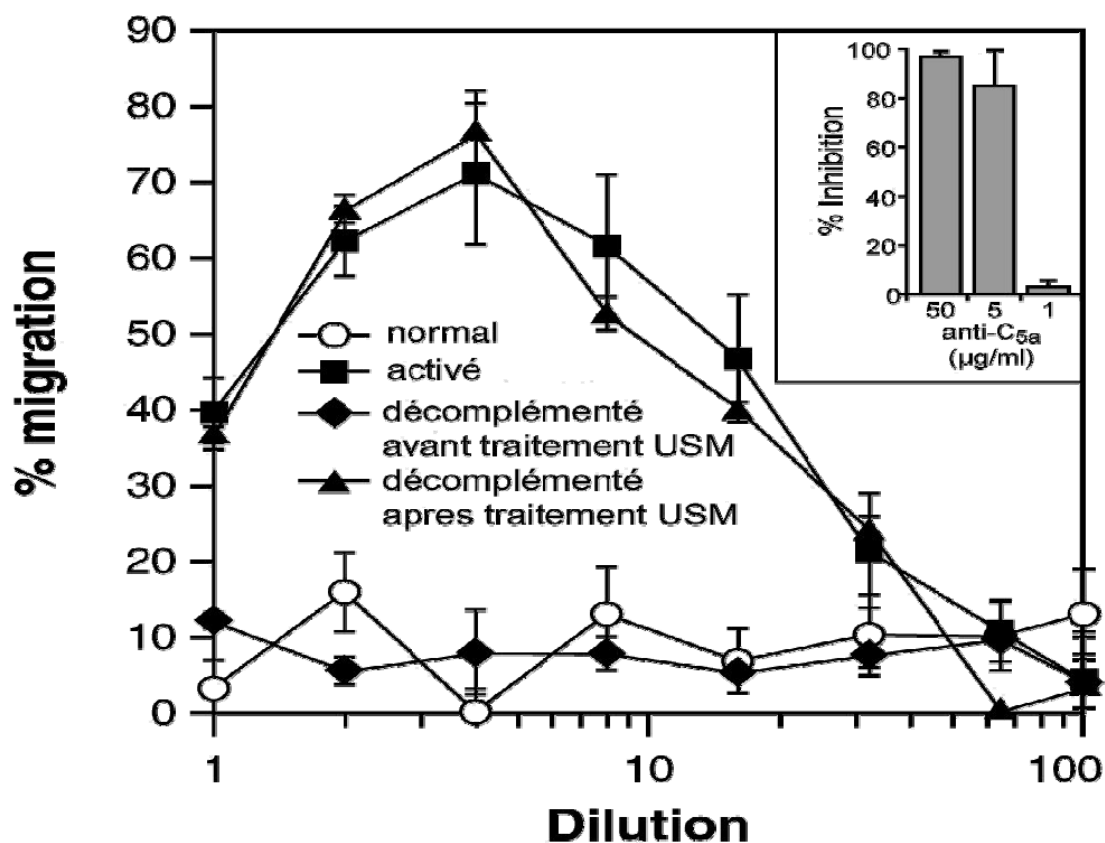
5. Figures et légende

Figure1 : Effet du plasma activé par les cristaux d'UMS sur la chimiotaxie



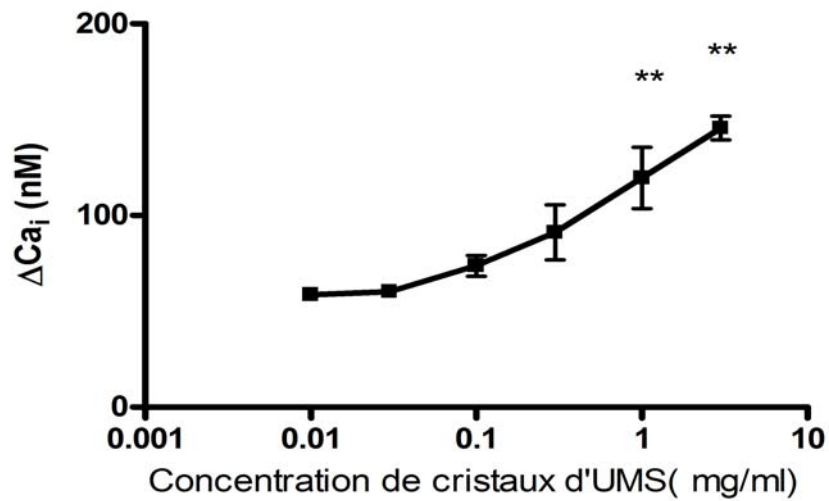
Les neutrophiles (10^6 cellules/ml) ont été pré-incubés avec la calceine ($5\mu\text{l/ml}$ finale) pendant 30 minutes à 37°C . Ensuite, les cellules ont été lavées dans du HBSS, et re-suspendues à 10^6 cellules/ml. Des concentrations croissantes de plasma activé ont été utilisées en guise d'agoniste pour l'essai de chimiotaxie. Le pourcentage de cellules ayant migrées a été calculé avec une courbe standard.

Figure 2 : Le complément est responsable de la chimiotaxie des neutrophiles.



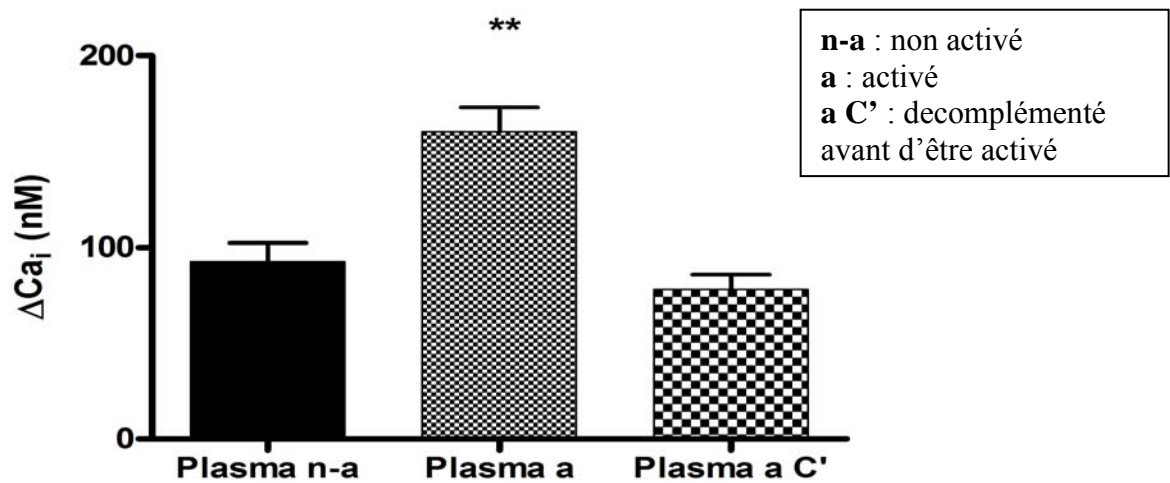
Les neutrophiles (10^6 cellules /ml) ont été pré-incubés avec la calceine ($5\mu\text{g/ml}$) pendant 30 minutes à 37°C . Ensuite, les cellules ont été lavées dans du HBSS, puis re-suspendues à 10^6 cellules /ml. Le plasma activé et le plasma décomplémenté après traitement avec les cristaux d'UMS (dilution 1/10, car c'est à cette dilution que la migration des cellules est appropriée) sont par la suite incubés avec l'anticorps (anti-C5a) neutralisant (l'anticorps était dilué respectivement 50 fois et 5 fois, correspondant à des concentrations de $7.5\mu\text{g/ml}$ et $3.75\mu\text{g/ml}$), puis soumis à l'essai de chimiotaxie.

Figure 3 : Détermination de la concentration minimale susceptible d'activer le plasma



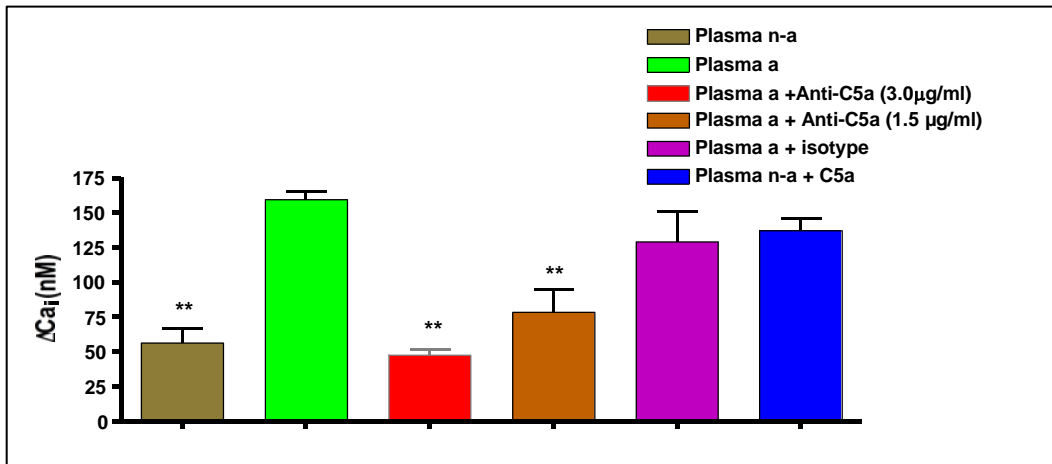
Une suspension de neutrophiles (10^7 cellules/ml) a été incubée avec $1 \mu\text{M}$ fura-3/AM pendant 30 minutes à 37°C . Les cellules sont ensuite re-suspendues dans du HBSS à 5×10^6 cellules/ml, et sont stimulées avec du plasma humain (dilution 1/10) activé avec différentes concentrations de cristaux d'UMS (0.01 ; 0.03 ; 0.1 ; 0.3 ; 1 ; 3 et 10 mg/ml). **, $p < 0.01$.

Figure 4 : Effet du plasma activé par les cristaux d'UMS sur la mobilisation du calcium



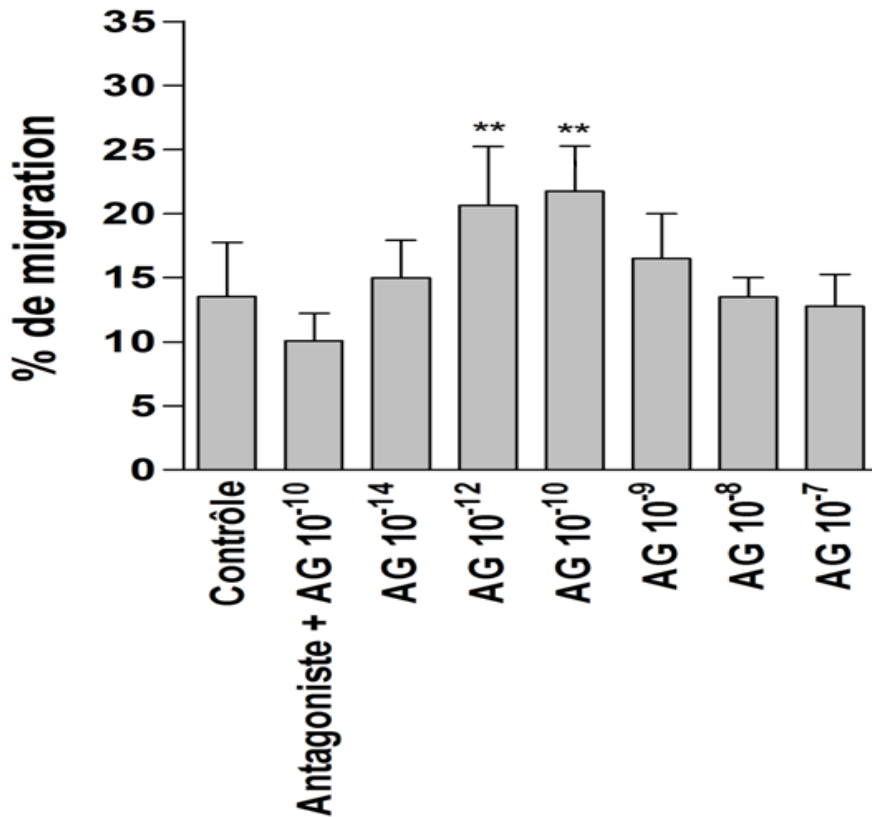
Une suspension de neutrophiles (10^7 cellules/ml) a été incubée avec $1 \mu\text{M}$ fura-3/AM pendant 30 minutes à 37°C . Les cellules sont ensuite re-suspendues dans du HBSS à 5×10^6 cellules/ml, et sont stimulées avec du plasma humain (dilution 1/10) activé avec des cristaux d'UMS (1 mg/ml) du plasma non activé et du plasma décomplémenté. **, $p < 0.01$.

Figure 5 : Contribution du facteur de complément C_{5a} généré par le plasma activé sur la mobilisation du calcium



Une suspension de neutrophiles (10^7 cellules/ml) a été incubée avec $1 \mu\text{M}$ fura-3/AM pendant 30 minutes à 37°C . Les cellules sont ensuite re-suspendues dans du HBSS à 5×10^6 cellules/ml. Le plasma humain activé avec des cristaux d'UMS (1 mg/ml) est aussi incubé avec l'anticorps anti- C_{5a} (1.5 et $3.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) ou un isotype contrôle pendant 60 minutes à 37°C . Enfin, le plasma traité avec du C_{5a} a aussi été en guise de contrôle utilisé pour stimuler les cellules re-suspendues à 5×10^6 cellules/ml. **, $p < 0.01$.

Figure 6 : Effet de l'agoniste du récepteur B_1 sur la chimiotaxie des neutrophiles



Les neutrophiles (10^6 cellules /ml) ont été pré-incubés avec la calceine ($5\mu\text{g/ml}$) pendant 30 minutes à 37°C . Ensuite, les cellules ont été lavées dans du HBSS, puis re-suspendues à 10^6 cellules/ml et cette suspension a été incubée avec de l'IL- 1β (1ng/ml finale) durant 60 minutes à 37°C (5% CO_2). Enfin, les cellules sont incubées avec l'antagoniste du récepteur B_1 (des-Arg⁹-Leu⁸-Bradykinine, 10^{-8} M final) et le tout est utilisé dans un essai de chimiotaxie. **, $p < 0.01$.

IV. Discussion

La goutte est caractérisée par une inflammation aiguë très douloureuse des articulations qui est associée à la présence de cristaux d'UMS. Les cristaux d'UMS sont issus de la précipitation d'acide urique favorisée par l'hyperuricémie.

Dans le liquide synovial, les cristaux sont opsonisés par les protéines plasmatiques et en même temps ils interagissent initialement avec le liquide synovial et les synoviocytes [77] [51]1-[50] libérant ainsi plusieurs agents pro-inflammatoires dont le facteur de complément

C_{5a} [57], [78]. Le C_{5a} pour sa part et d'autres chimio-attractants tel que l'IL-8, engendrent le recrutement massif des neutrophiles qui sont absents dans les liquides synoviaux dans une situation normale.

En fait, 90% des cellules recrutées lors de l'inflammation sont des neutrophiles, d'où l'importance du neutrophile dans l'évolution de la crise de goutte. Une déplétion des neutrophiles résulte en la nette amélioration des signes cliniques de goutte [79].

Étant donné que le plasma humain présente des similitudes biochimiques avec le liquide synovial, nous avons donc choisi de travailler avec du plasma qui est beaucoup plus facile.

Au début de ce projet, nous avons évalué la production d'anions superoxide par les neutrophiles suite à l'interaction avec des cristaux d'UMS opsonisés ou non-opsonisés par le plasma humain. Nous avons remarqué que l'opsonisation n'augmente pas l'activation des neutrophiles par les cristaux. Les études de Terkeltaub avaient aussi montré que les cristaux d'UMS opsonisés avec du plasma inhibaient la génération des anions superoxydes, la cytolyse et la phagocytose

[80, 81]. Pourtant, un récent rapport indique : que les cristaux recouverts des protéines plasmatiques induisent une faible activation des leucocytes, mais qu'ils pourraient interagir avec les récepteurs toll-like-2 et 4 présents sur les leucocytes [82].

Nous nous sommes donc posés la question suivante : qu'arrive-t-il au plasma ayant servi à l'opsonisation des cristaux?

La problématique actuelle est l'absence d'études montrant les effets directs du plasma activé par les cristaux, sur les neutrophiles.

Ainsi, pour répondre à cette question, nous avons en premier étudié l'effet du plasma activé sur la chimiotaxie des neutrophiles. Les neutrophiles sont activés par le plasma ayant été en contact avec les cristaux d'UMS; si bien que près de 60% des cellules ont répondu à l'attraction du plasma. En revanche, le plasma non activé n'induit qu'une faible migration des neutrophiles. Ces observations suggèrent que dans le plasma activé il y a très certainement une ou des substances générées suite à la présence des cristaux et que celles-ci stimulent la migration des neutrophiles. Mais, nous savons d'un point de vue expérimental peu ou pas d'informations sur la nature de ces substances.

Théoriquement, nous savons que le plasma qui a été utilisé pour opsoniser les cristaux subissent des changements conduisant à l'activation du système du complément.

Certaines études antérieures ont déjà constaté que l'activité du système du complément est accrue dans le liquide synovial des patients goutteux et que le système du complément est activé par les cristaux d'UMS via la voie classique et alternative [83].

Ainsi, dans la suite de notre projet visant de déterminer ce qui rendait le plasma activé par les cristaux d'UMS attractifs pour les neutrophiles, nous avons réalisé des expériences de chimiotaxie mettant en présence des neutrophiles avec le plasma activé, le plasma décomplémenté avant son traitement avec les cristaux, le plasma décomplémenté après avoir vu les cristaux et le plasma normal. Au sortir de ces expériences, nous avons pu remarquer que le plasma activé et le plasma décomplémenté après avoir vu les cristaux ont provoqué une migration nette des neutrophiles ; ce qui n'est le cas du plasma non activé et décomplémenté avant son traitement aux cristaux. Ces résultats suggèrent que les compléments joueraient un rôle dans la chimiotaxie des neutrophiles induite par le plasma activé par les cristaux d'UMS.

Afin de préciser la nature du facteur de complément généré par le plasma incubé avec les cristaux, nous avons traité pendant 60 minutes le plasma activé et le plasma décomplémenté après son incubation avec les cristaux avec l'anticorps anti-C_{5a}. La migration des neutrophiles vers ces deux préparations du plasma est inhibée presque à 100%, ce qui nous suggère que le facteur de complément et plus particulièrement le C_{5a} serait majoritairement responsable de cette migration. Pourtant, la cascade de la génération de facteurs du complément dans ce cas-ci passe par l'activation de la voie classique et/ou alternative, aboutissant entre autre à la synthèse du C_{5a}, mais aussi à celle du C_{3a}. Ce qui voudrait dire que le C_{3a} ne participe pas au mécanisme d'activation des neutrophiles favorisant sa chimiotaxie. Cependant, nous ne savons pas précisément le mécanisme par lequel le C_{5a} agit. Nous savons cependant que les récepteurs d'agents chimiotactiques sont presque tous couplés aux protéines G α [84]. En terme de protéines G, le neutrophile exprime principalement la protéine Gi _{α 2} [85].

Nous savons que le plasma activé par les cristaux d'UMS génère le facteur C_{5a} et que celui-ci serait principalement responsable de la migration des neutrophiles. Cependant, nous ne savons pas si la quantité de C_{5a} générée est proportionnelle à la concentration de cristaux

utilisée pour activer le plasma. Afin de diminuer les quantités d'anticorps anti-C_{5a} et des cristaux utilisés pour chacune de nos expériences, nous avons déterminé la concentration minimale des cristaux pouvant activer le plasma. Par conséquent, nous croyons que, à chaque fois que nous avons utilisé une certaine concentration d'anti-C_{5a} in vitro, la totalité de la quantité de facteur C_{5a} générée par le plasma a été complètement inhibée.

Maintenant nous savons que le plasma activé par les cristaux d'UMS provoque la chimiotaxie de neutrophiles, grâce principalement au facteur du complément C_{5a} généré par le plasma. En revanche, est-ce que ce même plasma peut induire une hausse du calcium intracellulaire? Si oui, quelle(s) serait (ent) la ou les substances responsables de cette mobilisation?

La mobilisation du calcium intracellulaire est l'une des réponses des neutrophiles à une stimulation. C'est la production d'un second messager nécessaire à l'activation cellulaire.

La mobilisation du calcium intracellulaire sert de deuxième signal dans l'activation du neutrophile et tout autres cellules. Le plasma activé par les cristaux d'UMS a permis d'examiner le rôle d'un ou de facteur(s) plasmatiques générés sur les neutrophiles. Les réponses induites par le plasma activé ont été inhibées par l'ajout de l'anti-C_{5a}. Ces observations suggèrent que le C_{5a} semble être à l'origine de la hausse du calcium intracellulaire.

Concernant la bradykinine, selon la littérature, elle est très instable dans les liquides biologiques, sa durée de demi-vie est d'environ moins de 40 secondes, ce qui ne facilite pas sa mise en évidence.

Ainsi, avant d'effectuer les expériences pour mettre en évidence une formation de bradykinine dans le plasma activé par les cristaux, nous avons tout d'abord cherché de vérifier l'effet de l'agoniste (Lys-des-Arg⁹-Bradykinine) du récepteur B₁ sur la chimiotaxie des neutrophiles humains. Nous avons utilisé la Lys-des-Arg⁹-Bradykinine parcequ'elle est plus stable que la bradykinine et possède des propriétés physiologiques similaires.

Nous avons réussi à reproduire les résultats obtenus par Ehrenfeld: en réponse à l'agoniste du récepteur B₁, il a observé une migration des neutrophiles sur gel d'agarose [76]. La différence entre nos expériences réside sur la technique utilisée : migration sur gel d'agarose

pour Ehrenfeld ; alors que nous avons fait migrer les neutrophiles sur une plaque de 96 puits.

En réponse à la Lys-des-Arg⁹-Bradykinine, la chimiotaxie des neutrophiles est rendue possible seulement lorsque les cellules avaient été pré-traitées avec de l'IL-1 β afin d'induire l'expression du récepteur B₁ [76]. La concentration optimale de la Lys-des-Arg⁹-Bradykinine qui stimule la migration des neutrophiles est de 10⁻¹⁰M. Cependant, le pourcentage des cellules qui migrent sous l'effet de la Lys-des-Arg⁹-Bradykinine est faible (environ 20%) ; comparativement à environ 70% des cellules migrées sous l'effet du fMLP. L'ajout de l'antagoniste du récepteur B₁ (des-Arg⁹-Leu⁸-BK) a inhibé la presque totalité de cette migration confirmant ainsi le rôle du récepteur B₁.

Par la suite, nous avons effectué des expériences de chimiotaxie en vue de mettre en évidence la présence de la bradykinine dans le plasma activé par les cristaux d'UMS. Afin de retarder la dégradation de la BK, nous avons incubé le plasma activé avec du captopril (un médicament qui empêche la kininase II de dégrader la des-arg⁹-BK en peptides inactifs); Cependant, nous n'avons pas réussi à montrer que le plasma activé par les cristaux génère *in vitro* la BK (résultat non rapporté dans ce mémoire) est en cours d'investigation

V. Conclusion

Nos résultats permettent de mieux comprendre le rôle des protéines plasmatiques générées sous l'effet des cristaux d'UMS.

Parmi les facteurs générés par le plasma, nous avons plutôt étudié le rôle du C_{5a} . Nous avons confirmé son rôle chimioattractant sur les neutrophiles. Dans le cadre de notre projet, le C_{5a} a été montré comme l'élément majoritairement impliqué dans la migration des neutrophiles.

Par contre, le C_{5a} n'est pas le seul facteur produit par le plasma qui soit, responsable de la hausse du calcium intracellulaire, ce qui nous pousse à identifier une ou d'autres substances qui seraient impliquées, au même titre que le C_{5a} , dans la mobilisation du calcium.

S'inspirant de l'article de Ehrenfeld intitulé « Chimiotaxie de neutrophiles induite par l'activation des récepteurs B_1 de kinine », nous avons pu vérifier le rôle chimioattractant de l'agoniste (Lys-des-Arg⁹-BK) du récepteur B_1 [76].

Cependant, l'effet chimiotactique de la Lys-des-Arg⁹-BK sur les neutrophiles est faible puisque nos résultats montrent une augmentation de la migration des neutrophiles d'environ 20%. En revanche, nous n'avons pas réussi à confirmer la présence de la bradykinine dans le plasma activé par les UMS.

Comme perspectives, ce travail suggère plusieurs possibilités d'études.

L'identification d'autres facteurs plasmatiques, produits de l'opsonisation des cristaux d'UMS et capables d'activer les neutrophiles reste un volet important de ce projet. Nous savons que le plasma activé a généré les facteurs du complément en particulier le C_{5a} dont le rôle chimioattractant a été confirmé. Le C_{5a} semble être majoritairement responsable de cette réponse chimiotactique. Ce qui n'est pas le cas pour la mobilisation du calcium intracellulaire, où la contribution du C_{5a} n'est que partielle. Ces observations nous laissent croire qu'il y a certainement d'autres substances présentes dans le plasma activé que nous n'avons pas réussi à identifier. C'est le cas de la bradykinine dont la littérature nous révèle avec certitude sa biosynthèse dans le plasma incubé en présence de particules chargées négativement (comme les cristaux d'UMS).

Pour la mise en évidence de la présence de la bradykinine, nous suggérons pour les études futures d'utiliser la technique de HPLC afin d'augmenter les chances d'identifier cet agoniste. La technique HPLC est très performante. Elle permet de détecter et d'isoler de petites protéines dans les liquides biologiques. L'utilisation de cette technique nécessite cependant d'importantes mise au point et des moyens financiers plus importants.

Par la suite il faudra tout de même caractériser l'expression du récepteur B₁ à la surface du neutrophile.

Enfin, il sera nécessaire de préciser les mécanismes par lesquels les facteurs plasmatiques identifiés activent le neutrophile et d'identifier d'autres facteurs plasmatiques pouvant activer les neutrophiles.

VI. Bibliographie

1. Wu, X., et al., *Hyperuricemia and urate nephropathy in urate oxidase-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(2): p. 742-6.
2. Bomalaski, J.S., et al., *Uricase formulated with polyethylene glycol (uricase-PEG 20): biochemical rationale and preclinical studies*. J Rheumatol, 2002. 29(9): p. 1942-9.
3. Coffier, *La goutte in rhumatologie*, Masson, Editor. 2002: Paris. p. 228-236.
4. Holmes, E.W., W.N. Kelley, and J.B. Wyngaarden, *Control of purine biosynthesis in normal and pathologic states*. Bull Rheum Dis, 1975. 26(4): p. 848-53.
5. Simkin, P.A., *Urate excretion in normal and gouty men*. Adv Exp Med Biol, 1977. 76B: p. 41-5.
6. Bardin, T., *[Mechanism of crystal deposition in the joints]*. Rev Prat, 1994. 44(2): p. 155-60.
7. McGill, N.W. and P.A. Dieppe, *The role of serum and synovial fluid components in the promotion of urate crystal formation*. J Rheumatol, 1991. 18(7): p. 1042-5.
8. Seegmiller, J.E. and R.R. Howell, *The old and new concepts of acute gouty arthritis*. Arthritis Rheum, 1962. 5: p. 616-23.
9. Scott, J.T., *Gout*. Ann Rheum Dis, 1983. 42 Suppl 1: p. 16-8.
10. Ferry, A.P., A. Safir, and H.E. Melikian, *Ocular abnormalities in patients with gout*. Ann Ophthalmol, 1985. 17(10): p. 632-5.
11. Gawoski, J.M., K. Balogh, and W.J. Landis, *Aortic valvular tophus: identification by X-ray diffraction of urate and calcium phosphates*. J Clin Pathol, 1985. 38(8): p. 873-6.
12. Nakayama, D.A., et al., *Tophaceous gout: a clinical and radiographic assessment*. Arthritis Rheum, 1984. 27(4): p. 468-71.
13. Tak, H.K., S.M. Cooper, and W.R. Wilcox, *Studies on the nucleation of monosodium urate at 37 degrees c*. Arthritis Rheum, 1980. 23(5): p. 574-80.
14. McGill, N.W. and P.A. Dieppe, *Evidence for a promoter of urate crystal formation in gouty synovial fluid*. Ann Rheum Dis, 1991. 50(8): p. 558-61.
15. Kam, M., et al., *Antibodies against crystals*. Faseb J, 1992. 6(8): p. 2608-13.
16. Ortiz-Bravo, E., M.S. Sieck, and H.R. Schumacher, Jr., *Changes in the proteins coating monosodium urate crystals during active and subsiding inflammation. Immunogold studies of synovial fluid from patients with gout and of fluid obtained using the rat subcutaneous air pouch model*. Arthritis Rheum, 1993. 36(9): p. 1274-85.
17. Burt, H.M. and J.K. Jackson, *Cytosolic Ca²⁺ concentration determinations in neutrophils stimulated by monosodium urate and calcium pyrophosphate crystals: effect of protein adsorption*. J Rheumatol, 1994. 21(1): p. 138-44.
18. Agudelo, C.A. and H.R. Schumacher, *The synovitis of acute gouty arthritis. A light and electron microscopic study*. Hum Pathol, 1973. 4(2): p. 265-79.
19. Ginsberg, M.H., et al., *Adsorption of polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzymes to monosodium urate crystals*. Arthritis Rheum, 1977. 20(8): p. 1538-42.
20. Phelps, P., D.J. Prockop, and D.J. McCarty, *Crystal induced inflammation in canine joints. 3. Evidence against bradykinin as a mediator of inflammation*. J Lab Clin Med, 1966. 68(3): p. 433-44.

21. Rosenberg, H.F., J. I. Gallin, *Inflammation, in Fundamental Immunology*. W.E. Paul ed, ed. F. edition. 1999, Lippincott-Raven: Philadelphia. 1051-1066.
22. Hachicha, M., et al., *Regulation of chemokine gene expression in human peripheral blood neutrophils phagocytosing microbial pathogens*. J Immunol, 1998. 160(1): p. 449-54.
23. McColl, S.R., et al., *EBV induces the production and release of IL-8 and macrophage inflammatory protein-1 alpha in human neutrophils*. J Immunol, 1997. 159(12): p. 6164-8.
24. Smith, J.A., *Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword*. J Leukoc Biol, 1994. 56(6): p. 672-86.
25. Cassatella, M.A., *The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils*. Immunol Today, 1995. 16(1): p. 21-6.
26. Ryckman, C., et al., *Monosodium urate monohydrate crystals induce the release of the proinflammatory protein S100A8/A9 from neutrophils*. J Leukoc Biol, 2004. 76(2): p. 433-40.
27. Gomez-Cambronero, J., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a chemoattractant cytokine for human neutrophils: involvement of the ribosomal p70 S6 kinase signaling pathway*. J Immunol, 2003. 171(12): p. 6846-55.
28. Ryckman, C., et al., *Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion*. J Immunol, 2003. 170(6): p. 3233-42.
29. Ryckman, C., et al., *Role of S100A8 and S100A9 in neutrophil recruitment in response to monosodium urate monohydrate crystals in the air-pouch model of acute gouty arthritis*. Arthritis Rheum, 2003. 48(8): p. 2310-20.
30. Seo, S.M., L.V. McIntire, and C.W. Smith, *Effects of IL-8, Gro-alpha, and LTB(4) on the adhesive kinetics of LFA-1 and Mac-1 on human neutrophils*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. 281(5): p. C1568-78.
31. Berger, M., et al., *Different G(i)-coupled chemoattractant receptors signal qualitatively different functions in human neutrophils*. J Leukoc Biol, 2002. 71(5): p. 798-806.
32. Heit, B., et al., *An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients*. J Cell Biol, 2002. 159(1): p. 91-102.
33. Blackwood, R.A., et al., *Unidirectional heterologous receptor desensitization between both the fMLP and C5a receptor and the IL-8 receptor*. J Leukoc Biol, 1996. 60(1): p. 88-93.
34. Sabroe, I., et al., *Chemoattractant cross-desensitization of the human neutrophil IL-8 receptor involves receptor internalization and differential receptor subtype regulation*. J Immunol, 1997. 158(3): p. 1361-9.
35. Foxman, E.F., J.J. Campbell, and E.C. Butcher, *Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis*. J Cell Biol, 1997. 139(5): p. 1349-60.
36. Chiou, W.F., et al., *C5a differentially stimulates the ERK1/2 and p38 MAPK phosphorylation through independent signaling pathways to induced chemotactic migration in RAW264.7 macrophages*. Int Immunopharmacol, 2004. 4(10-11): p. 1329-41.
37. Lee, W.L., R.E. Harrison, and S. Grinstein, *Phagocytosis by neutrophils*. Microbes Infect, 2003. 5(14): p. 1299-306.

38. Vieira, O.V., R.J. Botelho, and S. Grinstein, *Phagosome maturation: aging gracefully*. *Biochem J*, 2002. 366(Pt 3): p. 689-704.
39. Chertov, O., et al., *Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses*. *Immunol Rev*, 2000. 177: p. 68-78.
40. Faurschou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*. *Microbes Infect*, 2003. 5(14): p. 1317-27.
41. Borregaard, N. and J.B. Cowland, *Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte*. *Blood*, 1997. 89(10): p. 3503-21.
42. Roos, D., R. van Bruggen, and C. Meischl, *Oxidative killing of microbes by neutrophils*. *Microbes Infect*, 2003. 5(14): p. 1307-15.
43. Gougerot-Pocidallo, M.A., et al., *[Regulation of human neutrophil oxidative burst by pro- and anti-inflammatory cytokines]*. *J Soc Biol*, 2002. 196(1): p. 37-46.
44. Terkeltaub, R.A. and M.H. Ginsberg, *The inflammatory reaction to crystals*. *Rheum Dis Clin North Am*, 1988. 14(2): p. 353-64.
45. Ginsberg, M.H. and F. Kozin, *Mechanisms of cellular interaction with monosodium urate crystals. IgG-dependent and IgG-independent platelet stimulation by urate crystals*. *Arthritis Rheum*, 1978. 21(8): p. 896-903.
46. Wallingford, W.R. and D.J. McCarty, *Differential membranolytic effects of microcrystalline sodium urate and calcium pyrophosphate dihydrate*. *J Exp Med*, 1971. 133(1): p. 100-12.
47. Weissmann, G. and G.A. Rita, *Molecular basis of gouty inflammation: interaction of monosodium urate crystals with lysosomes and liposomes*. *Nat New Biol*, 1972. 240(101): p. 167-72.
48. Cherian, P.V. and H.R. Schumacher, Jr., *Immunochemical and ultrastructural characterization of serum proteins associated with monosodium urate crystals (MSU) in synovial fluid cells from patients with gout*. *Ultrastruct Pathol*, 1986. 10(3): p. 209-19.
49. Barabe, F., et al., *Crystal-induced neutrophil activation VI. Involvement of FcγRIIIB (CD16) and CD11b in response to inflammatory microcrystals*. *Faseb J*, 1998. 12(2): p. 209-20.
50. Gilbert, C., et al., *Crystal-induced neutrophil activation: VIII. Immediate production of prostaglandin E2 mediated by constitutive cyclooxygenase 2 in human neutrophils stimulated by urate crystals*. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(4): p. 1137-48.
51. Poubelle, P.E., R. De Medicis, and P.H. Naccache, *Monosodium urate and calcium pyrophosphate crystals differentially activate the excitation-response coupling sequence of human neutrophils*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987. 149(2): p. 649-57.
52. Roberge, C.J., et al., *Crystal-neutrophil interactions lead to interleukin-1 synthesis*. *Agents Actions*, 1991. 34(1-2): p. 38-41.
53. Hachicha, M., P.H. Naccache, and S.R. McColl, *Inflammatory microcrystals differentially regulate the secretion of macrophage inflammatory protein 1 and interleukin 8 by human neutrophils: a possible mechanism of neutrophil recruitment to sites of inflammation in synovitis*. *J Exp Med*, 1995. 182(6): p. 2019-25.
54. Schumacher, H.R., et al., *Comparison of sodium urate and calcium pyrophosphate crystal phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. Effects of crystal size and other factors*. *Arthritis Rheum*, 1975. 18(6 Suppl): p. 783-92.

55. Liote, F., et al., *Inhibition and prevention of monosodium urate monohydrate crystal-induced acute inflammation in vivo by transforming growth factor beta1*. *Arthritis Rheum*, 1996. 39(7): p. 1192-8.
56. Naff, G.B. and P.H. Byers, *Complement as a mediator of inflammation in acute gouty arthritis. I. Studies on the reaction between human serum complement and sodium urate crystals*. *J Lab Clin Med*, 1973. 81(5): p. 747-60.
57. Hasselbacher, P., *C3 activation by monosodium urate monohydrate and other crystalline material*. *Arthritis Rheum*, 1979. 22(6): p. 571-8.
58. Fields, T.R., et al., *Activation of the alternative pathway of complement by monosodium urate crystals*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1983. 26(2): p. 249-57.
59. Kellermeyer, R.W., *Hageman factor and acute gouty arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1968. 11(3): p. 452-9.
60. Molina, H., *Complement and immunity*. *Rheum Dis Clin North Am*, 2004. 30(1): p. 1-18, v.
61. Pekin, T.J., Jr. and N.J. Zvaifler, *Hemolytic Complement In Synovial Fluid*. *J Clin Invest*, 1964. 43: p. 1372-82.
62. Giclas, P.C., M.H. Ginsberg, and N.R. Cooper, *Immunoglobulin G independent activation of the classical complement pathway by monosodium urate crystals*. *J Clin Invest*, 1979. 63(4): p. 759-64.
63. Elsner, J., et al., *C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils*. *Eur J Immunol*, 1994. 24(3): p. 518-22.
64. Gerard, C. and N.P. Gerard, *C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor*. *Annu Rev Immunol*, 1994. 12: p. 775-808.
65. Gerard, N.P. and C. Gerard, *The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin*. *Nature*, 1991. 349(6310): p. 614-7.
66. Brown, E.J., *Complement receptors and phagocytosis*. *Curr Opin Immunol*, 1991. 3(1): p. 76-82.
67. Kaplan, A.P., et al., *The intrinsic coagulation/kinin-forming cascade: assembly in plasma and cell surfaces in inflammation*. *Adv Immunol*, 1997. 66: p. 225-72.
68. Bhoola, K.D., C.D. Figueroa, and K. Worthy, *Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases*. *Pharmacol Rev*, 1992. 44(1): p. 1-80.
69. Decarie, A., et al., *Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK: influence of enalaprilat*. *Am J Physiol*, 1996. 271(4 Pt 2): p. H1340-7.
70. Kaplan, A.P., K. Joseph, and M. Silverberg, *Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease*. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. 109(2): p. 195-209.
71. Dray, A., *Kinins and their receptors in hyperalgesia*. *Can J Physiol Pharmacol*, 1997. 75(6): p. 704-12.
72. Couture, R., et al., *Kinin receptors in pain and inflammation*. *Eur J Pharmacol*, 2001. 429(1-3): p. 161-76.
73. Bhoola, K., et al., *Kallikrein and kinin receptor expression in inflammation and cancer*. *Biol Chem*, 2001. 382(1): p. 77-89.
74. Damas, J. and G. Remacle-Volon, *Influence of a long-acting bradykinin antagonist, Hoe 140, on some acute inflammatory reactions in the rat*. *Eur J Pharmacol*, 1992. 211(1): p. 81-6.

75. Roberge, C.J., et al., *Crystal-induced neutrophil activation. V. Differential production of biologically active IL-1 and IL-1 receptor antagonist*. J Immunol, 1994. 152(11): p. 5485-94.
76. Ehrenfeld, P., et al., *Activation of kinin B1 receptors induces chemotaxis of human neutrophils*. J Leukoc Biol, 2006. 80(1): p. 117-24.
77. Di Giovine, F.S., et al., *Interleukin 1 (IL 1) as a mediator of crystal arthritis. Stimulation of T cell and synovial fibroblast mitogenesis by urate crystal-induced IL 1*. J Immunol, 1987. 138(10): p. 3213-8.
78. Doherty, M., J.T. Whicher, and P.A. Dieppe, *Activation of the alternative pathway of complement by monosodium urate monohydrate crystals and other inflammatory particles*. Ann Rheum Dis, 1983. 42(3): p. 285-91.
79. Ortel, R.W. and D.S. Newcombe, *Acute gouty arthritis and response to colchicine in the virtual absence of synovial-fluid leukocytes*. N Engl J Med, 1974. 290(24): p. 1363-4.
80. Terkeltaub, R., et al., *Lipoproteins containing apoprotein B are a major regulator of neutrophil responses to monosodium urate crystals*. J Clin Invest, 1984. 73(6): p. 1719-30.
81. Terkeltaub, R., et al., *Low density lipoprotein inhibits the physical interaction of phlogistic crystals and inflammatory cells*. Arthritis Rheum, 1986. 29(3): p. 363-70.
82. Liu-Bryan R, R.D., Sydlaske A, Terkeltaub R, *Engagement of toll-like receptor 2 is a central trigger of acute neutrophilic gout inflammation in vivo*. arthritis Rheum, 2004. 50: p. S240.
83. Dalbeth, N. and D.O. Haskard, *Mechanisms of inflammation in gout*. Rheumatology (Oxford), 2005. 44(9): p. 1090-6.
84. Haribabu, B., et al., *Function and regulation of chemoattractant receptors*. Immunol Res, 2000. 22(2-3): p. 271-9.
85. Sarndahl, E., et al., *Direct or C5a-induced activation of heterotrimeric Gi2 proteins in human neutrophils is associated with interaction between formyl peptide receptors and the cytoskeleton*. J Biol Chem, 1996. 271(25): p. 15267-71.
86. Goldsby, R., TJ, Kindt, BA Osborne, *Immunologie*. 4e ed. 2001, Paris: Dunod
87. Bardin T.— Mécanismes des dépôts cristallins articulaires. *Rev Prat (Paris)* 1994, 44, 155-160.

