

TABLE DES MATIERES

Table des matières	p 2
Table des illustrations	p 4
Introduction	p 7
<u>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE :</u>	p 8
<u>I- Le rôle des cytokines dans l'articulation.</u>	p 8
1-Les principales cytokines intervenant dans l'articulation	p 12
2-Etude spécifique des principales cytokines impliquées au niveau cartilagineux	p 12
2.a- L'Interleukine 1	p 12
2.b- L'Interleukine 6	p 16
2.c- L'Interleukine 8	p 20
2.d- L'Insulin-like growth factor	p 20
2.e- Le Transforming growth factor β	p 22
2.f- Les autres cytokines	p 23
<u>II- Etude spécifique du TNF-α</u>	p 23
1-Définition et structure	p 23
2- Production et activité biologique	p 25
3- Rôle dans l'inflammation du carpe	p 33
4- Les différentes méthodes de dosage du TNF- α	p 34
4.a- Les dosages immunologiques	p 34
4.b- Les dosages biologiques	p 35
4.c- Les dosages par RT-PCR	p 35
<u>III- Les autres facteurs de régulation de l'homéostasie articulaire –</u> <u>Rôle des métalloprotéinases.</u>	p 36
1- Les protéinases	p 36
1.a- Les métalloprotéinases	p 36
1.b- Les sérine protéinases	p 38
1.c- Les cystéine protéinases	p 39
1.d- Les protéinases aspartiques	p 39
2 Les prostaglandines	p 40
3- Les radicaux libres	p 40
<u>ETUDE EXPERIMENTALE</u>	p 42
<u>I- Matériel et méthode</u>	p 42

1- Les chevaux	p 42
2- Induction des lésions	p 42
3-Réalisation des prélèvements	p 42
4- Suivi clinique des animaux	p 44
5- Dosage du TNF- α	p 45
6- Dosage des métalloprotéinases matricielles	p 47
7- Autres expériences satellites	p 47
8- Examen post-mortem	p 47
 <u>II- Résultats</u>	 p 47
1- Suivi clinique	p 47
2- Imagerie médicale	p 49
3- Biochimie	p 49
4 Dosage du TNF- α	p 49
4.a- Dosage du TNF- α dans le sérum et le plasma	p 50
4.b- Dosage du TNF- α dans les liquides synoviaux	p 50
4.b-1- Chez le cheval 1	p 50
4.b-2- Chez le cheval 2	p 50
4.b-3- Chez le cheval 3	p 63
5- Dosage des métalloprotéinases matricielles	p 63
5.a- Etude qualitative	p 63
5.b- Etude quantitative	p 63
 <u>DISCUSSION</u>	 p 71
 <u>I- Fiabilité de la technique ; choix du protocole</u>	 p 71
1- Les chevaux	p 71
2- Choix du modèle et induction de la synovite	p 72
3- Durée du protocole et suivi clinique	p 72
4- Choix des paramètres étudiés et des méthodes de dosage	p 73
 <u>II- Commentaire des résultats</u>	 p 73
1- Dosage du TNF- α	p 74
1.a- Etude des taux de base à J0	p 74
1.b- Etude de la cinétique des taux de TNF- α au cours de l'expérimentation	p 75
1.b-1- Au niveau plasmatique et sérique	p 75
1.b-2- Au niveau des liquides synoviaux	p 75
2- Dosage des métalloprotéinases	p 76
2.a- Les MMP-2	p 77
2.b- Les MMP-9	p 77
 <u>III- Intérêt comparé des différents dosages effectués</u>	 p 78
1- Fiabilité des techniques et difficultés de mise en œuvre	p 78
2- Comparaison des paramètres	p 79
3- Autres paramètres intéressants	p 80
 Conclusion	 p 82
Bibliographie	p 83

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<u>Figure 1</u> : Coupe transversale d'une articulation synoviale	p 9
<u>Figure 2</u> : Transduction du message conduit par les cytokines au niveau cellulaire.	p 10
<u>Figure 3</u> : Facteurs de régulation intervenant dans la dégradation enzymatique du cartilage articulaire. p 11	
<u>Tableau 1</u> : Principales interleukines, cellules productrices et sensibles.	p 13
<u>Figure 4</u> : Facteurs impliqués dans la dégradation du cartilage articulaire dans l'arthrose équine.	p 14
<u>Figure 5</u> : L'interleukine 5 et son récepteur soluble, fonctionnement schématique.	p 15
<u>Figure 7</u> : Représentation schématique de la participation des cytokines dans la réaction inflammatoire.	p 17
<u>Figure 8</u> : Schéma illustrant les différents signaux pouvant amplifier ou au contraire réduire les productions d'IL-1, d'IL-6 et de TNF- α consécutives à l'activation des monocytes /macrophages par les bactéries ou les endotoxines.	p 18
<u>Figure 9</u> : Interleukine 6 et son récepteur. Fonctionnement schématique.	p 19
<u>Figure 10</u> : Les cytokines pro-inflammatoires et leurs interactions- Intervention de l'IL-6.	p 21
<u>Figure 11</u> : Régulation du phénomène inflammatoire par le jeu des cytokines et de leurs inhibiteurs.	p 24
<u>Tableau 2</u> : Caractéristiques comparées des deux formes de TNF.	p 26
<u>Figure 12</u> : Structure tridimensionnelle du TNF-Les zones représentées par des flèches sont en feuillet β .	p 27

<u>Figure 13</u> : Aspect tridimensionnel de l'association des trois molécules de TNF- α .	p 28
<u>Figure 14</u> : Représentation schématique des gènes du TNF humain.	p 29
<u>Tableau 3</u> : Super famille des ligands et des récepteurs apparentés au TNF.	p 30
<u>Tableau 5</u> : Les inducteurs du TNF- α au niveau des macrophages.	p 31
<u>Figure 15</u> : Schéma des domaines extra-cellulaires et cytoplasmiques des TNF R et de récepteurs apparentés.	p 32
<u>Figure 16</u> : Sites d'arthrocentèse du carpe chez le cheval.	p 43
<u>Figure 17</u> : Courbe témoin du TNF- α	p 46
<u>Figure 18</u> : Evolution du taux de TNF- α dans le carpe droit du cheval n° 1 au cours de l'étude.	p 51
<u>Figure 19</u> : Evolution du taux de TNF- α dans le carpe droit du cheval n° 2 au cours de l'étude.	p 52
<u>Figure 20</u> : Evolution du taux de TNF- α dans le carpe droit du cheval n° 3 au cours de l'étude.	p 53
<u>Figure 21</u> : Evolution du taux de TNF- α dans le carpe gauche du cheval n° 1 au cours de l'étude.	p 54
<u>Figure 22</u> : Evolution du taux de TNF- α dans le carpe gauche du cheval n° 2 au cours de l'étude.	p 55
<u>Figure 23</u> : Evolution du taux de TNF- α dans le carpe gauche du cheval n° 3 au cours de l'étude.	p 56
<u>Figure 24</u> : Comparaison de l'évolution des taux de TNF- α dans le sérum et le plasma au cours de l'étude chez le cheval 1.	p 57
<u>Figure 25</u> : Comparaison de l'évolution des taux de TNF- α dans les deux carpes au cours de l'étude chez le cheval 1.	p 58
<u>Figure 26</u> : Comparaison de l'évolution des taux de TNF- α dans le sérum et le plasma au cours de l'étude chez le cheval 2.	p 59
<u>Figure 27</u> : Comparaison de l'évolution des taux de TNF- α dans les deux carpes au cours de l'étude chez le cheval 2.	p 60

<u>Figure 28</u> : Comparaison de l'évolution des taux de TNF- α dans le sérum et le plasma au cours de l'étude chez le cheval 3.	p 61
<u>Figure 29</u> : Comparaison de l'évolution des taux de TNF- α dans les deux carpes au cours de l'étude chez le cheval 3	p 62
<u>Figure 30</u> : Evolution du taux de MMP-2 synoviales du cheval 1 au cours de l'étude dans les deux carpes.	p 64
<u>Figure 31</u> : Evolution du taux de MMP-2 synoviales du cheval 2 au cours de l'étude dans les deux carpes.	p 65
<u>Figure 32</u> : Evolution du taux de MMP-2 synoviales du cheval 3 au cours de l'étude dans les deux carpes.	p 65
<u>Figure 33</u> : Evolution du taux de MMP-9 monomères synoviales du cheval 1 au cours de l'étude dans les deux carpes.	p 66
<u>Figure 34</u> : Evolution du taux de MMP-9 monomères synoviales du cheval 2 au cours de l'étude dans les deux carpes.	p 67
<u>Figure 35</u> : Evolution du taux de MMP-9 monomères synoviales du cheval 3 au cours de l'étude dans les deux carpes.	p 68
<u>Figure 36</u> : Evolution du taux de MMP-9 dimères synoviales du cheval 1 au cours de l'étude dans les deux carpes.	p 68
<u>Figure 37</u> : Evolution du taux de MMP-9 dimères synoviales du cheval 2 au cours de l'étude dans les deux carpes.	p 69
<u>Figure 38</u> : Evolution du taux de MMP-9 dimères synoviales du cheval 3 au cours de l'étude dans les deux carpes.	p 70

INTRODUCTION

Les problèmes articulaires représentent une pathologie sérieuse et répandue chez les poulains et les chevaux de sport.

Une étude anglaise a démontré que l'arthrite septique affecte 1% de la production annuelle de poulains. (29)

Près d'un tiers des chevaux boiteux sont atteints au niveau du carpe ou de la jonction métacarpo-phalangienne. (29)

Ces arthropathies peuvent limiter voire stopper une carrière sportive du fait des séquelles qui s'ensuivent. Les animaux qui se remettent d'une atteinte articulaire de type arthrite, synovite ou ostéochondrite sont souvent atteints par la suite de maladies articulaires dégénératives. Chez un jeune cheval de course, par exemple, une arthrite traumatique avec épanchement et synovite sans gros dommage articulaire, fréquente au niveau du boulet et du carpe de ces animaux en entraînement, peut évoluer vers une ostéoarthrite si elle n'est pas traitée correctement, et de fait remettre en question une future carrière sportive.

D'où l'importance d'une détection précoce de ces pathologies afin de pouvoir mettre en place un traitement efficace avant des lésions trop sévères et irrémédiables de l'articulation.

Or les méthodes classiques d'investigation, que ce soient l'examen clinique, la radiographie ou l'échographie ne permettent pas de détecter ces pathologies suffisamment tôt pour éviter des séquelles plus ou moins étendues.

Le praticien manque donc d'outils diagnostiques pour orienter sa démarche. Il s'agit donc ici de trouver un marqueur précoce de l'inflammation et surtout une méthode fiable pour le détecter afin de permettre au vétérinaire de poser un diagnostic rapidement.

De nombreuses recherches ont donc été lancées ces dernières années sur diverses protéines et cytokines qui entrent en jeu au cours de l'inflammation articulaire. (2,4,6,8,13,21,29,31,34,35,51,53,63,65,66,68,71,72,73)

Le modèle présenté dans cette étude est basé sur la détection précoce d'un ensemble de protéines dont une cytokine, le Tumor Necrosis Factor (TNF), reconnue comme étant une des cytokines les plus fréquemment détectées dans le liquide synovial d'animaux atteints d'arthropathies dégénératives et des enzymes capables de dégrader la matrice cartilagineuse, les métalloprotéinases.

Le TNF a été mesuré dans le liquide synovial, le sérum et le plasma de trois chevaux ayant reçu une dose de lipopolysaccharide au sein de l'articulation radio-carpienne droite et ce pendant une durée de vingt et un jours. Quant aux métalloprotéinases, elles ont été quantifiées dans le liquide synovial de ces animaux.

Après une étude bibliographique du rôle des différentes cytokines et plus particulièrement du TNF au sein de l'articulation saine et inflammée ainsi que des métalloprotéinases, nous allons ensuite faire un compte-rendu des expériences et dosages menés. Pour finir, la discussion nous permettra de faire le point quant à l'intérêt de cette étude, ses débouchés éventuels et l'avenir de ces expérimentations

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I- LE ROLE DES CYTOKINES DANS L'ARTICULATION

L'articulation synoviale permet le mouvement et la transmission de la charge entre deux rayons osseux. Elle résulte de l'affrontement d'au moins deux surfaces articulaires recouvertes de cartilage hyalin, le tout soutenu par la capsule et les ligaments qui assurent une fonction de maintien et de stabilité. (fig. 1)

1-Les principales cytokines présentes dans l'articulation

Les cytokines sont des molécules qui permettent la communication entre les différentes cellules de l'organisme. Ce sont des molécules solubles également appelées facteurs de régulation peptidiques et qui sont à la base du système de communication intercellulaire au sein de l'organisme pluricellulaire.

Les cytokines sont des protéines de faible poids moléculaire (inférieur à 80 kDa) qui agissent par l'intermédiaire de leur fixation à des récepteurs cellulaires spécifiques portés à la surface des cellules cibles. (fig.2)

Les cytokines ont trois modes d'action : un effet endocrine avec une action sur des cellules distantes de leur lieu de production, mais elles peuvent également agir localement sur les cellules environnantes (effet paracrine) ou sur la cellule qui les a produites (effet autocrine).

Après interaction avec les récepteurs membranaires spécifiques, les cytokines modulent l'expression génique des cellules cibles en induisant un message intra-cellulaire.

Dans le cadre du fonctionnement articulaire qui nous intéresse ici, l'ensemble des événements moléculaires impliqués dans la synthèse, l'assemblage et le renouvellement de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire nécessite un système de régulation méticuleuse des synthèses et des destructions de ses divers constituants par le chondrocyte.(fig.3)

C'est ce fonctionnement idéal, basé sur un jeu de régulation très fin et sensible entre les différentes cytokines qui est perturbé en cas de processus pathologique ce qui dérègle alors l'homéostasie de la matrice extracellulaire qui est dégradée.

Le rôle des cytokines au niveau articulaire a été en premier mis en évidence par les travaux de Fell et Jubb qui ont pu démontrer l'existence d'un facteur de régulation peptidique dérivé de la synoviale de porc qui était incriminé dans la dégradation de cultures de cartilage in vivo. Ils l'ont nommé cataboline. (décrit par Cavaillon (11))

En pathologie articulaire, l'interleukine 1 est la cytokine la plus étudiée car la plus représentative.

On trouve bien sûr d'autres cytokines : différentes interleukines dont la 8 et la 6, le FGF (facteur de croissance des fibroblastes), le PGDF (platelet derived growth factor), le TGF (transforming growth factor) et l'IGF (insuline-like growth factor) et bien évidemment celle

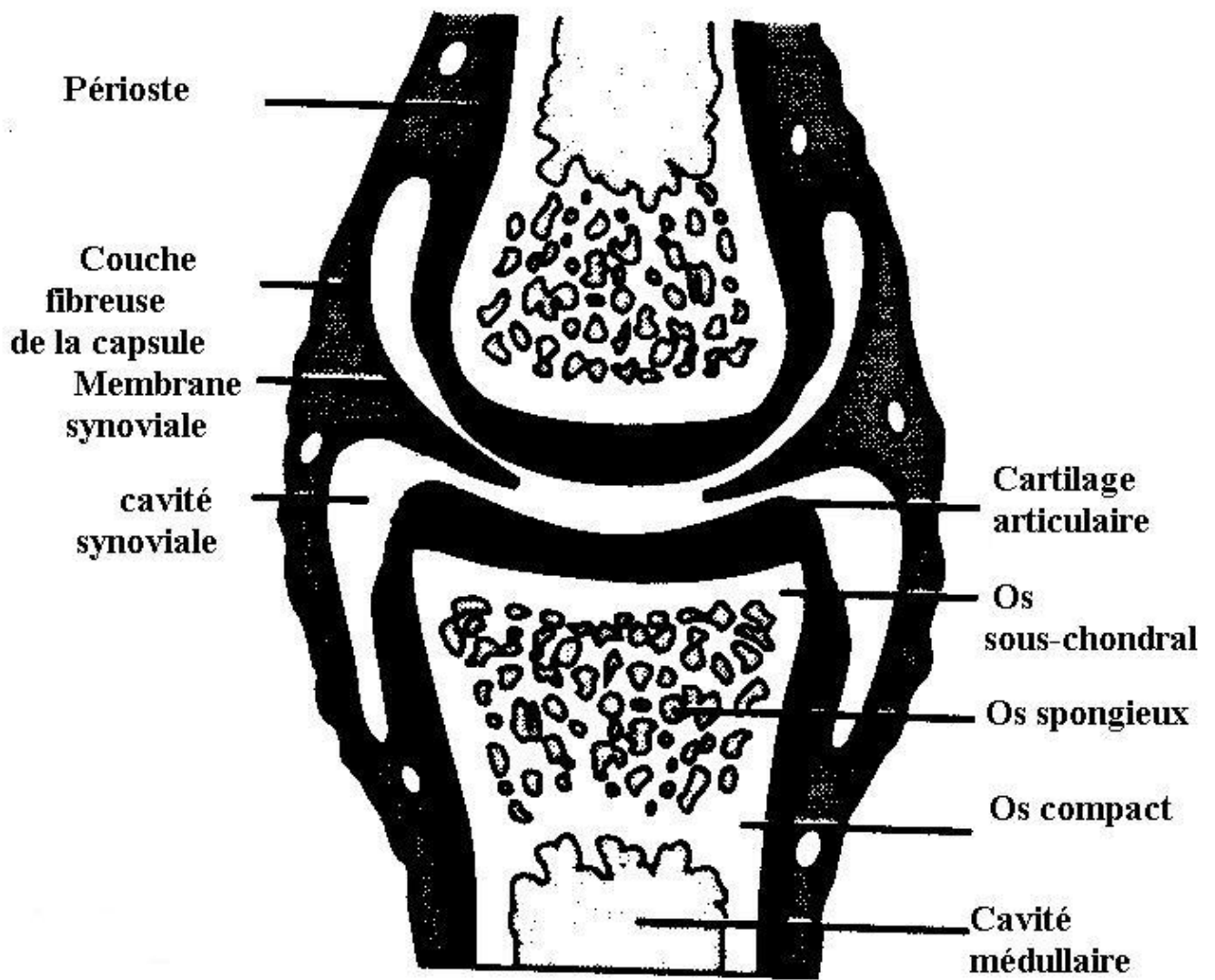
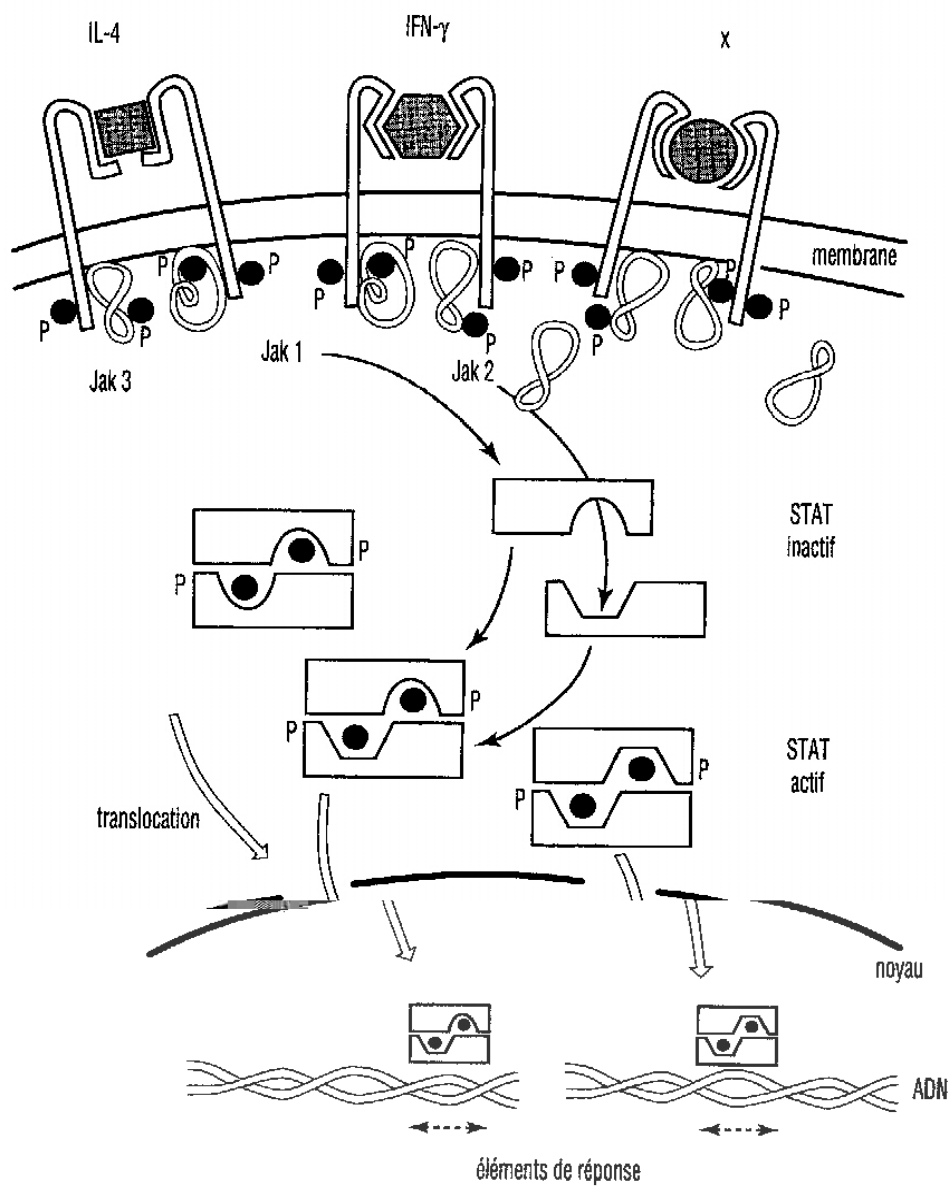


Figure 1 : coupe transversale d'une articulation synoviale (d'après J.Coquel)



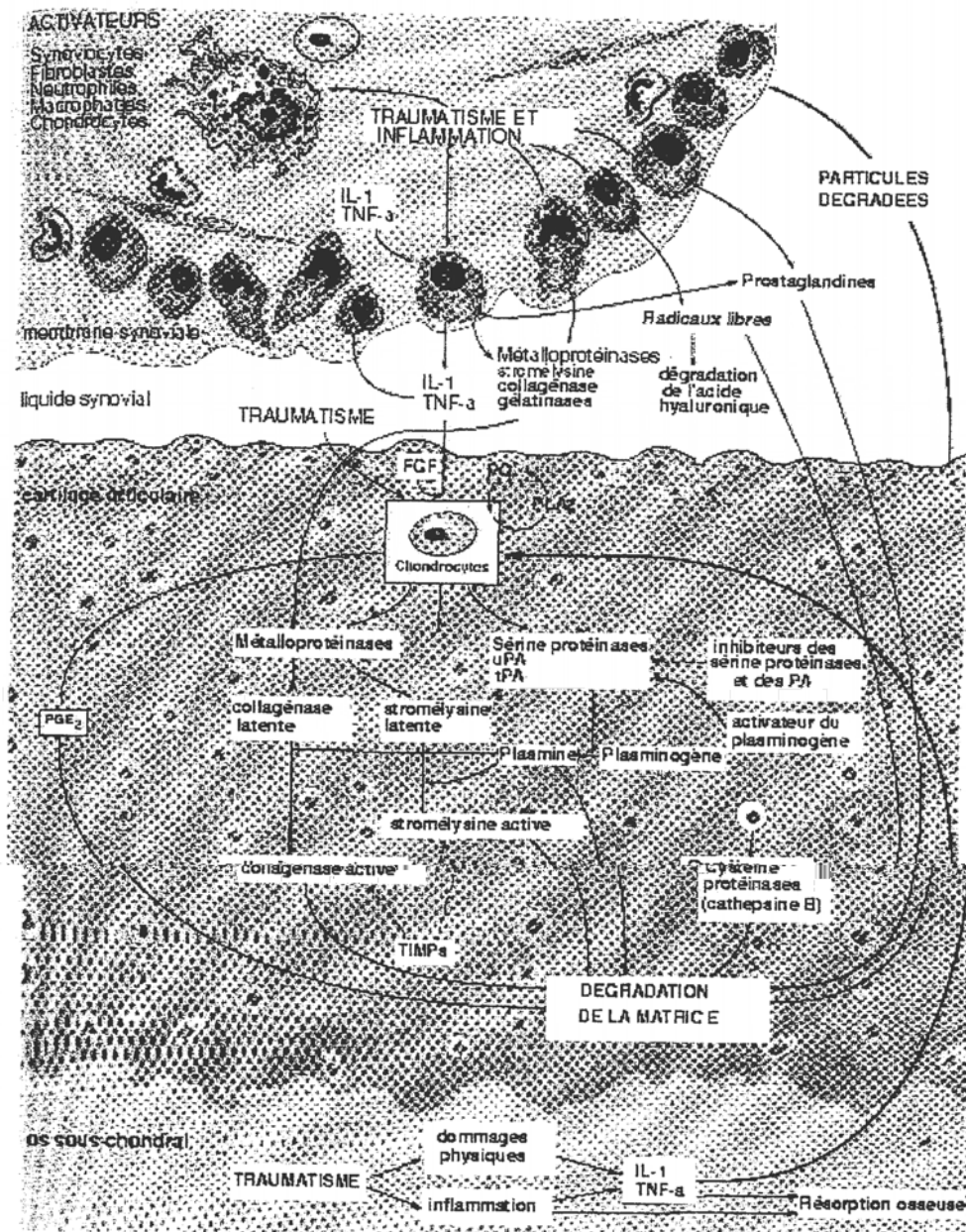


Figure 3 : facteurs de régulation intervenant dans la dégradation enzymatique du cartilage articulaire. D'après Platt(67) IL-1=interleukine 1 ; TNF- α =tumor necrosis factor α ; FGF=fibroblast growth factor; PG:prostaglandine ; PLA₂=phospholipase A₂; uPA= activateur du plasminogène de type urokinase; tPA=activateur tissulaire du plasminogène; PA= activateur du plasminogène; PGE₂=prostaglandine E₂; TIMPs= tissus inhibiteurs de métalloprotéinases.

qui nous intéresse ici, le TNF- α qui a des effets presque identiques à L'IL-1, notamment au niveau des affections articulaires dégénératives et inflammatoires : elles modulent la synthèse des métalloprotéinases intervenant dans la dégradation des composants matriciels par les chondrocytes et les cellules synoviales. (tableau 1).

La régulation du renouvellement de la matrice extracellulaire est ainsi assurée par ces cellules qui sont sous le contrôle et l'influence des cytokines et des stimuli mécaniques. (fig.4)

2- Etude spécifique des principales cytokines impliquées au niveau cartilagineux

2. a-l'Interleukine 1

L'interleukine 1 (IL-1) regroupe une petite famille de protéines, deux protéines agonistes les IL-1 α et IL-1 β et une protéine antagoniste IL-1RA (IL-1 récepteur antagoniste). (fig.5)

Les deux premières sont produites en réponse à un facteur d'agression infectieux, aux toxines microbiennes, aux agents inflammatoires, aux produits des lymphocytes activés et aux immuns-complexes.

Il existe moins de 30% d'homologie au niveau de la chaîne peptidique entre les deux chaînes α et β bien que ces deux molécules aient une action biologique similaire ce qui est probablement en relation avec leur agencement dans l'espace. Cependant l'activité de la forme β est 90 fois supérieure à celle de la forme α . Les récepteurs de chaque isoforme d'IL-1 sont différents selon le type de cellule incriminé mais les chondrocytes articulaires possèdent des récepteurs capables d'interagir avec les deux formes. May et coll. ont montré qu'une IL-1 équine partiellement purifiée pouvait être produite après stimulation de monocyte de sang périphérique par du lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* (LPS) et qu'elle avait des propriétés similaires à son homologue humaine (50). L'IL-1 équine a une masse moléculaire de 17 à 18 kDa et est synthétisée sous forme d'un précurseur qui est ensuite clivé en deux formes α et β (formes acides et basiques) qui en sont les deux formes actives.

Une activité IL-1 élevée a été détectée dans le liquide synovial d'articulations humaines atteintes par des affections diverses y compris des phénomènes dégénératifs. L'activité IL-1 est augmentée dans le liquide synovial de chevaux atteints d'affections articulaires aussi variées que l'arthrose (57), l'ostéochondrite disséquante, l'arthrite traumatique et le sepsis aigu. Le fait que l'on retrouve très peu d'infiltrats cellulaires dans certaines affections comme les affections dégénératives suggérerait que c'est la membrane synoviale qui serait à l'origine de cette activité (67). De nombreuses études ont été menées sur différentes espèces pour démontrer les effets de l'IL-1 sur le cartilage articulaire; Morris et Treadwell ont montré que L'IL-1 provoquait une diminution de la synthèse des protéoglycanes et une augmentation de la synthèse et de l'activité des enzymes de dégradation du cartilage sur des extraits de cartilage équin in-vitro (56). Ils ont également établi que le cartilage des chevaux âgés avait une réponse moins intense, sûrement due à une activité métabolique plus réduite que le cartilage des chevaux jeunes, ce qui avait été avancé par MacDonald et Tover (41). Ces derniers ont de plus observé que sur des extraits de cartilage in-vitro, l'IL-1 induisait une libération dose dépendante de protéoglycanes de la matrice. L'IL-1 aurait également des effets antagonistes sur la synthèse de collagène de type II chez plusieurs espèces. La cataboline décrite par Fell et Jubb a désormais été reconnue comme étant L'IL-1 et étant capable de favoriser la production de métalloprotéinases par du cartilage et des synoviocytes in-vitro. En effet, l'IL-1 augmente la synthèse et la libération des métallo-protéinases comme la

Cytokine	MM(kDa)	Gène*	Autres dénominations	Cellules productrices	Cellules sensibles**
IL1 (α et β)	17	2q	LAF : Lymphocyte-Activating Factor EP : Endogenous Pyrogen	Mo/MO, CD, CEp B, fibroblastes	T, B, Mo/MO, CEn, NK, PN...
IL2	15	4q	TCGF : T Cell Growth Factor	T (Th1)	T, B, NK
IL3	28	5q	Multi-CSF : Colony-Stimulatory Factor	T, NK activées	PN, B, Ma, Mo/MO, précuseurs hématopoïétiques
IL4	15	5	BSF I : B-Stimulatory Factor	T (Th2), PB/Ma	B, T, Ma-PB Mo/MO, Mo/Mo
IL5	13 x 2	5	BCGF II : B Cell Growth Factor, EDF : Eosinophil Differentiation Factor, Eo-CSF	T (Th2), Eo	B, Eo, PB
IL6	20-26	7p	BSF II, IFN β 2, HGF/PGF : Hybridoma/Plasmocytoma- Growth Factor	Mo/MO, T, B CE, Ma, fibroblastes	B et T, hépatocytes cellules souches
IL7	15	8q	Lymphopoïétine : LP	Cellules stromales : thymus, moelle hém.	Pre-B, thymocytes et T
IL8	8	17q	NAP : Neutrophil Activating Factor NCF : Neutrophil Chemotactic Factor	Mo/MO, CE, T, NK, PN, fibroblastes	PN, PB, T et B
IL9	14	5q		T	T, Mo/MO
IL10	19-21	1	CSIF : Cytokine Synthesis Inhibitory Factor	T (Th2), B, Mo	T (Th1), Ts, B, Mo/MO, Ma
IL12	35 + 40	3p	NKSF : Natural Killer cell stimulatory factor	Mo/MO, B	T (Th1) et Tc, NK
IL13	10	5q	P600	T (Th2)	B, Mo/MO, PN
IL15	15			Mo, CEp	T, NK
IL17	15-20			T	T, fibroblastes
IFN γ	20-25	12q	Interféron gamma MAF : Macrophage- Activatory Factor	T (Th1), NK	Mo/MO, Tc, NK, B, CEn
TNF α	17 x 3	6p	Tumor Necrosis Factor α ou Cachectine	Mo/MO, PN, T, NK Ma	Très diverses
TNF β	17 x 3	6p	Lymphotoxine : LT	T, NK	Très diverses

Tableau 1 : Principales interleukines, cellules productrices et sensibles

Liste des abréviations : Mo/MO : monocytes/macrophages PB : basophiles
CD : cellules dendritiques Ma : mastocytes
CEn : cellules endothéliales T : lymphocytes T
Tc -cytotoxiques
Ts – suppresseur

D'après Revillard (70)

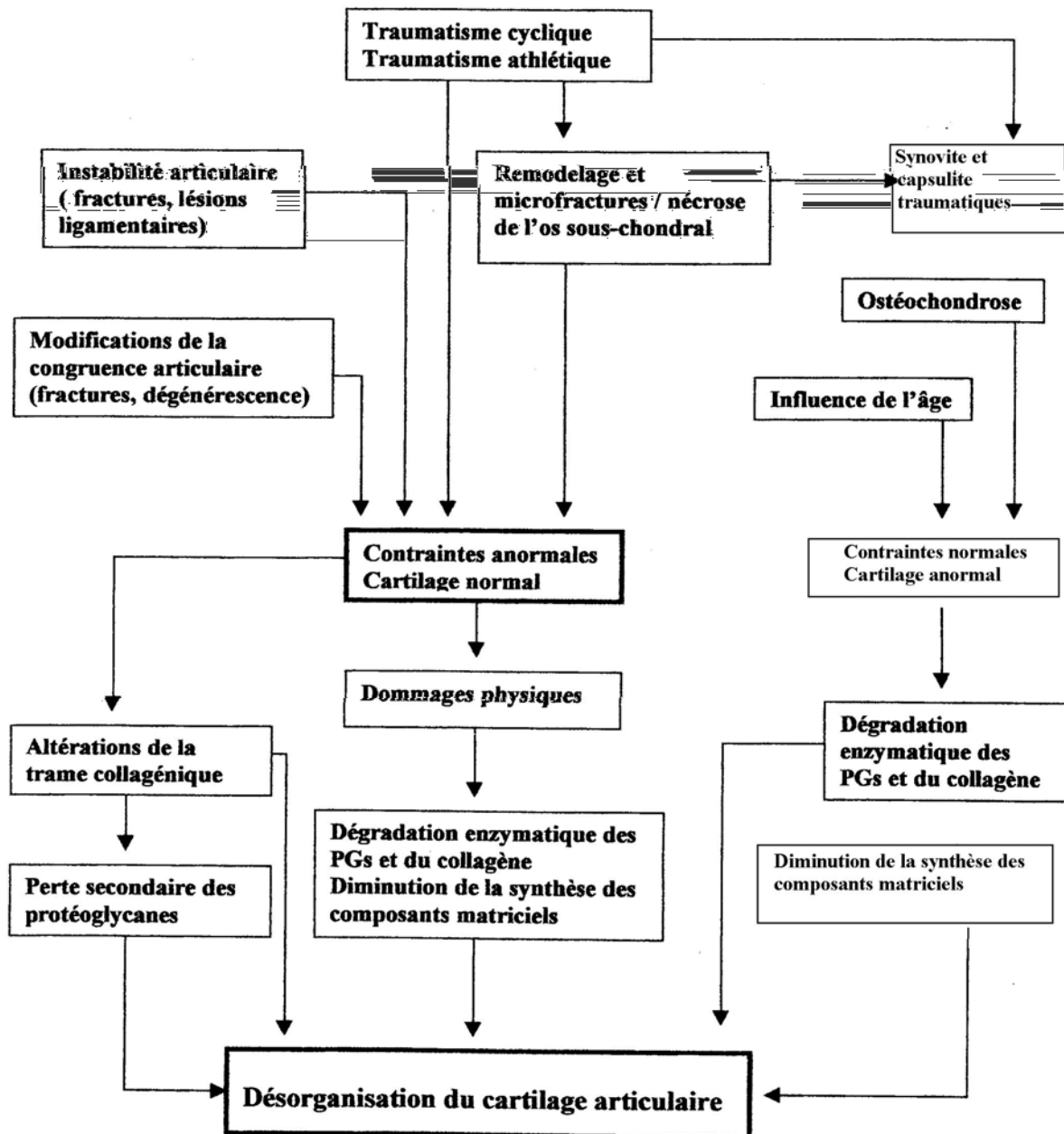


Figure 4 : facteurs impliqués dans la dégradation du cartilage articulaire dans l'arthrose équine. PGs = protéoglycanes. D'après MacDonald et Benton (40)

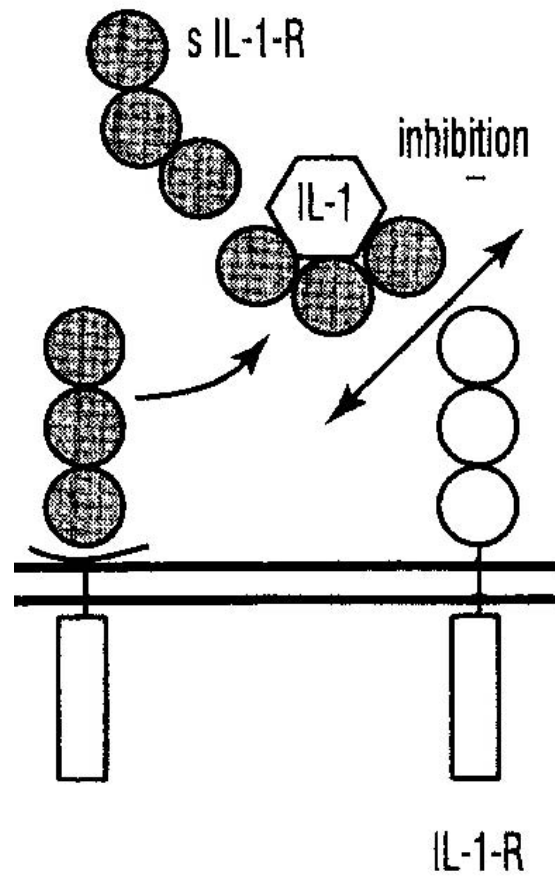


Figure 5 : L'interleukine 1 et son récepteur soluble, fonctionnement schématique . D'après Revillard (70) .

collagénase (73) et la stromélysine (56). La majorité des métallo-protéinases sont sécrétées sous forme latente, nécessitant donc un activateur pour être transformées en forme active. L'IL-1 stimule la production de stromélysine par les chondrocytes, qui convertit la collagénase latente en sa forme active. Les cystéines protéinases jouent également un rôle important dans la dégradation de la matrice extra cellulaire et leur libération peut être stimulée par l'IL-1 ou le TNF. Martel Pelletier et coll. ont suggéré que L'IL-1 pourrait être à l'origine du déséquilibre entre les MMPS et leurs inhibiteurs et ainsi promouvoir la dégradation du cartilage.(fig.6).

On a montré que l'IL-1 augmentait la synthèse de collagénase et de PGE2, d'activateurs du plasminogène tissulaire, des radicaux superoxydes et de l'IL-6 tout ceci associé à la dégradation accrue de la matrice cartilagineuse. Toutefois, il est à noter que toutes ces études ont été menées sur du cartilage immature (67). Les résultats sont à moduler en ce qui concerne le cartilage articulaire adulte, en particulier la dégradation des protéoglycanes, comme l'ont montré May et coll (50). Ces travaux montrent que l'expression phénotypique des chondrocytes est modulée de façon différente au cours de la croissance et de la maturation. En plus d'induire l'inhibition de la synthèse des protéoglycanes du cartilage articulaire, l'IL-1 semble capable de moduler la synthèse de collagène, en régulant le taux respectif des différents types de collagène. Ceci pourrait résulter en la réparation inappropriée après dégradation de la matrice. L'IL-1 a également des effets directs sur la membrane synoviale ; elle stimule la prolifération des fibroblastes synoviaux et induit des modifications sur les chondrocytes, synoviocytes et ostéoblastes.

Divers inhibiteurs de l'IL-1 ont été mis en évidence. Il a été montré que l'occupation de moins de 5% des récepteurs à l'IL-1 était suffisante pour déclencher un effet biologique ce qui implique qu'un excès important d'inhibiteurs est nécessaire afin d'occuper plus de 95 % des récepteurs (inhibition compétitive). Des récepteurs solubles peuvent également être sécrétés à l'extérieur de la cellule et empêcher la fixation de l'IL-1 à son récepteur (24). L'activité de l'IL-1 ou du TNF- α peut être modifiée ou amplifiée par la présence de l'autre. De même, les effets de l'IL-1 sur le métabolisme du cartilage articulaire peuvent être annulés par l'IGF-1 et le TGF- β . Enfin l'action de l'IL-1 sur les cellules synoviales peut être contrée par les inhibiteurs présents dans le liquide synovial ; par exemple, l'acide hyaluronique empêche la dégradation des protéoglycanes induite par l'IL-1.

Un schéma général du rôle de l'IL-1 (ainsi que du TNF- α) au cours de l'inflammation est visible sur les figures 7 et 8.

2. b-L'Interleukine 6

L'interleukine 6 (IL-6) est une cytokine de masse moléculaire 26 kDa (fig.9). On a montré que ses actions étaient variées : stimulation des hybridomes, stimulation de la prolifération des cellules de lignée B, stimulation de la synthèse de protéines inflammatoires par les hépatocytes, et activité mitogénique pour les cellules de la lignée T (67). Les chondrocytes articulaires humains produisent de l'IL-6 et peuvent ensuite être stimulés de manière dose-dépendante par l'IL-1, le TNF- α et le lipopolysaccharide bactérien (LPS). Les synoviocytes et les fibroblastes de la capsule articulaire synthétisent également de l'IL-6. Chez l'homme, Balbanc a trouvé une corrélation entre l'IL-6 et la collagénase, mais pas avec le TNF (4).

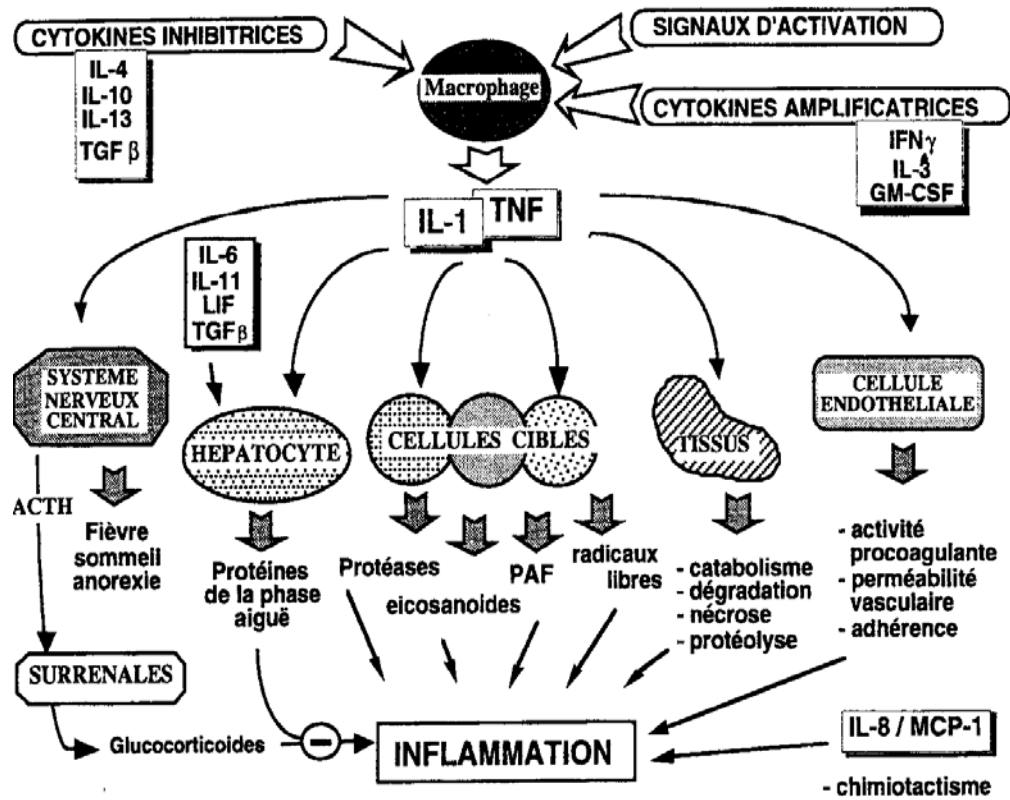


Figure 7 : Représentation schématique de la participation des cytokines dans la réaction inflammatoire. D'après Cavaillon (11).

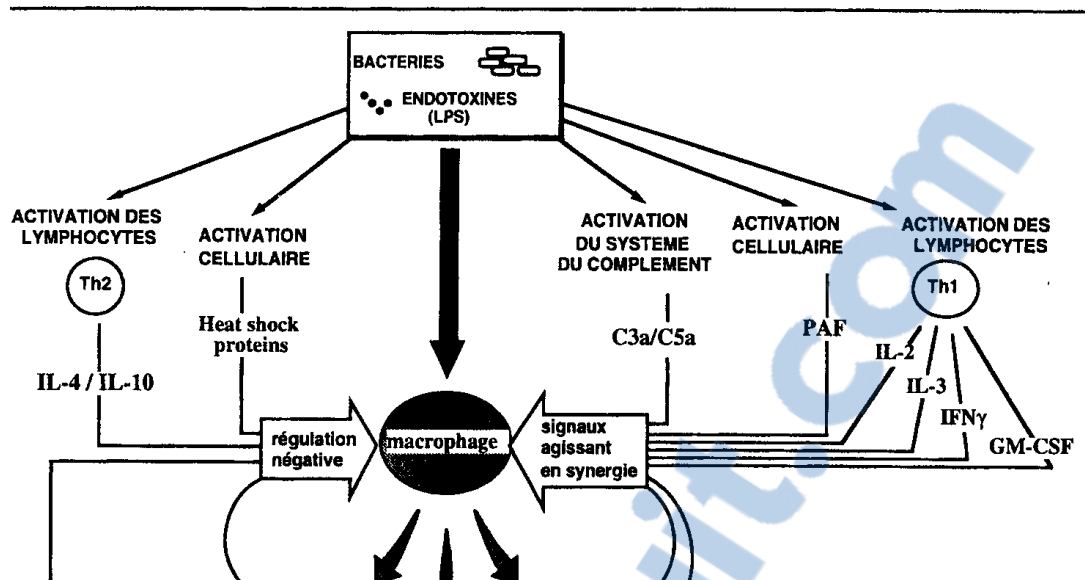


Figure 8 :Schéma illustrant les différents signaux pouvant amplifier ou au contraire réduire les productions d'IL-1, d'IL-6 et de TNF- α consécutives à l'activation des monocytes/macrophages par les bactéries ou les endotoxines. D'après Cavaillon (11).

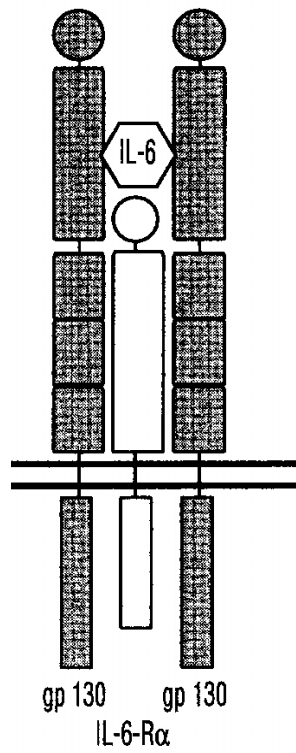


Figure 9 : Interleukine 6 et son récepteur.
D'après Revillard (70).

Middleton et coll. ont détecté une activité IL-6 sur du cartilage humain arthrosique et aucune sur du cartilage normal (53). De même, des taux élevés d'IL-6 ont été mis en évidence sur des chiens atteints d'arthrose expérimentale (77).

Le rôle de l'IL-6 dans le métabolisme du cartilage n'est pas encore clairement défini mais il y a peu de chance qu'il ait une activité autocrine. Dans les affections dégénératives toutefois, l'inflammation périodique aiguë pourrait résulter en la libération de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 et le TNF- α , qui stimulerait les synoviocytes et les chondrocytes à produire l'IL-6. La production d'IL-6 pourrait amplifier le phénomène inflammatoire par son action sur les cellules B et T, conduisant à une augmentation ultérieure de cytokines et d'enzymes protéolytiques qui pourront supprimer la synthèse et provoquer la dégradation des protéoglycanes (PGs) de la matrice extracellulaire. Son rôle dans le processus inflammatoire est principalement de favoriser la synthèse des protéines inflammatoires. Certains auteurs considèrent l'IL-6 (tout comme l'IL-8) comme étant pro-inflammatoire (fig.10). Un autre de ses rôles pourrait être le rétrocontrôle de l'IL-1 et l'augmentation de production des TIMPs.(inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases).

2. c- L'interleukine 8

L'interleukine 8 (IL-8) est une cytokine de masse moléculaire 6.5 kDa. L'IL-8 est un agent chimiotactique efficace pour les neutrophiles. Les chondrocytes libèrent des radicaux superoxydes et des enzymes lysozymiales quand ils sont stimulés par l'IL-8. Il a été montré que l'IL-1 induisait la synthèse d'IL-8 par les chondrocytes isolés et des extraits cartilagineux in vitro. Le rôle de l'IL-8 dans le métabolisme de la matrice extracellulaire est inconnu à ce jour mais la potentialisation de sa production par l'IL-1 pourrait suggérer un rôle directeur dans la migration des cellules inflammatoires vers leurs organes cibles durant les épisodes de dommage tissulaire au sein de l'articulation (67).

2. d- L' Insuline-like growth factor

L'insuline-like growth factor (IGF) se rencontre sous deux formes , l'IGF-1 et l'IGF-2 qui sont deux chaînes polypeptidiques de 7.5 kDa. L'IGF est trouvé dans la plupart des tissus du corps et est sous contrôle de l'hormone de croissance (GH). Dans le sérum, une forte proportion de l'IGF est fixée à des protéines de fixation spécifiques de 150 kDa. Le liquide synovial humain montre une activité IGF mais on ne sait pas si elle est d'origine sérique ou si elle provient de tissus articulaires.

L'IGF-1 est considéré comme un facteur de réparation tissulaire. L'action de l'IGF-1 fait intervenir un récepteur spécifique, une protéine hétérotétramérique. In vitro, on a montré que l'IGF-1 était capable de stimuler la synthèse des agrécans (68), du collagène de type II et des protéines. La biosynthèse des PGs du cartilage articulaire équin est stimulée par le recombinant humain de L'IGF-1 de manière dose-dépendante ; toutefois, la sensibilité aux effets du recombinant est inversement proportionnelle à l'âge de l'animal prélevé. En fait, Platt et Bayliss ont montré qu'une dose plus importante de recombinant était nécessaire pour une stimulation maximale du cartilage articulaire équin adulte (68). L'activité de L'IGF-1 serait corrélée à la gravité de l'atteinte du cartilage arthrosique, contrairement à l'IL-1 (53). On a montré que l'IGF-1 supprimait la synthèse du collagène de type I et réduisait le

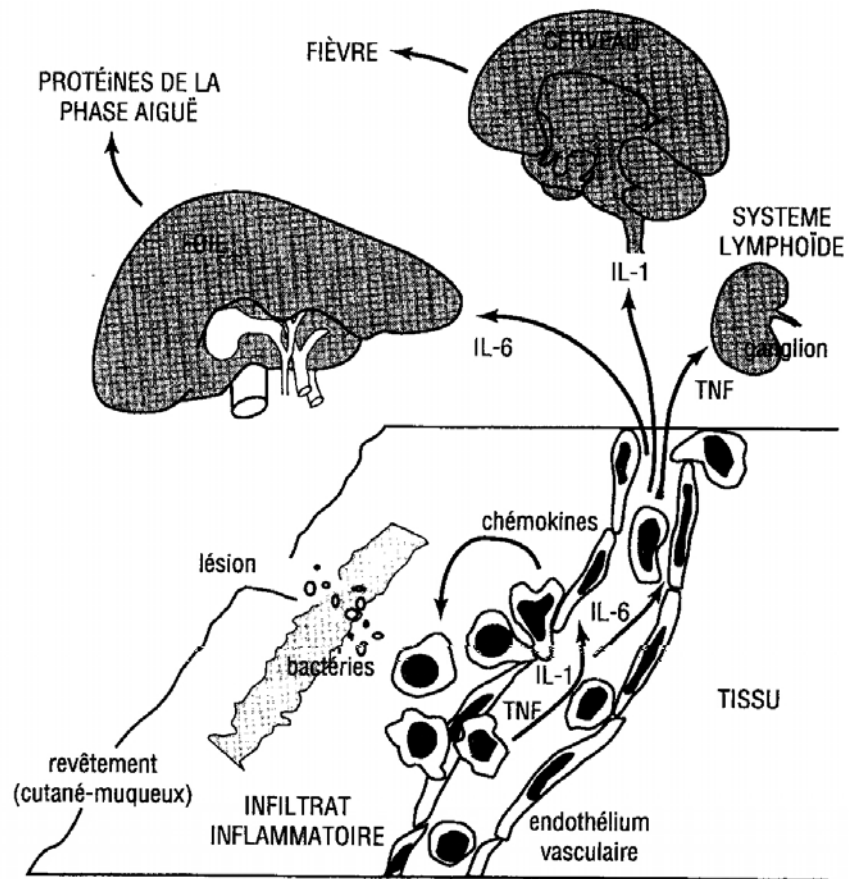


Figure 10 : Les cytokines pro-inflammatoires et leurs interactions- Intervention de l'IL-6.
D'après Revillard.(70)

catabolisme des PGs à base de cartilage bovin in vitro. Il a également été établi que le recombinant diminuait le taux de libération de PGs endogènes et nouvellement synthétisés de la matrice extracellulaire in vitro (68).

Plusieurs auteurs ont rapporté une augmentation de la biosynthèse des PGs associée à un regroupement des chondrocytes près des sites carencés en PGs dans le cartilage arthrosique. Ainsi, bien que les chondrocytes montrent une augmentation modérée de la biosynthèse des PGs dans les zones endommagées, une dégénérescence catabolique significative continue de surpasser toute tentative de réparation de la part du chondrocyte. Il a été montré une augmentation critique du taux d'ARN m d'IGF-1 et sa translation active dans les régions en dégénérescence du cartilage humain. Ces études suggèrent que les chondrocytes répondent à la carence en un des composants de la matrice en produisant de l'IGF-1 pour promouvoir une réponse réparatrice autocrine-paracrine qui peut entre autre bloquer les effets délétères induits par l'IL-1 sur la dégradation des PGs, mais reste inadéquate. Cette défaillance pourrait s'expliquer par un problème de biodisponibilité de l'IGF-1 dû à un excès de protéines de fixation (14). Pelletier et Martel-Pelletier expliquent cette incapacité de l'IGF-1 à contrer les effets de l'IL-1 et du TNF- α par une résistance du chondrocyte à l'action de cette hormone (57).

2. e- Le Transforming Growth Factor β

Le Transforming Growth factor β (TGF- β) fait partie d'une famille de molécules structurellement proches appelées TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 et TGF- β 5. Elles font partie d'une superfamille de cytokines incluant les protéines morphogéniques osseuses, la substance anti-mullerienne, l'activine et l'inhibine. Bien que ces molécules soient proches structurellement du TGF- β , il n'y a pas de réaction croisée avec le récepteur au TGF- β (59). Au départ, le TGF- β a été purifié à partir de plaquettes humaines et a été identifié comme un peptide homodimérique de masse moléculaire 25 kDa. Le TGF- β est potentiellement sécrété par tous les types cellulaires sous une forme biologiquement inactive. Il a été avancé que le complexe TGF- β latent était activé par l'action de protéases exogènes comme la plasmine et la cathepsine D. Trois types de récepteurs ont été décrits pour le TGF- β , mais un seul permettrait son expression. Alors que le récepteur au TGF- β semble être universel, la spécificité de la cible du TGF pourrait être déterminée par la capacité de la cellule à activer la forme latente de la molécule, ce qui constituerait une étape décisive dans l'action du TGF. Il a été montré que la décorine fixait spécifiquement le TGF- β et elle pourrait être une forme de stockage du TGF- β sous forme latente. Le TGF- β latent fixé pourrait jouer un rôle primordial dans la régulation de la réponse chondrocytaire aux dommages cellulaires. La destruction locale du collagène de la matrice, qui provoque la libération de décorine et de TGF- β , soumet les chondrocytes avoisinants à une concentration locale de TGF- β activé augmentée, ce qui induirait une activation du métabolisme matriciel et ainsi un mécanisme de réparation rapide en réponse.

Les effets du TGF- β in vitro ont été étudiés chez un certain nombre d'espèces. Il a été montré que le TGF- β pouvait augmenter la synthèse de PGs et en diminuer le catabolisme sur le cartilage bovin jeune. Des études plus poussées ont montré que le TGF- β augmentait la synthèse d'agrécanes et d'acide hyaluronique de manière coordonnée de façon à former des macromolécules typiques du cartilage articulaire normal. Le TGF- β stimule préférentiellement la synthèse des petits PGs interstitiels de la matrice extracellulaire comme la décorine et le biglycane. Le facteur de croissance peut également fortement augmenter la production de

collagène et de fibronectine par les fibroblastes, mais on ne sait pas s'il peut produire la même réponse sur les chondrocytes. On a montré que le TGF- β inhibait partiellement la dégradation cartilagineuse induite par l'IL-1 sur du cartilage articulaire porcin immature ; cette observation est due partiellement à la capacité du TGF- β à diminuer le nombre de récepteurs à l'IL-1 sur les chondrocytes. Il a été également montré qu'il augmentait la synthèse et la sécrétion de PAI-1 et de TIMPs et diminuait la synthèse d'activateur du plasminogène et de la stromélysine. Des extraits de cartilage articulaire équin cultivés in vitro en présence de recombinant humain de TGF- β ont montré une synthèse augmentée de PGs, bien que l'action soit moins forte que celle induite par le recombinant de l'IL-1. Le TGF- β antagonise les effets de l'IL-1 et vice-versa (13). Chez l'homme, on a également noté que la susceptibilité du cartilage aux facteurs de réparation tissulaire varie avec l'âge ainsi, le TGF- β est le plus puissant mitogène sur le cartilage des patients âgés.

Le TGF- β augmente la synthèse de plusieurs constituants de la matrice par diverses cellules, chondrocytes y compris, et diminue l'action des protéases. Il diminue la synthèse des protéinases (stromélysine, activateur du plasminogène) et augmente la synthèse de leurs inhibiteurs.

2. f- Les autres cytokines

Le FGF (Fibroblast Growth Factor) pourrait augmenter la production de MMps induites par l'IL-1 et l'IFN- γ (interféron γ) pourrait potentialiser les effets inhibiteurs de synthèse du TNF- α . Le FGF, tout comme les PDGFs (platelet derived growth factor), les IGFs et les TGF- β s, est mitogène et peut être considéré comme un facteur de réparation tissulaire (13). Le rôle de ces cytokines et leur impact réel dans la dégradation articulaire chez le cheval reste à définir.

Les chondrocytes au sein du cartilage articulaire équin synthétisent, organisent et régulent la mise en place de leur matrice extracellulaire complexe de façon très ordonnée et efficace. Malgré leur isolation spatiale, les chondrocytes maintiennent efficacement une composition matricielle optimale dans le cartilage sain, et les cytokines apparaissent comme des médiateurs importants qui contrôlent et coordonnent ce métabolisme. Certaines ont plutôt un rôle catabolique (IL-6, TNF- α), alors que d'autres favorisent plutôt la réparation tissulaire (IGFs, TGF- β s). Les affections dégénératives, qui impliquent une détérioration graduelle de la matrice extracellulaire, pourraient résulter de l'altération de ces mécanismes de régulation du métabolisme du chondrocyte (59). (fig.11)

II- ETUDE SPECIFIQUE DU TNF- α

1- Définition et structure

Le Tumor Necrosis Factor- α est une cytokine, plus précisément une monokine produite par les macrophages activés et les monocytes (11). Le TNF existe sous deux formes à fort degré d'homologie, le TNF- α et le TNF- β qui, lui, est une lymphotoxine produite par les lymphocytes T activés. Le TNF fut primitivement mis en évidence par sa capacité à induire in vivo la lyse de certaines cellules tumorales en culture et la nécrose hémorragique de tumeurs transplantées.

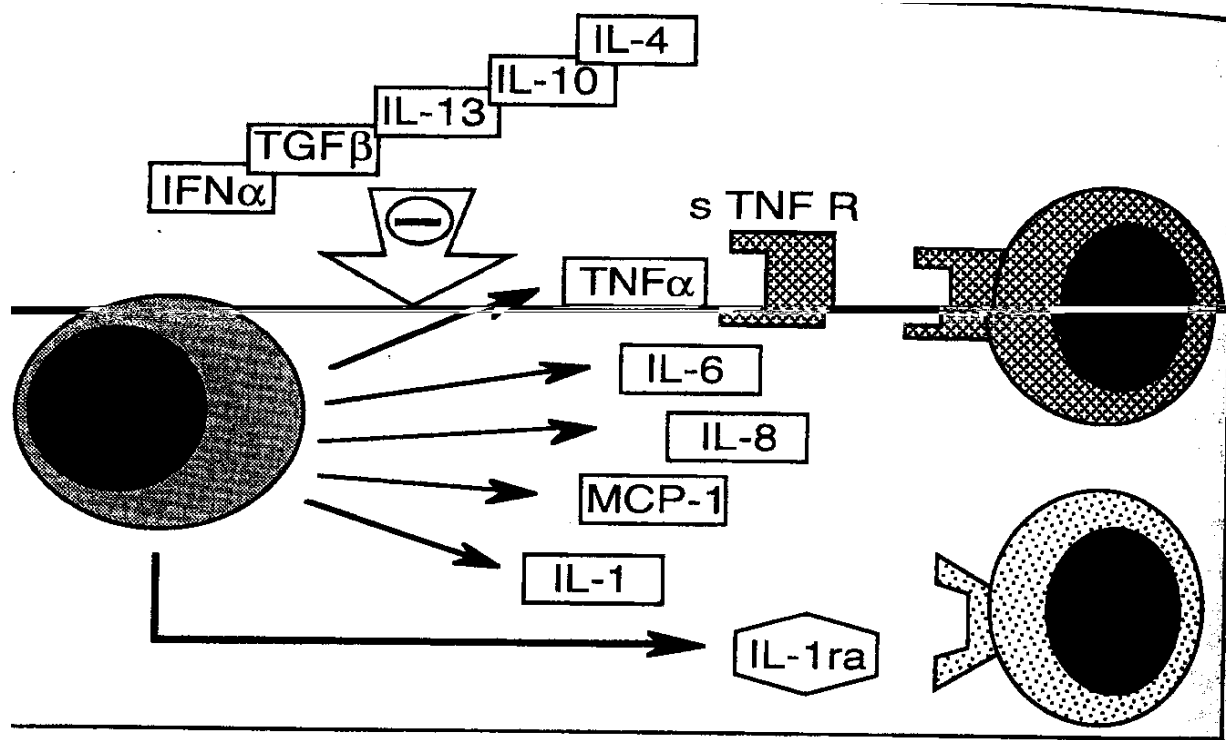


Figure 11 : Régulation du phénomène inflammatoire par le jeu des cytokines et de leurs inhibiteurs. D'après Cavaillon (11).

chez des souris (36) ; il fut également nommé temporairement cachexine du fait de ses propriétés cachectisantes lors d'infections parasitaires jusqu'à ce que l'on démontre la similitude des séquences de ces deux molécules. (tableau 2)

Le TNF- α est un peptide de 157 Acides aminés sous sa forme mature composé de trois sous unités de 17 kDa chacune. Il est produit sous la forme d'un précurseur de 233 acides aminés ensuite clivés grâce à une métalloprotéinase. Chaque monomère est essentiellement constitué de feuillet β (fig. 12) Ces trois monomères s'assemblent pour former un trimère en forme de cloche qui est la forme biologiquement active prédominante dans le sérum et les autres liquides physiologiques (fig.13). Il existe également une forme membranaire de TNF- α , de poids moléculaire 26 kDa, biologiquement active lors de contacts cellulaires, mise en évidence sur les cellules activées. Il s'agit d'une molécule ayant conservé son peptide signal.

Il existe une identité de séquence inter-espèce de 71% pour cette molécule.

Les gènes du TNF- α sont situés chez l'homme et la souris de manière unique au sein des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité et est composé de quatre exons. (fig.14)(11)

Il existe deux récepteurs cellulaires du TNF- α , également capables de fixer le TNF- β , le TNF R de type 1 (p55) et le TNF R de type 2 (p75) présentant 28 % d'homologie entre eux. Ils transmettent des signaux d'activation et sont à l'origine de l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Cependant, ces deux récepteurs sont probablement associés à deux fonctions différentes car l'un est présent en faible quantité et de manière constitutive (TNF R 1) et l'autre est inducible. Il existe également des formes solubles de ces deux récepteurs, présents dans les liquides biologiques. Ils sont constitués des domaines extra-cellulaires des formes membranaires et sont capables à forte concentration de fixer et d'inhiber le TNF- α , et à contrario d'accroître sa demi-vie en le stabilisant à faible concentration. (tableau 3)(11)

2 – Production et activité biologique

Le TNF- α est reconnu comme étant une cytokine pro-inflammatoire, à l'instar de l'IL-1 et l'IL-6. C'est un important médiateur des phénomènes inflammatoires aigus. (11)

Comme la plupart des cytokines pro-inflammatoires, le TNF- α est produit en abondance par rapport à une cytokine classique qui agit en principe dans l'environnement immédiat, en système autocrine (sur la cellule productrice elle-même) ou paracrine (sur les cellules voisines). Le TNF est sécrété quant à lui à des concentrations plus élevées sous l'influence de systèmes d'amplification (boucles de contrôle) et peut ainsi agir à distance de façon endocrine au sein du système immunitaire ou sur d'autres organes ou systèmes. (tableau 4)(30).

Les types de cellules productrices de cytokines sont très variés mais les sources cellulaires principales restent les cellules souches des lignées sanguines. Ainsi le TNF- α est produit essentiellement par les monocytes et les macrophages, les polynucléaires neutrophiles , les lymphocytes T, les cellules natural killer et les mastocytes, entre autres.....(tableau 5)

L'activité biologique du TNF- α est extrêmement diversifiée du fait de la très grande diversité de cellules sensibles et de sa capacité à induire la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires. Elle s'explique par l'action des molécules de TNF sur la membrane des cellules sensibles qui reçoivent le message par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques qui relaient ce dernier grâce à l'émission d'un signal interne (fig. 15) (55).

	TNF α		TNF β / LT α	
	Humain	Murin	Humain	Murin
Nombre d'acides aminés				
précurseur	233	235	205	202
forme mature	157	156	171	169
Homologies homme / souris		79 %		74 %
Homologie avec le TNF α	-	-	28 %	35%
Nombre de cystéines	2	2	0	1
Glycosylation	0	+	+	+
masse molaire (monomère)	17.3 kDa	18.5 kDa	25 kDa	18 kDa
Chromosome	6p21	17	6p21	17
Nombre d'exons	4	4	4	4

Tableau 2 : Caractéristiques comparées des deux formes de TNF. D'après Cavaillon (11).

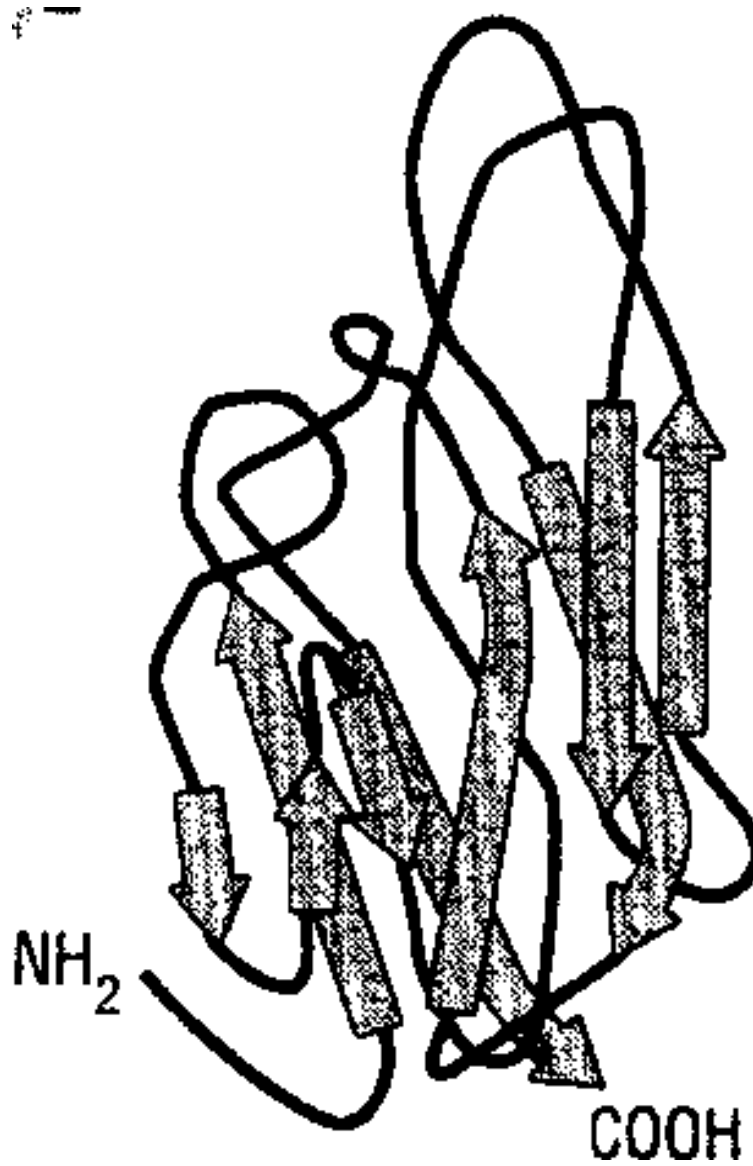


Figure 12 : Structure tridimensionnelle du TNF- Les zones représentées par des flèches sont en feuillet β . D'après Revillard (70).



Figure 13 : Aspect tridimensionnel de l'association des trois molécules de TNF- α .
D'après Cavaillon (11).

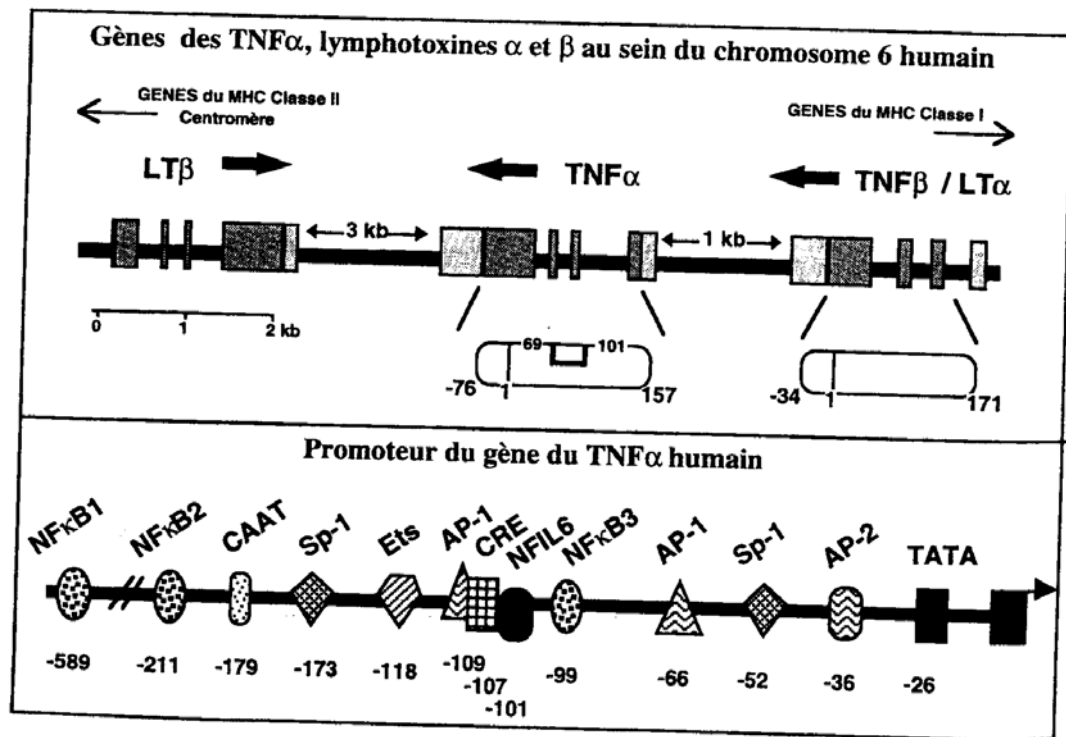


Figure 14.: Représentation schématique des gènes du TNF humain. D'après Cavaillon (11).

	kDa	a.a.	Chromosome	Observations
LIGANDS				
CD40L	35	261	Xq24	27% homologie avec TNF α (25% avec TNF β)
CD30L	26	234	9q33	trimérique, source T activés
CD27L		193	19p13.3	T activés
NGF	26	120	1p13	présent sur B & T
				homodimère. Facteur neurotrope, favorise la survie et la différenciation des neurones
			Fas-L	31 278
			RECEPTEURS	
			CD40	48 277 20q11.2-13.2
				présent sur le dendritiques f (homologie h
			CD30	595 1p36
			CD27	55 12q13
			NGF R	70-75 399 17q21-22
			Fas	36 278 10q24.1
				présent sur B, présent sur T
				faible affinité affinité est le
				impliqué dans

Tableau 3 : Super famille des ligands et des récepteurs apparentés au TNF.
D'après Cavaillon (11).

CYTOKINES & MEDIATEURS	PRODUITS MICROBIENS	STIMULI IMMUNOLOGIQUES	AUTRES
IL-1 ; IL-2 ; TNF GM-CSF ; IFN γ ACTH ; Cross-linking Fc γ R	bactéries (LPS; TSST-1, SPE A & B, SEB); parasites; mycoplasmes; virus champignons	tumeurs; GVH rejet de greffe Réact. mixte lymphoc. IgA polymériques anti-CD3; anti-CD28 anti-CD69 (+ PMA) traitement OKT3 <i>in vivo</i> fragments fibronectine	Exercice; Particules; Zymosan; Calcium ionophore; mitogènes T; PMA (PHA, PWM, ConA) Dimethylnitrosamine Rayons X

Tableau 5 : Les inducteurs du TNF- α au niveau des macrophages. D'après Cavaillon (11).

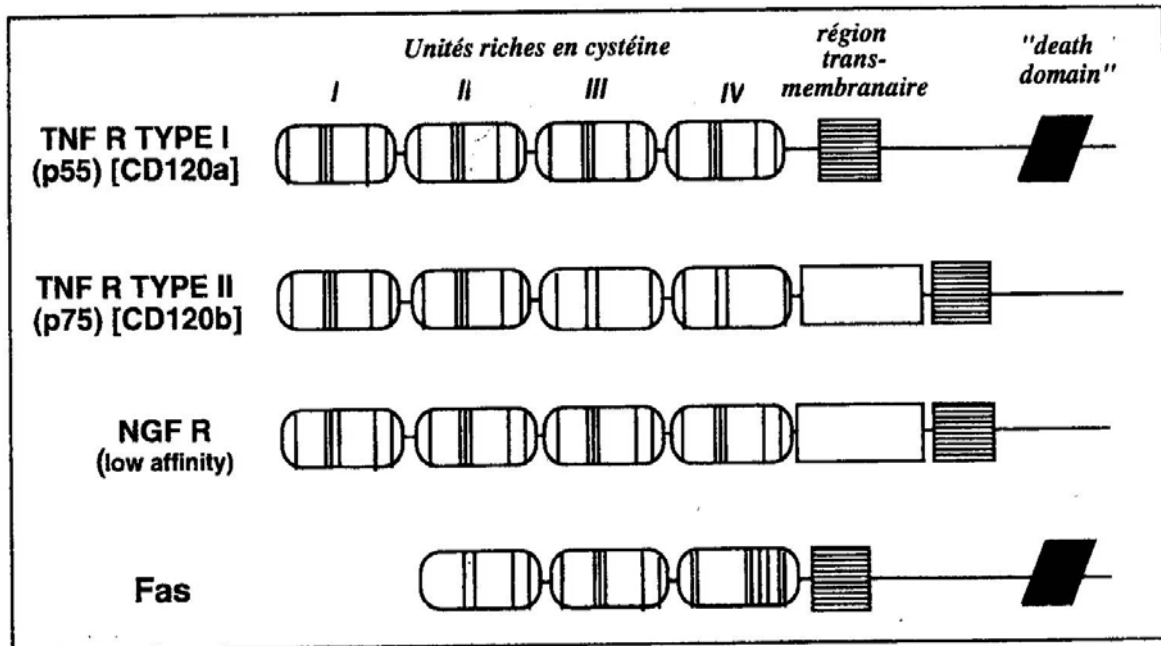


Figure 15 : Schéma des domaines extracellulaires et cytoplasmiques des TNF R et de récepteurs apparentés (NGF= Nerve Growth factor). D'après Cavaillon (11).

L'action du TNF- α est donc pleiotropique grâce à la diversité des cellules sensibles et sa capacité à pouvoir être diffusé à distance de la cellule productrice grâce aux concentrations élevées qu'il peut atteindre. Entre autres, il a une action sur le système nerveux central, le système immunitaire, les cellules hématopoïétiques et les fibroblastes....Il est une des cytokines majeures impliquées dans la réaction inflammatoire (fig. 7). Il est responsable du phénomène de choc septique dans les infections septicémiques, de phénomènes de cachexie en cas d'infection (résorption osseuse, fonte musculaire, action sur les adipocytes) et stimule le développement du système lymphoïde périphérique(18). De plus il agit également indirectement en stimulant la production d'autres cytokines pro-inflammatoires telles l'interleukine 1 et 6. Il est impliqué dans de nombreuses situations pathologiques : infections persistantes, septicémies, maladies auto-immunes et d'hypersensibilité et certains cancers.

Le TNF- α peut également jouer un rôle anti-cancéreux (d'où son nom) en induisant la production d'interféron β par les fibroblastes qui inhibent la multiplication de certaines cellules normales ou cancéreuses.

Le mode d'action du TNF- α se fait par l'intermédiaire de sa fixation à ses récepteurs spécifiques : des récepteurs solubles qui sont obtenus par protéolyse limitée du récepteur membranaire qui libère les domaines extra-cellulaires intacts (servant ainsi de système de transport ou d'antagoniste en capturant les molécules et les empêchant de se lier aux cellules réceptrices) et les récepteurs membranaires.

Une fois lié à son récepteur membranaire spécifique, le TNF- α induit la production de voies internes de signalisation et activent des enzymes (kinases) qui initient une cascade de réactions de la membrane jusqu'au noyau cellulaire ce qui conduit à la transcription de gènes cellulaires et à la synthèse de nouvelles protéines.

Le TNF- α est ainsi impliqué dans une cascade d'évènements qui mènent à la synthèse des protéines inflammatoires de type prostaglandines et thromboxanes (11) ainsi que d'autres cytokines pro-inflammatoires.

3- Rôle dans l'inflammation du carpe

Au cours de l'inflammation aigue d'une zone articulaire, il a été démontré (18) une élévation significative du taux de TNF- α au sein de l'articulation concernée.

Le TNF- α est sécrété au sein de l'articulation à la fois par les monocytes et macrophages, mais aussi par les chondrocytes et les cellules de la membrane synoviale au cours du phénomène inflammatoire .Ces cellules expriment le gène du TNF- α après activation par différents inducteurs (tableau 5) ; il existe également une voie de régulation négative, le TNF- α régulant sa propre sécrétion ainsi que différentes cytokines telles L'IL-1 et L'IL-6 principalement.

Le TNF- α est un co-facteur de l'activation des lymphocytes et de thymocytes et de ce fait peut induire la production d'IL-2 et de ses récepteurs. Il est un activateur des macrophages et induit la production de PGE2, la libération de lysozyme et la production d'IL-1, d'IL-6, d'IL-8 et d'IL-10.

Le TNF- α agit conjointement avec l'interleukine 1 en potentialisant ses effets. Il induit la synthèse des métalloprotéases neutres telles que les collagénases, la stromélysine, l'élastase et la plasmine qui sont responsables de la dégradation de la matrice cartilagineuse par catabolisme de ses constituants. De plus il augmente la production d' H₂O₂ en agissant comme agent de priming et activant les chondrocytes. Il induit également la production des eicosanoïdes, des activateurs du plasminogène et des protéines de la phase aigue, qui sont des protéines inflammatoires et intervient dans l'inhibition de la synthèse des protéoglycanes et du collagène de type II, tout en stimulant la synthèse de collagène de type III. Les chondrocytes, surtout ceux des couches superficielles, expriment un grand nombre de récepteurs du TNF- α ce qui explique son effet délétère sur le cartilage au cours de l'inflammation.

La sécrétion du TNF- α a pour résultat l'accumulation accrue de monocytes et neutrophiles dans l'articulation en augmentant l'adhésion cellulaire des leucocytes à la paroi endothéliale.

De plus TNF- α induit la production intra-articulaire de différentes cytokines dont IL-6, IL8, CSFs et lui-même.

4-Les différentes méthodes de dosage du TNF- α

Il existe trois méthodes principales de dosage de cette cytokine.

4. a- Les dosages immunologiques

Il s'agit de mesurer la quantité de TNF- α présent dans un liquide biologique en utilisant des anticorps monoclonaux anti-TNF- α qui se fixeront sur ces molécules.

La technique ELISA est celle la plus utilisée. Le complexe antigène-anticorps ainsi formé est quantifié grâce à une enzyme qui va réagir avec un substrat adéquat et produire une coloration quantifiable ensuite par spectrophotométrie. On utilise en général des anticorps monoclonaux préparés en immunisant des lapins à l'aide de TNF- α . Les sérums et liquides d'ascites sont récupérés et on isole ainsi des anticorps monoclonaux de type IgG que l'on fait réagir ensuite sur les liquides biologiques à analyser.(47)

Il est également possible d'utiliser des techniques radio immunologiques, où l'anticorps monoclonal utilisé est alors couplé à une substance radioactive ce qui permettra la quantification par mesure de la radioactivité émise par les échantillons.(6)

En principe, il existe une bonne antigénicité croisée entre les différents TNF- α de chaque espèce ce qui permettrait d'utiliser des antisérums humains pour les diverses expérimentations notamment sur les chevaux, mais il existe tout de même quelques différences de spécificité entre chaque espèce qui pose les limites de l'utilisation de cette technique quant à la précision du dosage.

Cependant l'intérêt est de pouvoir doser à la fois le TNF- α actif biologiquement et celui inerte car lié à différentes protéines qui sont pour la plupart des morceaux clivés de récepteurs au TNF et qui neutralisent son activité.

4. b- Les dosages biologiques

Ils permettent de doser non plus la quantité totale de molécules de TNF présentes, mais le TNF biologiquement actif, en mesurant son activité spécifique.

Il s'agit en fait d'utiliser la cytotoxicité du TNF sur des populations cellulaires sensibles et de mesurer ensuite la destruction de ces cellules par rapport à des témoins positifs et négatifs. Les lignées cellulaires les plus souvent utilisées sont les cellules de fibrosarcome de souris L929, les cellules WHEI 164 et les cellules L-M qui sont les populations cellulaires les plus sensibles et également les plus faciles à cultiver.(9)

Leur sensibilité est en général augmentée par l'induction des nouvelles synthèses protéiques par ajout d'actinomycine D ou de cycloheximide. On mesure ensuite la cytotoxicité par adjonction de différents colorants qui sont incorporés dans les cellules encore vivantes. La spectrophotométrie permet alors de déterminer le pourcentage de toxicité par rapport à un témoin sans TNF.

D'autres essais biologiques existent, incluant des techniques de suppression de la lipoprotéine lipase des adipocytes et la réduction des potentiels de repos du myocyte.

4. c- Les dosages par RT- PCR

Le TNF- α étant une protéine il est possible de le doser indirectement par quantification de sa molécule d'ARN-m dans les échantillons à tester. Cette technique permet de quantifier les modulations dans l'expression des gènes responsables de la synthèse du TNF- α .

Les molécules d'ARN-m de l'échantillon à tester sont mises en incubation avec une enzyme la transcriptase inverse et des nucléotides ainsi que deux précurseurs d'ADN et une ADN polymérase : la Taq-polymérase. Une molécule d'ADN est ainsi formée et répliquée à des millions d'exemplaires par l'ADN polymérase.

Cet ADN est ensuite mis en évidence et quantifié par migration par électrophorèse sur gel d'agarose.

Or cette réplication se fait à un taux constant et exponentiel ce qui permet la quantification des molécules présentes initialement grâce à des courbes standard.

Cette technique d'avenir est cependant encore peu utilisée dans le domaine qui nous intéresse ici.

III- LES AUTRES FACTEURS DE REGULATION DE L'HOMEOSTASIE ARTICULAIRE- RÔLE DES METALLOPROTEINASES.

1- Les protéinases

Quatre classes de protéinases ont été identifiées et la synthèse de la plupart d'entre elles est sous le contrôle de cytokines et d'hormones (fig 6).

1-a Les métalloprotéinases

Les métalloprotéinases de la matrice (MMPs) sont une famille d'enzymes capables de dégrader la matrice extracellulaire du cartilage articulaire à pH neutre. Elles sont caractérisées par la nécessité d'un ion Zn^{2+} au niveau de leur site actif (43). Les formes latentes de ces métalloprotéinases sont transformées en formes actives par perte des peptides qui découvrent le site actif. On peut classer les MMPs auxquelles on s'intéresse chez le cheval en trois groupes : les stromélysines, les collagénases, et les gélatinases (tableau 5)

La collagénase interstitielle ou tissulaire (ou MMP-1) est spécifique du collagène et clive les trois chaînes de la triple hélice en un même site : elle coupe la triple hélice de collagène de type II en deux parties inégales qui sont ensuite sujettes à la protéolyse. La collagénase interstitielle est produite par une gamme étendue de cellules telles que les macrophages, les fibroblastes, les cellules synoviales, les ostéoblastes, les chondrocytes et les cellules endothéliales. La seule action de cette enzyme en attaquant la liaison entre le collagène de type II et le collagène de type IX peut entraîner une désorganisation majeure de la matrice cartilagineuse .

Il existe une seconde collagénase humaine appelée collagénase neutrophile, ou MMP-8. Cette dernière est stockée dans des granules spécifiques dans les polynucléaires neutrophiles (PMNs) et sécrétée en réponse à certains stimuli. Ces deux enzymes ont la particularité d'être efficaces contre le collagène de type II mais ont également d'autres substrats. (Tableau 5)

A part la collagénase, la principale métalloprotéinase que l'on trouve dans les cultures de fibroblastes et de la membrane synoviale est la stromélysine, également appelée protéoglycanase ou MMP-3. La stromélysine agit sur un certain nombre de constituants de la matrice, y compris les protéoglycanes et le collagène entre autre de type II dans les portions non hélicoïdales (tableau 5). Elle attaque la protéine centrale de l'agrécan entre les domaines G1 et G2, et les fragments sont ensuite éliminés par endocytose ou par diffusion dans le liquide synovial ou le sang. On pense également que la stromélysine jouerait un rôle significatif dans l'activation de la pro-collagénase en collagénase. La stromélysine a besoin de la présence de calcium pour stabiliser la conformation de l'enzyme et faciliter la fixation au substrat. En fait le taux de calcium contenu dans la matrice extra-cellulaire est suffisant.

Une seconde enzyme très proche de la stromélysine a été isolée et a été appelée stromélysine - 2(ou MMP-10). Une autre enzyme, appelée matrilysine ou MMP-7 a la même spécificité de substrat que la stromélysine (12) et est donc capable de dégrader les PGs, la fibronectine, et la gélatine. Elle est également coactivateur de la collagénase et peut être intégrée à la famille des stromélysines.

Le sous-groupe des stromélysines apporte probablement la contribution la plus importante à la destruction de fond en phase inflammatoire en lien avec leur spécificité de substrat assez large et leur pH optimum (62). Les stromélysines ont un rôle double au sien du cartilage : elles dégradent les PGs mais permettent également d'induire la destruction du cartilage par les collagénases.

L'importance de la collagénase(MMP-1) et de la stromélysine (MMP-3) dans la dégradation de la matrice est soutenue par le fait qu'on observe de forts taux de ces enzymes dans le

cartilage arthrosique, et la membrane synoviale d'articulations atteintes chez l'homme. On considère d'ailleurs qu'elles sont corrélées à la sévérité des lésions tissulaires.

Une protéinase de 72 kDa, appelée gélatinase-A ou MMP-2, est capable de dégrader la gélatine, le collagène de type II dénaturé (entre autre par les autres MMPs) et le collagène de type IV. Elle est également efficace contre la fibronectine, l'élastine et le collagène de type V, VII, X et XI, mais pas contre le collagène de type I et VI (tableau 1). La MMP-2 fait partie des MMPs les plus répandues et est produite par différentes cellules dont les chondrocytes et les synoviocytes (18).

Une seconde gélatinase, de 92 kDa, aussi appelée gélatinase-B ou MMP-9 est un produit de sécrétion majeur des PMNs et des macrophages et est également active contre le collagène dénaturé. La MMP-9 a sûrement des rôles multiples dans la diapédèse cellulaire, l'augmentation de l'invasion cellulaire et la dégénérescence cartilagineuse par un renouvellement inapproprié de la matrice extracellulaire (1).

Toutes les MMPs sont sécrétées sous forme de pro-enzymes latentes qui sont activées à l'extérieur de la cellule. La collagénase est probablement activée par la stromélysine, mais aussi, ainsi que d'autres enzymes, par la plasmine, issue du plasminogène par l'action d'activateurs du plasminogène, la callicréine et la cathepsine B. Le plasminogène tissulaire est contrôlé par des activateurs synthétisés par les chondrocytes et la membrane synoviale. Des inhibiteurs des activateurs du plasminogène (PAI1 et PAI2) sont également présents dans le cartilage normal. De même, la MMP-9 pourrait être activée par d'autres MMPs comme les MMP-1, -2, -3 et -7. IL est à noter que de grandes concentrations de polynucléaires neutrophiles sont souvent trouvées dans l'articulation en cas d'affection de type inflammatoire. Ces cellules contiennent de grandes quantités de sérine protéinases et de MMPs. La libération de ces enzymes par décharge des granules près de la surface articulaire pourrait causer des dommages articulaires.

Les MMPs sont inhibées par deux inhibiteurs tissulaires des MMPs : les TIMPs (tissus inhibiteurs de métalloprotéinases) et l' α_2 macroglobuline, mais la taille importante de cette dernière limite son activité. Les TIMPs, au nombre de quatre chez l'homme(27) inhibent toutes les MMPs connues, ont une forte affinité pour les MMPs actives et forment un complexe enzyme-inhibiteur de façon stoechiométrique selon un ratio de 1 pour 1(16). Le TIMP-1 est une glycoprotéine de 28 kDa, similaire à TIMP-2 (10). Les TIMPs seraient également capables d'inhiber ou de retarder l'activation des formes latentes ; ainsi, le TIMP-1 se lie spécifiquement avec la MMP-9 latente et le TIMP-2 avec la MMP-2 latente. Les TIMPs sont trouvés dans la plupart des tissus conjonctifs et pourraient être l'inhibiteur le plus important du cartilage articulaire.

S'il paraît unanime que dans le cas d'une arthrite septique, le taux de TIMPs est déficitaire par rapport au taux de MMPs (19), en revanche, dans le cas d'une arthrite aseptique ou d'un phénomène dégénératif, Clegg et coll (20) trouvent une prédominance des TIMPs par rapport aux MMPs. En fait, les enzymes libérées dans le liquide synovial sont en contact avec leurs inhibiteurs : l' α_2 macroglobuline, qui est efficace contre toutes les protéinases, et les TIMPs (12).

Les enzymes complexées avec leurs inhibiteurs sont rapidement évacuées et dans la plupart des liquides synoviaux, un excès d'activité inhibitrice est trouvé.

Dans le cas d'arthrites septiques, par contre, la libération de protéinases par une grande quantité de neutrophiles fait que la capacité inhibitrice du liquide synovial est dépassée. Dans le cas de l'arthrose humaine, les résultats sont sujets à controverse. En fait, c'est l'équilibre entre les deux qui est important pour la progression de l'affection.

Pour ce qui est du cartilage normal, un léger excès de TIMPs est pressenti. Les cellules articulaires telles que les chondrocytes et les fibroblastes synoviaux sont capables de produire TIMP-1 et TIMP-2 alors que les monocytes sanguins périphériques ne sont capables de produire que TIMP-1(19). Les TIMPs fixés aux MMPs ne sont toutefois pas décelables par la méthode de la zymographie reverse.

En résumé, les MMPs semblent jouer un rôle majeur dans la dégradation du cartilage articulaire. Leur sécrétion est stimulée par le biais des cytokines inflammatoires IL-1 et TNF- α qui agissent sur les chondrocytes. Clegg et Carter ont montré que l'activation des MMPs, en particulier des gélatinases, était un événement majeur dans le développement d'affections dégénératives (17). De même, il a été montré que les concentrations de fragments de PGs, de stromélysine, de collagénase et de TIMPs étaient augmentées de façon significative dans le liquide synovial de patients arthrosiques.

1-b Les sérine protéinases

Le taux de sérine protéinases endogènes dans le cartilage est relativement faible comparé au taux de MMPs (12). Depuis longtemps, l'association a été faite entre la dégradation cartilagineuse et la plasmine. L'activation de la procollagénase par la plasmine a ensuite été admise. Les activateurs du plasminogène font partie des sérine protéinases.

Deux types d'activateurs du plasminogène ont été isolés dans le liquide synovial de patients arthrosiques : un activateur tissulaire (tPA) et un activateur de type urokinase (uPA). Tous deux clivent la plasminogène en plasmine active et le système est régulé par un ensemble d'inhibiteurs.

Il a été démontré que L'IL-1 et le TNF- α stimulaient la production de tPA et d'uPA par le cartilage. Le plasminogène, qui n'est probablement pas synthétisé par le chondrocyte, est présent dans la matrice cartilagineuse en quantité suffisante. Il a été avancé que le tPA libéré par le cartilage permettait la conversion du plasminogène en plasmine qui, à son tour, activerait la stromélysine et la collagénase.

L'élastase et la cathepsine G sont d'autres sérines protéinases, qui ont une capacité à dégrader les protéoglycanes.

1-c les cystéine protéinases

Les cathepsines B, H et L sont des protéinases lysosomiales qui appartiennent à la famille des cystéine protéinases. Les cathepsines B et L, qui sont les plus connues, clivent les extrémités peptidiques du collagène. La cathepsine B, clive également la zone de fixation de l'acide hyaluronique des protéoglycanes et dégrade la région de fixation des GAGs en de petits fragments. Les deux cathepsines génèrent des sites de clivage sur les protéines de liaison. La cathepsine B active également les MMPs. Des taux augmentés de cathepsine B ont été trouvés dans du cartilage humain arthrosique.

Les chondrocytes et les synoviocytes seraient capables de produire des inhibiteurs des cystéine protéinases et le déséquilibre entre les deux a été mis en évidence dans le cartilage arthrosique. Expérimentalement, la sécrétion de cathepsine est stimulée par l'IL-1 et le TNF- α .

Les calpaïnes, des cystéines protéinases du cytosol actives à pH alcalin et calcium dépendantes sont également trouvées dans le liquide synovial d'articulations arthrosiques humaines et sont capables de dégrader les PGs (14). Elles sont capables de dégrader rapidement à la fois les monomères et les agrégats.

1-d Les protéinases aspartiques

Un résidu acide aspartique est nécessaire à l'action catalytique de la cathepsine D. Dans les conditions inflammatoires et durant les périodes de destruction rapide de la matrice, elle est sécrétée à l'extérieur de la cellule par les macrophages et les cellules du tissu conjonctif, principalement sous forme de proenzyme. La cathepsine est la protéinase lysosomiale la plus importante en milieu acide, ce qui limite son action in-vivo aux zones où le CO₂ et l'acide lactique peuvent créer un pH suffisamment bas. La cathepsine dégrade les protéoglycanes à un pH optimal de 5 en clivant la zone de fixation de l'acide hyaluronique ainsi que plusieurs autres sites dans les zones riches en GAGs. Elle est également capable de dégrader le collagène de type II. On pensait qu'elle était la principale enzyme de dégradation dans l'espace péri-cellulaire du chondrocyte mais on se pose désormais la question de connaître son rôle réel dans la dégradation du cartilage arthrosique.

2- Les prostaglandines

On savait depuis quelque temps que les prostaglandines étaient produites par les articulations inflammées et qu'elles pouvaient diminuer le taux de protéoglycanes de la matrice cartilagineuse. La relation entre l'IL-1 et la production de PGE₂ a été établie.

Les effets de la PGE₂ sur les articulations comprennent une vasodilatation, une augmentation de la sensation de douleur, une diminution du taux de PGs du cartilage (par dégradation et inhibition de la synthèse), une déminéralisation osseuse et la promotion de la sécrétion d'activateurs du plasminogène (42).

Un rôle pro-inflammatoire a été avancé pour la PGE2 (15) et la phospholipase A2 (PLA2) dans un certain nombre d'affections chez l'homme, y compris l'arthrose. Le rôle de PLA2 dans la pathogénie de ces affections pourrait être dû à son activité enzymatique qui aboutit à la formation de divers médiateurs de l'inflammation comme les prostaglandines, le PAF et les lysophospholipides. Il est supposé que la PLA2 trouvée dans le liquide synovial est issue des chondrocytes plutôt que des autres types cellulaires. La stimulation des enzymes de dégradation par les chondrocytes pourrait être liée à la synthèse de prostaglandines via l'action de la PLA2 en réponse à l'IL-1 et au traumatisme mécanique. La corrélation positive entre la PLA2 et la stromélysine conduit à la supposition que la synthèse d'enzymes de dégradation des PGs par les chondrocytes est régulée par la PLA2 associée à la membrane par recrutement d'acide arachidonique et formation de prostaglandines.

D'autres études montrent que les prostaglandines pourraient augmenter la dégradation des PGs et la libération de MMPs latentes sur des cultures de chondrocytes. Il a été également établi qu'une diminution du taux de prostaglandines intracellulaires diminuait la synthèse de MMPs par les cellules synoviales et que les corticostéroïdes, qui sont des inhibiteurs puissants de la PLA2 étaient efficaces pour diminuer la synthèse de stromélysine par les chondrocytes.

Une activité élevée de PLA2 a été démontrée dans les zones soumises à forte pression du cartilage articulaire, alors que l'activité est faible dans les ostéophytes.

Pour ce qui est de la PGE2, elle possède d'indéniables effets pro-inflammatoires et servirait de relais d'action de l'IL-1. Cependant, elle pourrait peut-être contrebalancer les effets de l'IL-1 dans une boucle de rétrocontrôle négatif (15). May et coll (51) ont montré que la PGE2 était corrélée à la douleur et donc la boiterie et qu'elle n'avait pas de lien avec le taux de leucocytes synoviaux, suggérant par là qu'elle était produite par les cellules de l'articulation.

3-Les radicaux libres

En cas d'inflammation, la NADPH oxydase intégrée à la membrane cellulaire des PMNs et des macrophages produit des radicaux libres dérivés de l'oxygène dont l'anion superoxyde ($\cdot O_2^-$), les radicaux hydroxyl et le peroxyde d'hydrogène. Ces métabolites de l'oxygène sont libérés par la cellule et peuvent endommager les molécules avec lesquelles ils sont en contact. Les tissus articulaires pourraient servir de cible à l'attaque des radicaux libres au cours de l'inflammation chronique ou aigue, car ils sont capables de cliver les protéoglycanes et les molécules de collagène in vitro. Des études ont montré le clivage de l'acide hyaluronique par l'anion superoxyde et les radicaux hydroxyl. On a également la preuve que le superoxyde peut dégrader les chaînes α du collagène.

Par ailleurs, on a supposé qu'en plus des effets directs sur les composants matriciels, les radicaux libres pouvaient activer la collagénase latente de PMN et ainsi augmenter la destruction de la matrice. Le peroxyde d'hydrogène est capable de dépolymériser les agrégats de PGs de cartilage humain in vitro, ce qui pourrait être une conséquence éventuelle de la dégradation de l'acide hyaluronique et d'inhiber leur synthèse. Le capteur de radicaux libres le plus efficace dans ce contexte est la catalase, ce qui impliquerait que le peroxyde d'hydrogène est le plus actif des radicaux libres.

L'oxyde nitrique (NO), un médiateur physiologique important, que l'on pensait être efficace pour piéger les radicaux libres de par son affinité élevée pour l'anion superoxyde, génère en fait d'autres molécules tout aussi nocives. Bird et coll ont récemment montré que le NO régulait les effets de l'IL-1 sur la synthèse de PGs, mais qu'il était également antagoniste de la dégradation des PGs. Le NO aurait donc à la fois des effets cataboliques et anticataboliques sur le cartilage articulaire (7).

ETUDE EXPERIMENTALE

I- MATERIEL ET METHODE

1- Les chevaux

Les sujets ont été recrutés parmi les chevaux du service d'anatomie de l'ENVA. Il s'agit de trois trotteurs français, un mâle castré et deux femelles. Leur poids moyen était de 534 kg, + /- 57 kg

et mesurant 1.61 m, +/- 10.4 cm, au garrot. L'examen clinique préliminaire à cette étude n'a révélé aucun problème de santé et aucune boiterie n'a été décelée sur aucun membre que ce soit sur terrain souple comme sur terrain dur. Des clichés radiographiques ont été effectués sur les carpes de ces animaux en incidences oblique dorso-latérale et dorso-médiale afin d'écarter toute anomalie sub-clinique pouvant interférer avec l'étude. Ces clichés se sont révélés normaux pour tous les chevaux. Les sujets ont été confinés au box pendant toute la durée de l'étude, puis ont été euthanasiés à J 21 après le début des expérimentations.

2- Induction des lésions

Préalablement à l'induction de la synovite, les carpes droit et gauche de chaque cheval ont été tondus et désinfectés. Puis, un prélèvement de liquide synovial a été effectué sur chacune de ces articulations par arthrocentèse. Ensuite, il a été injecté respectivement dans le carpe droit 75µL d'une solution à 10µg par mL (soit 0.75 µg) de lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* O55 : B5 (LPS) diluée dans du soluté physiologique à 0.9% (NaCl) pour un volume total de 0.5 mL, et uniquement du soluté en volume identique dans le carpe gauche. Chaque cheval était donc en quelque sorte son propre témoin par l'intermédiaire de l'articulation gauche.

Le LPS fait partie de la membrane externe des bactéries et est relargué lors de bactériolyse ou durant des périodes de prolifération rapide de bactéries. (25)

La voie d'abord au niveau articulaire s'est située au niveau d'une dépression entre le radius et l'os carpal radial, médialement à l'extenseur radial du carpe, le membre étant semi fléchi. (fig.16)

3-Réalisation des prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés respectivement à J0 (donc avant induction), J0+3h, J1, J3, J7, J10, J15 et J21. Les chevaux ont été préalablement tranquilisés à l'aide de maléate d'acépromazine (Calmivet ND) à la dose de 0.03 mg par kilo, par voie intramusculaire environ vingt minute avant une sédation à l'aide de chlorhydrate de romifidine (Sédivet ND) à la dose de 0.035 mg par kilo par voie intraveineuse.(tableau 7)

Une prise de sang a été systématiquement effectuée pour recueillir le sérum (sur tube sec) et le plasma (sur tube EDTA).

Des échantillons de liquide synovial ont été prélevés par ponction articulaire des carpes droits et gauches et recueillis sur tubes héparinés. Puis ils ont été centrifugés à 2500 g pendant 10 minutes à 4°C puis conservés à – 80°C dans l'attente des dosages immunologiques

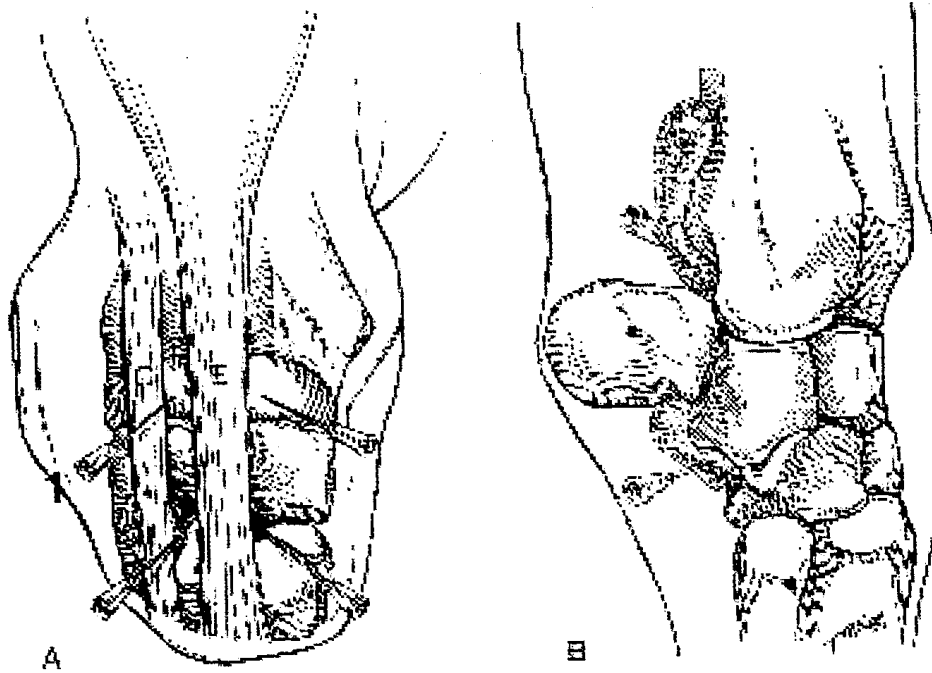


Figure 16 : sites d'arthrocentèse du carpe chez le cheval. En 1 , site de ponction de l'articulation antébrachio-carpienne utilisé lors de l'étude .

Pour des problèmes liés à la contention du cheval n° 2, il n'a pas été possible de récolter du liquide synovial sur l'articulation gauche à J0+3h, J7 et J15 et sur l'articulation droite à J0+3h sur cet animal.

4-Suivi clinique des animaux

Dans le but de corréler les signes éventuels d'inflammation avec les résultats des dosages effectués, un examen clinique a été réalisé toutes les deux heures le premier jour, puis tous les jours pendant 2 semaines et enfin tous les deux jours la dernière semaine. La fréquence cardiaque et la température rectales ont été relevées, ainsi que la température des carpes, notée de 0 (froid) à 5 (très chaud) et la douleur à la flexion, notée de 0 (absente) à 4 (très forte). De plus, la circonférence des carpes a été mesurée sous le processus styloïde du radius, à hauteur de l'os

A J+48h, le colorant rouge neutre est préparé extemporanément en diluant une solution à 3.3g/L au 1/10 puis additionné à raison de 50µl par puits au milieu. Après une incubation d'une heure à 37°C, deux lavages au PBS chaud sont réalisés (centrifugation à 1500tr/min pendant 8 min). On ajoute alors une solution de lyse cellulaire (10mL d'éthanol+ 10mL de Na₂HPO₄) à raison de 150µL par puits. On agite 5 min sur un agitateur de plaque et on lit au spectrophotomètre à 540nm de longueur d'onde. Sur chaque plaque, on ménage des puits témoins : témoins contenant des cellules incubées sans prélèvement, avec et sans actinomycine-D, témoins positifs contenant des cellules incubées avec une solution étalon de TNF-α.

On mesure ensuite la cytotoxicité du TNF-α en comparant la densité optique de l'échantillon par rapport à celle du témoin cellulaire (100% de survie). La référence de TNF-α (en unité par mL) a été posée comme étant l'inverse de la dilution pour laquelle on observe une cytotoxicité de 50%. L'activité du TNF-α pour laquelle on a une cytotoxicité de 50% est donc de 1U/mL.

On a donc : % de cytotoxicité = $1 - (\text{DO } 540 \text{ de l'échantillon} / \text{DO } 540 \text{ du témoin}) \times 100$ (fig.17)

6- Dosage des métalloprotéinases matricielles

L'activité des gélatinases a été dosée par une zymographie au SDS-PAGE (sodium-dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis) selon la méthode décrite par Clegg et coll (18) avec quelques modifications (34). Ce dosage est hautement spécifique car il est basé sur une réaction enzyme-substrat et permet d'obtenir le poids moléculaire des enzymes.

Le liquide synovial est dilué dans un tampon non réducteur Tris –HCl pH 6,8 (1 % de sodium dodécyl sulfate, 5% de glycérol, 0.004 % de bleu de bromophénol), incubé au bain-marie une heure à 37° C et déposé sur un gel de séparation à 10% d'acrylamide/bisacrylamide (25 µg de protéines totales par puits) et contenant 2.5 mg /mL de gélatine (sigma G 2500 type A) ; le gel de concentration est à un taux de 5% d'acrylamide.

Après migration dans le tampon de Laemmli (85 V durant 20 min puis 150 V pendant environ deux heures), le gel est ensuite placé dans un tampon de renaturation à 2,5% de Triton X-100 pendant une heure à température ambiante, rincé plusieurs fois puis incubé dans un tampon de lavage Tris-HCl 1M , pH 7,4 et enfin incubé un minimum de 72 heures dans un tampon de réactivation contenant 50mM de tris-HCl de CaCl₂, 10mM de NaCl et 0,05% de Brij 35, pH 7,4. Débarrassé du tampon de réactivation, le gel est incubé au minimum une heure en agitation douce dans un tampon de coloration au bleu de Coomassie R250 (5 mg/L) contenant 10 % d'acide acétique, 30 % de propanol-2 et 60 % d'eau distillée, puis décoloré par un tampon à 10 % d'acide acétique, 40 % de méthanol et 50 % d'eau distillée, afin de visualiser les bandes.

Les zones d'éclaircissement du gel teinté en bleu montrent la dégradation de la gélatine. Le calcul du poids moléculaire de la bande se fait grâce à un marqueur d'étalonnage (Amersham code RPN 756, 14.3-220kDa) dilué au 1/5 ème dans le Tampon Tris-HCl pH 6,8.

Pour une bande de lyse donnée, l'étendue du substrat décoloré est ensuite évaluée par densitométrie. L'image du gel est acquise et archivée par un logiciel d'analyse d'autoradiographies (Densylab, Photcapt systems). L'activité des MMPs totales (formes latentes et actives) est exprimée de manière semi-quantitative, en tenant compte de l'intensité, de la surface de la bande et de son poids moléculaire.

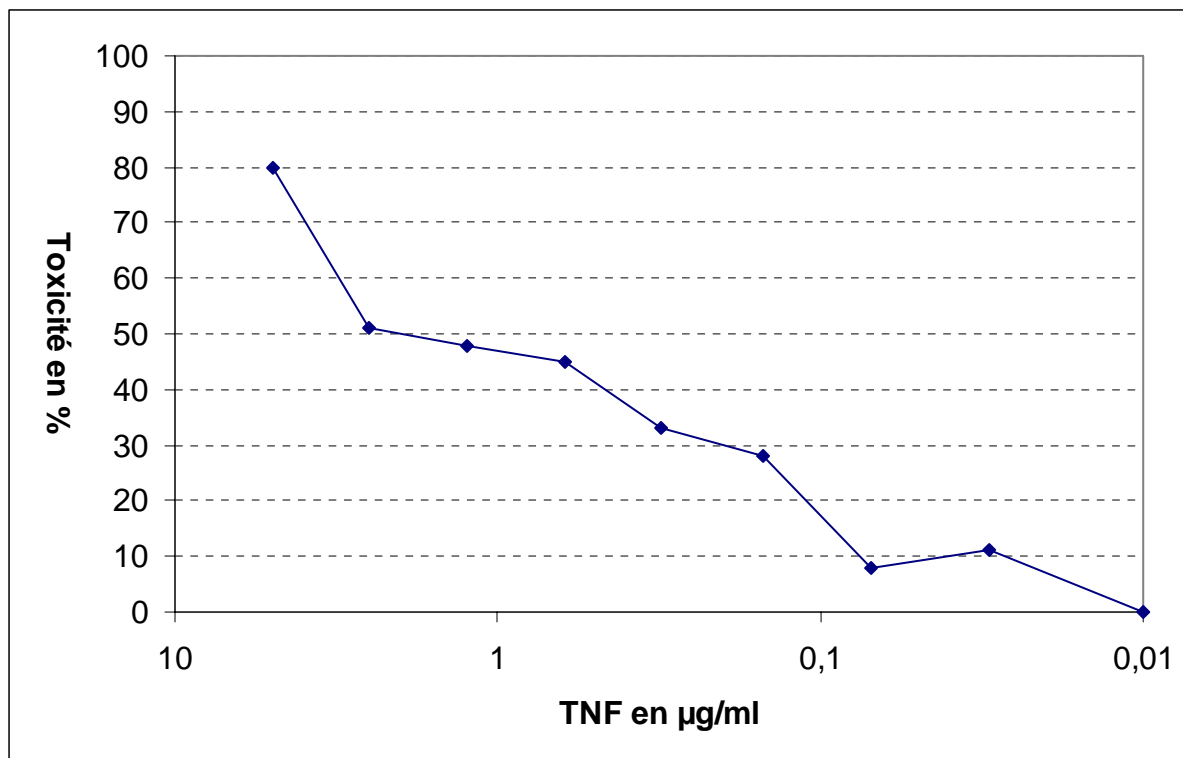


Figure 17 : Courbe témoin du TNF- α (échelle logarithmique)

Pour définir la spécificité des protéases, on incube le gel dans un tampon de réactivation en présence d'un inhibiteur spécifique des métalloprotéinases, l'EDTA (acide éthylène diaminetétracétique), de concentration finale 20mM. Cette dernière manipulation permet de confirmer que les enzymes sont des métalloendopeptidases.

7 – Autres expériences satellites

Cette étude rapporte les résultats obtenus sur les dosages du TNF- α et des métalloprotéinases, mais d'autres dosages ont été effectués parallèlement afin de profiter du protocole expérimental mis en place. Pour mémoire ont ainsi été réalisés le dosage des protéines totales, l'électrophorèse des protéines, la numération des leucocytes, les mesures de la vitesse de sédimentation, tous ces paramètres étant supposés pouvoir être des marqueurs de l'inflammation utilisables pour mettre au point une technique de détection.

8-Examen post-mortem

A la fin des trois semaines d'expérimentation, les sujets ont été euthanasiés afin de réaliser un examen anatomopathologique des articulations pour vérifier l'étendue des lésions inflammatoires. Sur chaque carpe, des échantillons de la membrane synoviale et de la capsule articulaire ont été prélevés et un examen histologique a été effectué après coloration à l'hémalaun-éosine-safran. Après dissection articulaire, les anomalies sur les structures péri-articulaires, les surfaces articulaires et la membrane synoviale ont été relevées. (tableau 7).

II-RESULTATS

1-Suivi clinique

La majorité des paramètres cliniques étudiés a montré un pic le jour suivant l'induction de la synovite (tableau 8).

Une augmentation significative de la fréquence cardiaque a été relevée entre le premier et le troisième jour et une légère hyperthermie s'est manifestée le premier jour, pour ensuite disparaître rapidement.(annexe 1).

Une tuméfaction importante du membre induit a pu être mise en évidence du premier au quatrième jour suivant l'induction et a persisté tout le long de l'expérimentation, mais à un moindre degré. Quand au carpe témoin, sa circonférence a augmenté dans une moindre mesure (0.5 à 1cm), pendant trois jours après l'induction.

Le premier jour, les trois sujets ont montré une diminution notable de la flexion passive du carpe, accompagné de signes de douleur. Ces symptômes ont été transitoires et modérés chez les chevaux un et deux, mais beaucoup plus marqués chez le cheval trois qui, présentant les manifestations d'une vive douleur, a reçu une injection intra-musculaire de sulfate de morphine à la dose de 60mg.

		Cheval 1		Cheval 2		Cheval 3	
		AD	AG	AD	AG	AD	AG
Inflammation péri-articulaire	J7	++	0	++	0	+++	0
	J14	+	0	+	0	++	0
	J21	0	0	0	0	+	0
Distension synoviale	J7	++	0	+++	0	+++	0
	J14	++	0	++	+	++	+
	J21	+	0	+	++	++	++
Synovite AABC	J7	+	0	+	0	+	0
	J14	+	0	+	0	+	+
	J21	++	+	++	+	++	+
Synovite ERC	J7	0	0	+	+	++	0
	J14	+	?	0	+	+	0
	J21	0	0	0	+	0	0
Synovite EDD	J7	++	0	0	0	0	0
	J14	+	+	++	+	0	+
	J21	+	0	++	0	+	+
Ostéophyte	J7	0	0	0	0	0	+
	J14	0	0	0	0	0	+
	J21	0	0	0	0	0	+
Total	J7	7	0	7	1	9	1
	J14	6	1	6	3	6	4
	J21	4	1	5	4	6	5

Tableau 8: Anomalies observées à l'échographie sur les carpes des trois chevaux à J7, J14 et J21 et scores échographiques. AABC :articulation antébrachio-carpienne ; ERC :extenseur radial du carpe ; EDD :extenseur dorsal du doigt.

Une élévation de la température de la face dorsale des carpes droites a été relevée de J1 jusqu'à environ à J4 à J6 et est restée constante au cours de l'étude pour deux sujets, quant aux carpes témoins, les manifestations de chaleur ont été plus tardives et plus fugaces de J2

À J6.

Tous les chevaux ont boîté au niveau du membre antérieur droit dès le premier jour de l'expérience, qui a persisté à un niveau moindre durant toute la durée de l'étude, sauf chez le cheval 2 qui ne boîtaît plus dès le troisième jour.

2- Imagerie médicale

A l'échographie, des signes nets de synovite sur le carpe induit ont été relevés à J7, ces anomalies se sont atténuées, mais étaient encore visibles à J14 et J21.

Le carpe témoin a également montré des modifications à l'échographie, mais plus tardivement, et à un degré moindre.

L'examen radiographique n'a révélé quand à lui que peu de modifications excepté, sur deux animaux, une légère densification de l'os sous-chondral du bord dorsal de l'os radial.

3- Biochimie

Ces résultats font partie des expériences satellites menées au cours de l'étude, mais donnent une bonne idée de l'état de la réaction inflammatoire au cours de l'expérience, ce qui pourra nous aider dans notre interprétation des résultats obtenus.

Dans le liquide synovial, il a été relevé une augmentation nette du nombre de leucocytes, principalement des neutrophiles dès J1 avec un pic plus élevé au niveau de l'articulation induite. Cette neutrophilie s'est atténuée en une dizaine de jours sur le carpe témoin et en deux à trois semaines sur l'articulation lésée.

De plus, une nette augmentation des protéines synoviales, notamment des α 1-globulines, dès trois heures après l'induction, à gauche comme à droite, avec des valeurs cependant plus élevées à droite. Cette élévation a persisté jusqu'à J10.

Quant aux signes systémiques de l'inflammation, le taux de protéine plasmatique est resté constant excepté une forte élévation des α 1 globulines.

Les vitesses de sédimentation sont en moyenne supérieures jusqu'à J7 aux valeurs relevées sur les courbes témoins de chaque cheval puis ont tendance à devenir inférieures aux valeurs de référence après la première semaine.(annexe 1)

4-Dosage du TNF- α

Ce qui est d'emblée remarquable au cours de ces dosages dont les résultats sont exprimés en pourcentage de toxicité, c'est la variabilité du taux de base de TNF- α chez chaque animal quel que soit le liquide biologique étudié. A Jo les taux de TNF- α sont respectivement par exemple au

niveau du carpe droit mesurés à 55 % chez le cheval 1, 47% chez le cheval 2 et 0 chez le cheval 3. Cette variabilité se retrouve au niveau du carpe controlatéral, du sérum et du plasma.

4-a Dosage du TNF- α dans le sérum et le plasma.

Nous allons nous intéresser aux phases au cours desquelles le taux de TNF- α est passé au dessus du taux de base de TNF mesuré à J0 pour rechercher une élévation de la concentration de cette molécule concomitante à l'inflammation.

Chez le cheval 1, le taux de TNF après une brève chute reste globalement supérieur au taux de base de J0+3h à J3 dans le sérum, avec un pic centré sur J1 (85 % de toxicité). Dans le plasma, il augmente de J1 à J10 avec un pic à J3.

Chez le cheval deux, le taux de base mesuré est d'environ 51 % de toxicité dans le sérum et le plasma et varie très peu au cours de l'expérimentation, restant sensiblement centré au tour de cette valeur, sauf une mesure à 59 % à J15 dans le sérum qui ne semble pas significative.

Chez le cheval trois, dans le sérum, il y a une augmentation du taux de TNF de J0+3h à J7 ; et une élévation de ce taux de J0+3h à J15 dans le plasma.

4-b Dosage du TNF- α au dans les liquides synoviaux

4-b-1 Chez le cheval 1

Au niveau du carpe droit, il y a une élévation du taux de TNF- α de J0+3h à J10 avec un pic à J7 de 64 % de toxicité. (fig. 18)

Au niveau du carpe gauche, il y a une élévation transitoire du taux de TNF- α entre J0+3h et J3 centrée sur J1 avec un pic à 60% puis le taux devient assez variable pendant le reste de l'expérimentation (fig. 21).

Sur les deux courbes comparées carpe droit et carpe gauche, on remarque que l'élévation du taux de TNF α se fait de manière plus marquée et sur une durée plus élevée au niveau du carpe droit par rapport au carpe témoin (fig.24).

4-b-2 Chez le cheval 2

Le taux de TNF- α dans le carpe droit a une valeur maximale à J1 (60%) (fig.19). Il est raisonnable de penser qu'il y a une élévation de ce taux à partir de J0+3h mais la mesure n'a pu être effectuée à cause de l'agitation de l'animal. Le taux de TNF α décroît ensuite jusqu'à J3 puis a une légère tendance à s'élever pour revenir à la valeur de départ sur la fin de l'expérience.

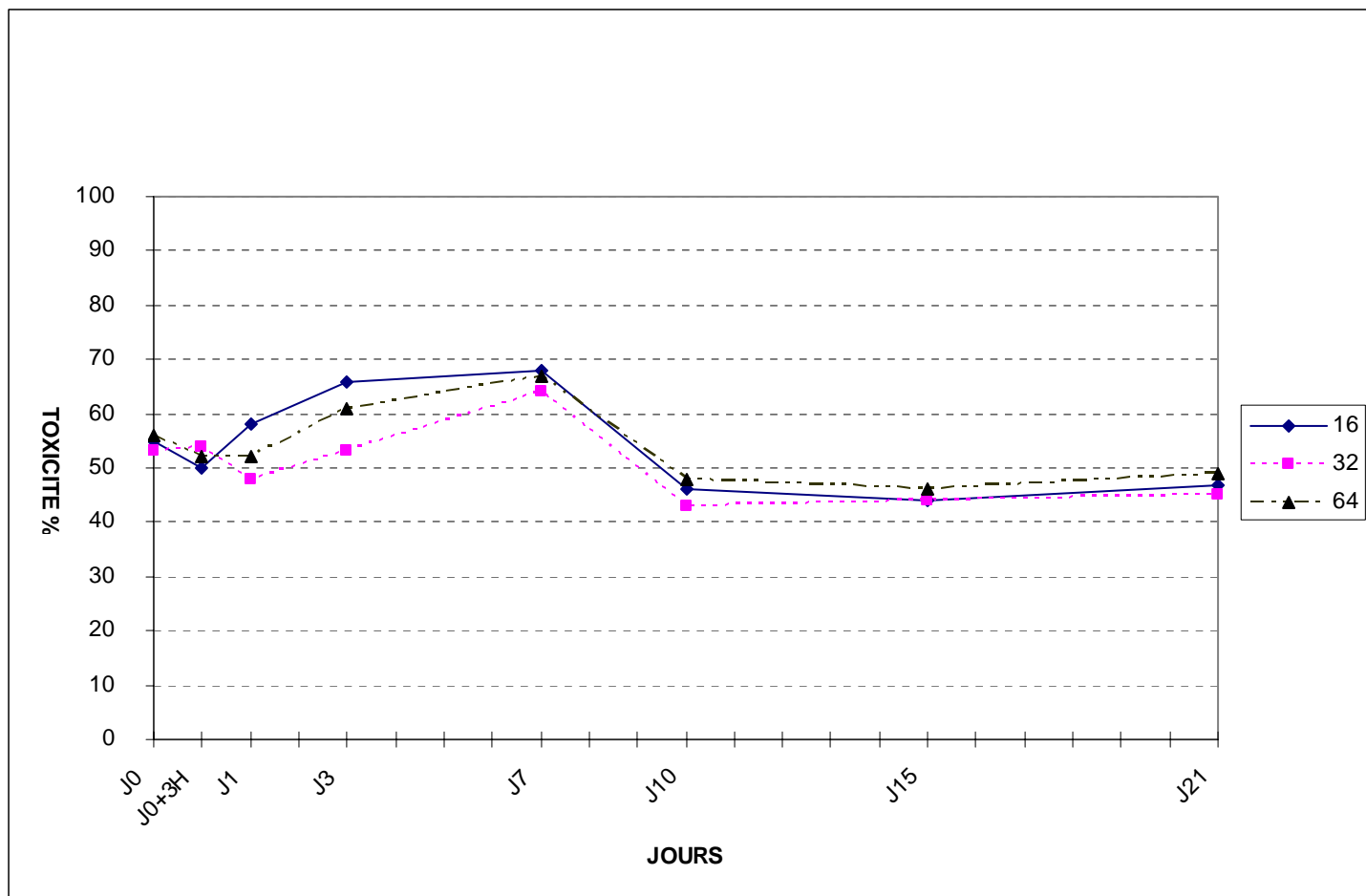


Figure 18 : Evolution du taux de TNF- α dans le carpe droit du cheval n°1 au cours de l'étude. Dilutions au 1/16, 1/32 et 1/64.

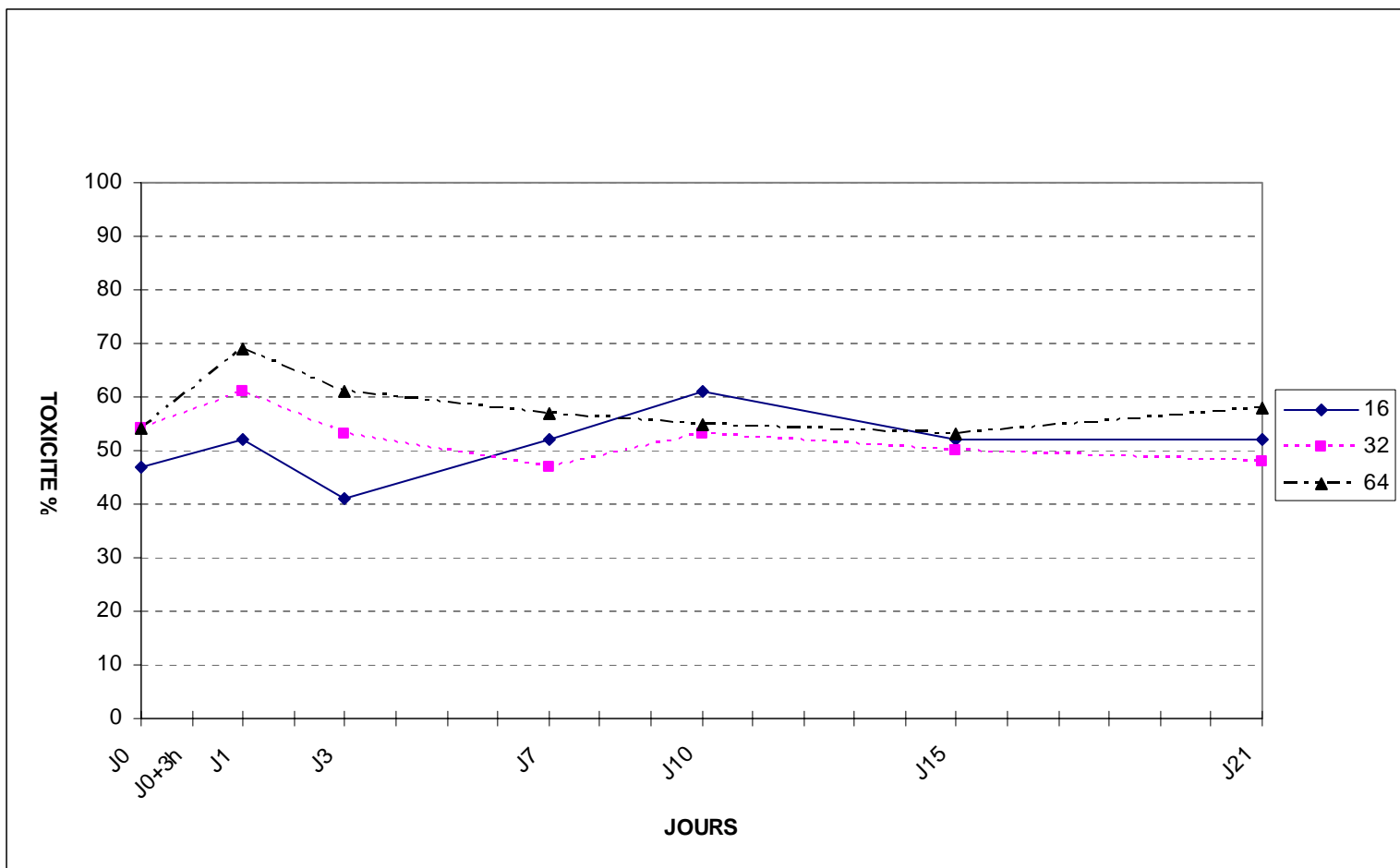


Figure 19 : évolution du taux de TNF- α dans le carpe droit du cheval n°2 au cours de l'étude.
Dilutions au 1/16, 1/32, 1/64.

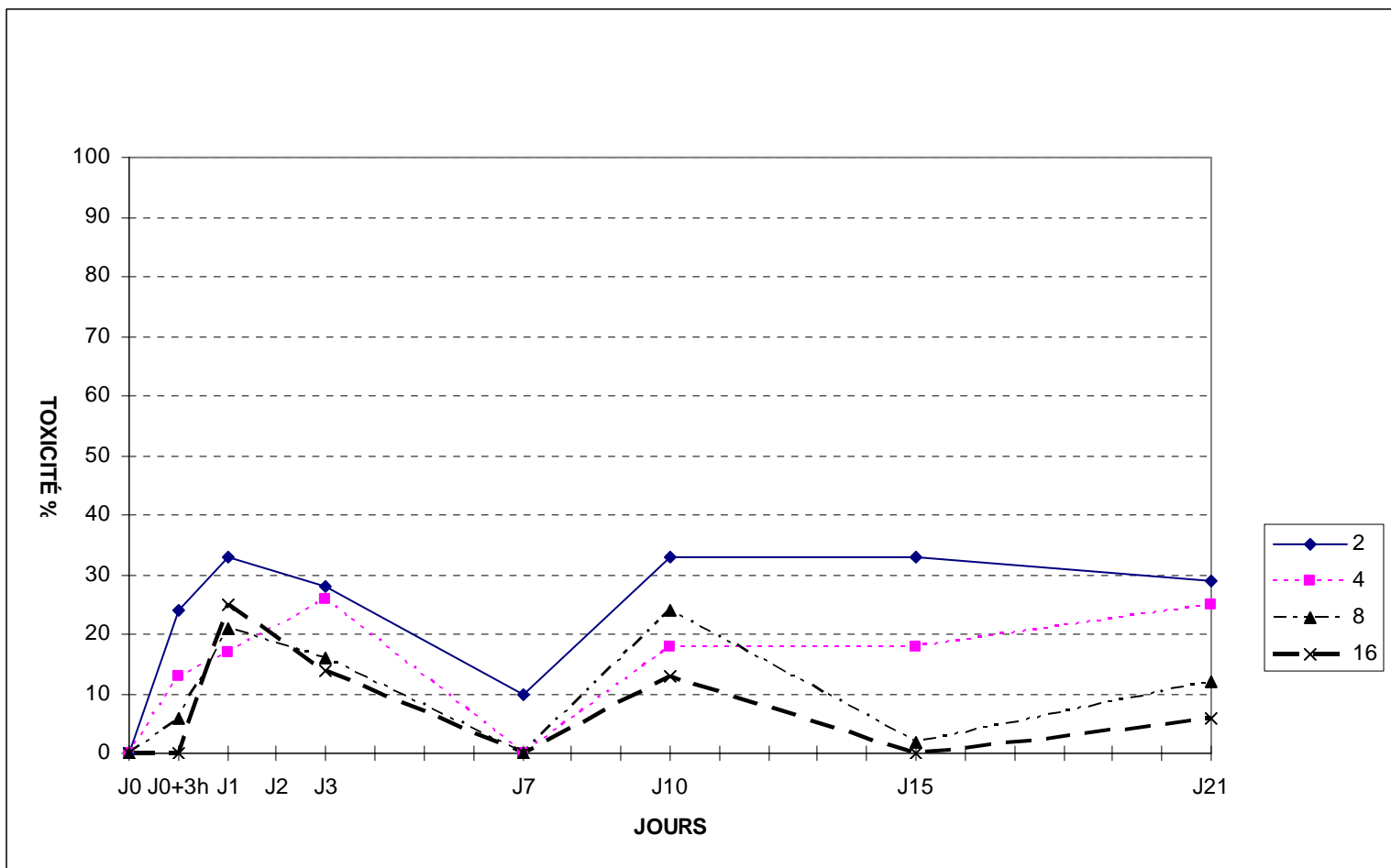


Figure 20 : Evolution du taux de TNF- α dans le carpe droit du cheval n°3 au cours de l'étude.
Dilutions au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16.

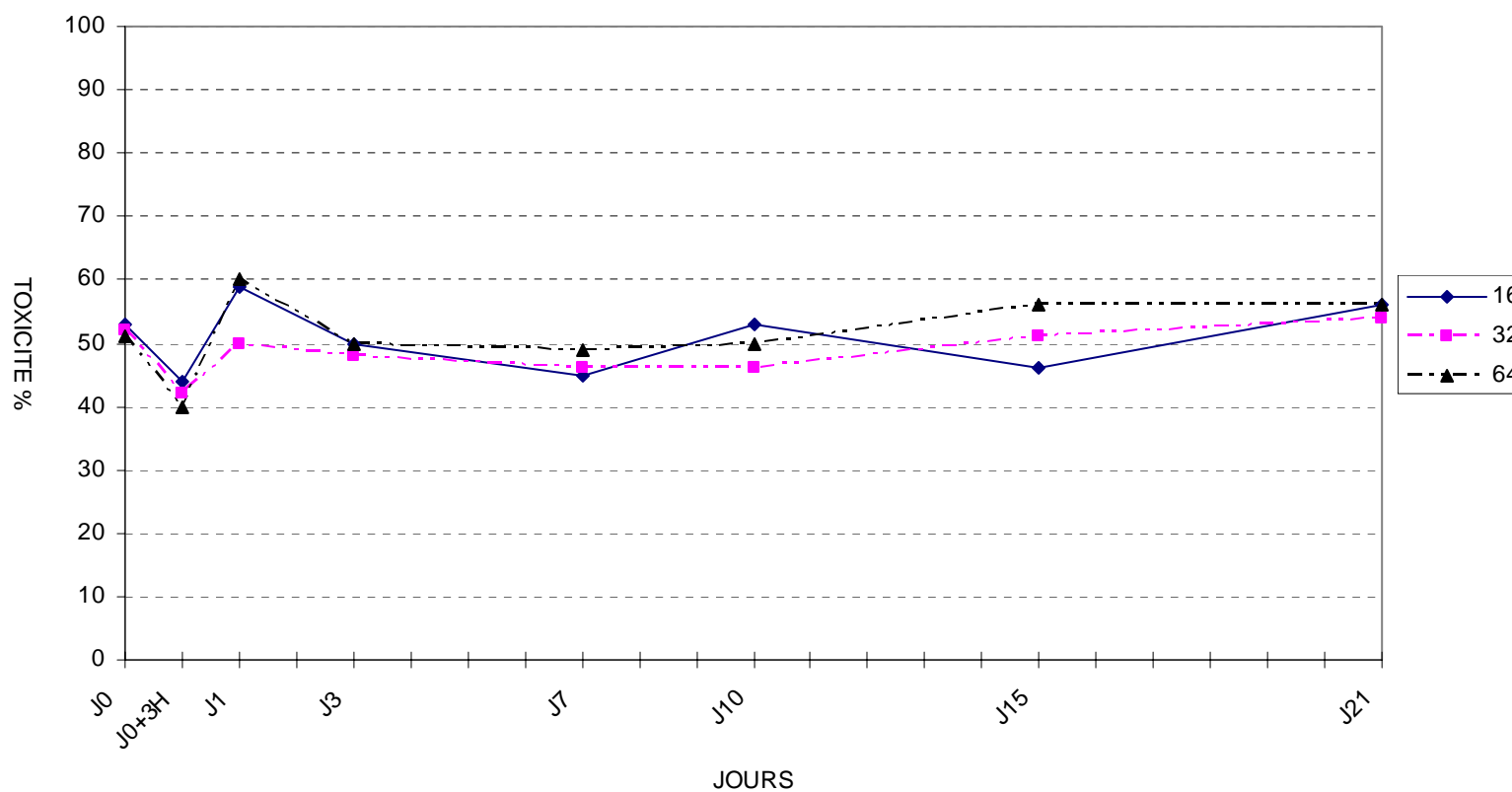


Figure 21 : Evolution du taux de TNF- α dans le carpe gauche du cheval n° 1 au cours de l'étude.
Dilutions 1/16, 1/32 et 1/64.

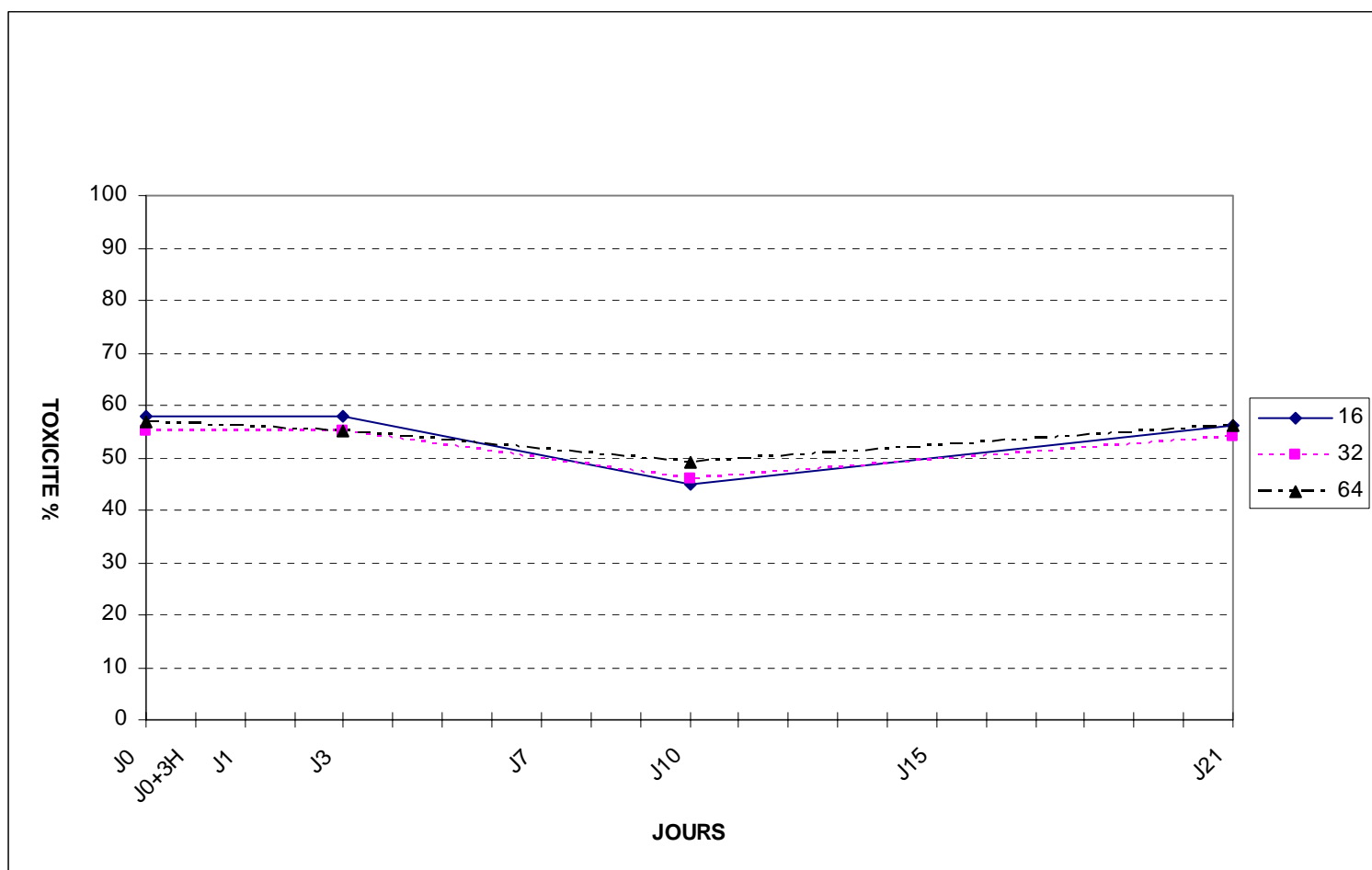


Figure 22 : Evolution du taux de TNF- α dans le carpe gauche du cheval n°2 au cours de l'étude.
Dilutions au 1/16, 1/32, 1/64.

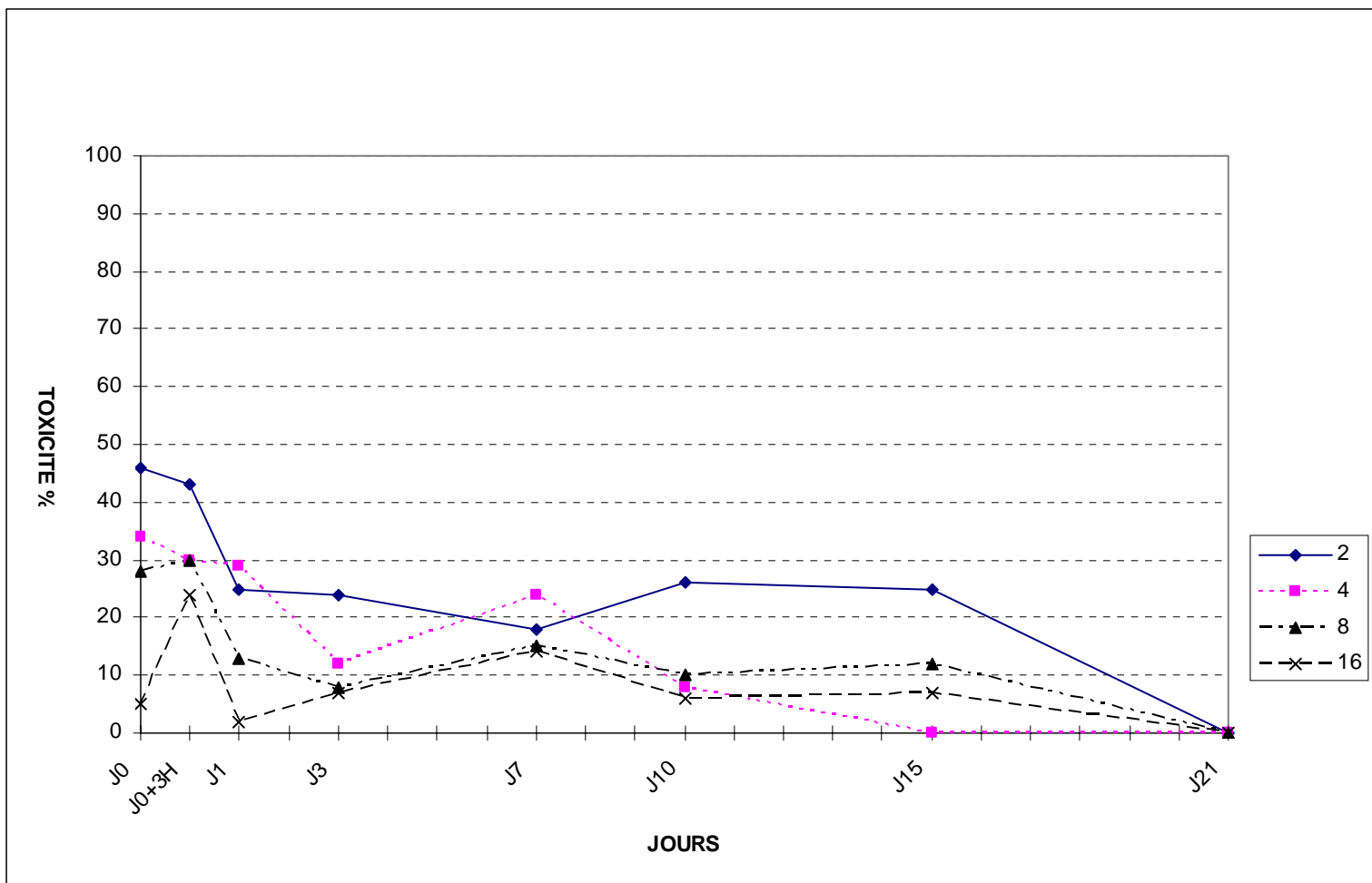


Figure 23 : Evolution du taux de TNF- α dans le carpe gauche du cheval n°3 au cours de l'étude.
Dilutions au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16.

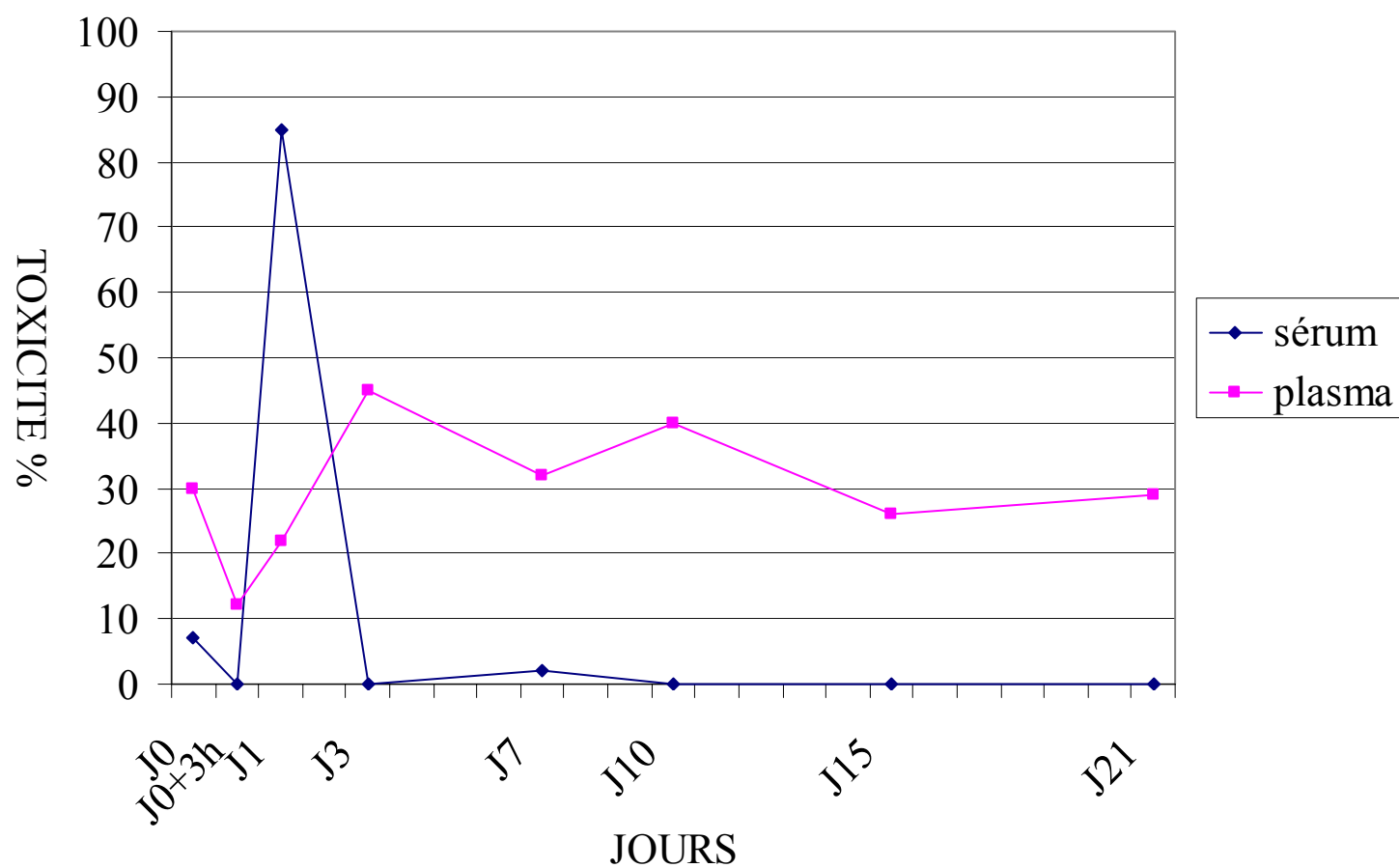


Figure 24 : Comparaison de l'évolution des taux de TNF- α dans le sérum et le plasma au cours de l'étude chez le cheval 1(dilution au 1/16)

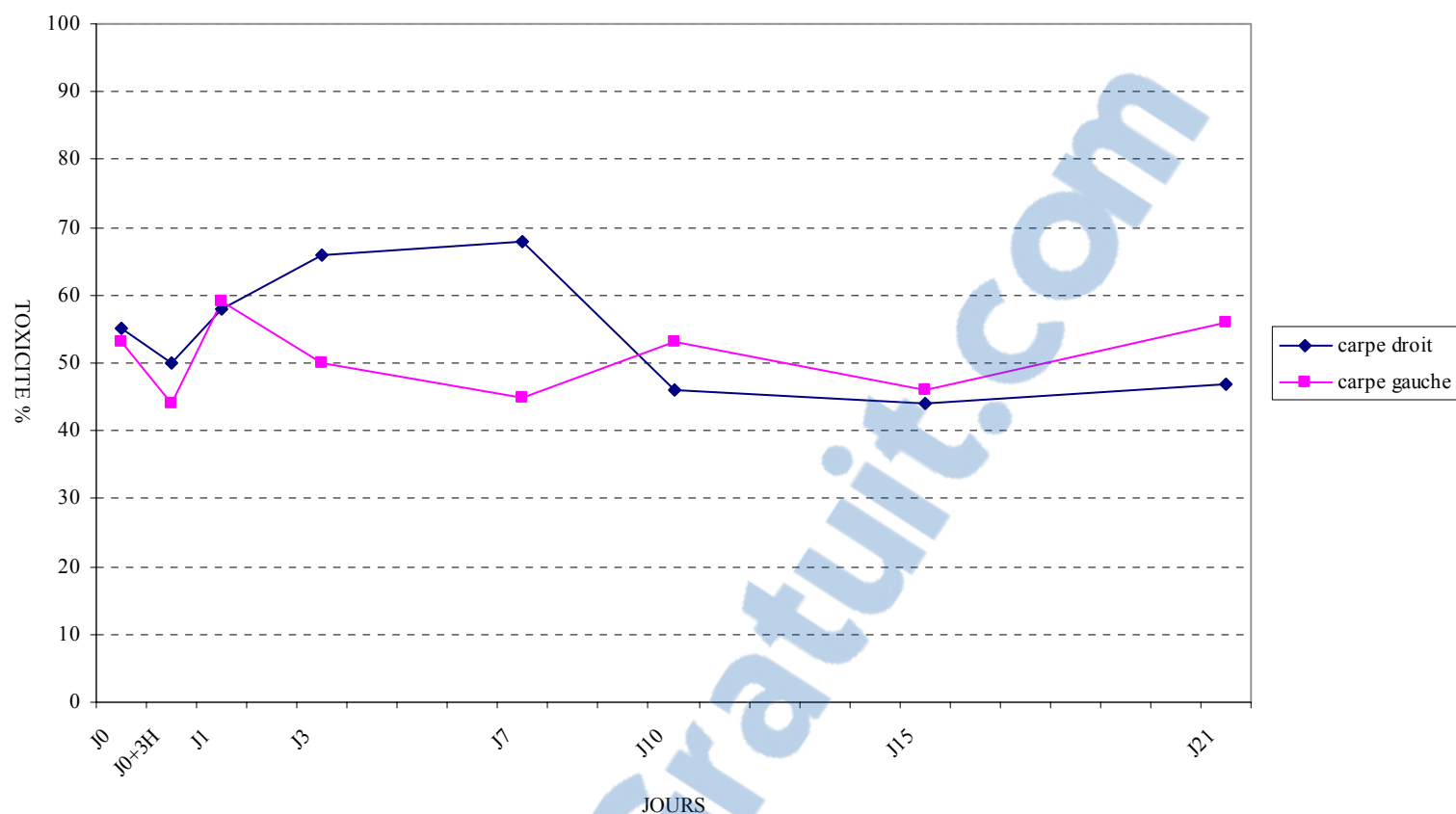


Figure 25 : Comparaison de l'évolution des taux de TNF- α dans les deux carpes au cours de l'étude (dilution au 1/16) chez le cheval n°1.

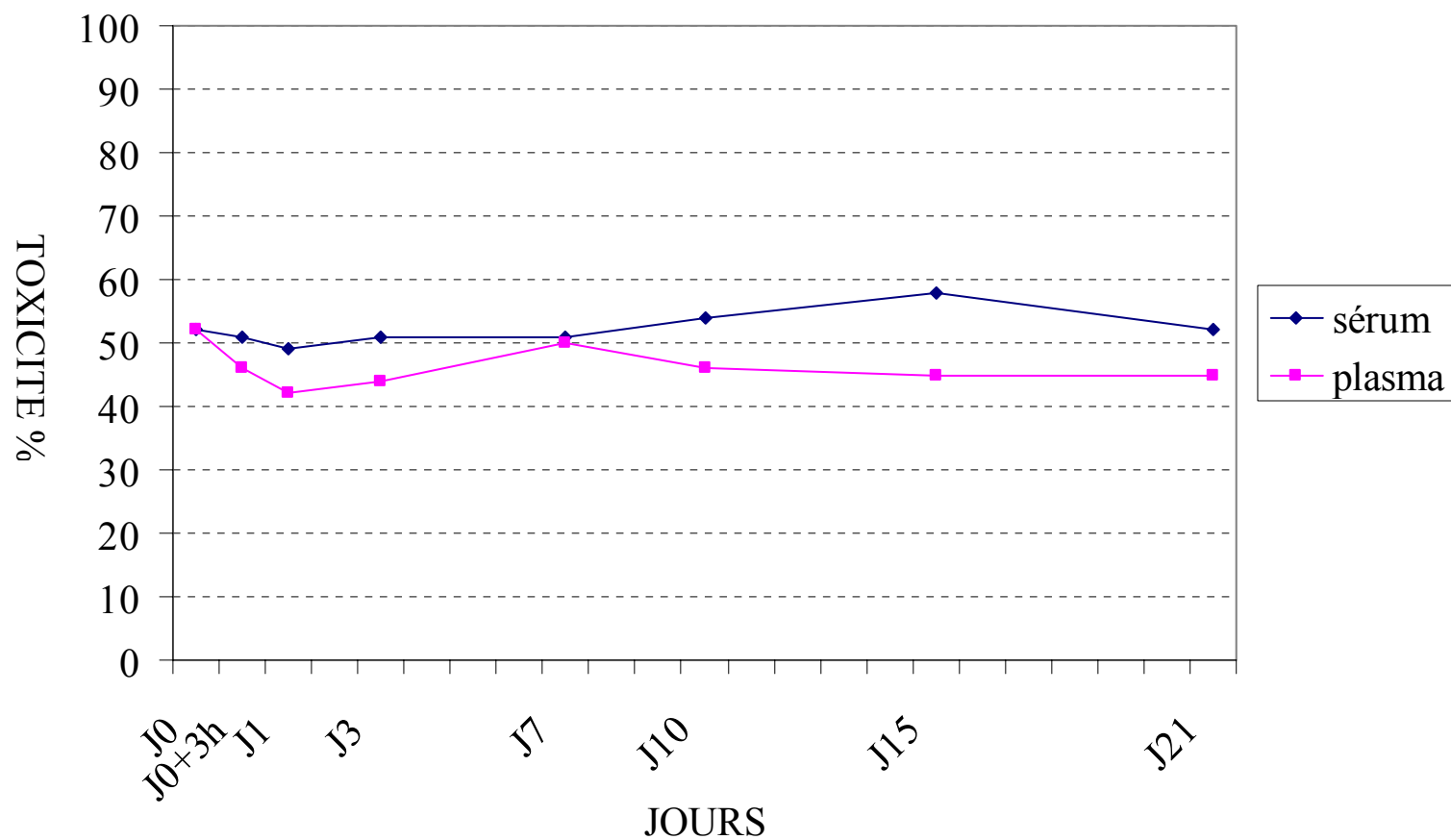


Figure 26 : Comparaison de l'évolution du taux de TNF- α dans le sérum et le plasma au cours de l'étude (dilution au 1/16) chez le cheval n°2.

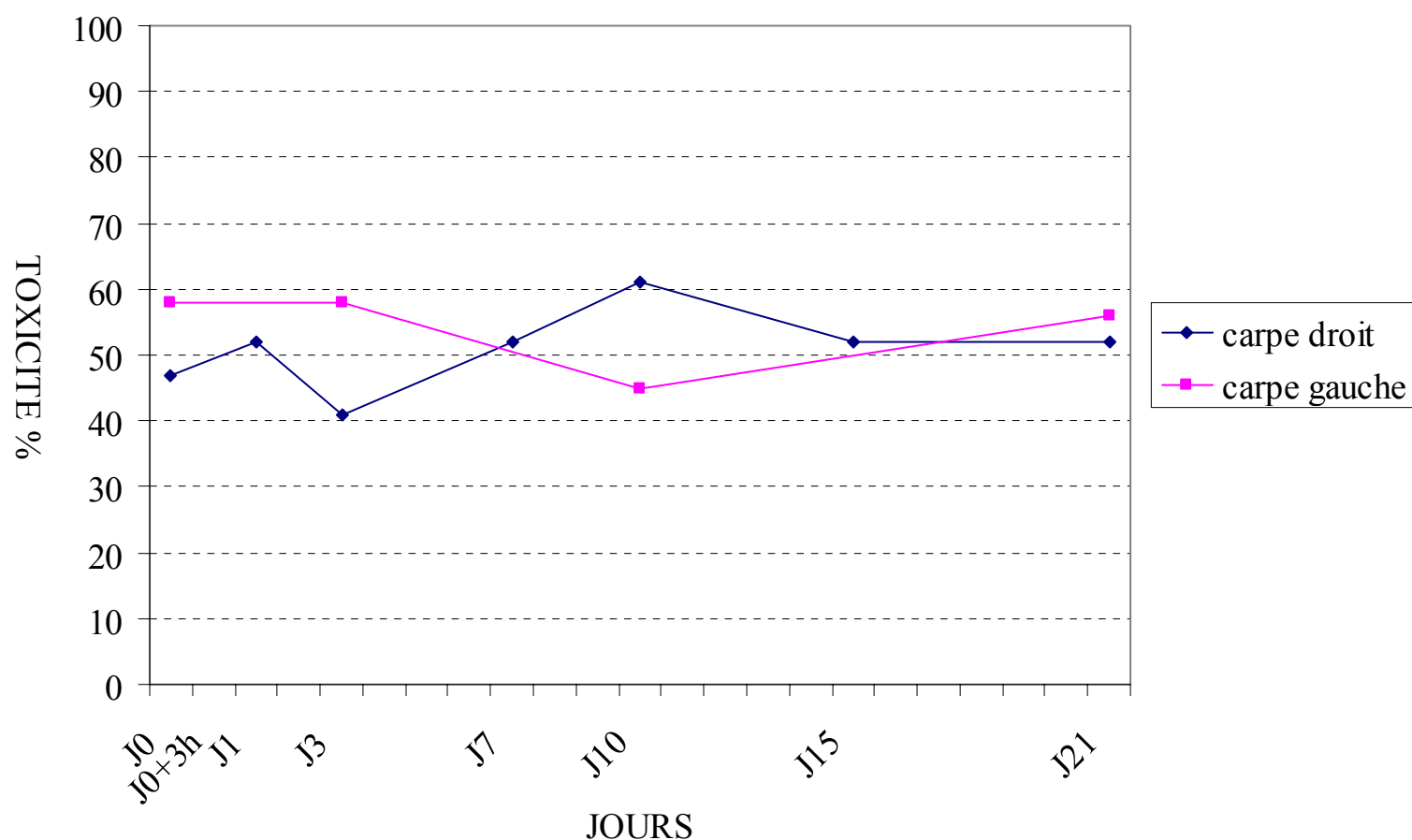
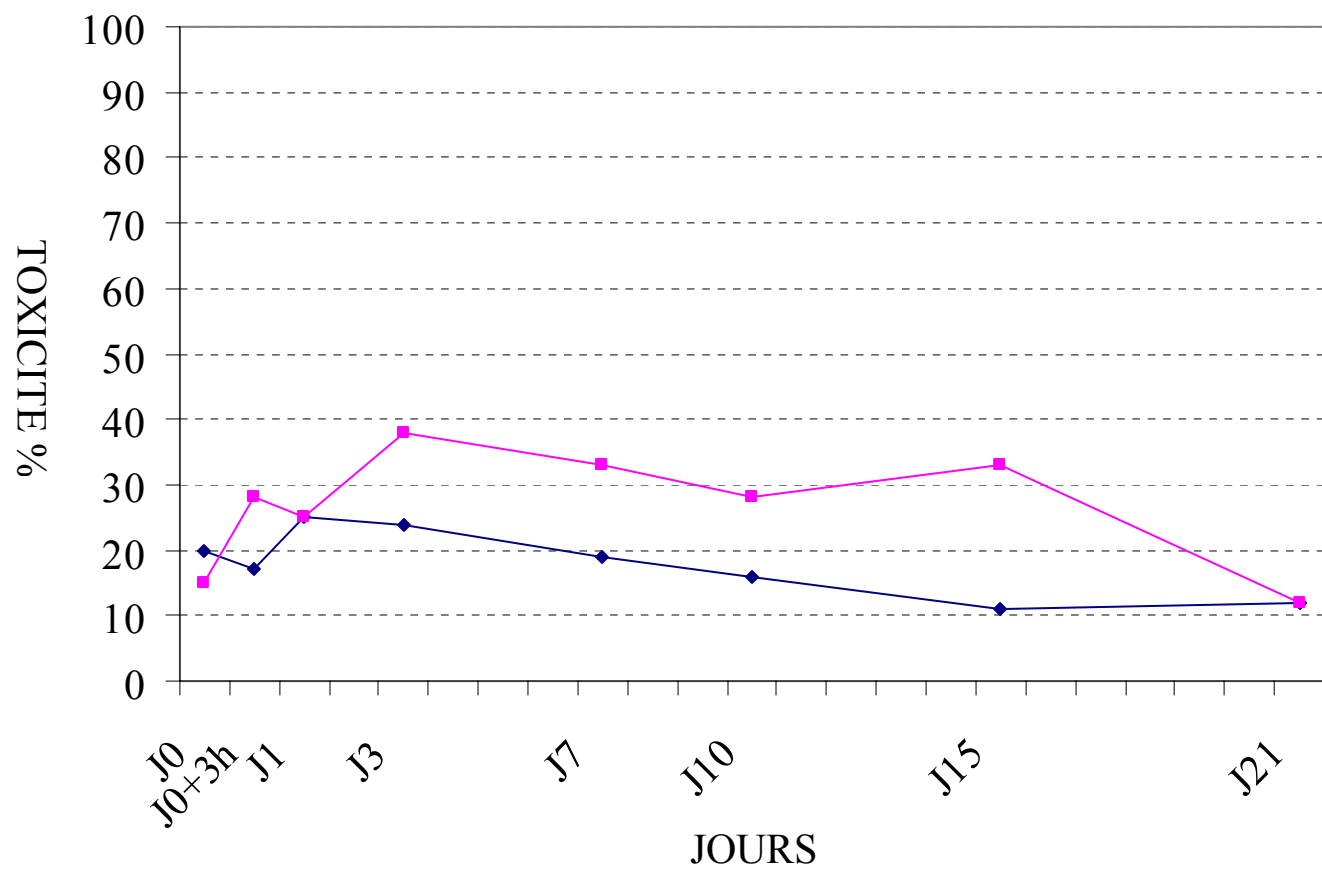


Figure 27 : Comparaison de l'évolution des taux de TNF- α dans les deux carpes au cours de l'étude (dilution au 1/16) chez le cheval n°2.



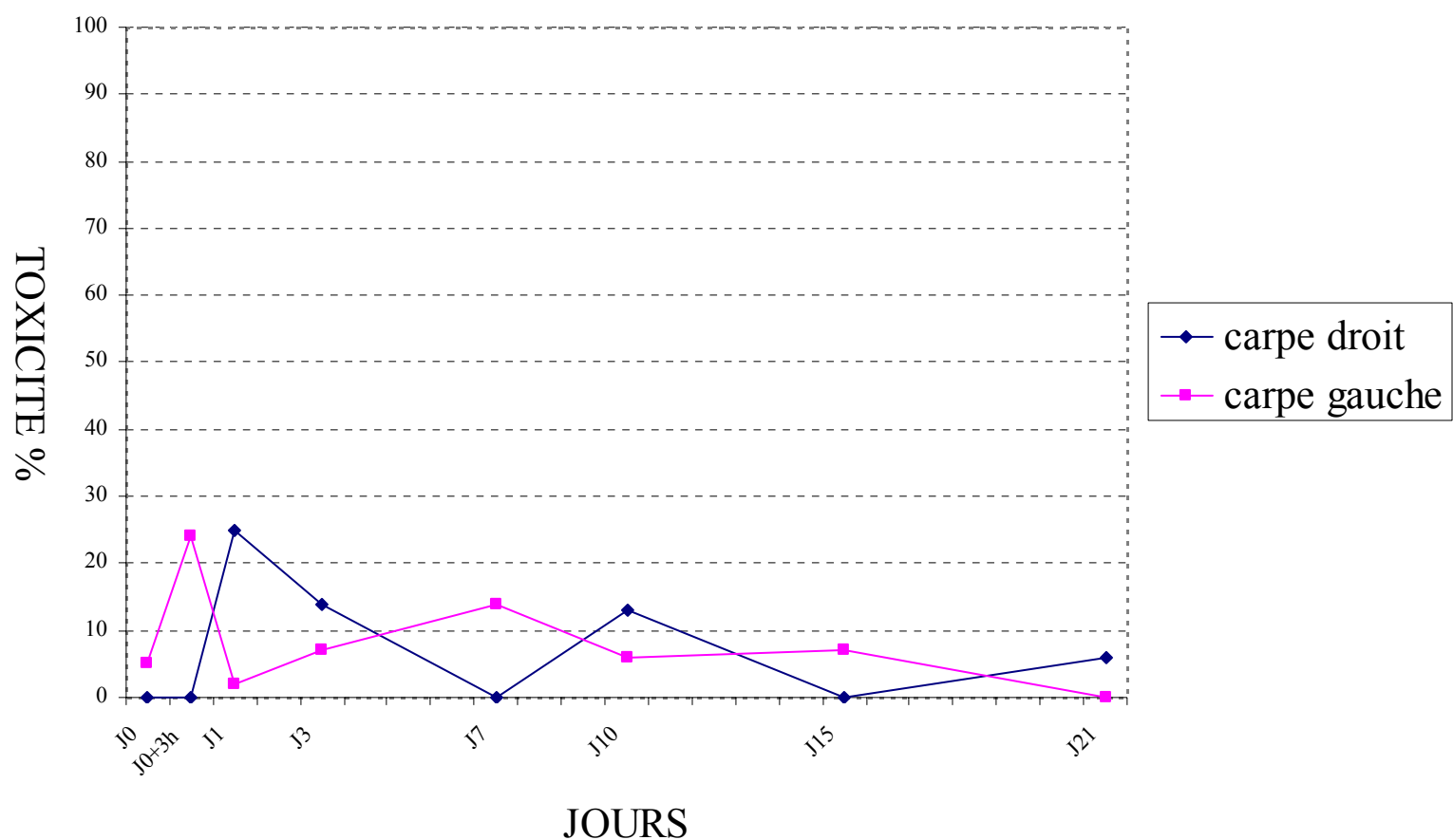


Figure 29 : Comparaison de l'évolution des taux de TNF- α dans les deux carpes au cours de l'étude (dilution au 1/16) chez le cheval n°3.

Dans le carpe gauche, on manque de valeurs de mesure, mais il semble que ce taux reste sensiblement entre les valeurs de 60% et 50% au cours des trois semaines d'expérimentation (fig.22).

Sur les deux courbes comparées, on ne peut vraiment déduire une différence d'évolution entre les taux de TNF des deux liquides synoviaux respectifs, les deux courbes restant assez proches (fig.27).

4-b-3 Chez le cheval 3

Dans le carpe droit, le taux de TNF- α s'élève de J0+3h jusqu'à J7 avec un pic à J1 puis se réélève de J10 à la fin de l'expérimentation (fig. 20).

Dans le carpe gauche, il y a une légère élévation du taux de TNF- α jusqu'à J0+3h qui aurait plutôt tendance à diminuer ensuite jusqu'à J1 puis à rester relativement stable avec des variations mineures autour du taux de base (fig. 23).

Sur les deux courbes comparées, on remarque un décalage entre les deux pics de TNF dans les liquides synoviaux, celle dans le carpe témoin étant plus précoce et plus transitoire (fig. 29).

5-Dosage des métalloprotéinases matricielles

Cette étude montre par le biais de l'étude densitométrique de zymogrammes, une suractivation des MMPs dans le liquide articulaire. En effet le standard de référence a permis d'obtenir les poids moléculaires de différentes bandes enzymatiques.

5-a Etude qualitative

Les gélatinases trouvées dans cette étude sont les mêmes que celles trouvées dans l'étude de Clegg et coll. (19), à partir d'articulations septiques et aseptiques.

La forme latente de MMP-2 se manifeste par une bande protéique assez large à 66kDa, alors que sa forme active se reflète par une bande plus fine, plus inconstante, à 59kDa.

Une bande peut être observée à 99 kDa, ce qui correspond au MMP-9 monomère sous forme latente, une bande de 84 kDa correspondant à sa forme activée et une bande de 225 kDa correspondant au MMP-9 dimère.

D'autres enzymes ont montré une activité gélatinolytique aux alentours de 40 kDa, mais leur présence dans le liquide synovial n'est pas forcément corrélée aux lésions articulaires (31).

5-b Etude quantitative

L'activité des MMP-2 est augmentée dans les membres induits de J3 à J21 pour les chevaux 1 et 2 de façon nette. Pour le cheval trois, l'activité des MMP-2 reste globalement supérieure dans le carpe induit dès J0+3h jusqu'à J21 avec un pic entre J1 et J7 sans que la différence d'activité entre les deux carpes soit cependant très élevée (fig. 30à 32).

Pour le MMP-9 monomère et dimère, une augmentation est visible de J0+3h à J7 pour les chevaux 1 et 3(avec un pic centré sur J3 pour le cheval 1). On observe un effet rebond à J10 et J15 respectivement pour les chevaux 1 et 3 (fig. 33 à 38).

Quant au cheval 2, une augmentation des MMP-9 est relevée entre J0+3h et J3.

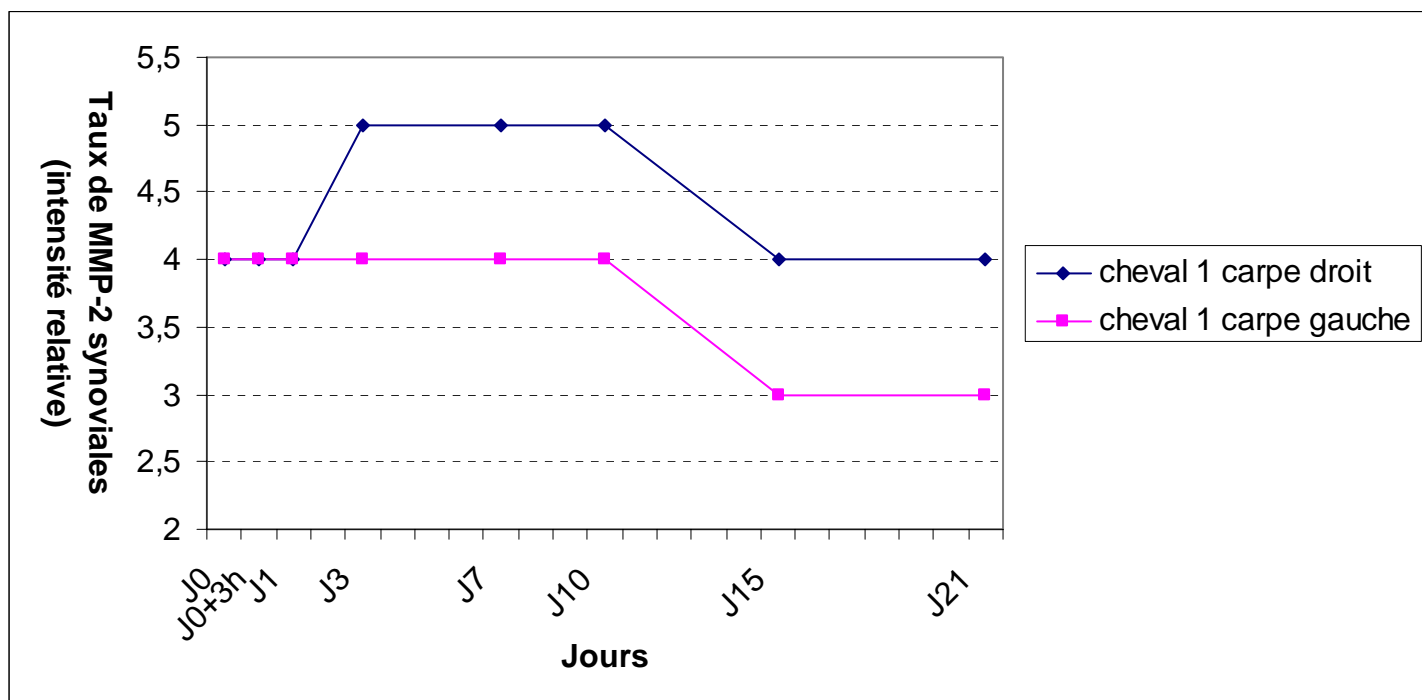


Figure 30 : Evolution du taux de MMP-2 synoviales du cheval 1 au cours de l'étude dans les deux carpes .

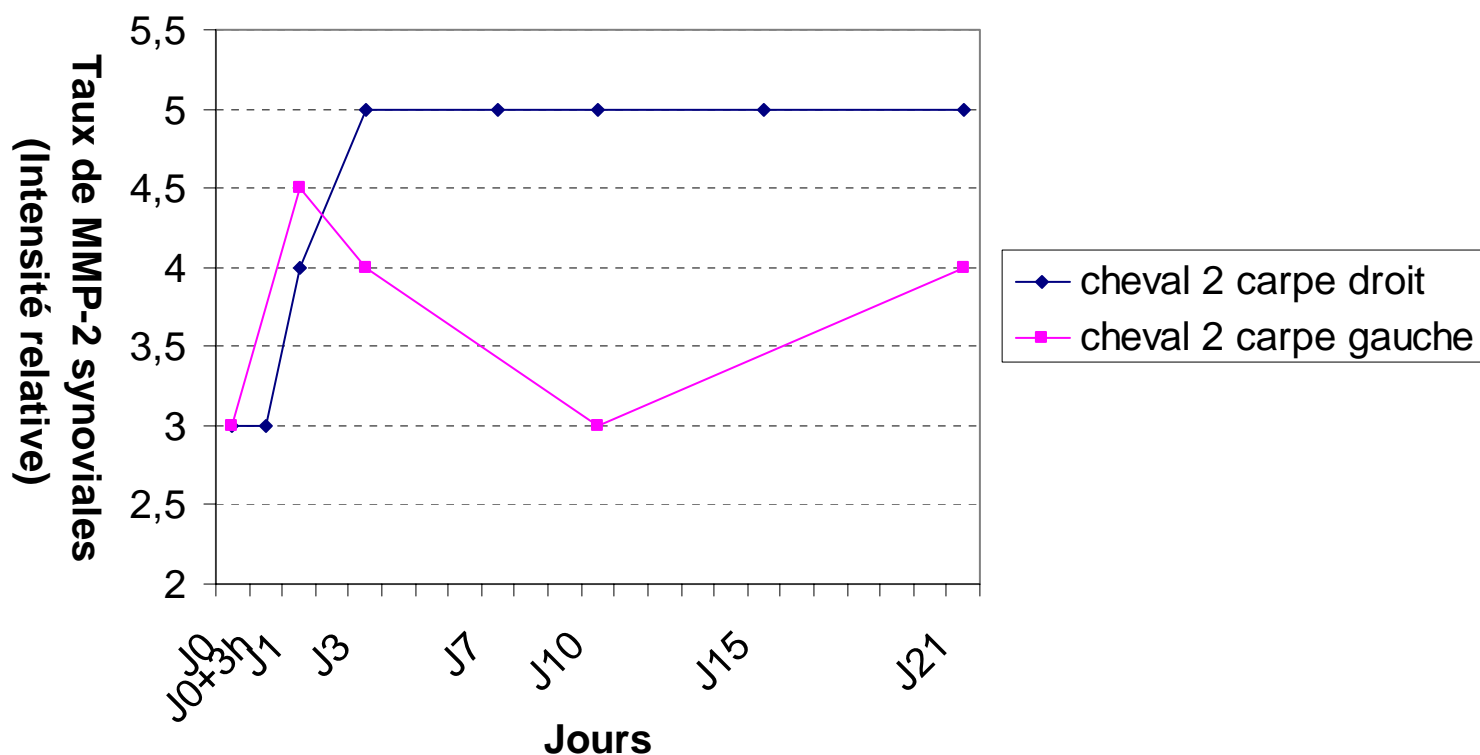


Figure 31 : Evolution du taux de MMP-2 synoviales du cheval 2 au cours de l'étude dans les deux carpes.

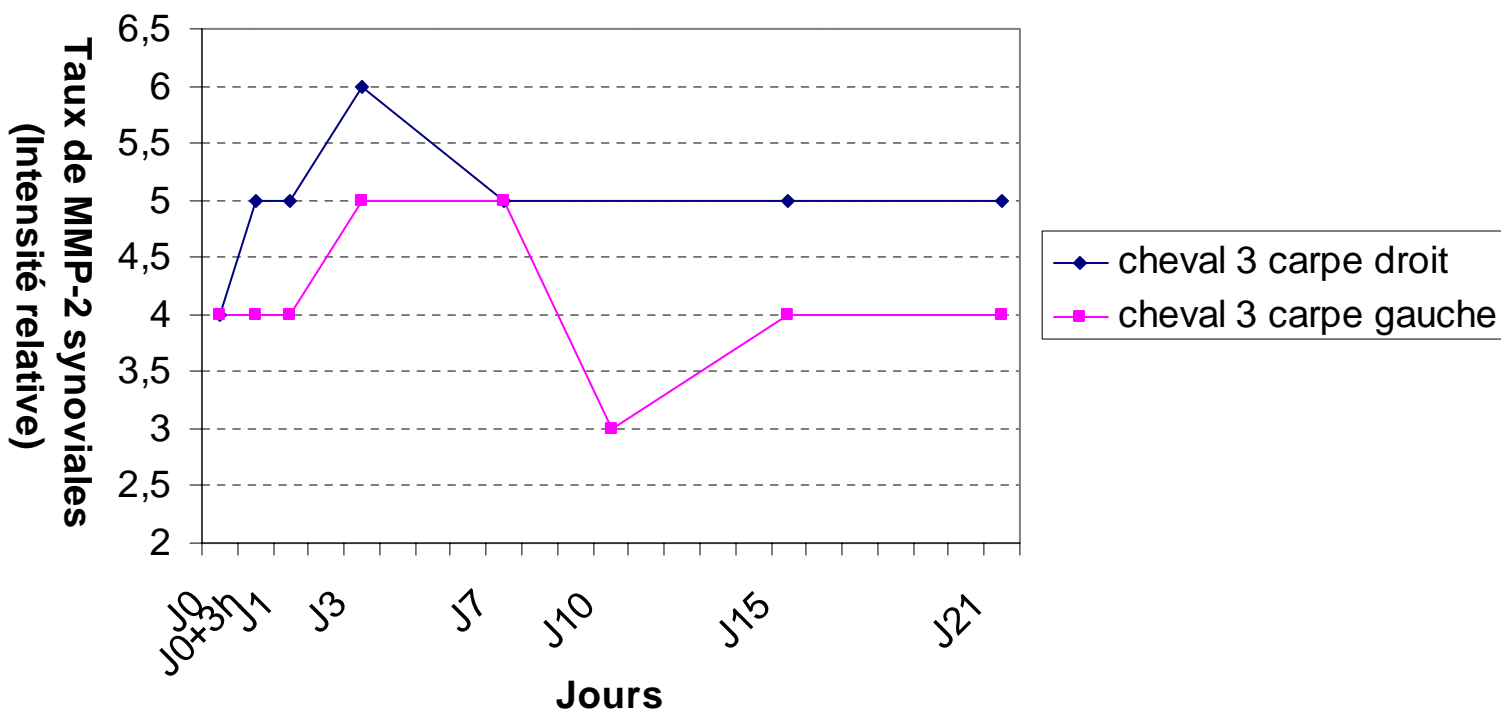


Figure 32 : Evolution du taux de MMP-2 synoviales du cheval 3 au cours de l'étude dans les deux carpes.

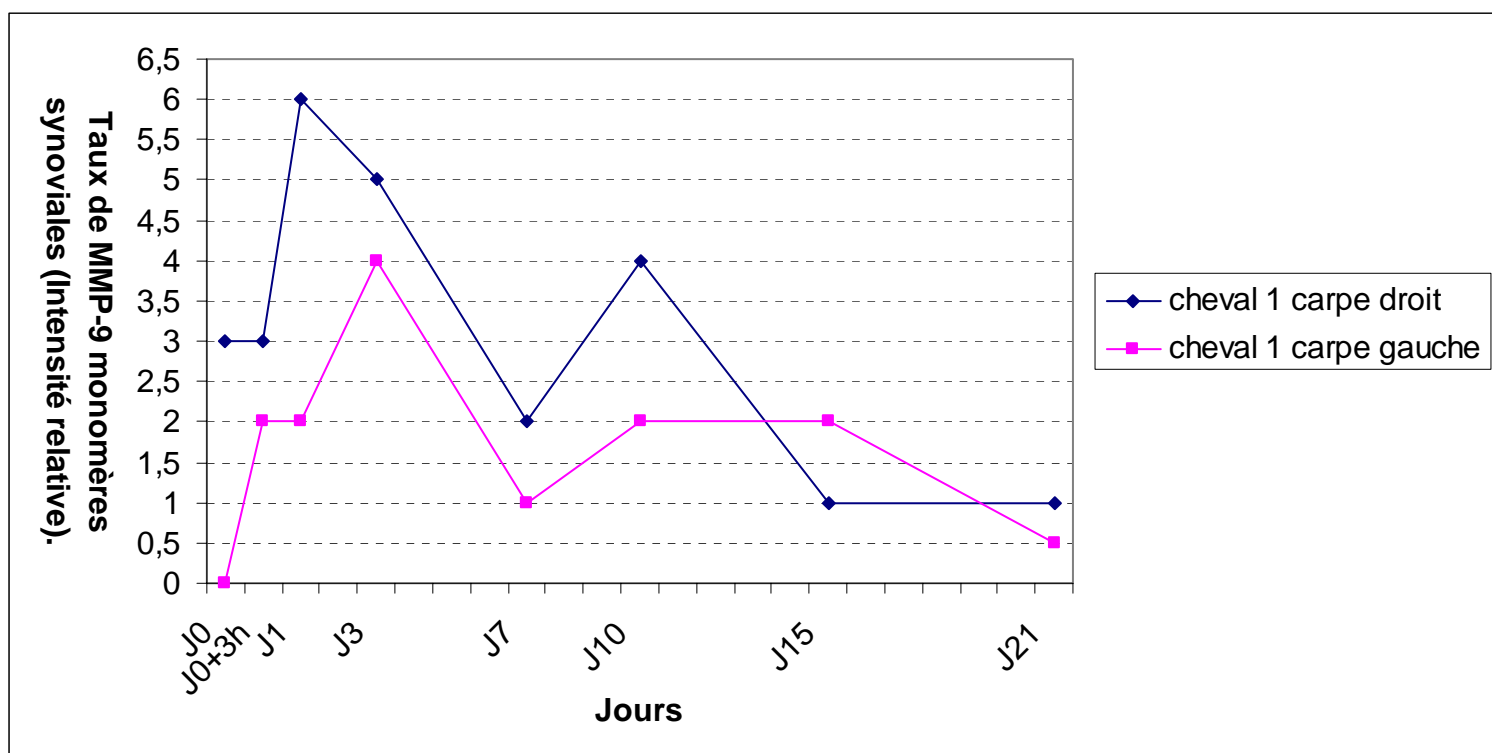


Figure 33 : Evolution du taux de MMP-9 monomères synoviales du cheval 1 au cours de l'étude dans les deux carpes

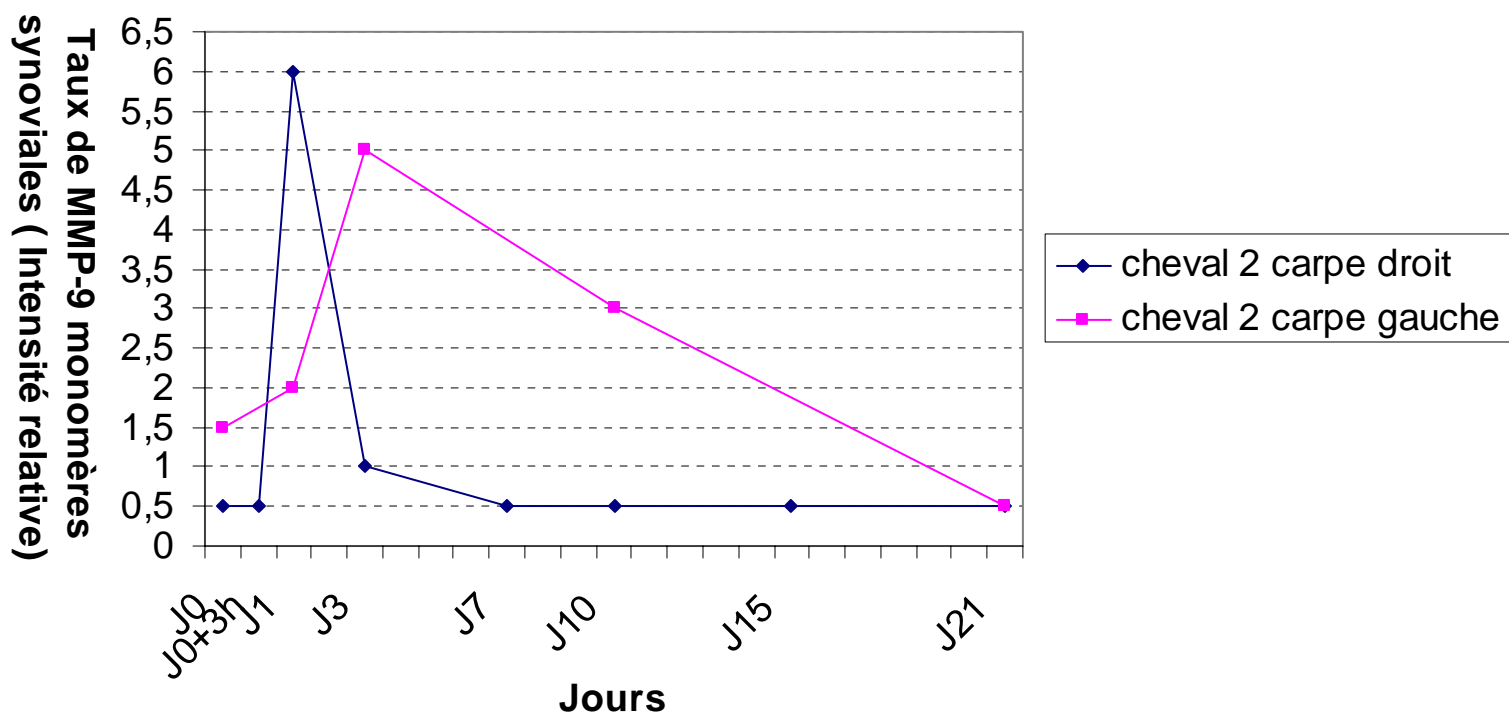


Figure 34 : Evolution du taux de MMP-9 monomères synoviales du cheval 2 au cours de l'étude dans les deux carpes.

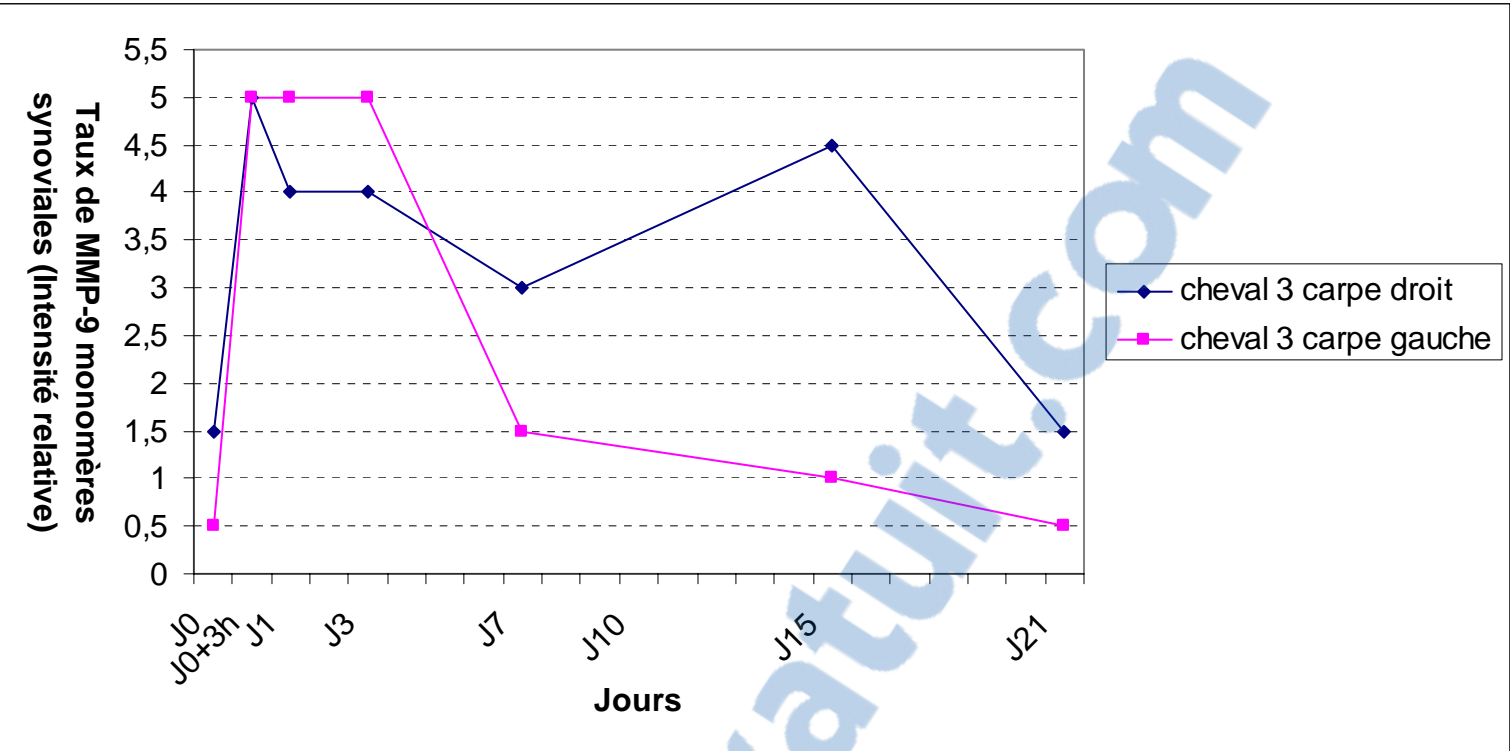


Figure 35 : Evolution du taux de MMP-9 monomères synoviales du cheval 3 au cours de l'étude dans les deux carpes.

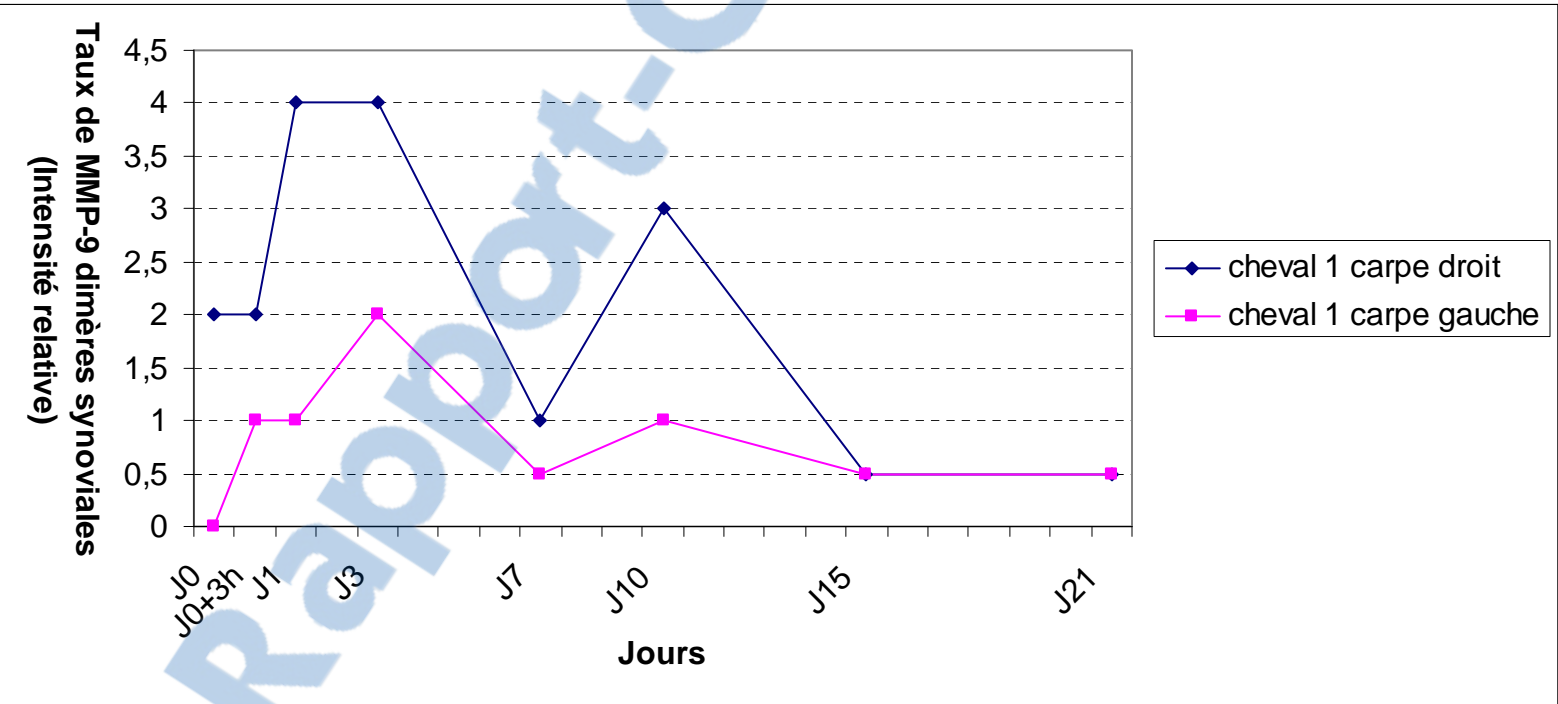


Figure 36 : Evolution du taux de MMP-9 dimères synoviales du cheval 1 au cours de l'étude dans les deux carpes.

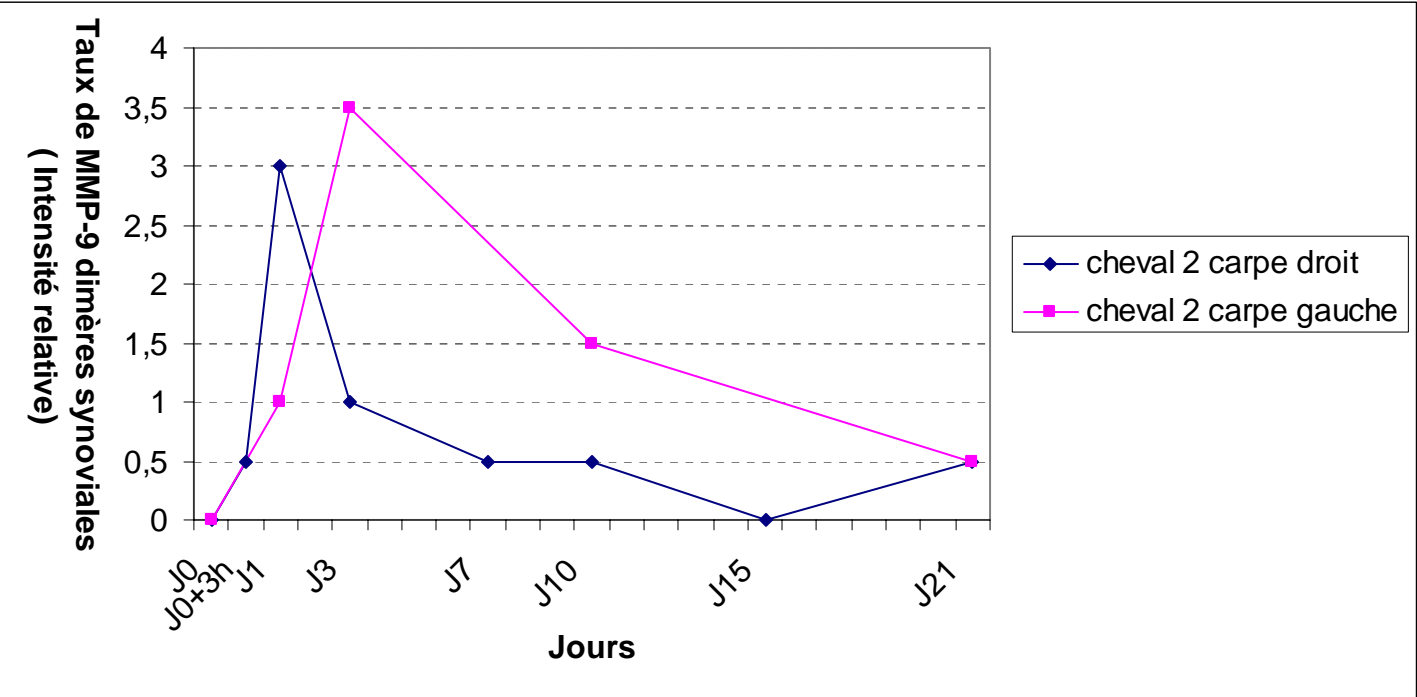


Figure 37 : Evolution du taux de MMP-9 dimères synoviales chez le cheval 2 au cours de l'étude.

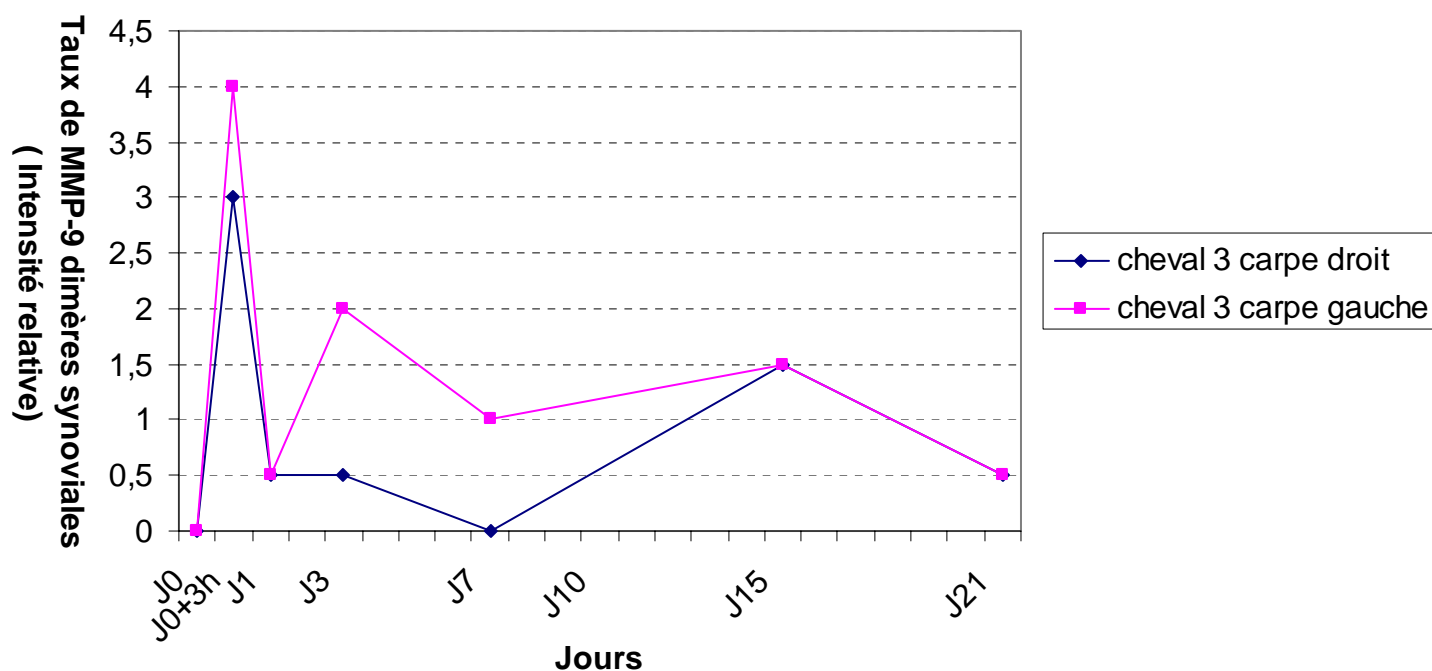


Figure 38 : Evolution du taux de MMP-9 dimères synoviales chez le cheval 3 au cours de l'étude dans les deux carpes.

DISCUSSION

I- FIABILITE DE LA TECHNIQUE ; CHOIX DU PROTOCOLE

1-Les chevaux

Cette étude a été menée sur un petit échantillon qui n'est pas statistiquement significatif. Cependant, il s'agissait d'évaluer l'intérêt de la mise en place de ce modèle afin de réaliser des études futures et dégager une méthode de dosage possible. Du fait que le protocole mis en place était extrêmement lourd à réaliser, nous avons opté pour un petit échantillon.

Les trois chevaux utilisés étaient des individus adultes (âge moyen 6.5 ans). En effet, il a été montré que l'activité métabolique au sein de l'articulation était moins marquée chez les chevaux âgés. Ils étaient de plus cliniquement sains et non entraînés au moins l'année précédant l'étude : aucun phénomène inflammatoire engendré par les contraintes liées à l'activité sportive n'était donc actif et susceptible d'interférer avec l'étude.

MacIlwraith a en effet montré que des traumatismes répétés sur un cartilage sain entraînaient une inflammation des tissus mous, un tiraillement des capsules articulaires, voire une instabilité articulaire, pouvant être à l'origine de la réaction en chaîne de dégradation du cartilage (38).

2-choix du modèle et induction de la synovite

La dose de LPS choisie est intermédiaire par rapport à ce qui est rapporté dans la bibliographie et a permis d'obtenir un effet significatif tout en restant dans les limites du tolérable. Palmer et Bertone (53) ont montré que des faibles doses de LPS pouvaient fournir un modèle de synovite correct sans répercussions systémiques (signes d'endotoxémie : hyperthermie, abattement, inappétence, boiterie sans appui pour des doses inférieures ou égales à 0.5mg). Todhunter et coll obtiennent des signes cliniques beaucoup plus marqués que dans notre étude en utilisant du LPS à forte dose (0,02µg/kg) additionné de sulfate de morphine à 0,1 mg/kg en suivant leurs chevaux 18 jours (73) et en répétant l'injection à plusieurs jours d'intervalle. Hawkins et coll (29) observent également quelques effets systémiques avec 3 µg de LPS par articulation. Cornelissen et coll obtiennent une chronologie d'apparition et de disparition des symptômes similaire à nos résultats en utilisant des particules de polivinyl alcool, mais n'observent pas d'anomalie cartilagineuse à 50 jours avec travail sur six semaines. (21).

Enfin les modèles à l'adjuvant de Freund et au monoiodoacétate de sodium sont répertoriés pour provoquer des ostéophytes et des lésions articulaires irréversibles, avec des réactions périarticulaires importantes (21,26). De même, MacIlwraith et van Sickle (44), en utilisant comme modèle l'injection intra-articulaire de filipine avaient provoqué des modifications histologiques et morphologiques importantes et irréversibles (nécrose des chondrocytes, hypertrophie des chondrocytes restants, formation de chondrones, d'ostéophytes). Des injections répétées de LPS à faible dose (61) ou à dose plus forte (73) ont également été proposées. Le LPS utilisé dans notre étude est du LPS d'*Escherichia coli* O55/B5 purifié par chromatographie.

Le choix d'utiliser l'articulation antébrachio-carpienne a été guidé par le fait que c'est une articulation facile à prélever, où l'on peut recueillir une quantité de liquide synovial importante. Elle est de plus bien documentée dans la bibliographie(26,27,44,63,73). Le fait d'injecter une solution saline dans l'articulation témoin permet de reproduire l'augmentation de volume de liquide synovial.

Par contre la méthode d'induction de la synovite par injection intra-articulaire, de fait légèrement vulnérante, pourrait interférer par d'éventuelles conséquences inflammatoires non liées au LPS, cependant l'injection controlatérale permet d'avoir à peu près les mêmes conditions inflammatoires liées au protocole dans les deux carpes.

3-Durée du protocole et suivi clinique

La durée du protocole nous était imposée par l'utilisation ultérieure des chevaux par le laboratoire d'anatomie de l'ENVA à des fins d'enseignement. Le choix de ne suivre les chevaux que trois semaines n'a permis de mettre en évidence que les phases inflammatoires aiguë et subaiguë, avec peu d'effet sur le cartilage.

Un des biais de cette étude est de pratiquer des arthrocentèses répétées sur les deux carpes, ceci provoquant une inflammation articulaire, comme en témoigne l'évolution des paramètres sur le membre témoin. En effet, ceux-ci ont révélé une synovite avec distension articulaire, chaleur locale, leucocytose synoviale, augmentation des protéines synoviales, présence de MMP-9 monomères et dimères, ainsi que des lésions découvertes à l'examen anatomopathologique : hématome sous-cutané, synovite, traces d'aiguille sur le cartilage. L'apparition de cette synovite a toutefois été retardée pour le membre témoin par rapport au membre induit.

Un autre effet négatif a été dans la première journée post-induction, où les prélèvements étaient assez rapprochés, la difficulté d'obtenir suffisamment de liquide synovial, la synovite n'étant pas encore développée. D'où le manque de certaines valeurs en début d'expérimentation.

Un troisième inconvénient a été la gestion des chevaux, plus ou moins difficiles à ponctionner. Une alternative aurait pu être de placer un cathéter en téflon dans chaque articulation (37) dans un premier temps, ce qui aurait été moins vulnérant, et aurait permis de prélever le liquide synovial à souhait dans les premières heures.

Le sujet le plus douloureux a reçu du sulfate de morphine quatre heures après l'induction. La molécule a été choisie pour interférer le moins possible avec l'étude. En effet, dans l'étude de Todhunter et coll. (73), la douleur induite par le LPS était maximale entre la première et la deuxième heure post-induction, mais le chlorhydrate de morphine ajouté au LPS a permis la diminution voire la suppression de la boiterie entre la deuxième et la troisième heure post-induction. De même, dans l'étude de Palmer et Bertone (61), les chevaux présentant des signes d'endotoxémie ont reçu de la phénylbutazone et ont été écartés du protocole du fait de ses propriétés anti-inflammatoires. Par contre la flunixin-méglumine ne semble pas avoir d'effet sur l'activité du TNF- α mesurée après une induction au LPS par voie intra-veineuse. (45).

4- Choix des paramètres étudiés et des méthodes de dosage.

Le dosage du TNF- α a été réalisé selon la méthode de Mackay (41), dont a également été inspirée l'étude de Billinhurst et coll. (6). Dans ces deux études, les deux auteurs ont utilisé des antiséras anti-TNF- α humain pour confirmer la spécificité de leur dosage et ainsi montrer que l'activité cytotoxique observée était bien due au TNF- α . De la même façon, Todhunter et coll. (73) utilisent un anticorps de lapin anti-TNF- α humain qui présente l'intérêt d'être spécifique de l'homme et de présenter un taux de réaction croisée avec TNF- β , IL-1- α et IL-6 inférieur à 0,1%, pour localiser l'activité TNF- α . Les récepteurs au TNF p55 et p75 peuvent être de la même façon immunolocalisés dans le cartilage articulaire et la membrane synoviale. La recherche de l'activité du TNF au niveau sanguin ne paraît pas concluante (27) et peu spécifique (13).

Le TNF- α a été choisi en tant que marqueur de l'inflammation du fait de son rôle prépondérant au cours du phénomène inflammatoire au sein de l'articulation et de la relative précocité de la réponse à TNF- α au cours de l'inflammation au LPC. Il aurait été également possible de doser les IL-1 ou IL-6 selon les mêmes principes de dosage, mais le protocole expérimental était plus pratique et plus fiable quant au niveau des cellules à utiliser en tant que cible pour quantifier la cytotoxicité de ces interleukines.

Le choix de doser les métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9 se basait sur le fait que c'était un dosage bien documenté (1,17, 18, 19) et que l'on avait une méthode de dosage fiable pour mettre en évidence ces gélatinases (zymographie au SDS-PAGE). De plus, l'évaluation de ces métalloprotéinases a été rarement effectuée dans le temps.

Il a été également décidé, de manière parallèle à ces dosages, de mesurer des paramètres cliniques tels que la température rectale, la boiterie, la fréquence cardiaque etc. pour pouvoir corréler les résultats obtenus au niveau de ces dosages avec l'intensité réelle de l'inflammation au niveau du carpe. C'est également pour cette raison que des paramètres biologiques ont été étudiés, en tant que marqueurs classiques de l'inflammation chez le cheval (protéines, totales, leucocytes, globulines).

II- COMMENTAIRE DES RESULTATS

L'intégration de données cliniques, d'imagerie médicale et de données biologiques et biochimiques ainsi que le suivi de leur cinétique a permis de confirmer la mise en place d'une synovite accompagnée d'une boiterie et des premiers symptômes de l'arthrite. L'inflammation aigüe créée par ce modèle est appuyée par les paramètres cliniques et par l'augmentation des α 1 globulines dans le sang et le liquide synovial des membres induits dès le premier jour du protocole. De la même façon, une importante augmentation dans le liquide articulaire des constituants protéiques dérivants du plasma a témoigné d'une modification de la perméabilité de la membrane synoviale. Cette réaction localisée est associée à des phénomènes anormaux comme l'afflux de leucocytes. La réaction inflammatoire aigüe permet à l'organisme de contenir et d'éliminer les agents infectieux dans les tissus grâce à l'infiltration leucocytaire, mais ces mêmes

leucocytes ont aussi la capacité de libérer au cours de leur phagocytose, des enzymes protéolytiques dommageables pour les tissus environnants.

1-Dosage du TNF- α

1-a Etude des taux de base à J0

Il s'avère que dès J0, les taux de base en TNF- α dans les deux articulations droites et gauches chez nos animaux sont extrêmement variables. Anormalement élevés chez les chevaux un et deux, au dessus de 50 % de toxicité dans les deux carpes chez ces deux animaux, ils sont quasi nuls voire nuls dans le carpe droit chez le cheval trois. Est-ce lié à un statut inflammatoire chronique chez les deux premiers sujets dû à une utilisation antérieure, bien que nos trois chevaux aient été au repos et non utilisés pendant une année complète avant cette expérience ? Ou plus simplement le taux de base normal de TNF- α chez les chevaux est-il très variable, sans que ce soit pour autant une marque de l'inflammation en cas de taux élevé.

Le dosage du taux de TNF- α sur prélèvement unique de liquide synovial sur une articulation suspecte en vue de détecter une inflammation précoce semble donc ici absolument sans fondement.

Cependant, il est à noter que bien que variables d'un animal à un autre, les taux de base de TNF- α dans les deux carpes sont remarquablement proches en valeur à J0. Cela permet d'envisager d'utiliser chaque cheval comme son propre témoin en prélevant en cas de suspicion de lésion articulaire à la fois une articulation saine et l'articulation suspecte avec bien sûr l'inconvénient de pratiquer des manipulations délicates et peu anodines sur deux articulations avec le risque, bien que faible, de lésions induites.

Quant aux taux à J0 dans le sérum et le plasma, ils sont également assez variables chez les trois animaux avec la même conséquence sur la fiabilité de ces paramètres dans le cadre d'une détection précoce de l'inflammation. Ils sont cependant très proches en valeur dans ces deux liquides biologiques, ce qui est somme toute logique, vu le TNF- α est présent en solution dans le sang. De plus, on n'observe pas de relation entre les taux sanguins et les taux synoviaux ; s'ils sont élevés dans le sang, ils ne le sont pas forcément dans les carpes, par exemple chez le cheval un qui présente des taux sériques et plasmatiques bas (respectivement 5% et 30% de toxicité) pour des taux au niveau du carpe de 51 %et 52% de toxicité. Au contraire, chez le cheval trois, malgré des taux quasi nuls dans les carpes, on retrouve 20%et 15% de toxicité dans le sérum et le plasma.

En effet, on peut raisonnablement supposer que les taux sériques et plasmatiques reflètent plus l'état inflammatoire au niveau de l'organisme dans son ensemble, et que des éléments extérieurs à l'expérimentation peuvent intervenir, chaque animal n'étant jamais à l'abri d'infections passagères sans répercussion clinique mais contre lesquelles ont été mises en jeu les défenses corporelles et la réponse inflammatoire.

Par contre l'évolution chronologique de ces paramètres au cours de l'expérience pourra peut être être corrélée à l'évolution des taux articulaires afin d'établir une cinétique de la réponse inflammatoire.

1-b Etude de la cinétique des taux de TNF- α au cours de l'expérimentation.

Vu qu'il n'est pas possible d'établir un taux « normal » de TNF- α au-dessus duquel on pourra diagnostiquer une inflammation, il s'agit donc de suivre l'évolution de la quantité de TNF- α au cours de l'expérimentation afin de constater si il y a une différence notable et significative entre les deux carpes qui pourrait permettre de prendre le carpe gauche comme témoin et en déduire que le droit est lésé rien que par observation des courbes de dosage.

1-b-1 .Au niveau plasmatique et sérique

Les dosages au niveau du sérum et du plasma sont de peu d'utilité. Le taux reste remarquablement stable tout au long de l'expérimentation chez un cheval, dépassant à peine la valeur de base. On note juste un pic de TNF- α chez un des chevaux dans le sérum à J 1 sans pour autant le retrouver au niveau du plasma ce qui laisse à penser que la valeur obtenue est peu fiable .De plus même quand le taux de TNF- α est supérieur au taux de base, il ne s'élève pas cependant de manière significative.

Les dosages sériques et plasmatiques semblent donc de peu d'utilité pour suivre l'inflammation articulaire ; ils ne sont pas corrélés non plus à des signes cliniques d'atteinte générale, en effet les pics d'hyperthermie observés ainsi que les élévations de fréquence cardiaque chez les trois animaux ne suivent pas les courbes de TNF- α de leurs sérums et plasmas respectifs. La répercussion de l'atteinte articulaire au niveau de l'état général de l'animal n'est donc pas quantifiable par ce biais.

1-b-2 Au niveau des liquides synoviaux

Il y a au cours de l'expérience une élévation indéniable du taux de TNF- α dans le carpe induit chez les trois chevaux de manière précoce (dès J0+3h) avec des pics de toxicité marqués. On a donc effectivement un marqueur de l'inflammation présent précocement dans l'articulation lésée ce qui est à la base ce que nous recherchions. Nos résultats viennent par là confirmer les observations trouvées dans la bibliographie.

Ainsi dans l'étude de Cornelissen et coll (19), la concentration de TNF- α atteint un maximum quatre heures après induction pour décroître quasiment totalement dans les huit heures. Dans l'étude d'Hawkins et coll ; le pic d'activité du TNF- α se situe deux heures après induction et l'activité dans le membre témoin reste indétectable (27). Dans une autre étude, une relation a été établie entre l'activité de TNF- α et le taux de protéines totales dans le liquide synovial (34). Selon Cornelissen et coll. (21) le pic de TNF- α pourrait être à l'origine du pic de leucocytes observé quatre heures plus tard.

Cependant, cette élévation est fugace, le retour au taux de base se faisant chez les trois chevaux entre J3 et J7 selon les animaux, alors que les signes cliniques sont certes notables, mais relativement modérés. Reste à savoir, si en mettant au point un test pour des praticiens, il sera possible de détecter au laboratoire cette élévation transitoire en tenant compte du délai entre l'atteinte inflammatoire effective et sa suspicion par le propriétaire puis le praticien.

De plus, au cours de notre expérience, on note des élévations secondaires, plus tardives, du taux de TNF- α autour de J10, notamment chez deux chevaux. Il peut s'agir d'effets inflammatoires « rebond », mais plus probablement la technique est à mettre en cause du fait des lésions créées par les ponctions répétées des articulations et du fait de lésions inflammatoires possiblement induites.

Le problème posé par nos résultats, encourageants de prime abord si l'on considère que l'on obtient bien des pics de TNF- α dans nos articulations lésées après déclenchement d'une inflammation par le LPS, c'est qu'il n'y a pas de différence notable entre les cinétiques des deux courbes entre les carpes lésés et témoins, ces derniers présentant également des pics de toxicité, bien que, certes, plus transitoires et moins marqués.

Cependant, si l'on considère que la seule valeur de référence dont nous pourrions disposer afin d'avoir un teste fiable serait la valeur du taux de TNF- α d'une articulation saine qui serait le reflet du taux de base en dehors de toute phase inflammatoire chez l'animal concerné, le fait que l'articulation contro-latérale présente également une élévation remarquable du taux de TNF- α , parfois même supérieur à celui mesuré dans l'articulation lésée ne permet donc pas de disposer de témoin, rendant par là même tout test inutile.

En effet, à un instant t donné (celui du prélèvement par le praticien), le fait que les mesures dans un carpe suspect et un carpe sain soient identiques ne permettrait pas de conclure à l'intégrité de l'articulation.

On pourrait éventuellement envisager de mettre en place une mesure sur plusieurs jours qui serait alors plus parlante, mais le nombre de prélèvements délicats à réaliser ainsi que la durée nécessaire à ces mesures pour avoir des résultats significatifs rendent d'emblée cette technique parfaitement inutile dans le cadre d'une détection précoce de l'inflammation, sans compter que cela serait risqué chez des animaux qui sont souvent de grande valeur.

Nos résultats confirment donc l'étude de Billingham et coll. (6) ont montré que la différence des taux de TNF- α entre les liquides synoviaux des articulations du groupe témoin et du groupe atteint d'arthropathie chronique n'était pas significative. Toutefois, ils avaient mis en évidence une augmentation significative du TNF- α intra-articulaire au cours de l'inflammation aiguë sur ces mêmes articulations comparées aux articulations normales. Ils ont donc conclu que la détermination du taux de TNF- α dans l'articulation du cheval était de valeur diagnostique limitée dans l'évaluation de l'arthrite.

2-Dosage des métalloprotéinases

La zymographie a permis dans cette étude de mettre en évidence une production excessive de MMP-2 et de MMP-9 monomères et dimères.

2-a Les MMP-2

En effet les MMP-2 sont activées dès l'induction, sans retour à des valeurs normales en fin de protocole. De plus la forme active à 66kDa est prédominante, ce qui implique nécessairement un clivage du segment terminal de la forme latente de 72kDa, comme l'avaient fait observer

Johnson et coll. (33). Chez le cheval, ces MMP-2 sont sécrétées par les chondrocytes et les synoviocytes et sont présentes dans le cartilage normal et anormal (21,38).

En excès dans le milieu biologique, elles reflètent un déséquilibre de l'homéostasie de la matrice cartilagineuse. L'étude de Johnson et coll. (33) a montré une augmentation significative des MMP-2 actives dans les tissus conjonctifs du pied de chevaux atteints de fourbure aiguë et /ou évolutive depuis plusieurs années. Une augmentation significative des MMP-2 a également été notée dans le liquide synovial d'articulations septiques ou présentant des dégénérescences comparativement au liquide d'articulations saines.(19)

Dans notre étude, le dosage des métalloprotéinases de type MMP-2 a montré une augmentation significative de ces dernières dès J3, élévation stable dans le temps puisque persistant tout le long de l'expérimentation. Les taux de base à J0 sont de plus chez les trois chevaux relativement homogènes et les valeurs dans les carpes témoins étant systématiquement inférieures et ce de manière notable par rapport au carpe induit, sauf bien entendu à J0.

Toutes ces observations permettent donc de retenir les MMP-2 comme marqueur possible de l'inflammation qui puisse être intéressant pour le praticien.

2-b Les MMP-9

Les gels de zymographie montrent une production excessive de MMP-9 monomères dans les membres induits entre le premier et le troisième jour du protocole, puis on observe un retour à des valeurs normales en fin de protocole.

Cette sécrétion se fait essentiellement sous sa forme active avec des bandes de 84kDa ou en phase de l'être avec de multiples bandes intermédiaires de la forme latente à la forme active.

La présence de MMP-9 monomères est à relier à la présence d'un processus dégénératif (31). Les MMP-9 monomères sont sécrétés par les synoviocytes et les chondrocytes. Contrairement à ces des MMP-2, les leucocytes ont en effet la capacité de sécréter des MMP-9 monomères (18) ou des plasmines activatrices des MMPs(61).

La sécrétion des MMP-9 monomères est parfaitement corrélée à l'infiltration leucocytaire dans cette étude. Dans les membres témoins, on constate une activation modérée des MMP-9 monomères. L'arthrocentèse entraînant un microtraumatisme dans le milieu articulaire par les prélèvements répétés, l'activité de ces MMP-9 monomères serait partiellement due à une infiltration leucocytaire.

On a donc une élévation précoce des MMP-9 dans les carpes induits, de manière plus marquée que dans les carpes témoins et ce dès J0+3h. Cependant, on retrouve pour ces molécules la même variabilité des taux de base à J0 quoique moins marquée que pour le TNF- α ce qui nécessiterait donc qu'un cheval soit son propre témoin. De plus le retour à la normale assez rapide (autour de J3) en fait une molécule moins fiable pour le praticien car plus fugace par rapport aux MMP-2.

L'activation des MMP-9 monomères n'étant pas immédiatement inhibée par les tissus inhibiteurs de MMPs (TIMPs), on observe un pic de MMP-9 dimères dans les membres induits avant que les TIMPs régulent l'activation de façon stoechiométrique dans un ratio de 1/1 (MMP-9 monomère/TIMP)

Ceci est en accord avec les travaux de Clegg et coll. (20) qui ont identifié une activité anti-MMP en utilisant une technique de zymographie reverse. L'utilisation d'une méthode de dosage plus quantitative comme celle de Ahrens et coll (1), par l'utilisation d'anticorps spécifiques de la MMP-9 permet de mettre en évidence et de quantifier les MMP-9, même au sein des complexes formés avec leur inhibiteur, mais pas de différencier les formes latentes libres des formes latentes complexées.

Les travaux antérieurs de Clegg et coll.(18) et Jouglin et coll.(34) avaient montré que la MMP-9 augmentait régulièrement avec le degré de gravité ou de destruction du cartilage articulaire alors que la MMP-9 dimère était un indicateur de plus grande gravité clinique. La dimérisation est en effet le reflet d'une production excessive de MMP-9 monomères.

On observe une relation linéaire entre les activités des MMP-9 monomères et dimères.

Sur des articulations atteintes d'arthrose, Brama et coll.(8) ont montré que l'activité des MMP-9 était près du double des valeurs trouvées dans les articulations normales, contrairement aux articulations atteintes d'ostéocondrose où les activités des MMPs étaient quasiment inchangées. De même, chez l'homme, on a observé que les taux de MMP-9 différaient selon qu'il s'agissait de liquide synovial d'origine inflammatoire ou mécanique (26). Chez l'homme atteint d'arthrite rhumatoïde, les quantités de MMP-2 et -9 dans le liquide synovial ne semblent pas influencées par la quantité restante de cartilage sain.

III-INTERET COMPARE DES DIFFERENTS DOSAGES EFFECTUES-

Nous nous sommes donc intéressés dans cette étude à trois molécules qui nous semblaient prometteuses dans le cadre d'une détection précoce de l'inflammation chez le cheval.

L'avantage dans cette étude était de pouvoir comparer deux paramètres et méthodes de dosage différents tout en suivant l'évolution de l'inflammation par des signes cliniques et ce, sur les mêmes individus, et pendant une période suffisamment longue pour en tirer des conclusions fiables sur une évolution cinétique de ces paramètres.

1- Fiabilité des techniques et difficultés de mise en oeuvre

Dans les deux cas qui nous intéressent ici, il s'agit de méthodes biologiques qui ont été utilisées pour détecter et quantifier l'inflammation.

Or, un marqueur biologique doit être spécifique, dans le sens où il reste inchangé lors d'affections autres que celle étudiée à savoir l'arthropathie dégénérative tout en reflétant tout ou partie des processus pathologiques affectant l'articulation.

C'est pour cette raison que le dosage du TNF- α dans le sang est de peu d'intérêt car il est le reflet de l'inflammation à un niveau plus général de l'organisme. Par contre, les dosages synoviaux que ce soient pour le TNF- α ou les MMPs sont très spécifiques et sont bien le reflet de l'atteinte articulaire du fait des rôles prépondérants de ces molécules dans le processus de dégradation du cartilage au cours de l'inflammation.

De plus, les techniques de dosage utilisées doivent également être fiables, et refléter le plus précisément possible les quantités réelles de chaque molécule dans le liquide étudié.

L'intérêt d'avoir étudié trois paramètres indépendamment les uns des autres par deux méthodes différentes (cytotoxicité et zymographie) est de comparer la fiabilité de ces deux techniques. En effet sur les cinétiques observées respectivement pour le TNF- α et les MMP-2 et MMP-9, on retrouve dans le temps les mêmes pics inflammatoires même s'ils peuvent être décalés, ce qui permet d'en déduire que nous avons obtenu le reflet quasi fidèle du processus inflammatoire dans l'articulation.

Par ailleurs, la répétitivité de ces techniques n'est pas à mettre en doute, les dosages ayant été effectués plusieurs fois à des dilutions différentes avec le TNF- α et il fut possible de mettre en évidence un effet dose en rapport avec la dilution. De même, dans le cadre des métalloprotéinases, la zymographie reposant sur une relation enzyme substrat hautement spécifique, la répétitivité et la fiabilité de la technique ne peuvent être mises en doute.

Nous disposons donc de deux techniques fiables pour détecter deux marqueurs précoces de l'inflammation dans le carpe. Quant à la possibilité d'en tirer un test utilisable par le praticien en pratique courante, c'est plus discutable. En effet, ce sont des méthodes lourdes et onéreuses qui nécessitent du temps (dosages effectués sur plusieurs jours dans les deux techniques) ce qui peut être délicat quand on recherche une détection rapide, avec des manipulations de laboratoire délicates. De plus les substrats utilisés étant des prélèvements synoviaux, cela pose le problème d'effectuer des arthrocentèses sur des articulations sensibles, à savoir le carpe des chevaux.

2- Comparaison des paramètres.

Nous avons dosé respectivement le TNF- α , les MMP-2 et les MMP-9. Lequel de ces trois marqueurs de l'inflammation est le plus intéressant en pratique ?

Nous cherchions un marqueur précoce, c'est le cas pour nos trois molécules qui sont présentes dès J0+3h ou J1 selon les animaux, donc au tout début de l'inflammation.

Par contre, il faut également que l'on puisse avoir une échelle de dosage fiable avec des valeurs seuils au dessus desquelles le praticien peut poser un diagnostic d'arthropathie. Le TNF- α est là de peu d'intérêt car on l'a vu précédemment, nous ne disposons pas de valeur de base homogènes chez tous les chevaux et il n'est guère possible d'utiliser une articulation saine comme témoin, les taux de TNF- α s'y élevant également.

Quant aux MMP-9 monomères et dimères, elles aussi ont des valeurs de base hétérogènes, mais néanmoins le carpe induit étant beaucoup plus réactif que le carpe sain, il est possible d'utiliser un cheval comme son propre témoin avec toujours ce petit inconvénient d'aller ponctionner une articulation saine.

De plus, il serait préférable de disposer d'un marqueur qui ne soit pas fugace afin d'éviter le risque de diagnostics négatifs liés à des prélèvements un peu tardifs par rapport au début de l'inflammation. De ce fait là aussi le TNF- α n'est pas indiqué, quant aux MMP-9, leur taux revient assez rapidement à la normale.

De ce fait, il ressort de cette étude que les marqueurs qui semblent les plus prometteurs sont les MMP-2 qui sont présentes dans les liquides synoviaux dès J0+3h, restent élevées durant au moins trois semaines (durée de notre étude) et de plus ont des valeurs de base suffisamment

homogènes ainsi que des pics suffisamment marqués pour ne pas à avoir à utiliser un cheval comme son propre témoin.

3- Autres paramètres intéressants

L'étude d'autres paramètres aurait pu être envisagée, par exemple, les protéines inflammatoires, dont la production hépatique est augmentée en réponse à des médiateurs produits par les leucocytes et les macrophages au cours d'épisodes d'infection et d'inflammation sont de bonnes candidates.

Une protéine inflammatoire idéale aurait un taux basal faible avec des normes peu variées, resterait inchangée avec le sexe et l'âge, augmenterait fortement (d'un facteur 100) en réponse à l'infection et à l'inflammation et le taux de réponse serait proportionnel à la quantité de tissu endommagé (36).

Les protéines inflammatoires connues chez l'homme et l'animal sont la protéine C (CRP), la sérum amyloïde A (SAA, l'haptoglobuline, le fibrinogène, la céruloplasmine, l'orosomucoïde, l' α 1-antitrypsine, l' α 2 macroglobuline, le complément et les protéines de la coagulation (32). Chez l'homme, les principales protéines inflammatoires utilisées sont la CRP et la SAA (58).

Le fibrinogène est couramment utilisé chez le cheval, mais ne permet pas de localiser l'affection. L'haptoglobuline s'est révélée utile en cas d'abcès profond et d'infections bactériennes ou virales chez le cheval. Par contre la CRP n'est pas une protéine inflammatoire de choix chez le cheval (32) alors qu'on a montré chez l'homme qu'en cas d'arthrite rhumatoïde les taux de MMP-9 et de CRP étaient corrélés (13,26) et que la CRP était en relation avec l'exercice physique.

En revanche, la SAA serait intéressante chez le cheval en cas d'infections bactériennes et virales naturelles ou induites chez l'adulte, le nouveau-né ou le fœtus(66)avec des taux particulièrement intéressants lors d'arthrite septique mais à l'inverse, un taux élevé ne permet pas de localiser le problème.

D'après des études menées chez l'homme, Ishiguro propose l'utilisation de certains paramètres comme le ratio C6S/C4S et les concentrations antigéniques de kératane sulfate comme marqueurs du métabolisme des protéoglycanes (32), mais la validité de ceux –ci est controversée chez l'homme (13) et reste à définir chez le cheval semble refléter de façon assez fiable les lésions articulaires et permettre d'établir un pronostic (13).

Il serait également intéressant de se pencher sur le dosage des autres interleukines régulant le phénomène inflammatoire (IL-1, IL-3, IL-10 ou TGF- β par exemple) car elle contribuent également à la persistance de l'inflammation. De même, les récepteurs solubles à ces interleukines, qui permettent un contrôle du taux de ces molécules en les fixant seraient intéressant à explorer de par leur persistance et leur présence moins fugace dans l'articulation au cours de l'inflammation.

CONCLUSION

Problèmes sérieux et répandus dans le domaine de la pratique équine, les atteintes articulaires posent au praticien le challenge d'un diagnostic le plus précoce possible s'il veut intervenir avant les conséquences délétères de ces affections.

Cette étude visait donc à cerner quelques molécules qui pourraient être utiles en laboratoire dans ce but, ainsi que les moyens de les mettre en évidence.

Son succès fut relatif. Bien qu'elle permit de mettre en œuvre un modèle expérimental fiable d'arthrite inflammatoire aigue comme décrit dans la bibliographie, ainsi que l'évolution de différents paramètres associés au cours des différentes phases inflammatoires, elle ne put permettre de dégager une méthode de dosage suffisamment fiable pour être d'un intérêt indéniable en pratique.

Il ressort cependant de cette étude que la perspective d'avenir dans le domaine des marqueurs inflammatoires au niveau articulaire réside dans les MMPs, notamment les MMPs 2, ce qui est déjà le cas en médecine humaine (13) où les MMPs sont considérées comme les meilleurs marqueurs potentiels de l'arthrose.

Quant au TNF- α , il ne semble finalement que de peu d'intérêt, malgré le rôle majeur qu'il joue au cours des lésions articulaires.

Cependant, cette étude nous aura permis de mieux connaître Les phénomènes inflammatoires articulaires chez le cheval et d'envisager de nouvelles perspectives thérapeutiques, comme le propose Mac Ilwraith avec les inhibiteurs des MMPs et la thérapie génique(43).

BIBLIOGRAPHIE

1. AHRENS D , KOCH AE , POPE RM , STEIN-PICARELLA M , NIEDEBALA MJ (1996). Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kdgelatinase B) in human rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, **39** (9) ,1576-1587.
2. ALLEN GK , CAMPBELL-BEGGS C , ROBINSON JA , JOHNSON PJ , GRENN EM (1996) . Induction of early-phase endotoxin tolerance in horses. *Equine vet. J.* **28** (4) , 269-274.
3. ALWAN WH , CARTER SD , DIXON JB , BENNETT D , MAY SA , EDWARDS GB (1991). Interleukin-1-like activity in synovial fluids and sera of horses with arthritis. *Res. in vet. Science*, **51** , 72-77.
4. BALBANC JC , VIGNON E , MATHIEU P , BROQUET P , CONROZIER T , RICHARD M (1991). Cytokines, prostaglandine E2, phospholipase A2 et métalloprotéases du liquide synovial dans l'arthrose. *Rev. Rhum.* , **58** (5) , 343-347.
5. BAXTER G (1994). Effects of tumor necrosis factor on in vitro digital arterial responses in horses. *Am. J. Vet. Res.* , **55** (4) , 551-555.
6. BILLINGHURST RC , FRETZ PB , GORDON JR (1995). Induction of intra-articular tumor necrosis factor during acute inflammatory responses in equine arthritis. *Equine Vet. J.* , **27** (3), 208-216.
7. BIRD JLE, MAY S , BAYLISS MT (2000). Nitric oxyde inhibits aggrecan degradation in explant cultures of equine articular cartilage. *Equine Vet. J.* , **32** (2) , 133-139.
8. BRAMA PA , TEKOPPELE JM , BEEKMAN B , VAN-MEEREN PR , BARNEVELD A (1998). Matrix metalloproteinase activity in equine synovial fluid : influence of age, osteoarthritis and osteochondrosis. *Ann. Rheum. Dis.* , **57** (11) , 697-699.
9. CARGILE JL , MACKAY RJ , DANKERT JR , SKELLEY L (1995). Effects of tumor necrosis factor blockade on interleukin 6 , lactate , thromboxane and prostacyclin responses in miniature horses given endotoxin. *Am. J. Vet. Res.* **56** (11) , 1445-1450.
10. CARGILE JL , MACKAY RJ , DANKERT JR , SKELLEY L (1995). Effect of treatment with a monoclonal antibody against tumor necrosis factor (TNF) on clinical, hematologic and circulating TNF responses of miniature horses given endotoxin. *Am. J. Vet. Res.* **56** (11) , 1451-1459.
11. CAVAILLON JM (1996). Tumor necrosis factor et lymphotoxines. *In : Les cytokines . 2* ème ed. Paris, Masson, 301-317.
12. CAWSTON TE (1995). Proteinases and inhibitors. *In : Immunology of rheumatoid disease. British Medical Bulletin*, **51** (2), 385-401.
13. CHEVALIER X (1997) Is a biological marker for osteoarthritis within reach? *Rev. Rhum. [Engl.Ed.]*, **64** (10), 562-577.

14. CHEVALIER X (1998). Le cartilage normal. *La Presse Médicale*, **27** (2), 75-80.
15. CHEVALIER X (1998). Le cartilage arthrosique. *La Presse Médicale*, **27** (2), 81-88.
16. CHEVALIER X, TYLER JA (1996). Production of binding proteins and role of the insulin-like growth factor in binding protein 3 in human articular explants. *Br. J. Rheum.* , **35**(6), 515-522.
17. CLEGG PD , CARTER SD (1999). Matrix metalloproteinase 2 and 9 are activated in joint diseases. *Equine Vet. J.* , **31** (4) , 324-330.
18. CLEGG PD , BURKE RM , COUGHLAN AR , RIGGS CM , CARTER SD (1997). Characterisation of equine matrix metalloproteinases 2 and 9 and identification of the cellular sources of the enzymes in joints. *Equine Vet. J.* , **29** (5), 335-342.
19. CLEGG PD, COUGHLAN AR ,RIGGS CM , CARTER SD (1997). Matrix metalloproteinases 2 and 9 in equine synovial fluids. *Equine Vet. J.* , **29** (5), 343-348.
20. CLEGG PD, COUGHLAN AR , CARTER SD (1998). Equine TIMP-1 and TIMP-2 : identification, activity and cellular sources. *Equine Vet. J.* , **29** (5), 416-423.
21. CORNELISSEN BP , RIJKENHUIZEN AB, VAN DEN HOOGEN BM, RUTTEN VP, BARNEVELD A (1998). Experimental model of synovitis /capsulitis in the equine metacarpophalangeal joint. *Am. J. Vet. Res.* , **59** (8), 978-985.
22. COTE N , TROUT DR , HAYES AM (1996). Evaluation of plasma α 2 macroglobulin and interactions with tumor necrosis factor- α in horses with endotoxemic signs. *Can. J. Vet. Res.* , **60** ,150-157.
23. COYNE CP , FENWICK BW , IANDOLA J , WILLIAMS D , GRIFFITH G (1993). Isolation of an inhibitor of tumor necrosis factor- α mediated cytotoxicity liberated from chemotoxin-stimulated equine white blood cell populations. *Am. J. Vet. Res.* , **54** (6) , 845-855.
24. DINARELLO CA , THOMPSON RC (1991). Blocking IL-1: interleukin-1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunology today*, **12** (11) , 404-410.
25. DUDHIA J , PLATT D (1995). Complete primary sequence of equine cartilage link deduced from complementary DNA. *Am. J. Vet. Res.* , **56** (7), 959-965.
26. GAUDIN P , RAZAKABOAY M , SURLA A , BERTHIER S , FAUCONNIER J , MOREL F *et al.* (1997) . A study of metalloproteinases in fifty joint fluid specimens. *Rev.Rhum. [engl. Ed.]*, **64** (6), 375-381.
27. GOTTSCHALK RD , REYERS F , VAN DEN BERG SS (1998). The effect of endotoxin and anti-endotoxin serum on synovial fluid parameters in the horse. *J. S. Afr. Vet. Ass.* , **69** (1) , 7-11.

28. GUSTAFSON SB , TROTTER GW , NORRDIN RW , WRIGLEY RH , LAMAR C (1992).Evaluation of intra-articularly administered sodium monoiodoacetate-induced chemical injury to articular cartilage of horses. *Am. J. Vet. Res.*, **53** (7), 1193-1202.
29. HAWKINS DL , MACKAY RJ , GUM GG , COLAHAN PT , MEYER JC (1993). Effects of intra-articular administered endotoxin on clinical signs of disease and synovial fluid tumor necrosis factor. *Am. J. Vet. Res.* , **54** (3), 379-386.
30. HAY CW , CHU Q , BUDSBERG SC , CLAYTON MK , JOHNSON KA (1997). Synovial fluid interleukin 6, tumor necrosis factor and nitric oxide values in dogs with osteoarthritis secondary to cranial cruciate ligament rupture. *Am. J. Vet. Res.* , **58** (9), 1027-1032.
31. HENSON FM , SCHOFIELD PN , JEFFCOTT LB (1997). Expression of transforming growth factor- β 1 in normal and dyschondroplastic articular growth cartilage of the young horse. *Equine Vet. J.* , **29** (6), 434-439.
32. ISHIGURO N, ITO T, MIYAZAKI K, IWATA H (1999). Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and glycosaminoglycans in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *The J. Rheumatol.* , **26** (1), 34-40.
33. JOHNSON PJ , TYAGI SC , KATWA LC , GANJAM VK , MOORE LA , KREEGER JM *et al.* (1998). Activation of extracellular matrix metalloproteinases in equine laminitis. *Vet. Record*, **142** (15), 392-396.
34. JOUGLIN M , ROBERT C , VALETTE JP , MEDDAHI A , DENOIX JM (1998). Corrélations entre les métalloprotéinases et les lésions cartilagineuses dans 99 articulations de chevaux au repos. *Rec. Med. Vet.* , **174** (5/6), 37-44.
35. JOUGLIN M , ROBERT C , VALETTE JP , GAVARD F , QUINTIN COLONNA F , DENOIX JM (2000). Metalloproteinases and tumor necrosis factor- α activities in synovial fluids of horses: correlation with articular cartilage alterations. *Vet. Res.*, **31** (5), 507-515.
36. KENT J(1992). Acute phase proteins : their use in veterinary diagnosis. *Br. Vet. J.*, **148** (4), 279-282.
37. KENT LLOYD KC , STOVER SM , PASCOE JR , POOL RR (1988). A technique for catheterization of the equine antebrachiocarpal joint. *Am. J. Vet. Res.*, **49** (5), 658-662.
38. LITTLE CB , GHOSH P , ROSE R (1997). The effect of strenuous versus moderate exercise on the metabolism of proteoglycans in articular cartilage from different weight-bearing regions of the equine third carpal bone. *Osteoarthritis cartilage*, **5** (3), 161-172.
39. MACDONALD MH , TOVER SM (1992). Regulation of the matrix metabolism in equine cartilage explant cultures by interleukin 1. *Am. J. Vet. Res.* , **53** (12), 2278-2285.

40. MACDONALD MH , BENTON HP (1996). Cellular response and receptors mechanisms in joint disease. *In: Joint disease in the horse*. Philadelphia, WB Saunders, 447-467.
41. MACDONALD MH , TOVER SM , WILLITS NH , BENTON HP (1994). Effect of bacterial lipopolysaccharids on sulfated glycosaminoglycan metabolism and prostaglandin E2 synthesis in equine cartilage explant cultures. *Am. J. Vet. Res.* **55** (8) , 1127-1138.
42. MACILWRAITH CW (1996). General pathobiology of the joint and response to injury. *In :Joint disease in the horse*.Philadelphia, WB Saunders, 40-70.
43. MACILWRAITH CW (2000); Joint repair in the equine athlete. *In : Proceedings of conference on Equine sport Medicine Association*. Taormina, 2000, Arno Lindner, 229-244.
44. MACILWRAITH CW, VAN SICKLE DC (1981). Experimentally induced arthritis of the equine carpus : histological and histochemical changes in the articular cartilage; *Am J. Vet. Res.* , **42** (2), 209-217.
45. MACKAY RJ (1992). Association between serum cytotoxicity and selected clinical variables in 240 horses admitted to a veterinary hospital. *Am.Vet. Res.*, **53** (5), 748-752.
46. MACKAY RJ, LESTER G (1992). Induction of the acute phase cytokine, hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6, in the circulation of horses treated with endotoxin. . *Am.Vet. Res.*, **53** (8), 1285-1289.
47. MACKAY RJ, MERRITT AM , ZERTUCHE JM , WHITTINGTON BS? SKELLEY BS (1991). Tumor necrosis factor activity in the circulation of horses given endotoxin. *Am.Vet. Res.*, **52** (4). 533-538.
48. MACLEOD JN , FUBINI SL , GU DN , TETREAULT JW , TODHUNTER RJ (1998). Effect of synovitis and corticosteroids on transcription of cartilage matrix proteins . *Am.Vet. Res.*, **59** (8), 1021-1026.
49. MARTEL-PELLETIER J , MACCOLLUM R , FUJIMOTO N , OBATA K , CLOUTIER JM , PELLETIER JP (1994). Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloproteases may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest.*, **70** (6), 807-815.
50. MAY SA , HOOKE RE , LEES P (1990). The characterisation of equine interleukin-1 . *Vet. Immunol. Immunopathol.* , **24** (2), 169-175.
51. MAY SA , HOOKE RE , PEREMANS KY , VERSCHOOTEN F , LEES P(1994). Prostaglandin E2 in equine joint disease. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift.*, **63** (6), 187-190.
52. MEIROM R , MOSS S , BERSTEIN M , BIDER Z , BRENNER J (1996). The association between tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and microbiological findings in the synovial fluid of aborted and neonatal calves. *J. Vet. Med. B* , **43**, 439-444.

53. MIDDLETON J , MANTHEY A , TYLER J (1996). Insulin-like growth factor(IGF) receptor, IGF-1 , interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 mRNA expression in osteoarthritic and normal human cartilage. *J. Histochemi. Cytochem.* , **44** (2) , 133-141.
54. MOORE RM , MUIR WW , CAWRSE M , BERTONE AL , BEARD WL (1995). Systemic and colonic venous plasma eicosanoid and endotoxin concentrations and interleukin-6 activities in horses during low-flow ischemia and reperfusion of the large colon. *Am. J. Vet. Res.* **56** (5) 656-663.
55. MORRIS DD , CROWE N , MOORE JN (1992). Reduced endotoxin-induced production of tumor necrosis factor activity by equine peritoneal macrophages exposed to the dual inhibitor of arachidonic acid metabolism. *Can J. Vet. Res.* **56** 110-114.
56. MORRIS EA , TREADWELL BV (1994). Effect of interleukin-1 on articular cartilage from young and aged horses and comparison with metabolism of osteoarthritic cartilage. *Am J. Vet Res.* , **55** (1) , 138-146.
57. MORRIS EA , MACDONALD BS, WEBB AC , ROSENWASSER LJ(1990). Identification of interleukin-1 in equine osteoarthritic joint effusion. *Am. J. Vet. Res.*, **51** (1), 59-64.
58. MURRAY RC , DEBOWES RM , GAUGHAN EM , MOSIER DE , ATHANASIOU KA (1995). Variations in the biochemical properties of articular cartilage of the midcarpal joint of normal horses. *Vet Comp. Orthop. Traum.*, **8** (3), 133-140.
59. MURRAY RC , WHITTON RC , VEDI S , GOODSHIP AE , LEKEUX P (1999) . The effect of training on the calcified zone of the middle carpal articular cartilage. *Equine Vet. J. Suppl.*, **30**, 274-278.
60. MURRAY RC , JANICKE HC, HENSON FM , GOODSHIP AE (2000) Equine carpal articular cartilage fibronectin distribution associated with training, joint location and cartilage deterioration. *Equine Vet. J.* , **32** (1), 47-51.
61. PALMER JL , BERTONE AL , (1994). Experimentally-induced synovitis as a model for acute synovitis in the horse. *Equine Vet. J.* , **26** (6), 492-495.
62. PALMER JL , BERTONE AL , (1994). Joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease. *Equine Vet. J.*, **26** (4) 263-277.
63. PALMER JL , BERTONE AL , MALEMOUD CJ , MANSOUR J (1996). Biochemical and biomechanical alterations in equine articular cartilage following an experimentally induced synovitis. *Osteoarthritis cartilage*, **4** (2), 127-137.
64. PARRY BW, COWELL RL , TYLER RD (1992) Synovial fluid; *In: diagnostic cytology of the dog and cat*. Goleta, american veterinary publications, 121-136.
65. PELLETIER JL , MARTEL-PELLETIER J (1994) Role of synovial inflammation, cytokines and IGF-1 in the physiopathology of osteoarthritis. *Rev. Rhum. [Ed. Fr.]*, **61** (9), 103-108.

66. PEPYS MB , BALTZ ML , TENNENT GA , KENT J , OUSEY J , ROSSDALE PD (1989). Serum amyloid a protein (SAA) in horses, objective measurement of the acute response. *Equine Vet. J.* , **21** (2) 106-109.
67. PLATT D (1996). Articular cartilage homeostasis. *In: Joint disease in the horse ; Philadelphia, WB Saunders, 29-40.*
68. PLATT D, BAYLISS MT (1995) Proteoglycan metabolism of equine articular cartilage and its modulation by insulin-like growth factors. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **18** (2), 141-149.
69. SANTER V, SRIRTANA A , LOWTHER DA (1983). Carrageenin induced arthritis. A morphologic study of the development of inflammation in acute arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.*, **12** (2), 160-168.
70. REVILLARD.(2001) Les cytokines. *Immunologie*.(1),169-191.
71. SCHNEIDER RK , BRAMLAGE LR , MOORE RM , MECKLENBURD LM, KOHN cw , GABEL AA (1992). A retrospective study of 192 horses affected with septic arthritis /tenosynovitis. *Equine vet. J.* , **24** (6), 436-442.
72. SEETHNATNAN P , BOTTOMS GD , SCHAFFER K (1990) Characterization of release of tumor necrosis factor, interleukin-1, and superoxide-anion from equine white blood cells in response to endotoxin.*Am J. Vet Res.* , **51** (8), 1221-1225;
73. SPIERS S , MAY SA , BENNETT D , EDWARDS GB (1994). Cellular sources of proteolytic enzymes in equine joints. *Equine Vet. J.* , **26** (1), 43-47.
74. TODHUNTER PG , KINCAID SA , TODHUNTER RJ , KAMMERMANN JR , JOHNSTONE B ? BAIRD AN *et al.* (1996). Immunohistochemical analysis of an equine model of experimentally-induced arthritis. *Am . J. Vet. Res.* **57** (7), 1080-1093.
75. TODHUNTER RJ (1996). Anatomy and physiology of synovial joints.*In : Joint disease in the horse. Philadelphia, WB Saunders , 1-28.*
76. ULEVITCH RJ, TOBIAS PS (1995) . Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.*, **13**, 437-457.
77. VENN G, NIETFIELD JJ , DUTS AJ , BRENNAN FM , ARNER E , COVINGTON M *et al.* (1993). Elevated synovial fluid levels of interleukin -6 and tumor necrosis factor associated with early experimental canine osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, **36** (6) , 819-826.

CONTRIBUTION A L' ETUDE D'UN MODELE EXPERIMENTAL DE L' INFLAMMATION ARTICULAIRE CHEZ LE CHEVAL ; RECHERCHE D' UN MARQUEUR PRECOCE DE L' INFLAMMATION .

DEMAY Anne

RESUME :

En médecine équine, les pathologies articulaires inflammatoires sont malheureusement diagnostiquées trop tardivement par rapport à la survenue de séquelles éventuelles.

Le but de cette étude a donc été de réaliser un modèle d'arthrite inflammatoire induite chez trois chevaux afin d'en suivre l'évolution au niveau de deux types de marqueurs potentiels de

l'inflammation : le TNF- α et les métalloprotéinases matricielles de type MMP-2 et MMP-9. Elle a été menée conjointement avec une étude parallèle qui consistait à suivre l'évolution de l'inflammation d'un point de vue clinique et médical afin de corroborer la validité de ce modèle. Au final, les résultats obtenus pour le TNF- α dans les conditions de cette étude furent plutôt décevants et ce sont les métalloprotéinases qui se sont révélées les candidates les plus valables en vue de la mise au point de tests diagnostics de l'inflammation. Néanmoins, cette étude a permis de mettre au point un modèle d'arthrite expérimentale chez le cheval et d'établir l'intérêt indéniable d'expérimentations futures visant à pouvoir utiliser le dosage des métalloprotéinases en pratique.

MOTS CLES : CHEVAL
INFLAMMATION
CARPE
ARTHRITE
LPS
TNF- α
METALLOPROTEINASES
MODELE ANIMAL

JURY :

Président : Pr.....

Directeur : Pr F. Quintin-Colonna

Assesseur : Pr H. Combrisson

Adresse de l'auteur : 12 Grand Rue
77230 Marchémoret

**EXPERIMENTALLY INDUCED ARTHRITIS OF THE EQUINE CARPUS ;
SEARCHING AN EARLY DETECTABLE BIOLOGICAL MARKER.**

DEMAY Anne

SUMMARY

Articular damages are a major pathology in equine medicine and are often detected too late in order to avoid sequels.

The point of this study was to find an early detectable marker of the articular inflammation using a model of experimentally induced synovitis on three horses.

Therefor we tested two types of molecules: TNF- α and matrix metalloproteinases .On the same time, a clinical study of the evolution of the inflammatory response in the carpal articulation of those horses was conducted.

This study showed that TNF- α was of no great use in early detection of articular lesions, but there were significant results obtained with the metalloproteinases.

It should be interesting to investigate further in this way, particularly on real patients.

KEY WORDS: HORSE
OSTEOARTHRITIS
INFLAMATION
CARPUS
LPS
TNF- α
METALLOPROTEINASES
ANIMAL MODEL

JURY

President :

Director : Pr F. Quintin-Colonna

Assessor : Pr H . Combrisson

Author's address : 12 Grand Rue
77230 Marchémoret

