

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة فرحات عباس- سطيف-
UNIVERSITE FERHAT ABBAS -SETIF- UFAS (ALGERIE)

MEMOIRE

Présenté à la Faculté des Sciences
Département de Biologie
Pour l'obtention du Diplôme de

MAGISTER

En Immunologie et Biologie Moléculaire Appliquées
Option : Inflammation et Molécules Bioactives

Par :

Mr DERRADJI Yacine

THEME

EVALUATION DES PARAMETRES DE L'INFLAMMATION LORS DE L'INDUCTION DE L'ARTHRITE RHUMATOÏDE CHEZ LE RAT PAR LE COLLAGENE II.

Soutenu le : 29/04/2007

Devant la commission d'examen :

Président :	Dr BAGHIANI Abderrahmane	M.C à l'Université de Sétif
Rapporteur :	Dr ARRAR Lekhmici	M.C à l'Université de Sétif
Examineurs :	Dr SENATOR Abderrahmane	M.C à l'Université de Sétif
	Dr BOURICHE Hamama	M.C à l'Université de Sétif

إهداء

وضع العالم المسلم الجليل الحسن بن الهيثم
هذه الجملة في مقدمة كل كتبه
أنا ما دامت لي الحياة باذل جهدي وعقلي ومستفرد
طاقتي في العلم لثلاثة أمور:

- 1- إفادة من يطلب الحق في حياتي وبعد مماتي
- 2- ذخيرة لي في قبوري ويوم حسابي
- 3- رفعة لسلطان المسلمين

أهدي هذا العمل أولاً إلى والدي وكل عائلتي
وثانياً إلى كل من يؤمن بمبادئ هذا العالم ويسعى إلى
تحقيقتها.

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire d'Immunologie et a profité du financement du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS) et de l'Agence Nationale pour le Développement de la Recherche en Santé (ANDRS)

Je remercie **Dr ARRAR Lekhmici**, maître de conférence à l'université de Sétif de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pendant trois ans, durant lesquels j'ai beaucoup appris grâce à ses conseils et son suivi.

Je tiens à remercier **Dr BAGHIANI Abderrahmane**, de m'avoir fait honneur de présider le jury de soutenance. Je remercie vivement **Dr SENATOR Abderrahmane** et **Dr BOURICHE Hamama** d'avoir accepté de juger mon travail de magister.

J'exprime ma gratitude à **ROUBA Khaled** qui a toujours été à mes côtés dans le laboratoire ainsi que dans les sorties ce qui m'a permis de profiter de son expérience et son soutien.

Je remercie **KAAROUCHE Hocine**, chef de service, **Dr ABDELLOUCHE Djamel**, médecin chef, et **Dr TALHI Naima** maître assistant au laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Sétif ainsi que tous les techniciens et stagiaires du laboratoire pour leur aide précieuse dans la réalisation des coupes histologiques.

Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, trouve ici l'expression de mes très vifs remerciements.

Résumé

L'arthrite rhumatoïde (AR) est une maladie auto-immune touchant les articulations. Les modèles animaux de cette maladie ont participé à la compréhension de son étiologie et physiopathologie ainsi qu'à la recherche de nouveaux traitements. L'arthrite induite chez le rat par le collagène type II est l'un de ces modèles les plus représentatifs de la maladie humaine du fait qu'il remplit la majorité des critères fixés par l'association américaine de rhumatologie pour le diagnostic de l'arthrite rhumatoïde.

L'arthrite induite dans notre travail, par le collagène type II chez le rat est une maladie qui s'est étalée sur 60 jours et qui se caractérise par : (1) une atteinte symétrique des articulation des pattes postérieures où le gonflement donne à la patte 130% de son volume initial au pic de la maladie (21^{ème} jour), (2) perte du poids du groupe malade avoisinant 9%, (3) une augmentation de la vitesse de sédimentation des globules rouges qui atteint 4 fois celle des témoins, (4) une intense infiltration leucocytaire de la membrane synoviale et la moelle osseuse ce qui conduit à la destruction du cartilage et de l'os et à la déformation de l'articulation.

La xanthine oxydoréductase est présente dans l'articulation arthritique et les espèces oxygénées réactives qu'elle génère peuvent contribuer dans le processus inflammatoire ayant lieu. Pour tester cette éventualité nous avons préparé des anticorps spécifiques de cette enzyme chez le rat. Malheureusement, les anticorps à différentes concentrations (27.93-223.5 µg/ml) n'ont donné aucune inhibition d'aucune des trois activités XO, XDH, NADHO de l'enzyme humaine et bovine.

L'utilisation des anticorps d'autres espèces animales pourrait avoir un effet inhibiteur comme indiqué dans la bibliographie. Ces anticorps pourraient alors être utilisés comme traitement dans le modèle animal de l'arthrite.

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is an auto-immune disease implicating joints. Animal models of this disease have participated to the understanding of its etiology and physiopathology as well as to the search of new treatments. Collagen type II induced arthritis in rats is the more representative of the human disease among these models because it fulfill the majority of the criteria fixed by the American Rheumatology Association (ARA) for rheumatoid arthritis diagnosis.

Collagen type II induced arthritis in rat is 60 days lasting disease characterized by: (1) symmetric joints involvement of the hind paws where the swelling reach 130% of the initial volume at the maximum of the disease (day 21), (2) lose of 9% of body weight in the arthritic group, (3) increase in red blood cells sedimentation rate to reach 4 times its of the control, (4) intense leukocytes infiltration of the synovial membrane and bone marrow which lead to cartilage and bone destruction and joint deformation.

Xanthine oxidoreductase (XOR) is present in arthritic joints and reactive oxygen species generated by this enzyme could participate to the inflammatory process occurring there. To test this possibility we have prepared antibodies against this enzyme in rat. Unfortunately these antibodies with different concentration (27.93- 223.5 $\mu\text{g/mL}$) failed to inhibit any of the three activities XO, XDH, NADHO of the human and bovine enzyme.

The use of antibodies from other species could have an inhibitor effect as mentioned in the bibliography. These antibodies could be then used as treatment in the animal model of arthritis.

ملخص

التهاب المفاصل الرثوي عبارة عن مرض مناعي ذاتي يصيب المفاصل. ساهمت النماذج الحيوانية لهذا

المرض في فهم أسبابه وفيزيولوجيته بالإضافة إلى البحث عن أدوية جديدة. التهاب المفاصل المحدث بواسطة

الكولاجين نوع II هو الأكثر تمثيلاً للمرض البشري من بين هذه النماذج، هذا راجع لتواجد معظم المعايير

المعتمدة من طرف الجمعية الأمريكية لعلم الروماتيزم (ARA) في تشخيص التهاب المفاصل.

التهاب المفاصل المحدث عند الجرذ بواسطة الكولاجين نوع II هو مرض يمتد 60 يوماً ويتميز بـ:

(1) الإصابة المتوازية لمفاصل الأطراف السفلية أين يعطي الانتفاخ للطرف 130% من حجمه الأصلي عند

الحد الأقصى للمرض (يوم 21)، (2) فقدان ما يقارب 9% من وزن المجموعة المريضة، (3) زيادة سرعة

ترسب كريات الدم الحمراء لتصل إلى 4 مرات مقارنة الشواهد، (4) تسلل كثيف لخلايا الدم البيضاء إلى

الغشاء الزلالي و نخاع العظم مما يؤدي إلى تدمير الغضروف و العظم و إلى تشويه المفصل.

الأنزيم المؤكسد المرجع للكزانتين يتواجد في المفصل المصاب واحتمال مساهمة الأنواع

الأوكسيجينية النشطة التي ينتجها في الالتهاب وارد. للتأكد من هذه الفرضية قمنا بتحضير أجسام مضادة لهذا

الإنزيم عند الجرذ. مع الأسف لم تتمكن الأجسام المضادة المستعملة بتركيز مختلفة (27.93-223.5

ميكروغرام/مل) من تثبيط أي من النشاطات الثلاث XO، XDH و NADHO للإنزيم البشري والبقري.

يمكن أن يعطي استعمال أجسام مضادة محضرة عند أصناف حيوانية أخرى أثراً تثبيطياً كما هو

مشار إليه في المراجع. هذه الأجسام المضادة يمكن استعمالها كعلاج للنموذج الحيواني لالتهاب المفاصل.

Abréviations

AA: Amyloid arthritis.

ACF: Adjuvant complet de Freund.

ADN: Acide désoxyribonucléique.

AIF: Adjuvant incomplet de Freund.

AINS: Anti-inflammatoires non stéroïdiens.

AR: Arthrite rhumatoïde.

ARA: American association of rheumatology.

ATE: Acute traumatic effusion.

C II: Collagène Type II.

C5aR: Récepteur de la composante 5 du complément.

CD: Cell determinant.

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité.

CPA: Cellules présentatrices de l'antigène.

DA: Dark Agouti.

DMARD: Disease-modifying anti-rheumatic drugs.

DTT: Dithiothréitol.

EDTA: Ethylène diamine tétraacétique.

ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay.

ENR: Espèces nitrogénés réactives.

FAD: Flavine adénine dinucléotide.

FcγR: Récepteur de la fraction cristallisable des immunoglobulines gamma.

GM-CSF: Granulocyte-mastocyte colony stimulating factor.

H₄B: Tetrahydrobiopterin.

HLA: Human Leucocyte antigens.

Hsp-65: Heat choc protein-65.

IL-1 à 17: Interleukine-1 à 17.

IL-1Ra: Récepteur a de l'interleukine-1.

INF: Interféron.

kDa: kilodalton.

KLH: Keyhole limpet hemocyanin

LEW.1AV1: Lewis.1AV1.

LPS: Lipopolysaccharides.

mBSA: Methylated bovin serum albumin.

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1.

MDP: Muramyl dipeptide.

MMP: Matrix metaloproteinase.

MPO: Myeloperoxydase.

NAD⁺: Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé.

NADH: Nicotinamide adénine dinucléotide réduit.

NOX: NADPH oxydases.

OA: Osteoarthritis.

OPD: Orthophenylene diamine.

PA: Pyrophosphate arthropathy

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis.

PBS: Phosphate-buffered saline.

PFR: Protein flavin ratio.

PG: Prostaglandine.

Phox: Phagocytic oxidases.

PIA: Pression intra-articulaire.

PM: Poids moléculaire.

PsA: Psoriatic arthritis.

RANKL: Receptor activator of nuclear factor- κ B Ligand.

REL: Réticulum endoplasmique lisse.

SD: Standard deviation.

SDS: Sodium dodecyl sulfate.

SLPI: Secretory leukocyte protease inhibitor.

SOD: Superoxyde dismutase.

TBS: Tris buffered saline.

TDM: Trehalose-dimycolate.

Tris: Tris (hydroxymethyl) aminométhane.

UV/Vis: Ultraviolet/Visible.

VS: Vitesse de sédimentation.

XDH: Xanthine déshydrogénase.

XO: Xanthine oxydase.

XOR: Xanthine oxydoréductase.

SOMMAIRE

Introduction	1
Etude bibliographique de l'Arthrite rhumatoïde	
L'arthrite rhumatoïde	2
1. Etiologie	2
1.1. Prédispositions génétiques	3
1.2. Agents infectieux	4
2. Manifestation cliniques de la maladie	4
2.1. manifestations articulaires	4
2.2. Manifestations extra-articulaires	6
2.2.1. Nodules rhumatoïdes	6
2.2.2. Manifestations pleuro-pulmonaires	6
2.2.3. Atteintes cardio-vasculaires	7
2.2.4. Manifestations neurologiques	8
3. Physiopathologie de l'arthrite rhumatoïde	8
4. Modèles animaux de l'arthrite rhumatoïde	12
5. Traitements de l'arthrite rhumatoïde	16
6. Rôle de la XOR dans l'arthrite rhumatoïde	20
6.1. Caractérisation, localisation et rôles physiologiques de la XOR	20
6.2. Les ROS générées par la XOR dans la pathologie de l'articulation arthritique	23
6.3. Autres sources des espèces oxygénées et nitrogénées réactives	29
6.3.1. NADPH oxydase	30
6.3.2. Myelopéroxydase (MPO)	30
6.3.3. Nitric oxyde synthase (NOS)	30
6.3.4. Autres sources	31
7. But du travail	32
Matériel et Méthodes	
1. Matériel	33
1.1. Animaux	33
1.2. Réactifs et Milieux biologiques	33
2. Méthodes	33
2.1. Induction de l'arthrite	33
2.1.1. Volume de l'œdème	34
2.1.2. Poids corporel	34
2.1.3. La vitesse de sédimentation des globules rouges	34
2.2. Purification de la Xanthine oxydoréductase	35
2.2.1. Obtention de l'extrait brut	36
2.2.2. Purification sur colonne héparine-Agarose	36
2.2.3. Contrôle de pureté de la XOR	37

2.2.4. Activités enzymatiques de la xanthine oxydoréductase	38
2.3. Préparation des anticorps Anti-XOR	38
2.3.1. Immunisation	38
2.3.2. Titration des Anti-XOR par ELISA	39
2.3.3. Précipitation des IgG par sulfate de sodium	39
2.3.4. Purification des IgG sur ProtéineA-Agarose	40
2.3.5. Purification des IgG anti-XOR par immunoaffinité	40
2.3.6. Testes de pureté et réactivité des anti-BXOR	41
2.3.7. Inhibition de l'activité enzymatique de la XOR par les anti-XOR	43
2.4. Dosage des protéines	44
2.5. Analyse statistique	45

Résultats

1. Etude des paramètres de l'arthrite induite par le collagène II	46
1.1. Volume de l'œdème	48
1.2. Poids corporel	48
1.3. Vitesse de sédimentation des globules rouges	50
1.4. Histopathologie	51
1.4.1. Infiltration des leucocytes	52
1.4.2. Formation du pannus et destruction du cartilage et de l'os	53
2. Etude de l'effet inhibiteur des anticorps anti-XOR	54
2.1. Purification de la XOR bovine et humaine	54
2.2. Etude de la réactivité des anticorps de rat anti-BXOR	57
2.2.1. Détermination des titres des sérums anti-XOR	57
2.2.2. Purification des IgG anti-XOR	59
2.2.3. Réactivité des anticorps préparés	62
2.2.4. Effet des anticorps de rats sur les activités de la xanthine oxydoréductase	63

Discussion

1. Le modèle animal de l'arthrite rhumatoïde	66
2. Le rôle de la xanthine oxydase dans l'arthrite	69
2.1. Participation de la XOR dans l'arthrite rhumatoïde	69
2.2. Inhibiteurs de la XOR	70
2.3. L'approche anticorps anti-XOR	72
2.3.1. Obtention des anticorps anti-XOR	72
2.3.2. Inhibition des activités de la XO	73

Conclusion et perspectives	75
---	----

Références bibliographiques	76
--	----

Introduction

L'arthrite rhumatoïde (AR) est une maladie auto-immune qui se manifeste par des atteintes articulaires et extra-articulaires pouvant évoluer vers une destruction de l'articulation handicapant le malade et menaçant sa vie. L'étiologie de l'AR n'est pas encore bien définie mais l'implication de facteurs génétiques et environnementaux est sujette de spéculations.

Les études physiopathologiques ont permis l'identification de plusieurs composantes cellulaires et moléculaires de l'immunité innée et acquise qui jouent des rôles clés dans l'installation, l'aggravation et la chronicité de la maladie. Ces composantes sont actuellement ciblées dans les essais thérapeutiques innovants à base de biomolécules (anticorps, récepteurs, médiateurs et substances naturelles d'origine végétale).

Plusieurs modèles animaux de l'AR ont été développés, ce qui a permis d'explorer l'étiologie et la physiopathologie de la maladie et d'évaluer l'efficacité de différents traitements. Parmi ces modèles, l'arthrite induite par le collagène type II est considérée comme le meilleur représentant de l'affection humaine. En plus de sa gravité et chronicité, ce modèle animal remplit aux moins quatre des sept critères d'inclusion établis par l'association américaine de rhumatologie (American Rheumatology Association : ARA) pour le diagnostic de l'AR.

Dans l'AR humaine l'implication de la xanthine oxydoréductase (XOR) a été soulevée par plusieurs chercheurs qui se sont basés sur la capacité de cette enzyme à générer des espèces oxygénées réactives (reactive oxygen species : ROS), qui jouent des rôles physiologiques et pathologiques essentiellement dans les lésions tissulaires, et à cause de sa présence dans la membrane et le liquide synoviaux avec des taux élevés. L'exposition de l'articulation à des cycles d'ischémie-réperfusion accompagnant le mouvement de l'arthritique accentue l'action de la XOR qui se transforme en oxydase générant les ROS.

Dans notre étude nous avons essayé d'induire l'arthrite chez le rat par le collagène type II, d'étudier les différents paramètres de cette maladie et d'évaluer l'éventuelle participation de la XOR en utilisant ses anticorps spécifiques.

ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE DE
L'ARTHRITE RHUMATOÏDE

L'ARTHRITE RHUMATOÏDE

L'arthrite rhumatoïde (AR) ou polyarthrite rhumatoïde (PR) a été décrite pour la première fois par Landré Beauvais en 1800 sous le nom de "goutte asthénique" puis en 1853, par Charcot sous le nom de rhumatisme articulaire progressif. Elle fut désignée sous le nom d'arthrite rhumatoïde par Garrod, en 1859 à Londres (Eyquem et de Saint Martin, 1981).

L'AR est une maladie d'étiologie incertaine, qui se manifeste par une atteinte inflammatoire polyarticulaire, le plus souvent symétrique, pouvant évoluer vers une destruction articulaire et périarticulaire (Vaillancourt, 1990). L'AR touche 1-3% de la population mondiale. Elle est quatre fois moins fréquente chez l'homme que chez la femme et débute entre 40 et 55 ans. Souvent, l'arthrite se déclenche suite à un surmenage, une infection rhino-pharyngée ou une exposition au froid humide, et commence par l'atteinte des articulations des poignets et des doigts, surtout les métacarpo-phalangiennes (Eyquem et de Saint Martin, 1981). L'évolution progressive de la maladie conduit à l'implication de la quasi-totalité du système articulaire à l'exception des coxo-fémorales, les temporo-maxillaires, le rachis dorsal et lombaire (Coste, 1971).

1. Etiologie

L'arthrite rhumatoïde est une maladie multifactorielle complexe. En plus des facteurs génétiques qui déterminent la susceptibilité, la maladie peut être déclenchée par des facteurs environnementaux dont les infections bactériennes semblent importantes (**figure 1**). Le tabagisme, l'obésité, la transfusion sanguine, les hormones et les chocs émotionnels font partie des facteurs pouvant participer à l'étiologie de l'AR (Symmons et Harrison, 2000).

1.1. Prédispositions génétiques

Le facteur génétique est, depuis longtemps, suspecté de contribuer à l'arthrite rhumatoïde qui est 2 à 3 fois plus fréquente dans les familles d'arthritiques que dans les familles de sujets normaux (Eyquem et de Saint Martin, 1981). Ce constat a conduit à l'hypothèse que les arthritiques sont génétiquement prédisposés à réaliser des autosensibilisations (Coste, 1971). Parmi les gènes prédisposant à la maladie celui codant pour les antigènes du complexe major d'histocompatibilité classe II (CMH II) (chez l'homme, HLA : Human Leucocyte antigens), et surtout les allèles HLA-DR4, HLA-DR1 et HLA-DRw10 qui sont associés à 89% des arthritiques (Wordsworth *et al.*, 1991). Ces allèles semblent participer à la sélection positive des lymphocytes T autoréactives dans le thymus (Taneja *et al.*, 2003). Les gènes du CMH II ne constituent qu'environ 50% des facteurs génétiques, d'autres gènes et facteurs peuvent y contribuer (Lorentzen et Klareskog, 1996; Olofsson et Holmberg, 2003).

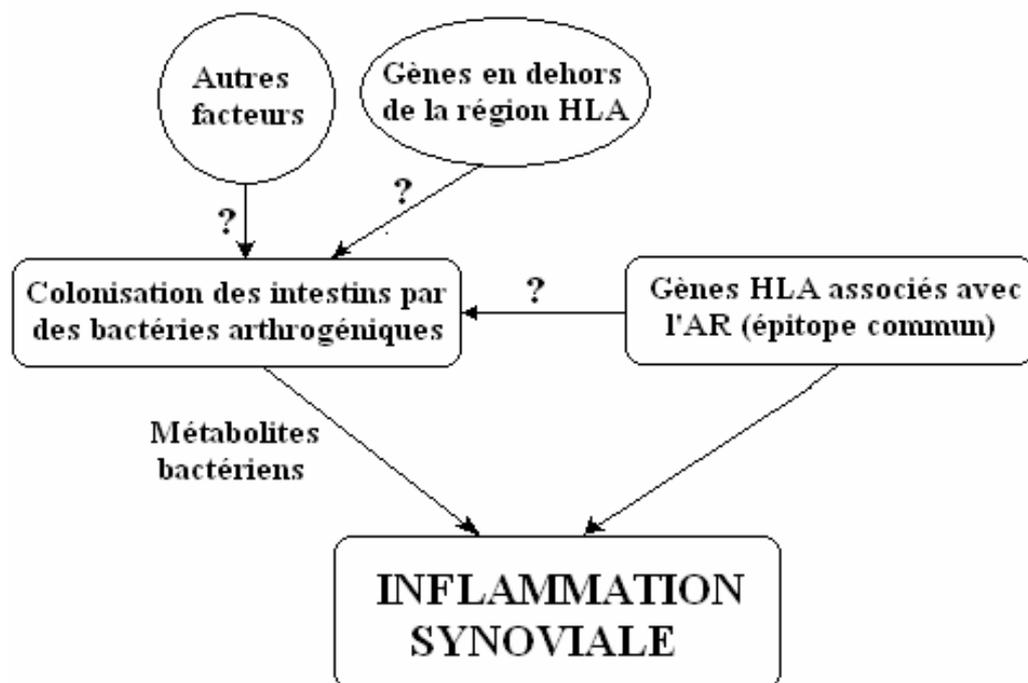


Figure 1: Etiologie de l'arthrite rhumatoïde (Toivanen, 2003).

1.2. Agents infectieux

L'intervention d'une infection bactérienne ou virale dans le déclenchement de la polyarthrite rhumatoïde est envisagée depuis plus d'un demi-siècle (Eyquem et de Saint Martin, 1981). Plusieurs agents infectieux ont été détectés dans le liquide synoviale des arthritiques: les mycobactéries (Van Der Heijden *et al.*, 1999), les mycoplasmes (Johnson *et al.*, 2000), le virus Epstein Barr (Scotet *et al.*, 1996). En plus de ces agents, la flore intestinale normale peut être associée au développement de la maladie (Toivanen, 2003). Ces bactéries ont été capables d'induire l'arthrite chez le rat (Zhang *et al.*, 2001). La capacité de ces agents infectieux à induire l'arthrite est due au mimétisme que peut jouer leurs antigènes (Wildner et Diedrichs-Moehring, 2005). Parmi ces antigènes, le mieux caractérisé est la protéine du choc thermique 65 (heat shock protein : hsp 65) des mycobactéries, et plus spécifiquement son peptide 180-188. Les cellules T qui reconnaissent ce peptide réagissent aussi avec les protéoglycanes du cartilage et sont capables du transfert de l'arthrite (Prakken *et al.*, 1997). En effet, l'induction de la tolérance à ce peptide chez le rat le protège de l'arthrite (Prakken *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 1998).

2. Manifestations cliniques de l'arthrite rhumatoïde

Bien que l'AR se manifeste principalement par une atteinte articulaire, elle s'accompagne de lésions systémiques qui ne sont généralement pas inquiétantes. Dans certains cas, cependant, ces manifestations extra-articulaires, particulièrement celles qui impliquent les vaisseaux sanguins, peuvent menacer la vie du malade (Vaillancourt, 1990).

2.1. Manifestations articulaires

La maladie s'installe progressivement avec des poussées. On retrouve des manifestations articulaires de type synovites, pannus et ténosynovites (rupture tendineuse), également une oligo ou polyarthrite bilatérale inflammatoire. En phase d'état, le patient présente des déformations

caractéristiques des articulations : type touche de piano, coup de vent cubital, col de cygne, boutonnière, maillet (**Figure 2**). Il se produit une destruction progressive du cartilage et du tendon aboutissant à la perte de la fonction (Clavel, 2004).



Figure 2: Atteinte des articulations de la main. Les déformations sont très nettes soit sur photographie ou sur image radiologique (Clavel, 2004).

La synovite rhumatoïde représente la lésion initiale. Elle est caractérisée par l'hyperplasie des synoviocytes de bordure formant trois ou quatre couches, une vasodilatation de la synoviale, un œdème et une infiltration leucocytaire (Eyquem et de Saint Martin, 1981). A partir de la synovie se forment des villosités qui envahissent la cavité articulaire et, plus tard, un pannus qui recouvre le cartilage articulaire et finit par le détruire. Le pannus peut se transformer en un épais tissu fibreux entraînant une ankylose progressive de l'articulation atteinte (Vaillancourt, 1990).

Le liquide synovial présente, suite à la synovite rhumatoïde une modification de sa composition. On constate, en plus de l'infiltration polynucléaire, une diminution de la viscosité et du taux du complément et une augmentation du taux des d'immunoglobulines G et M, des cytokines et des enzymes (Eyquem et de Saint Martin, 1981).

2.2. Manifestations extra-articulaires

Les manifestations extra-articulaires s'observent surtout au cours de l'AR sévère, ancienne, avec des facteurs rhumatoïdes à titre élevé. Plusieurs localisations peuvent être affectés: cœur, poumon, œil, tube digestif, ganglions, moelle osseuse, peau et muscles.

2.2.1. Nodules rhumatoïdes

Observés en moyenne dans 20% des patients. Ils siègent surtout aux coudes et sur la face dorsale des doigts (**Figure 3**). Le nodule est considéré comme l'aboutissement d'une nécrose par vascularité oblitérante (Eyquem et de Saint Martin, 1981).

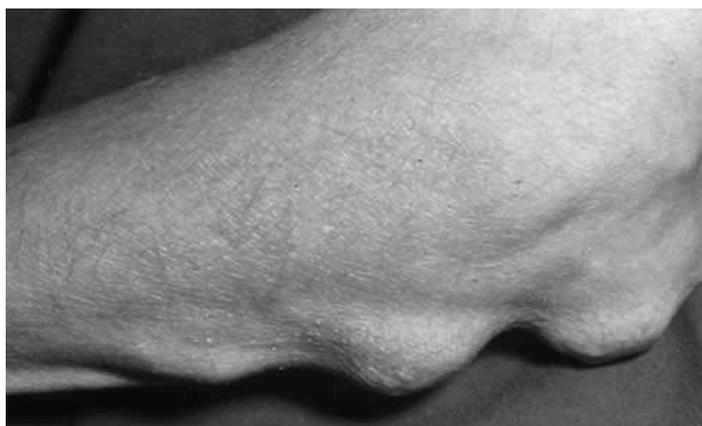


Figure 3: Nodules rhumatoïdes au coude (Dreano *et al.*, 2002).

2.2.2. Manifestations pleuro-pulmonaires

Les atteintes pulmonaires de l'AR se manifestent par des pleurésies ou des fibroses interstitielles diffuses (**Figure 4**) (Saravanan et Kelly, 2006). On peut également observer des nodules rhumatoïdes pulmonaires. Certaines atteintes pulmonaires de l'AR sont des complications dues au traitement on cite par exemple la bronchiolite (D-pénicillamine ou tiopronine) ou la pneumopathie d'hypersensibilité (Méthotrexate) (Payne, 1984 ; Saravanan et Kelly, 2004).

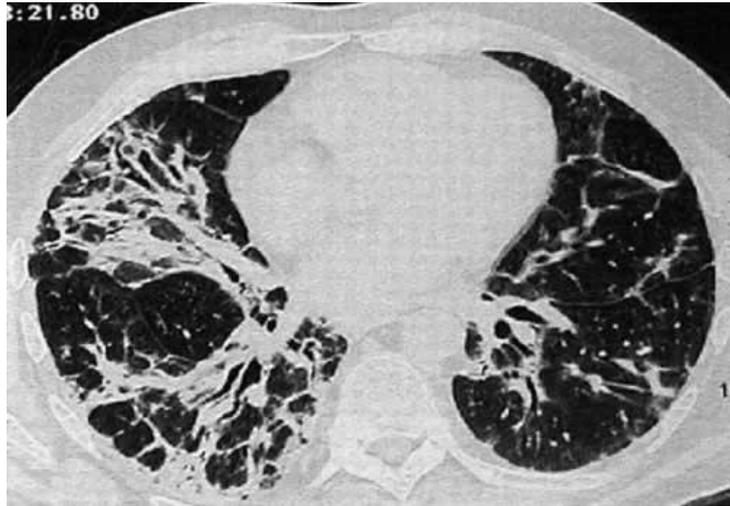


Figure 4: Pneumopathie interstitielle non spécifique, image obtenue par scanner (Dreano *et al.*, 2002).

2.2.3. Atteintes cardio-vasculaires

La péricardite est la complication la plus fréquente de l'AR. Il peut exister une vascularité rhumatoïde et des ulcérations des membres inférieurs (**Figure 5**). Plus rarement, on peut observer une vascularité viscérale: touchant le tube digestif ou le myocarde (Eyquem et de Saint Martin, 1981).



Figure 5: Vascularité rhumatoïde et ulcération du pied (Dreano *et al.*, 2002).

2.2.4. Manifestations neurologiques

Les patients atteints de l'AR peuvent présenter des neuropathies sensitivomotrices plus ou moins importantes. Il peut également exister une compression, du nerf cubital au coude ou du nerf médian au poignet, liée aux altérations articulaires (Vaillancourt, 1990).

3. Physiopathologie de l'arthrite rhumatoïde

Malgré que l'étiologie exacte du déclenchement reste à déterminer, des évidences se sont accumulées sur la participation de l'immunité innée et acquise dans la physiopathologie de l'AR (**Figure 6**). Le complément (Hietala *et al.*, 2002) et le neutrophile (Schrier *et al.*, 1984; Wipke et Allen, 2001) composantes essentielles de l'immunité innée sont indispensables au développement du modèle animal de l'arthrite. L'immunité acquise cellulaire et humorale, représentée respectivement par les lymphocytes T auto-réactives et les auto-anticorps, est essentielle chez les arthritiques. Ces deux composantes sont capables de transférer l'arthrite à l'animal (Stuart *et al.*, 1988). En effet, l'élimination des lymphocytes T auto-réactives ou le blocage de la production des anticorps empêche le développement du modèle animal de l'arthrite (Zhang *et al.*, 2002).

Les complexes immuns sont d'une importance capitale dans le développement de la maladie (Wipke *et al.*, 2004). Leur formation entre des auto-anticorps (facteurs rhumatoïdes, anticorps anti-collagène II et autres) et leur antigènes spécifiques (IgG modifiées, collagène II ou autres antigènes) conduit à l'activation du complément. Cette activation au niveau de l'articulation, génère les anaphylatoxines C3a et C5a qui attirent les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes et les macrophages aboutissant à l'installation d'un site inflammatoire destructeur. Les souris déficientes en récepteur C5aR sont protégées contre l'arthrite (Grant *et al.*, 2002).

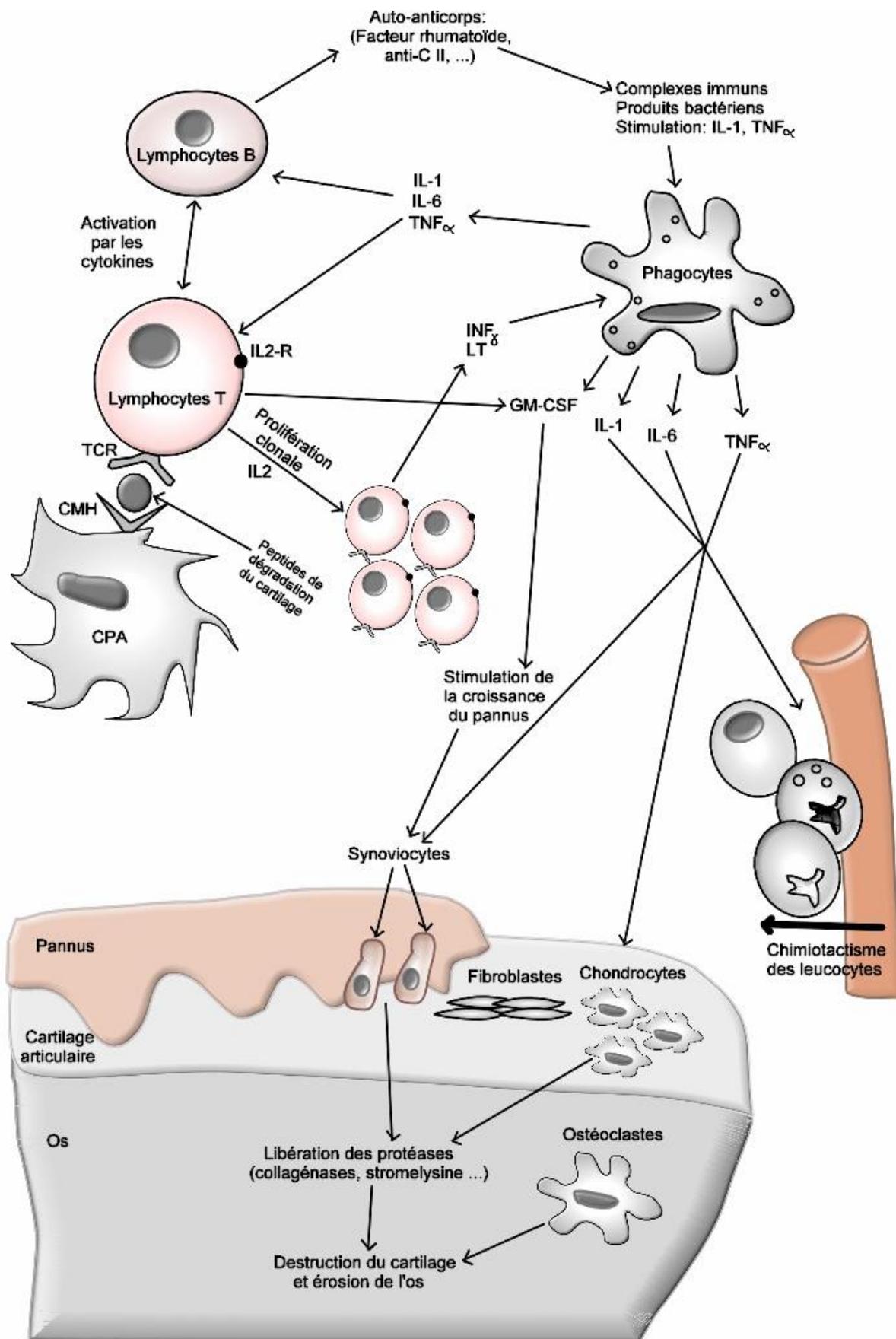


Figure 6: Physiopathologie de l'arthrite rhumatoïde (Brooks, 1998).

Une fois arrivés sur place, ces phagocytes utilisent leur récepteur de surface FcγR pour se lier aux complexes immuns. Les résultats de cette fixation diffèrent selon le type de ce récepteur. Il en existe trois types: FcγRII, FcγRI et FcγRIII ; le premier facilite l'endocytose et les deux autres activent le phagocyte pour libérer les cytokines pro-inflammatoires (Van Lent *et al.*, 2003). Les souris déficientes en FcγRI et FcγRIII ne développent pas d'arthrite alors que les déficientes en RII développent une arthrite plus sévère (Kleinau *et al.*, 2000; Kaplan *et al.*, 2002) puisque, en absence de phagocytose, les complexes immuns persistent plus longtemps pour aggraver la situation. Le nombre des FcγRII exprimés sur la surface des macrophages du liquide synovial des arthritiques est inférieur à celui trouvé sur les macrophages du sang, et l'inverse pour les FcγRIII. Ces derniers sont plus abondants dans ces deux cellules en comparaison avec celles des sujets normaux (Wijngaarden *et al.*, 2003). Les phagocytes activés *via* le FcγRIII (les macrophages) secrètent les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF-α) ce qui attire d'autres phagocytes et lymphocytes (T et B). Les interleukines Il6, IL1β, TNF-α et IFN-γ sont présents dans le liquide synovial des arthritiques et leur taux est en corrélation avec le nombre des leucocytes (Holt *et al.*, 1992). L'importance de ces cytokines est révélée par les modèles animaux où l'arthrite est exacerbée chez les animaux les sur-exprimant (Pettipher *et al.*, 1986; Niki *et al.*, 2001) est modéré ou absente chez les animaux déficients en ces cytokines (de Hooge *et al.*, 2000; Hata *et al.*, 2004).

Les leucocytes arrivés et les cellules résidentes (synoviocytes) prolifèrent et s'activent ce qui conduit à la libération d'autres cytokines et chémokines: IL-2, IL11, IL17, IL-8, GM-CSF (granulocyte mastocyte colony stimulating factor), RANKL (receptor activator of nuclear factor-κB ligand) et MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) (Nishiura *et al.*, 1996; Troughton *et al.*, 1996; Sew Hoy *et al.*, 1997; Gravallesse, 2002). Contrairement aux cytokines pro-inflammatoires, les cytokines anti-inflammatoires (Il-4 et IL-10) sont absents dans la membrane et le liquide synovial arthritiques (Sew Hoy *et al.*, 1997). Chez l'animal, la déficience de ses

cytokines exacerbe l'arthrite (Hata *et al.*, 2004) alors que leur sur-expression l'inhibe (Ma *et al.*, 1998).

En plus de la libération des cytokines, plusieurs protéases sont libérées conduisant à la dégradation du cartilage : collagénase de la fibroblaste (MMP-1), Stromelysin-1 (MMP-3), (Smeets *et al.*, 2003), collagénase du neutrophile (MMP8), collagénase-3 (MMP-13), gélatinase B (MMP-9) (Kontinen *et al.*, 1999), élastase, cathepsine B et L (Huet *et al.*, 1992), élastase du macrophage (MMP12) (Wang *et al.*, 2004). Chez l'animal, la sur-expression de ces enzymes exacerbe l'arthrite (Wang *et al.*, 2004) et leur déficience (van Meurs *et al.*, 1999) ou inhibition par le SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor) (Song *et al.*, 1999) empêche son développement. Ces enzymes dégradent les composantes du cartilage (collagène, élastine, protéoglycannes ...) générant des épitopes qui seront présentés par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) aux lymphocytes T auto-réactives ce qui maintient le taux des cytokines élevé et perpétue l'inflammation (Van Den Steen *et al.*, 2002).

Physiologiquement l'ostéoblaste contrôle l'activation et la prolifération des ostéoclaste dans le processus de maintenance et réparation de l'os (Bolon *et al.*, 2004). La nature inflammatoire de l'articulation perturbe cet équilibre en faveur de l'ostéoclaste. Les macrophages (CD14+) activés par le RANKL se différencient en ostéoclastes est contribue à la résorption de l'os (Danks *et al.*, 2002). Dans L'arthrite induite chez les souris déficientes en RANKL, l'os est protégé de l'érosion mais le cartilage est dégradé ce qui indique une différence dans le mécanisme de dégradation de ces deux tissus (Pettit *et al.*, 2001).

4. Modèles animaux de l'arthrite rhumatoïde

Le traitement et la prévention de l'arthrite rhumatoïde dépendent en grande partie de l'accumulation des connaissances concernant les facteurs génétiques et environnementaux déclanchant la maladie, ainsi que les effecteurs immunologiques qui y participent. Pour cela, des modèles animaux ont commencé à être proposés depuis la description de la maladie humaine (Waksman, 2002).

Actuellement il existe un grand nombre de modèles ressemblant plus au moins à la maladie humaine et qui ont été obtenus par une variété de procédés (**Tableau 1**). Différentes huiles ont été utilisées pour induire l'arthrite chez les rats Dark Agouti (DA), l'espèce de rats la plus susceptible. On cite l'huile de paraffine (Adjuvant incomplet de Freund; AIF) (Svelander *et al.*, 2001), l'avridine (Prakken *et al.*, 1997), le squalène (Carison *et al.*, 2000), et le puissant arthritogène, le pristane (Hansson *et al.*, 2002; Olofsson et Holmberg, 2003). Le mécanisme exact par lequel les huiles induisent l'arthrite n'est pas connu, l'hypothèse de l'accumulation dans l'articulation est à présent écartée. Une étude réalisée avec le squalène radioactif a montré son accumulation dans les nodules lymphatiques où il active non spécifiquement les lymphocytes T ce qui déclenche l'arthrite (Holm *et al.*, 2002). La majorité des modèles d'arthrite induite par l'huile ont été utilisés pour étudier l'association du facteur génétique à l'étiologie de la maladie (Lorentzen *et al.*, 1998). Cette association est aussi étudiée à l'aide d'animaux transgéniques porteurs d'allèles de l'HLA humain (Bradley *et al.*, 1997; Cope, 2003).

Pour inspecter l'intervention des infections bactériennes ou les bactéries de la flore intestinale normale dans l'étiologie de l'AR, les parois cellulaires de plusieurs de ces bactéries ont été utilisés pour induire la maladie : *Lactobacillus casei* (Simelyte *et al.*, 2001), *Mycobacterium tuberculosis* (Bolon *et al.*, 2004), *Bifidobacterium adolescentis* (Zhang *et al.*, 2001), *Mycoplasma pulmonis* (Cole *et al.*, 1975).

Tableau 1: Modèles animaux de l'arthrite rhumatoïde (Adapté de Lorentzen, 1999 et Waksman, 2002)

Stimulus ou méthode d'induction	Animaux susceptibles utilisés
<p>- Huiles Huile de paraffine (Adjuvant incomplet de Freund) Pristane (2,6,10,14-tétraméthypentadécane)</p> <p>Squalène (C30H50) Avridine + AIF Hexadécane (C16H34) Heptadécane (C17H34)</p> <p>- Bactéries</p> <p>* Parois cellulaires Mycobactérium tuberculosis; M. bovis; M. Butyricum; M. smegmatis Nocardia astéroïdes Lactobacillus cassei Streptocoque Bifidobacterium adolescentis</p> <p>* Composantes des parois cellulaires Muramyl dipeptide (MDP) (mycobactéries) + AIF Trehalose-dimycolate (TDM) (mycobactéries) + AIF β-glucan (Saccharomyces cerevisiae) β-glucan (Saccharomyces cerevisiae) + AIF Lipopolysaccharide (LPS) (E. coli) + AIF</p> <p>- Composantes du cartilage Collagène type II (bovin, poulet, rat)</p> <p>Protéoglycane link protein, aggrecan core protein, glycoprotein-39 Cartilage intermediate layer protein Glycosaminoglycanes</p> <p>- Modèles transgéniques HLA-B27</p> <p>HLA-DQ8 HLA-DR1 et HLA-DR4 HLA-DRβ1</p> <p>- Autre modèles IL-1 Ra knock-out Albumine bovine méthylée (mBSA)</p>	<p>Rat (DA) Rat (DA, LEW.1AV1), Souris (H2-K) Rat (DA) Rat (DA, LEW.1AV1) Rat (DA) Rat (DA)</p> <p>Rat (DA, LEW) Rat (LEW) Rat (LEW) Rat (LEW) Rat (LEW)</p> <p>Rat (DA, LEW) Rat (DA, LEW) Rat (DA) Rat (DA, LEW) Rat (DA, LEW)</p> <p>Souris (C3HQ, DBA/1), Rat (DA, LEW, Wistar), Primate Souris (BALB/c) Souris (DBA/1, C57Bl/6) Souris (BALB/c)</p> <p>Rats (LEW, F344), Souris (C57Bl/6) Souris (B10.M) Souris (B10.M) Souris (SCID)</p> <p>Souris Souris, Lapin (Dwarf Russian)</p>

Les composantes de ces parois suspectées d'être à l'origine de leur arthritogénicité sont aussi utilisées pour induire l'arthrite (Lorentzen, 1999). Le mimétisme des antigènes bactériens avec les autoantigènes, essentiellement les composantes du cartilage, est l'une des hypothèses proposées pour expliquer la participation de ces dernières à l'étiologie de la maladie et la localisation de l'affection au niveau de l'articulation. Pour étudier cela, différentes composantes du cartilage articulaire sont utilisées pour induire la maladie (Kaplan *et al.*, 2002; Waksman, 2002; Wang et Roehrl, 2002).

L'arthrite induite par le collagène type II, proposée en 1977 par Trentham et ses collaborateurs, est actuellement considérée comme le meilleur modèle animal de l'arthrite humaine (Waksman, 2002). Ce modèle est réalisé par immunisation des rats par le collagène type II; composante majeure du cartilage articulaire. La maladie obtenue est plus chronique et destructrice du cartilage et de l'os que celle obtenue par les adjuvants à base d'huile (exception faite pour le pristane). Elle touche un grand nombre d'animaux même les espèces résistantes aux huiles et aux parois bactériennes: rats Wistar (Trentham *et al.*, 1977; Stuart *et al.*, 1988), Souris (Bäcklund *et al.*, 2003), singe Rhésus (T Hart, 1998). Les anticorps développés contre le collagène jouent un rôle important dans l'initiation de la maladie (**Figure 7**), ils ont été utilisés pour transférer passivement la maladie à des animaux non immunisés: rats (Stuart *et al.*, 1982; Stuart et Dixon, 1983), souris (Kagari *et al.*, 2002; Nandakumar *et al.*, 2003). Ces anticorps s'accumulent dans l'articulation en se fixant sur le cartilage (**Figure 8**) et activent le complément ce qui attire les phagocytes. Ces derniers libèrent leur cytokines et protéases, ce qui attire d'autres cellules inflammatoires et cause la destruction du cartilage et l'os articulaire (Stuart *et al.*, 1988).

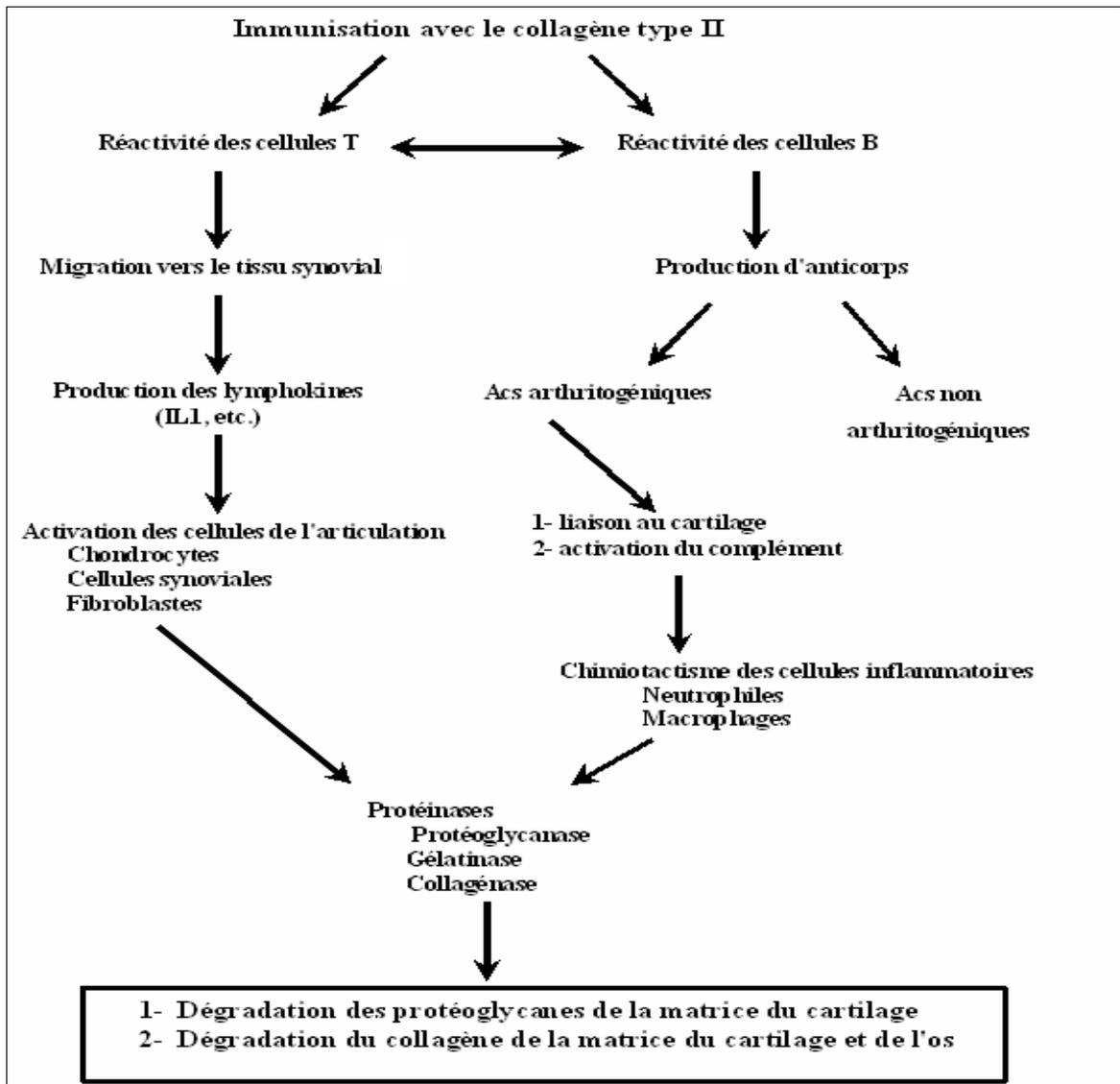


Figure 7 : Schéma proposé pour la pathogénie de l'arthrite induite par le collagène type II (Stuart *et al.*, 1988).

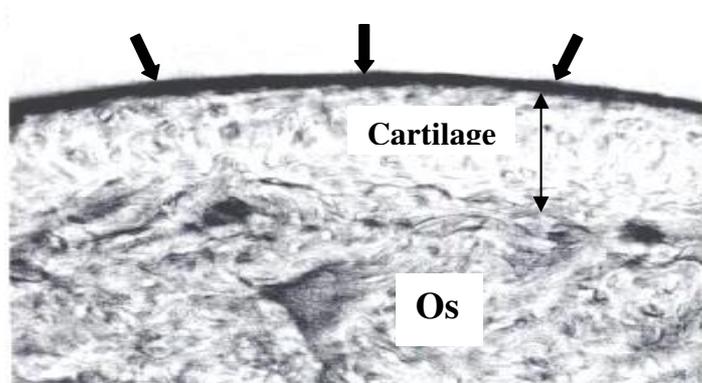


Figure 8: Fixation des anticorps sur la surface du cartilage articulaire, montrée par immunomarquage (flèches) (Stuart *et al.*, 1988).

5. Traitement de l'arthrite rhumatoïde

La prise en charge de l'arthrite rhumatoïde fait appel à des médicaments à visée symptomatique, ainsi qu'à un traitement de fond (**Tableau 2**). Ce dernier n'est pas curatif, puisque l'étiologie est souvent mal connue. En plus du traitement médicamenteux, la prise en charge de l'AR comporte le repos, les traitements doux, le régime alimentaire (Buchanan *et al.*, 1991), la réadaptation fonctionnelle (Bearne *et al.*, 2002) et les interventions chirurgicales.

Les traitements symptomatiques ont pour but de soulager les douleurs issues de l'inflammation mais influencent peu ou pas l'évolution de la maladie. On utilise des antalgiques purs dont le paracétamol et ses dérivés, des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), à doses souvent élevées, qui exposent, à des degrés divers, aux risques digestifs d'intolérance. Les AINS agissent en inhibant la synthèse des prostaglandines (PG) par inhibition des cyclooxygénases (Simon et Yocum, 2000). En cas d'inefficacité on peut utiliser des corticostéroïdes à faible posologie (Brown, 1985).

Les traitements de fond sont susceptibles d'arrêter ou de freiner l'évolution de l'AR. Plusieurs médicaments modifiant la maladie (DMARDs) sont utilisés: sels d'or (Kean *et al.*, 1997), Méthotrexate (Burbage, 2005), Antipaludéens de synthèse, Sulfasalazine (Samanta *et al.*, 1992), Dérivés thiolés et Immunodépresseurs (Ciclosporine, Azathioprine) (Gaffney et Scott, 1998). Les principaux effets indésirables des traitements de fond sont l'immunosuppression, les troubles endocriniens, les troubles digestifs et les perturbations hématologiques. La stratégie actuelle de traitement consiste à combiner plusieurs DMARDs (Coates et al, 1984; Choy, 2004).

Tableau 2: traitements médicamenteux disponibles pour les maladies rhumatismales (Lacaille, 2000)

- Traitement symptomatique

*** Antalgiques**

*** Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)**

Aspirine, Ibuprofen, Ketoprofen,
Naproxen, diclofenac, diflunisal

*** Corticostéroïdes**

Prednisone, Methylprednisolone

- Traitement de fond:

*** Anciens Antirhumatismaux modifiant la maladie (DMARD)**

Les sels d'or : Allochrysine®, Auranofin®

Les sulphydrilés: Trolovol®, Acadione®

L'hydroxychloroquine: Plaquenil®

*** Nouveaux Antirhumatismaux modifiant la maladie (DMARD)**

La sulfasalazine : Salazopyrine®

Le methotrexate : Novatrex®

Le leflunomide : Arava®

*** Immunosuppresseurs**

Ciclosporine : Néoral®

Azathioprine : Imurel®

Cyclophosphamide : Cytosan®

*** Traitements biologiques**

Anakinra : Kineret® (Antagoniste du récepteur de l'IL1)

Infliximab : Remicade® (Ac chimérique humaine souris anti-TNF)

Adalidumab : Humira® (Ac humain anti-TNF)

Etanercept : Enbrel® (IgG-récepteur du TNF)

Plusieurs traitements expérimentaux issus des concepts immunologiques et qui visent à contrôler les acteurs principaux dans la physiopathologie de l'AR sont en cours de développement (**Tableau 3**) (Breedveld et Kalden, 2004). Certaines de ces approches ont obtenus l'autorisation de mise en marché ou sont en phases finales de teste: adalidumab (Humira®: anticorps humain anti-TNF) (van de Putte *et al.*, 2003), infliximab (Remicade®: anticorps chimérique humain-souris anti-TNF) (Quinn *et al.*, 2005), étanercept (Enbrel®: protéine de fusion IgG-récepteur de TNF) (Clunie *et al.*, 2003), anakinra (Kineret®: antagoniste du récepteur de l'IL1) (Rau *et al.*, 2003).

En plus du traitement médicamenteux plusieurs interventions locales et chirurgicales sont à envisager dans la stratégie du traitement: évacuation des épanchements articulaires, pose de prothèses pour les grosses articulations, synovectomie, arthroplasties, arthrodièse. La réadaptation fonctionnelle, la kinésithérapie, l'ergothérapie et l'adaptation de l'environnement professionnel et domestique au handicap du patient sont une partie intégrante du traitement (Vaillancourt, 1990).

Tableau 3: les interventions biologiques examinées dans l'AR (Breedveld et Kalden, 2004)

- Molécules de surface cellulaire :

McAb Anti-CD3, McAb anti-CD4, McAb anti-CD5, McAb anti-CD7, McAb anti-CD20 (rituximab), McAb anti-CD25, McAb anti-CD28, McAb anti-CD52, protéine de fusion de l'IL2, anti-ICAM-1, CTLA-4-Ig

- thérapie visant les cytokines :

Antagonistes du TNF (McAb, récepteur soluble du TNF)

Antagoniste du récepteur de l'IL1

Antagonistes de IL6 (McAb, récepteur de IL6)

Administration des cytokines anti-inflammatoires (IL4, IL10, IFN γ , et IFN β)

- induction de la tolérance

Application des antigènes (collagène II, HCGP-39)

Vaccination avec les cellules T ou les récepteur de surface des cellules T

Interférence avec l'activation des cellules T (CTLA-4-Ig)

- Inhibition des chémokines

- Inhibition de l'activation du complément

- Plasmaphérèse, colonnes d'immunoabsorption

- Transplantation de la moelle osseuse

McAb: (monoclonal antibodies) anticorps monoclonaux; ICAM: intracellular adhesion molecule; CTLA-4: cytotoxic T lymphocyte antigen-4; Ig: immunoglobulines; IL: interleukine; TNF: tumour necrosis factor; IFN: interféron

6. Rôle de la xanthine oxydoréductase dans l'arthrite rhumatoïde

La xanthine oxydoréductase (XOR) est une molybdoflavoenzyme complexe connue depuis 100 ans et étudiée sous sa forme pure depuis plus de 60 ans, cela est en grande partie dû à sa disponibilité et son extraction facile à partir du lait où elle constitue une composante majeure de la membrane des globules lipidiques (Harrison, 2002).

6.1. Caractérisation, localisation et rôles physiologiques de la XOR

La XOR est constituée de deux sous-unités identiques et catalytiquement indépendantes de poids moléculaires approximatif de 300 kDa (**Figure 9 et 10**). Chaque sous-unité (PM 150 kDa) est constituée de trois domaines associés chacun à un cofacteur spécifique. Le domaine N-terminal (1-165 acides aminés) est composé de deux sous domaines avec un centre fer-soufre ($\text{Fe}_2\text{-S}_2$) pour chaque un. Le domaine intermédiaire (226-531 acides aminés) contient une molécule flavine adénine dinucléotide (FAD). Le domaine C-terminal est le plus large (590-1332 acides aminés) et où siège le cofacteur du molybdène (l'association du molybdoptérine avec l'atome de molybdène) (Harrison, 2002).

L'enzyme est largement distribuée parmi les différentes espèces (Parks et Granger, 1986). Chez les Mammifères elle présente de très fortes homologues pouvant atteindre 90%. Chez les bovins l'enzyme a été détectée dans l'épithélium et l'endothélium des glandes mammaires, et l'endothélium du foie, cœur, poumons, intestins et reins (Jarasch *et al.*, 1981; Jarasch *et al.*, 1986). Chez l'homme elle a été détectée dans le foie et le duodénum (Kooij *et al.*, 1992), l'endothélium des capillaires des muscles cardiaques et squelettiques (Hellsten-Westing, 1993) et l'endothélium des hépatocytes, reins, cerveau, poumons (Moriwaki *et al.*, 1993). Le foie, les intestins et les glandes mammaires restent de loin les plus riches en XOR parmi les différents tissus des mammifères (Berry et Hare, 2004).

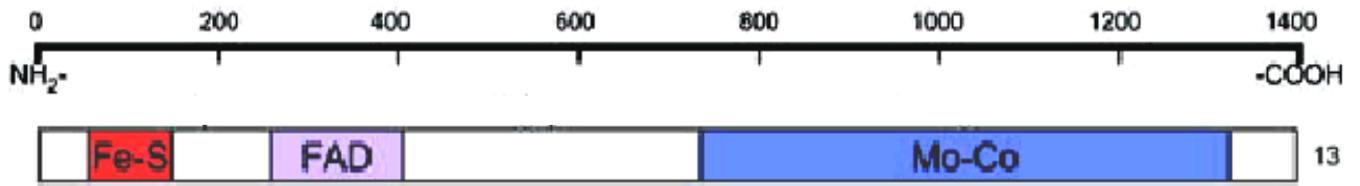


Figure 9 : Les domaines constituant une sous unité de la XOR (Berry et Hare, 2004).

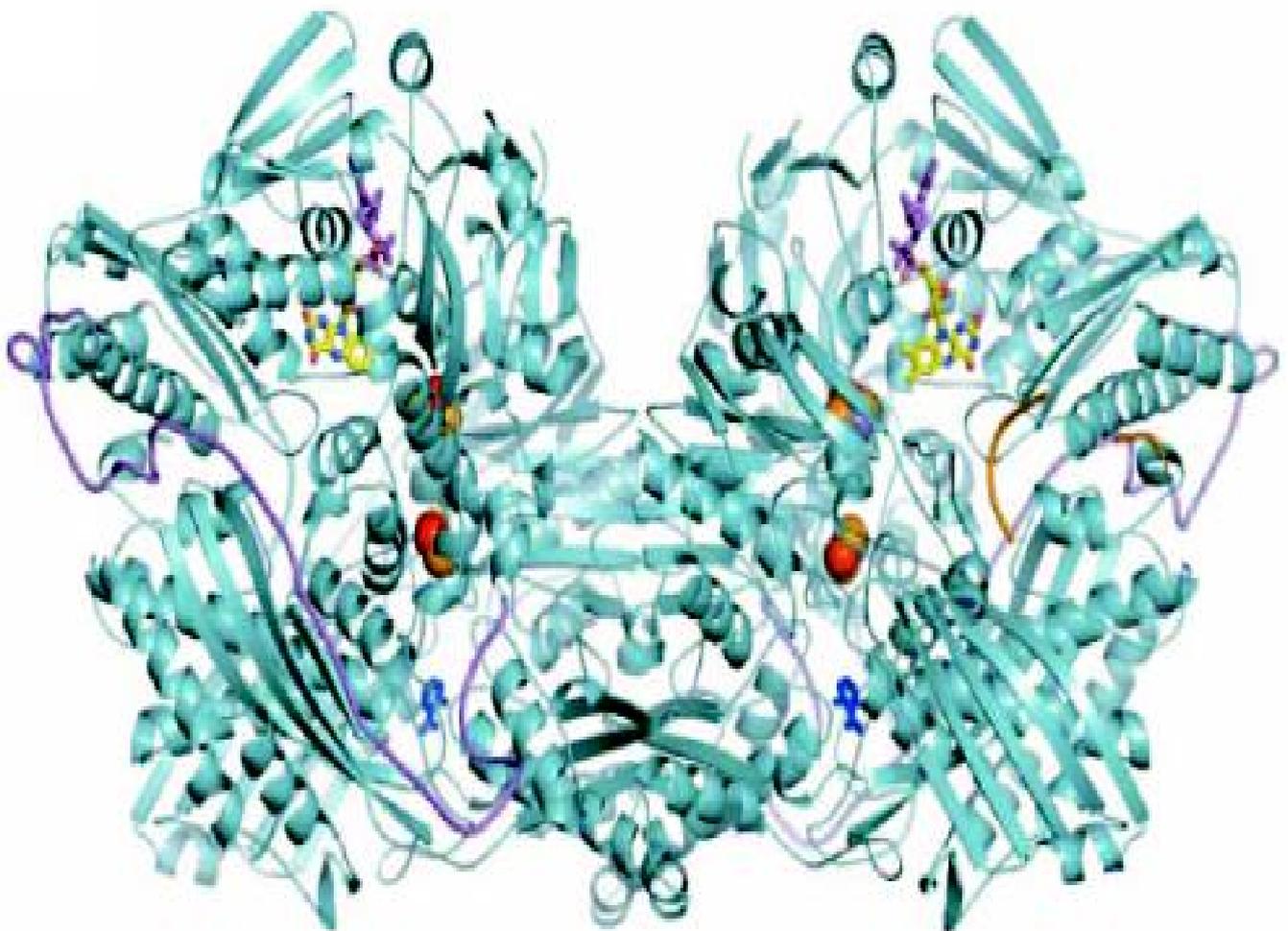


Figure 10 : Diagramme en ruban de la structure de la XDH bovine, les différentes couleurs présentent les groupements prosthétiques (FAD, Centres Fer-soufre) (Nishino *et al.*, 2005).

La xanthine oxydoréductase des mammifères existe en deux formes interconvertibles: la forme déshydrogénase (forme D (XDH), EC. 1.1.1.204) et la forme oxydase (forme O (XO), EC. 1.1.3.22). La forme prédominante in vivo est la forme déshydrogénase, elle est convertie en oxydase lors des conditions pathologiques ou au cours des procédés de purification (Harrison, 2002). Cette conversion se fait soit d'une manière réversible, par oxydation des groupements sulfhydrils (SH) (Nishino et Nishino Ta., 1997) ou irréversible par protéolyse (Amaya *et al.*, 1990). La forme déshydrogénase réduit l'oxygène moléculaire (O_2) et le NAD^+ avec une préférence pour ce dernier. Les changements aux environs du centre FAD issus de la conversion rendent l'enzyme incapable de réduire le NAD^+ , la réduction du O_2 génère l'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (**Figure 11**) (Harrison, 2004).

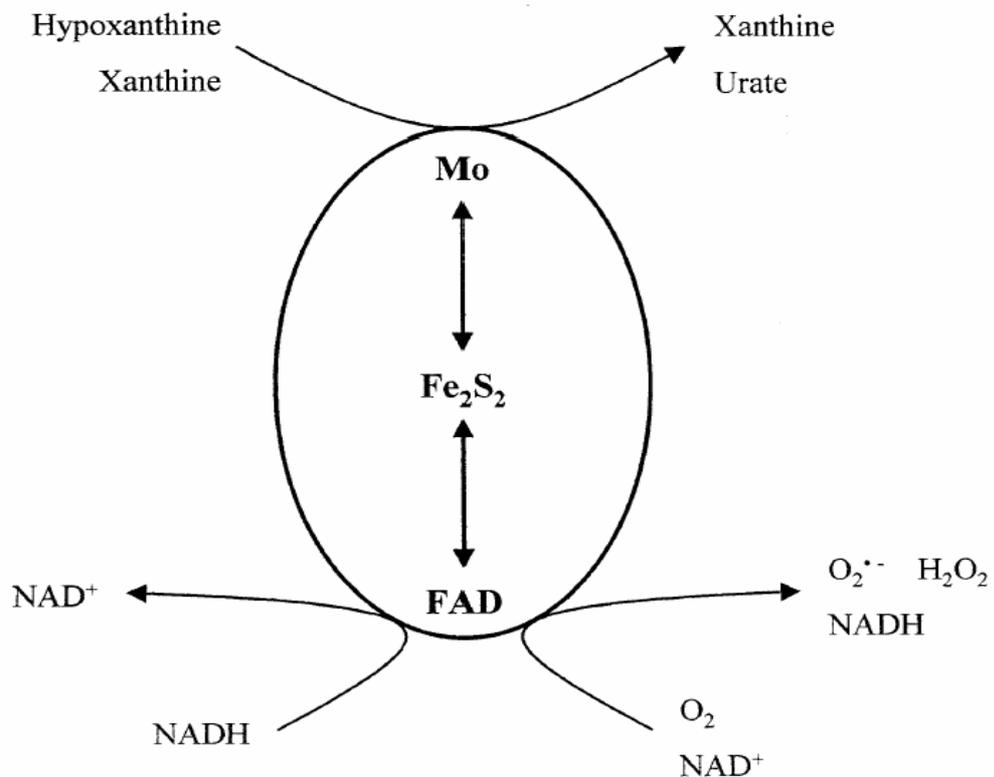


Figure 11: Les réactions physiologiques catalysées par la XOR (Harrison, 2002)

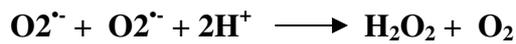
La xanthine oxydoréductase joue différents rôles dans la physiologie des mammifères. Le premier de ces rôles est le métabolisme des purines où elle oxyde l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique. Cette réaction constitue l'étape finale de la dégradation des acides nucléiques et sa défaillance conduit à la xanthinurie ou la goutte (respectivement hypo ou hyperactivité XOR) (Parks et Granger, 1986; Yamamoto *et al.*, 1992). L'acide urique généré par l'activité de la XOR joue un rôle antioxydant dans le sérum (Harrison, 2004). L'enzyme participe dans l'absorption du fer dans la muqueuse intestinale et dans sa mobilisation dans le foie (Topham *et al.*, 1982a, b). Elle participe dans la sécrétion du lait des glandes mammaires (McManaman *et al.*, 2002). Grâce aux espèces oxygénés (ROS) et nitrogénés (RNS) réactives qu'elle génère, l'enzyme joue un rôle antimicrobien dans le lait, le tube digestif et le sang (Hancock *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2004).

6.2. Les ROS générées par la XOR dans la pathologie de l'articulation arthritique

La physiopathologie complexe de l'articulation arthritique fait intervenir différentes composantes cellulaires et moléculaires. Les espèces oxygénées réactives jouent un rôle important dans cette pathologie. Cela a été confirmé par Kawai et ses collaborateurs (2000) qui ont utilisés la technique ESR (electron spin resonance) pour détecter la formation du radical hydroxyle (OH^\bullet) dans le liquide synoviale du rat arthritique. Le taux du OH^\bullet augmente en présence de la superoxyde dismutase (SOD) et diminue par l'ajout d'un chélateur de métaux, ce qui a conduit à la conclusion que l'hydroxyle est généré par la réaction de Haber-Weiss (**Figure12**).

Dismutation du superoxyde

SOD



Réaction de Haber-Weiss



Figure 12: Génération de l'hydroxyle à partir du superoxyde (Kawai *et al.*, 2000).

La xanthine oxydoréductase est proposée comme une des sources importantes des ROS. Cette enzyme existe dans la membrane (Allen *et al.*, 1987 ; Stevens *et al.*, 1991) et le liquide (Hanachi, 2001 ; Arrar, 2002) synovial. Son activité est élevée dans le sérum (Miesel et Zuber, 1993) et le liquide synovial (Hanachi, 2001) des patients arthritiques. Le liquide synovial contient en plus de l'enzyme, ses substrats (hypoxanthine et xanthine) (Gudbjornsson *et al.*, 1991). Les cytokines pro-inflammatoires TNF α , IFN γ et IL1, dont le taux augmente dans l'articulation arthritique (Wastacott *et al.*, 1990; Kaneko *et al.*, 2001; Kagari et al, 2002), augmentent l'activité de l'enzyme en augmentant sa transcription (**Tableau 4**) (Pfeffer *et al.*, 1994) et les modifications post-transcriptionnelles (Page *et al.*, 1998).

Tableau 4 : Facteurs régulant l'expression du gène de la XOR (Berry et Hare, 2004).

Régulation positive	Régulation négative
Hypoxie	Hyperoxie
Lipopolysaccharides	
Interféron gamma	
Interleukine 1	
Interleukine 6	
Tumor necrosis factor alpha	
Dexamethasone	
Cortisol	
Prolactine	

La variation de la pression intra-articulaire peut exposer l'articulation aux conditions d'ischémie-réperfusion. La prolifération de la lignée synoviale, la vascularisation du tissu et le fait que l'articulation est maintenue par une capsule rigide augmentent la pression intra-articulaire. La mobilisation des articulations affectées renforce cette pression qui excède la pression des vaisseaux sanguin irriguant la synovial empêchant ainsi l'arrivé du sang (ischémie), l'arrêt du mouvement diminue cette pression ce qui facilite le flux sanguin (réperfusion) (**Figure 13**) (Jawed *et al.*, 1997; Bodamyali *et al.*, 1998).

En 1981, Granger et ses collaborateurs ont proposé un mécanisme de l'implication de la XOR dans le processus d'ischémie-réperfusion. Durant l'ischémie (absence de l'oxygène), l'ATP intracellulaire est épuisé suite à l'arrêt de la phosphorylation oxydative dans la

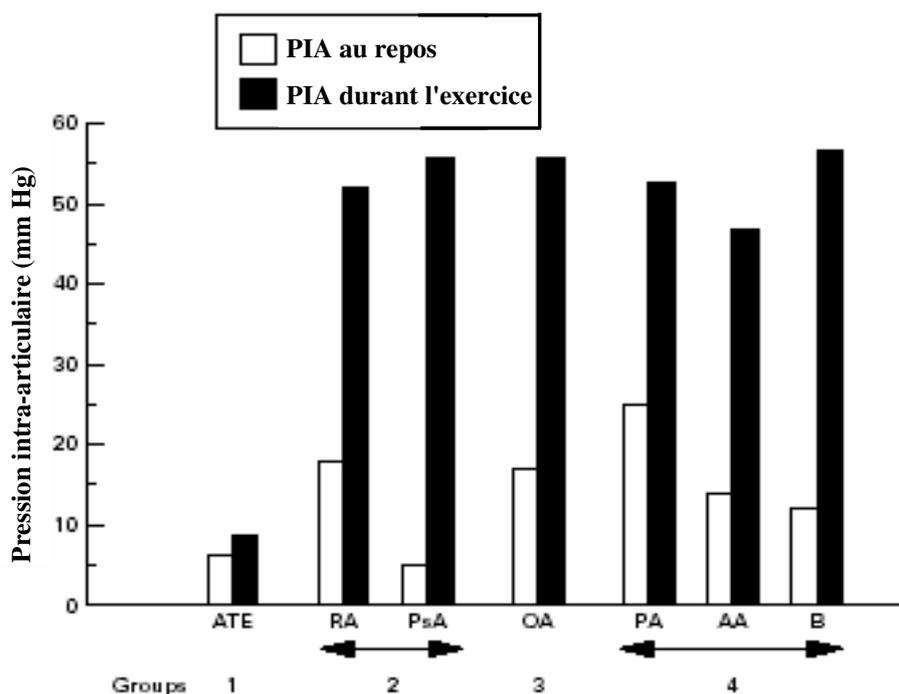


Figure 13: Pression intra-articulaire (PIA) au repos et durant l'exercice (Jawed *et al.*, 1997).

La pression intra-articulaire est élevée au repos et durant l'exercice dans les arthrites inflammatoires (RA (rheumatoid arthritis), PsA (psoriatic arthritis), OA (osteoarthritis), PA (pyrophosphate arthropathy), AA (amyloid arthritis), B (Behcet's arthritis)) en comparaison avec le traumatisme articulaire (ATE (acute

mitochondrie. Par manque d'énergie la cellule maintient difficilement le gradient ionique transmembranaire. Ce qui augmente le flux calcique intracellulaire et déclenche une conversion irréversible de la XDH en XO par l'activation des protéases Ca^{2+} -dépendantes. Cette conversion est accompagnée de l'accumulation de l'hypoxanthine issue du catabolisme exagéré de l'ATP pour compenser le manque d'énergie dû à l'absence de l'oxygène. Une fois le taux de O_2 augmente (réperfusion), la XO l'utilise comme accepteur d'électrons dans l'oxydation de l'hypoxanthine et la xanthine générant en conséquence le superoxyde (Granger *et al.*, 1981; McCord *et al.*, 1985). Ce dernier se transforme en peroxyde d'hydrogène sous l'effet de la superoxyde dismutase. Ces deux métabolites génèrent en présence des ions métalliques le puissant radical hydroxyle (réaction Haber-Weiss; décrite plus haut) (Winterbourn, 1981; Rowley et Halliwell, 1983; Aruoma et Halliwell, 1987) (**Figure 14**).

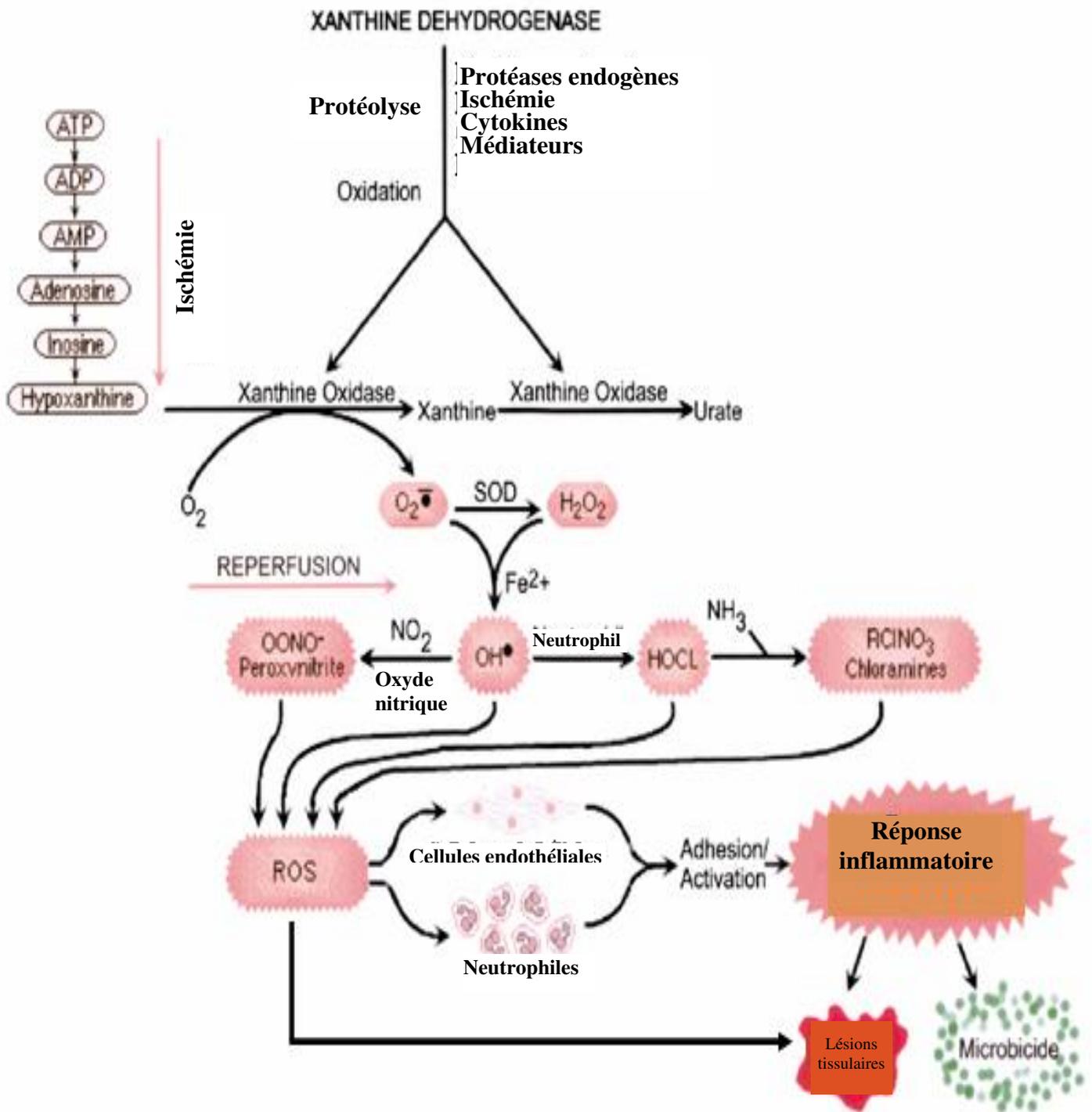


Figure 14 : mécanisme des lésions tissulaires post-ischémiques induites par la xanthine oxydoréductase (adapté de Meneshian *et al.*, 2002)

Mis à part l'implication de la XOR dans l'ischémie-réperfusion, ses deux formes XDH et XO sont capables de générer l'ion superoxyde via l'activité NADH-oxydase (Nakamura, 1991; Sanders et al, 1997). L'enzyme réduit le nitrite (NO_2^-) en oxyde nitrique (NO) (Godber *et al.*, 2000) qui réagit avec l'ion superoxyde pour donner le peroxonitrite (ONOO^-) hautement toxique (Harrison, 2002) (**Figure 15**). En plus de leur pouvoir destructeur, les ROS ($\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^\bullet) et RNS (NO, ONOO^-) générés par la XO participent au recrutement et l'activation des neutrophiles (Grisham *et al.*, 1986) et ostéoclastes (Bax *et al.*, 1992).

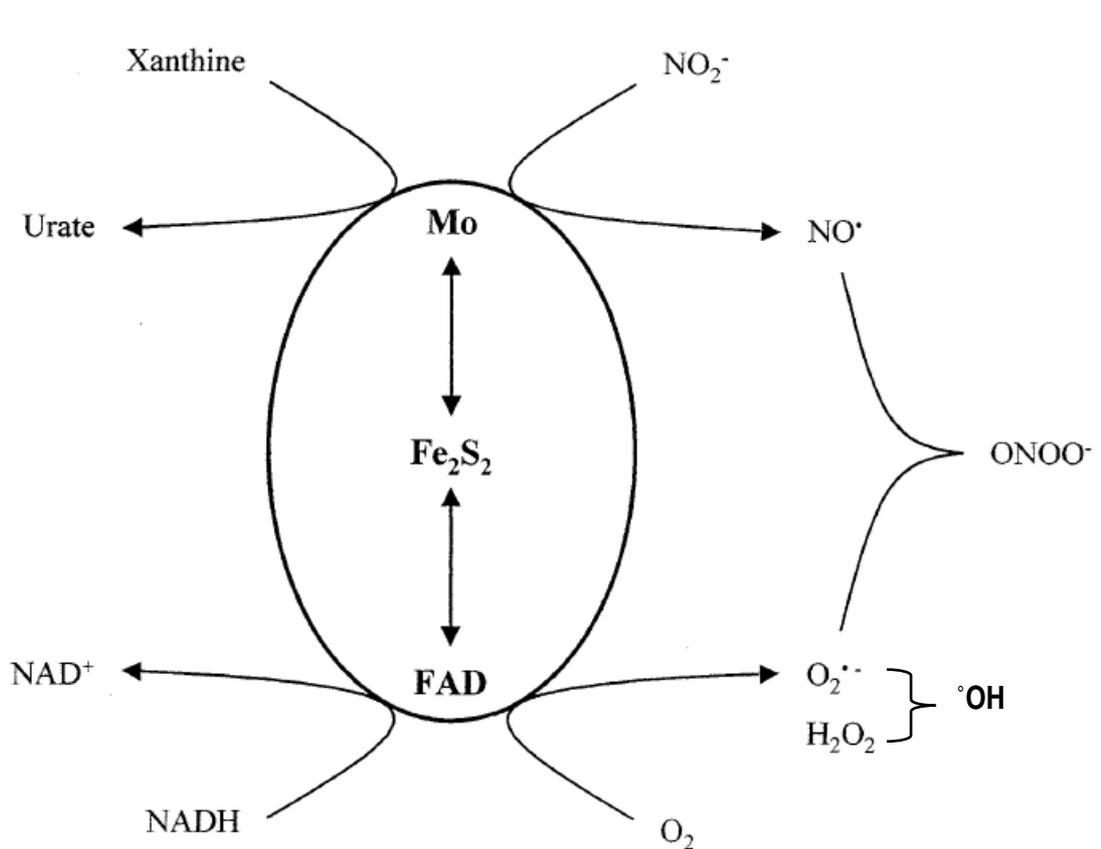


Figure 15: génération des espèces oxygénées et nitrogénées réactives par la xanthine oxydoréductase (adapté de Harrison, 2002).

6.3. Autres sources des espèces oxygénées et nitrogénées réactives

La XO n'est pas la seule source des ROS et RNS. Différentes sources enzymatiques ou non-enzymatiques peuvent également les générer (**Figure 16**). En effet, chaque système de transfert d'électrons peut être source des ROS (Thannickal et Fanburg, 2000). Les enzymes mitochondriales, ceux du réticulum endoplasmique, des lysosomes, des granules (NADPH oxydase et myelopéroxydase) et les enzymes cytoplasmiques (cyclooxygénase, lipooxygénase, indole amine dioxygénase, monoamine oxydase, aldéhyde oxydase, dihydroorotate déshydrogénase, flavoprotéine déshydrogénase et tryptophane dioxygénase) produisent des ROS et RNS (Ricciardolo *et al.*, 2004).

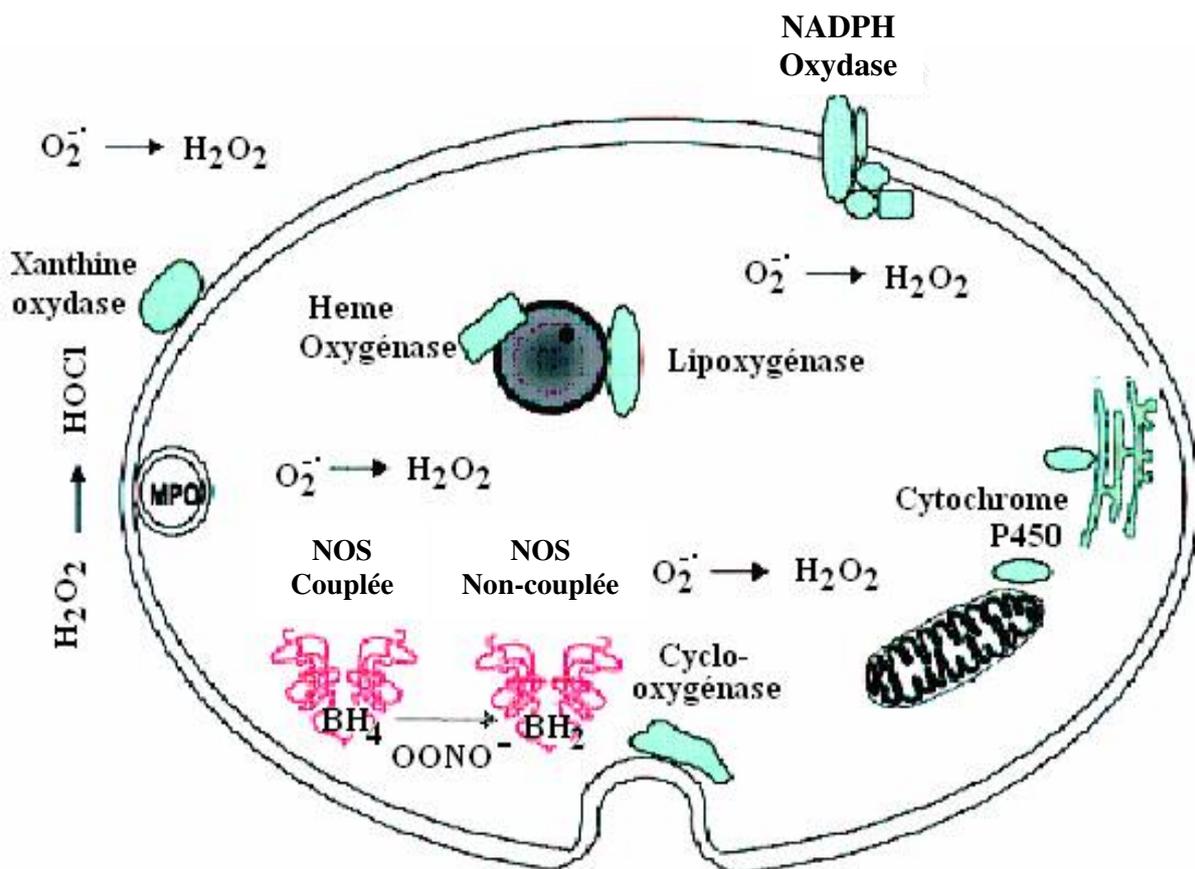


Figure 16 : Sources potentielles des ROS et RNS dans la cellule (Griendling et FitzGerald, 2003).

6.3.1. NADPH oxydase

Les phagocytes (neutrophiles, éosinophiles et macrophages) participent dans plusieurs pathologies humaines dont l'AR. Le neutrophile est une des cellules importantes dans l'installation de la maladie, sa déplétion réduit par 65% l'inflammation (Schrier *et al.*, 1984). Les macrophages et les neutrophiles sont présents dans le liquide synovial des arthritiques (Lutz *et al.*, 2004). Le nombre de neutrophiles dans le liquide synovial est 3.31 fois plus grand que dans le sang et 6.27 fois plus que dans le sang des sujets normaux (Davies *et al.*, 1990). La NADPH oxydase phagocytaire (la famille Phox: phagocytic oxidases) est une importante source du superoxyde, la dismutation et la réaction de Haber-Weiss conduisent à la génération du OH[•]. Différentes protéines de la famille NOX (NADH oxidases), homologues des sous-unités de la NADPH oxydase phagocytaires, ont été identifiées dans les cellules vasculaires (cellules endothéliales, cellules lisses et fibroblastes) (Heerebeek *et al.*, 2002; Geiszt *et Leto*, 2004). Des études ont montrés que ces NADPH vasculaires sont actives et capables de générer les ROS mais avec un taux plus faible que celui de la NADPH oxydase phagocytaire (Lassègue *et Clempus*, 2002).

6.3.2. Myelopéroxydase (MPO)

En plus de la NADPH oxydase, les phagocytes activés du liquide synovial des arthritiques secrètent la myelopéroxydase (Davies *et al.*, 1990). Cette enzyme utilise le OH[•] pour générer l'acide hypochlorique HOCl. Ce dernier peut réagir avec les nitrites issus de l'oxyde nitrique pour donner les chloramines (RCINO₃) (Ricciardolo *et al.*, 2004).

6.3.3. Nitric oxyde synthase (NOS)

L'enzyme nitric oxyde synthase est exprimée dans différents types de cellules (neurones, cellules endothéliales et épithéliales, fibroblastes et cellules lisses vasculaires) (Ricciardolo *et al.*,

2004). L'oxyde nitrique (NO) est secrété dans l'articulation par les chondrocytes et les macrophages. Ces cellules ont une activité NOS élevée chez les arthritiques (Clair *et al.*, 1996). L'oxyde nitrique n'a pas de rôles pathologiques proprement dit mais sa réaction avec le superoxyde donne le pyroxyde nitrite (ONOO⁻) (Ricciardolo *et al.*, 2004). La NOS utilise le L-arginine et le tetrahydrobiopterin (H4B) pour synthétiser le NO. En cas de manque d'arginine ou de H4B ou oxydation de ce dernier l'enzyme produira le superoxyde à la place de l'oxyde nitrique. Le H4B peut être oxydé par le superoxyde généré par d'autres enzymes (ex: NADPH oxydase) (Griendling et FitzGerald, 2003 ; Taniyama et Griendling, 2003).

6.3.4. Autres sources

La chaîne de transfère d'électrons de la mitochondrie génère les ROS. Physiologiquement 1 à 4 % de l'oxygène consommé par la mitochondrie est partiellement réduit en superoxyde. L'atteinte de l'ADN mitochondrial augmente cette production (Mueller *et al.*, 2005). Les péroxysomes grâce aux différentes enzymes qu'elles contiennent (glycolate oxydase, urate oxydase, D-aminoacid oxydase, L-a-hydroxyacide oxydase) synthétisent une partie importante du H₂O₂ cellulaire (Thannickal et Fanburg, 2000). Le réticulum endoplasmique lisse synthétise le superoxyde par le cytochrome P-450 lors de l'oxydation des acides gras insaturés (Griendling et FitzGerald, 2003). Le métabolisme de l'acide arachidonique médié par les cyclo et lipooxygénases comporte des étapes avec des ROS comme médiateurs (Thannickal et Fanburg, 2000).

Le grand nombre de sources des radicaux libres dans l'articulation arthritique remet en cause l'importance donnée aux ROS générés par la xanthine oxydoréductase dans cette pathologie. L'importance de l'enzyme doit être étudiée dans des modèles animaux à l'aide d'inhibiteurs spécifiques. Une fois l'implication de l'enzyme confirmée, des approches thérapeutiques préventives ou curatives peuvent être envisagées.

7. But du travail

Provocation de l'arthrite rhumatoïde chez le rat par le collagène type II.

Suivi des paramètres de l'inflammation articulaire chez les rats traités.

Préparation des anticorps anti-xanthine oxydoréductase chez le rat

Etude de l'effet inhibiteur des anticorps anti-XOR

Etude des possibilités d'utilisation des anti-XOR dans le traitement de l'arthrite chez le rat

MATERIELS ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel

1.1. Animaux

Les rats Albino Wistar mâles et femelles pesant de 200 à 300 g (Institut Pasteur d'Algérie) sont mis en adaptation une semaine avant l'expérimentation dans l'animalerie du Département de Biologie avec un accès libre à l'eau et la nourriture standard (concentré pour rats, Groupe Avicole El-Kseur Bejaia).

1.2. Réactifs et milieux biologiques

La plupart des produits utilisés dans cette étude proviennent de Sigma (Allemagne). Le lait bovin est fraîchement obtenu de la ferme de Ain Sfiha à Sétif et traité directement à l'arrivée au laboratoire. Le lait humain est obtenu de femmes volontaires au niveau de la ville de Sétif et gardé à -20°C jusqu'à utilisation.

2. Méthodes

2.1. Induction de l'arthrite

L'arthrite a été induite chez les rats Albino Wistar selon le modèle développé par Trentham *et al.* (1977) avec modifications. Après une semaine d'adaptation, les rats sont divisés en deux groupes d'âge et de poids homogènes. Le collagène type II (CII) est dissout dans 0.1 M acide acétique (2.5 mg/ml) pendant une nuit à 4°C puis 100 μl de cette solution sont émulsifiés avec le même volume d'adjuvant complet de Freund (ACF). Le mélange est immédiatement administré par injection intradermique à la base de la queue et à quatre points sur le dos des rats après anesthésie et épilation. Après sept jours de la première injection, une injection de rappel de 200 μg de CII préparé de la même façon a été effectuée (Campo *et al.*, 2003). Le groupe témoin a subi le même traitement mais en utilisant l'acide acétique seul.

Différents critères de la maladie ont été évalués le jour de l'induction (J_0) de l'arthrite et pendant les 30 jours suivants. Les valeurs sont obtenues par soustraction de la valeur initiale (J_0) considérée comme nulle.

2.1.1. Volume de l'œdème

Le volume des quatre pattes des rats est mesuré par pléthysmomètre (UGO basile, Allemagne) le jour de l'induction de l'arthrite et chaque 4 jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Pour assurer la reproductibilité des résultats les pattes du rat sont immergées dans le compartiment de mesure jusqu'à ce que le niveau du liquide atteigne l'axe de la cheville pour les pattes postérieurs et le poigné pour les pattes antérieurs (Hildebrandt *et al.*, 2000). Le volume de l'œdème est obtenu par soustraction du volume initial des pattes du rat (Selloum *et al.*, 2003).

2.1.2. Poids corporel

Le poids corporel est mesuré à l'aide d'une balance de précision avant le début de l'expérimentation ce qui permet de répartir les rats en groupes de poids homogène puis à intervalles réguliers de l'expérimentation.

2.1.3. La vitesse de sédimentation des globules rouges

La vitesse de sédimentation (VS) des globules rouges est considérée comme un marqueur général de l'inflammation. Elle est essentiellement déterminée par la concentration des protéines plasmatiques majeures (fibrinogène, immunoglobulines) qui augmente lors de l'inflammation. Ces protéines s'attachent à la surface des globules rouges neutralisant la charge négative qui tient ces cellules éloignées. Cela conduit à l'agrégation de ces dernières et leur précipitation plus rapide. L'anémie augmente aussi la VS par l'augmentation du rapport concentration des protéines sériques / nombre des globules rouges (Rapaport, 2000). À intervalles réguliers, 1 ml de sang rétro-orbital est récupéré dans 222 μ l de citrate de sodium

5% puis transféré dans des microtubes. La sédimentation est mesurée en mm après une heure (Hildebrandt *et al.*, 2000).

2.1.4. Réalisation des coupes histologiques

Les pattes postérieures et antérieures sont disséqués au-dessus de la cheville et du poignet respectivement. Une fois la peau enlevée, les pattes sont fixées dans le formol à 10% pendant une semaine, puis décalcifiées dans l'acide formique à 5% avec changement de bain jusqu'à une décalcification complète (Campo *et al.*, 2003). Les étapes suivantes: inclusion, coupe, et coloration sont effectuées au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique, CHU de Sétif.

Les échantillons sont déshydratés par passage dans trois bains successifs de 30 min d'éthanol (70-75°, 90-95° et 100°), puis éclaircies dans deux bains de 20 min de toluène et inclus dans la paraffine (deux bains de 2 heures chacun) (l'opération est automatisée à l'aide d'un automate TISSUE-TEK® II). L'inclusion définitive est ensuite réalisée dans des moules métalliques (Shandon [O] Histocentre). Les blocs de paraffines obtenus sont ensuite coupés par microtome (LEICA RM 2145). Les coupes de 5 µm d'épaisseur sont étalées sur des lames et séchées pendant une heure à 37°C, réhydratées, colorées à l'hématoxyline-éosine (SHANDON [O]) (Bensalem-Bendjelloul, 1998). L'analyse des coupes histologiques porte sur ces critères : inflammation synoviale, intégrité du cartilage, érosion de l'os, infiltration de la moelle osseuse, inflammation extra articulaire (Boyle *et al.*, 2001).

2.2. Purification de la Xanthine oxydoréductase

La XOR humaine et bovine a été purifiée à partir du lait humain et bovin selon la méthode utilisée dans notre laboratoire (Baghiani *et al.*, 2003) et le laboratoire de biochimie de l'université de Bath en Angleterre (Benboubetra *et al.*, 1997). Toutes les étapes ont été effectuées à 4°C.

2.2.1. Obtention de l'extrait brut

Le lait bovin frais et le lait humain décongelé à 25°C sont centrifugés pendant 30 min à 3000 tpm (centrifugeuse LU-418H). La crème est récupérée et dissoute dans deux volumes de phosphate de potassium (K_2HPO_4 0.2M, EDTA 1 mM, DTT 5mM) ce qui permet de libérer l'enzyme des membranes lipidiques. Après une agitation d'une heure, le mélange est centrifugé à 3000 g (centrifugeuse Sigma 3K30C) pendant 30 min. Le surnageant est récupéré par filtration sur laine de verre puis 15%(V/V) de butanol refroidi et 15% (P/V) sulfate d'ammonium sont ajoutés. Après une agitation de 50 min le mélange est centrifugé à 10000 g pendant 20 min Le surnageant est récupéré et 20 % (P/V) de sulfate d'ammonium est ajouté et laissé sous agitation pendant 60 min puis centrifugé à 11000 g pendant 30 min Le précipité brun flottant est récupéré est dissout dans un petit volume de tampon héparine (25 mM phosphate de sodium, 1 mM EDTA, pH 6 ou 7.4 pour l'enzyme bovine ou humaine respectivement) et dialysée une nuit contre le même tampon. Une dernière centrifugation à 18000 g pendant 60 min puis une filtration sur membrane de 0.45µm permettent d'éliminer les impuretés restantes donnant une solution brune considérée comme l'extrait brut de l'enzyme.

2.2.2. Purification sur colonne héparine-Agarose

L'affinité observée entre la XOR et l'héparine (Fukushima *et al.*, 1995) est utilisée pour obtenir une enzyme de grande pureté. L'extrait brut obtenu dans la première étape est injecté avec un débit constant de 18ml/h dans une colonne d'héparine-Agarose 4% préalablement équilibré avec le même tampon. Pour éliminer les protéines non adsorbées, la colonne est lavée avec le tampon héparine puis le même tampon contenant 0.1M NaCl. Ensuite l'enzyme est éluée avec le même tampon contenant 0.2 M NaCl ou 0.4 M NaCl pour l'enzyme bovine et humaine respectivement. Les fractions contenant l'enzyme sont dialysées une nuit contre le tampon phosphate de sodium (50 mM; pH 7.4; 0.1 mM EDTA) à 4°C puis réparties en petits

aliquotes de 1ml et conservées à -20°C. La colonne est régénérée par le tampon héparine contenant 1M NaCl et conservé dans le même tampon avec 0.01% (P/V) d'azide de sodium.

2.2.3. Contrôle de pureté de la XOR

La pureté de l'enzyme est contrôlée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du SDS et par balayage spectral entre 200 et 700 nm.

2.2.3.1. Spectre d'absorbance UV-Vis

La XOR possède un spectre d'absorbance spécifique. Un balayage spectral est effectué entre 200 et 700 nm (spectrophotomètre Techom 8500 UV-Vis) et le PFR (Protein-flavin ratio : A_{280}/A_{450}) (absorbance de la protéine/ absorbance du centre FAD) est utilisé comme un indice de pureté ; plus le PFR est proche de 5 plus l'enzyme est pure (Bray, 1975).

2.2.3.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du SDS

La pureté et le poids moléculaire sont déterminés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 7% en présence du sodium dodécyl sulfate (SDS) selon Laemmli (1970). Les échantillons et les témoins de poids moléculaires (Sigma) (29 kDa-116 kDa) sont dissociés par chauffage à 100°C pendant 5 min dans la solution d'échantillon (V/V) puis injectés (20-40 µg/ puit). La migration débute sous 10 mA jusqu'à l'entrée des échantillons dans le gel de concentration puis la tension est augmentée à 30 mA. Après migration, les protéines sont fixées et colorées dans la solution de coloration contenant 0.2% (P/V) bleu brillant R250 pendant une heure. Le gel est ensuite décoloré dans l'acide acétique à 10% (V/V).

2.2.4. Activités enzymatiques de la xanthine oxydoréductase

Les activités oxydase et déshydrogénase sont mesurées par spectrophotométrie en aérobie, selon la méthode de Nakamura et Yamazaki (1982). L'activité = Nombre de µmole de substrat transformé / min (unité internationale, UI).

Les trois activités de l'enzyme : xanthine oxydase, xanthine déshydrogénase, NADH oxydase ont été testées dans un tampon phosphate (50 mM; pH 7.4; 0.1 mM EDTA). La réaction est déclenchée par l'ajout d'une quantité appropriée de XOR au milieu réactionnel.

L'activité Xanthine oxydase correspond à l'oxydation de la xanthine en urate à 295 nm ($\Sigma\text{urate} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), le milieu réactionnel contient 100 μM Xanthine. L'activité Xanthine déshydrogénase exprime la réduction du NAD^+ en NADH à 340 nm ($\Sigma\text{NADH} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Le milieu réactionnel contient 100 μM Xanthine, 500 μM NAD^+ . L'activité totale (xanthine oxydoréductase + xanthine oxydase) est mesurée à 295 nm ($\Sigma\text{urate} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) dans un milieu réactionnel contenant 100 μM Xanthine et 500 μM NAD^+ . L'activité NADH oxydase correspond au dosage de la disparition du NADH du milieu réactionnel à 340 nm ($\Sigma\text{NADH} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Le milieu réactionnel contient 100 μM NADH.

2.3. Préparation des anticorps Anti-XOR

2.3.1. Immunisation

Les rats Albino Wistar ont été immunisés selon la méthode de Rousseaux-Prévost *et al.* (1989) avec modifications. 400 μg de BXOR dans 200 μl PBS ont été émulsifiés avec le même volume de l'adjuvant complet de Freund (ACF). Le mélange a été administré par injections intradermiques à différents points sur le dos des rats après anesthésie et épilation. Quatre rappels ont été effectués par la suite espacés de 15 jours, l'adjuvant incomplet de Freund (AIF) a été utilisé dans ces rappels. Sept jours après chaque rappel, 1.5 ml de sang est récupéré par voie rétro-orbitale. Après le dernier rappel le maximum de sang est récupéré par décapitation de l'animal. Le sang ainsi obtenu est laissé coaguler 4 h à température ambiante puis une nuit à 4°C. Le sérum est récupéré par centrifugation 3000 tpm pendant 15 min puis conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

2.3.2. Titration des Anti-XOR par ELISA

Les sérums de rats récupérés après chaque rappel sont titrés pour leur teneur en IgG anti-BXOR par ELISA indirecte (Enzyme Immunosorbent Assay) (Benboubetra *et al.*, 1997). Les plaques de microtitration sont adsorbées avec 5-10µg/mL de HXOR ou BXOR dilué dans le tampon carbonate-bicarbonate de sodium (50 mM, pH 9.6) pendant 4 h à température du laboratoire. Les plaques sont lavées 3 fois pendant 5 min, après cette étape et après chaque étape suivante, avec le tampon PBS-Tween (10 mM, pH 7.4, 0.05% Tween 20). Les sites encore libres sont saturés par la caséine 2% (P/V) dans le PBS-tween pendant une nuit à 4°C puis une heure avec agitation à 37°C. Les sérums dilués dans le PBS-Tween sont ensuite ajoutés et incubés pendant 90 min à 37°C avec agitation. Les IgG de lapin anti-IgG de rat conjugués à la peroxydase et dilués à 1/4000 dans PBS-Tween sont ajoutés et incubés 90 min à 37°C avec agitation. La réaction immunitaire est révélée par ajout de l'Orthophénylene Diamine (OPD, Sigma) dans la solution de substrat (Diagnostics pasteur, France). La réaction est arrêtée avec 50 µl H₂SO₄ (1N). L'absorbance est mesurée à 492 nm avec un lecteur ELISA (Stat Fax-2100).

2.3.3. Précipitation des IgG par sulfate de sodium

La précipitation par sulfate de sodium est utilisée pour obtenir une fraction riche en IgG (Benboubetra, 1989). 18 % de sulfate de sodium sont ajoutés au sérum graduellement avec agitation. Le sérum est agité une heure, puis laissé reposer une heure, puis centrifugé à 4000 tpm /30 min (centrifugeuse Hettich universal 2S), le précipité est dissout et lavé par centrifugation trois fois avec le tampon de lavage (0.1M CaHCO₃, 18% sulfate de sodium). Le précipité final est dissout dans du tampon phosphate (0.1 M, pH 8) pour obtenir le volume initial du sérum et dialyser contre le même tampon une nuit à 4°C.

2.3.4. Purification des IgG sur Protéine A-Agarose

La pureté des IgG obtenus par précipitation est augmentée par passage sur une colonne d'affinité Protéine A agarose. La fraction d'IgG dialysée une nuit contre le tampon phosphate (0.1 M Na_2HPO_4 , pH 8) est injectée dans la colonne Protéine A-Agarose préalablement équilibrée par le même tampon, après un recyclage de 4 heures la colonne est lavée par le tampon phosphate et les IgGs sont éluées par le tampon Glycine-HCl (0.2 M Glycine, pH 2.8) dans des fraction de 2.5 ml où chaque fraction est récupéré dans 1 ml Tris-HCl 1 M, pH 8.5.

Pour assurer l'obtention d'un maximum d'IgG, la fraction non adsorbée est réinjectée dans la colonne après rééquilibration, recyclée 4 h et les IgG éluées par Glycine-HCl. Les fractions obtenues sont mélangées concentrées et dialysées contre le tampon phosphate de sodium 50 mM; pH 7.4; 0.1 mM EDTA pendant une nuit à 4°C. La colonne est ensuite régénérée par lavage avec le tampon phosphate puis le tampon acétate de sodium (0.1 M, pH 4, 0.5 M NaCl), et finalement conservée dans le tampon phosphate contenant 0.01% azide de sodium.

2.3.5. Purification des IgG anti-XOR par immunoaffinité

2.3.5.1. Préparation de la colonne d'immunoaffinité BXOR-Agarose

La colonne a été préparée avec le gel Agarose 4% activé par le bromure de cyanogène en suivant le protocole de la firme Sigma (www.sigma-aldrich.com).

Le gel est lavé et gonflé par du HCl 1 mM préalablement refroidi pendant au moins 30 min. En total 200 ml d'HCl par gramme de gel sont ajoutés par aliquotes, le surnageant étant éliminé à chaque fois. Le gel est ensuite lavé par l'eau distillée 5 à 10 fois son volume, puis avec le tampon de couplage (0.1 M NaHCO_3 , 0.5 M NaCl, pH 8.3) 5 ml pour 1 gramme de gel et immédiatement transféré dans la solution du ligand préalablement dialysé une nuit contre le tampon de couplage. Le ligand est mélangé 2 heures à température ambiante ou une nuit à 4°C en utilisant un agitateur à renversement (l'agitateur magnétique casse les billes du gel). Le reste

non fixé du ligand est éliminé par lavage avec le tampon de couplage. Les groupements réactifs encore libres sont bloqués par 0.2 M Glycine, pH 8 pendant 2 heures à température ambiante ou 16 heures à 4°C. Finalement le gel est lavé par le tampon de couplage pH 8.3, puis avec le tampon acétate (0.1 M; 0.5 M NaCl; pH 4). Le cycle de lavage pH basique / pH acide est appliqué 5 fois. Le gel est utilisé immédiatement ou conservé à 4°C avec 1 M NaCl contenant 0.01% (P/V) Azide de sodium.

2.3.5.2. Purification des IgG anti-BXOR sur colonne BXOR-Agarose

Le protocole et les tampons utilisés sont les mêmes que ceux utilisés pour la colonne ProtéineA-Agarose précédemment citée.

Les IgG anti-BXOR sont directement purifiés à partir de la fraction d'IgG obtenue par précipitation pour éviter la perte en IgG constaté lors de la purification sur la colonne protéineA-Agarose. La fraction non adsorbée issue de la première application sur la colonne est réinjectée une deuxième fois pour assurer la récupération de la totalité des IgG anti-BXOR. Les fractions éluées de la colonne sont mélangées, concentrées, et dialysées une nuit contre le tampon phosphate (50 mM; 0.1mM EDTA; pH 7.4), puis conservées à -20°C.

2.3.6. Tests de pureté et réactivité des anti-BXOR

La pureté des fractions d'IgG est testée par SDS-PAGE avec un gel de séparation de 7% (voir 2.2.3.2.). Quant à leur réactivité, elle a été testée par trois techniques : Western blot, dot immunobinding et la technique de double immunodiffusion sur agarose d'Ouchterlony.

2.3.6.1. Western blot

Après la fin de l'électrophorèse de la xanthine oxydoréductase les bandes protéiques sont transférées sur papier de nitrocellulose par migration sous un champ électrique selon la méthode de Tsang *et al.* (1983). Le papier nitrocellulose saturé avec le tampon de transfère (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20 % Méthanol, pH 8.3) est déposé sur le gel de polyacrylamide.

L'ensemble est recouvert des deux cotés par plusieurs couches de papier filtre saturé par le même tampon. Le montage est immergé dans le tampon de transfert et subit une migration sous 40 mA pendant une nuit. A la fin de la migration le papier de nitrocellulose est coloré par le rouge ponceau (4 % dans l'acide trichloroacétique) pour confirmer le transfert des protéines, puis lavé avec le TBS (50 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.4). Les sites encore libres sont bloqués par incubation 2 heures avec la caséine (2 % dans TBS). Après lavage avec TBS, le papier nitrocellulose est incubé avec les anti-BXOR (dilué 1/100 dans le TBS) pendant 90 min, lavé par le TBS et finalement incubé pendant 90 min avec les IgG de lapin anti-IgG de rat marqués à la peroxydase. Après lavage la réaction immunitaire est révélée par le chromogène chloronaphtol (3 mg dans 1 ml méthanol + 2 µl H₂O₂ à 30% dans 5 ml TBS). Après développement de la coloration le papier est lavée par du TBS et conservé à l'abri de la lumière (Arrar, 1987).

2.3.6.2. Dot immunobinding

Le principe est le même que le Western blot à l'exception que l'antigène est directement déposé sur le papier nitrocellulose (Hawkes *et al.* 1982).

Des carrés d'un cm sont tracés sur le papier de nitrocellulose à l'aide d'un crayon. Le papier est ensuite imbibé par l'eau distillée, séché et les antigènes dilués dans le TBS sont déposés (5 µl / carré). Le papier de nitrocellulose est séché à l'air libre et peut être conservé pendant plusieurs semaines sans perte de la réactivité des antigènes. Les autres étapes sont les même que celles du western blot (Arrar, 1987).

2.3.6.3. Double immunodiffusion d'Ouchterlony

Cette méthode est basée sur la double diffusion des anticorps et des antigènes sur un gel d'agarose. L'Ouchtetlony se pratique en agarose à 1% (P/V) en tampon véronal à pH 8.4 (Ouchterlony, 1958). À un volume de tampon véronal on ajoute un volume d'eau distillée et du

l'azide de sodium 0.1% (P/V), le mélange est ensuite porté à 100°C, on ajoute alors l'agarose et on le laisse à ébullition pendant 25 à 30 min puis à l'aide d'une pipette préalablement chauffée et rincée à l'eau distillée bouillante on dépose du mélange dans des boîtes pétrie et on les laisse se solidifier deux heures à température ambiante avant de les utiliser. Des réservoirs de 2 à 3 mm de diamètres sont creusés dans le gel et les échantillons déposés. Le gel est gardé horizontalement pendant 3 jours à température ambiante et en atmosphère humide pour éviter toute dissociation en surface. Puis lavé pendant 24 h dans de l'eau physiologique avec renouvellement du bain. Le gel est ensuite coloré pendant 30 min (bleu brillant R250 0.1%, méthanol 70%, acide acétique 10%, H₂O distillée 20%), puis décoloré dans la même solution sans bleu brillant R250.

2.3.7. Inhibition de l'activité enzymatique de la XOR par les anti-XOR

Les IgG anti-BXOR purifiés ont été testés pour leur inhibition de l'activité Xanthine oxydase, Xanthine déshydrogénase ainsi que l'activité NADH oxydase des deux enzymes BXOR (406 µg/ml) et HXOR (222 µg/ml). Le tampon phosphate et les IgG de rat (225µg/ml) non immunisés ont été utilisés comme contrôle négatif et l'allopurinol (50 µM) comme contrôle positif pour l'inhibition de l'activité enzymatique.

L'enzyme est préalablement incubée avec différentes concentrations de l'anti-BXOR une heure à 37°C (**Tableau 5**). Etant donné que les activités xanthine déshydrogénase et NADH oxydase de l'enzyme bovine étaient très faibles, cette dernière a été préalablement transformée vers la forme déshydrogénase par incubation avec le dithiothreitol (DTT) 10 mM une heure à 37°C.

Tableau 5: Les différentes concentrations utilisées d'anti-BXOR

	IgG rat témoin	AC1	AC2	AC 3	AC4	AC5
Concentration (µg/ml)	225	27.93	55.87	83.812	111.75	223.5

2.4. Dosage des protéines

La concentration de l'enzyme XOR a été estimée en se basant sur l'absorbance du centre FAD à 450 nm ($\Sigma FAD = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Pour les autres protéines l'estimation est faite selon la méthode de Bradford (1976) modifiée par Macart et Gerbaut (1982). Une courbe d'étalonnage est établie en utilisant sérum albumine humaine comme standard (**Figure 17**).

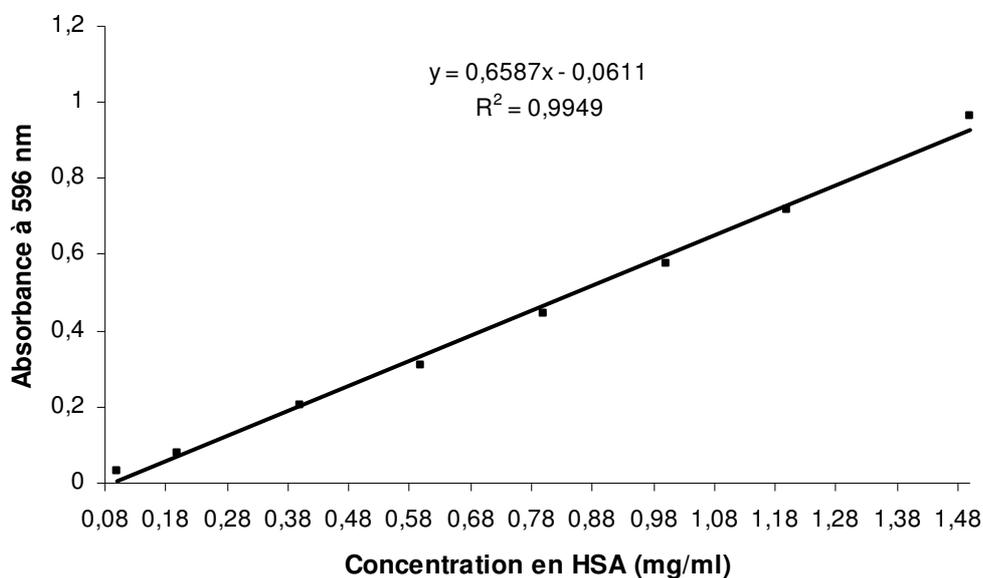


Figure 17 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976) modifiée par Macart et Gerbaut (1982).

2.5. Analyse statistique

Les valeurs sont la moyenne \pm SD ou SEM. Le test *t* de Student est utilisé pour comparer les moyennes (Schwartz, 1992). Les différences avec une probabilité inférieure à 0.05 sont considérées statistiquement significatives.

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS

1. Etude des paramètres de l'arthrite induite par le collagène II

L'arthrite est induite chez le rat Albinos Wistar par l'injection d'une dose immunisante de collagène type II avec un rappel après sept jours. Suite à l'immunisation, des ulcères se forment à l'endroit de l'injection puis se cicatrisent totalement dans 10 jours sans séquelles permanentes. Ces ulcérations sont probablement dues à l'adjuvant complet de Freund (huile de paraffine renfermant des bactéries).

Les premiers signes significatifs du développement de l'arthrite ne commencent à apparaître qu'au bout de 14 jours de la première injection. Ce temps correspond à environ sept jours de l'apparition des anticorps spécifiques (réponse primaire) (Roitt *et al.*, 1985). Cette observation montre la rapidité avec laquelle les anti-collagène II commencent à détruire le cartilage en créant un site inflammatoire dû à la formation de complexes immunitaires collagène-anti collagène qui activent le complément générant des anaphylatoxines (C3a et C5a). La maladie atteint son maximum au 21^{ème} jour puis rechute pour s'arrêter finalement d'évoluer au bout de 60 jours laissant des articulations déformées. Il est à noter que malgré la sévérité de la maladie aucune mortalité n'a été observée.

L'arthrite typique a touché 70 % (7/10) des rats et les articulations impliquées sont essentiellement les articulations distales des pattes postérieures : cheville, articulations métatarso-phalangiennes et interphalangiennes. Le genou est également affecté chez certains rats. Le gonflement touche en premier lieu la cheville et les tissus qui l'entourent, puis se propage pour atteindre toute la patte qui devient rouge et ankylosée. Les métatarso-phalangiennes et les interphalangiennes ne sont atteintes que tardivement donnant un maximum de gonflement de la patte.

L'arthrite n'est bilatérale que pour 48.85% (3/7) des rats arthritiques (**Figure 18f et g**), une seule patte est atteinte pour les autres (**Figure 18e**). Dans 28.57% (2/7) des rats arthritiques, les pattes antérieures sont aussi impliquées mais le gonflement reste localisé dans quelques articulations interphalangiennes (**Figure 18b, c**).



Figure 18: Comparaison des pattes normales et arthritiques. En (a) pattes antérieures de témoin non arthritique, (b) et (c) pattes antérieures de rat arthritique, (d) pattes postérieures de témoin non arthritique, (e), (f) et (g) pattes postérieures de rats arthritiques (*respectivement : unilatéral, bilatéral, et bilatéral vue de profil*).

Dans un essai préliminaire l'adjuvant de Freund qui provoque l'arthrite chez les souches de rat plus sensibles (Lorentzen, 1999), n'a montré aucun effet sur les rats Albinos Wistar. De plus aucune différence n'est observée entre le groupe témoin immunisé par l'émulsion adjuvant incomplet de Freund-acide acétique et celui immunisé par l'émulsion adjuvant complet de Freund dans l'acide acétique. Pour l'évaluation de la maladie nous avons choisi l'étude des paramètres décrits dans la bibliographie (Hildebrandt *et al.*, 2000; Campo *et al.*, 2003).

1.1. Volume de l'œdème

Le volume des quatre pattes de chaque rat est mesuré par pléthysmomètre le jour de l'induction de l'arthrite et la différence entre cette mesure et les mesures ultérieures représente le volume de l'œdème. L'augmentation du volume d'œdème du groupe arthritique par rapport au normal ne devient significative qu'au 14^{ème} jour ($p \leq 0.05$) puis elle augmente très rapidement pour atteindre un maximum le 21^{ème} jour ou les pattes gagnent 130.05% ($p \leq 0.01$) de leur volume initial en comparaison avec le groupe normal dont les pattes ne gagnent que 20.73% de leur volume initial suite à la croissance normale. Le gonflement diminue ensuite graduellement pour disparaître finalement au bout de 60 jours laissant des articulation déformées. Néanmoins, il reste significatif jusqu'au 30^{ème} jour ($p \leq 0.01$) (**Figure 19**).

1.2. Poids corporel

Les rats arthritiques ne supportent plus la peine causée par le déplacement sur leurs pattes oedémateuses et nous avons remarqué qu'ils atteignent difficilement la nourriture. Ce qui, en plus de l'inflammation généralisée, a influencé énormément le poids du groupe. Les rats du groupe malade ont perdu jusqu'à 8.68% de leur poids initial au bout de 30 jours ($p \leq 0.05$) en comparaison avec le groupe normal qui lui à gagné 6.42 % de son poids (**Figure 20**).

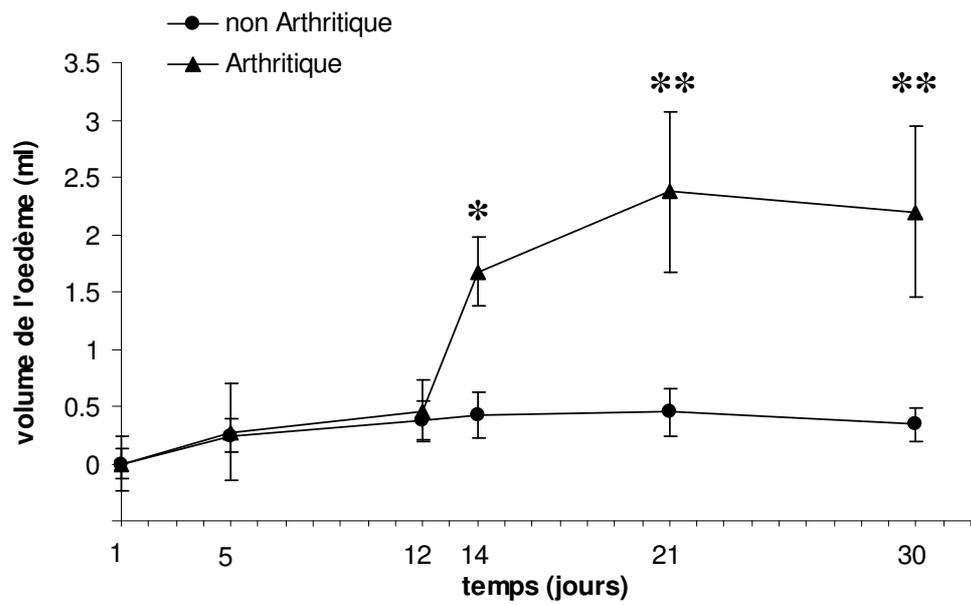


Figure 19: Volume de l'œdème : les valeurs représentent la moyenne \pm SEM. Les étoiles représentent les différences significatives ; * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$).

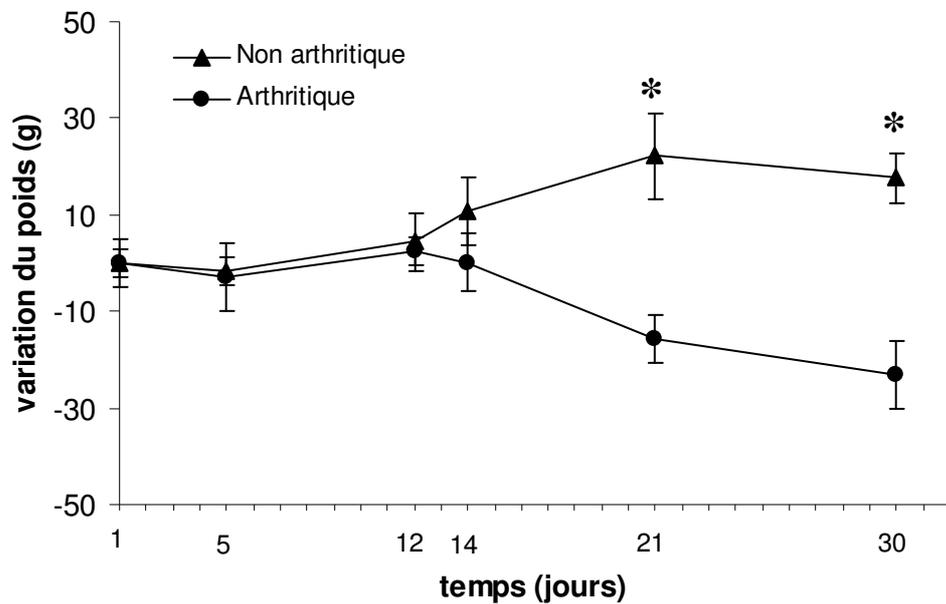


Figure 20: Changement du poids corporel (poids – poids initial). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM. Les étoiles représentent la signification selon le test t de Student ($p \leq 0.05$).

1.3. Vitesse de sédimentation des globules rouges

L'inflammation s'est répercutée aussi sur la vitesse de sédimentation des globules rouges qui augmente légèrement dès la déclaration de l'arthrite au 14^{ème} jour. Elle arrive ensuite à un maximum au 21^{ème} jour, dépassant de 4 fois celle du groupe témoin ($p \leq 0.01$). Ensuite la VS commence à revenir à la normale avec la diminution de l'intensité de l'arthrite, mais elle reste néanmoins élevée jusqu'au 30^{ème} jour donnant 2.3 fois la valeur du groupe témoin ($p \leq 0.01$) (Figure 21).

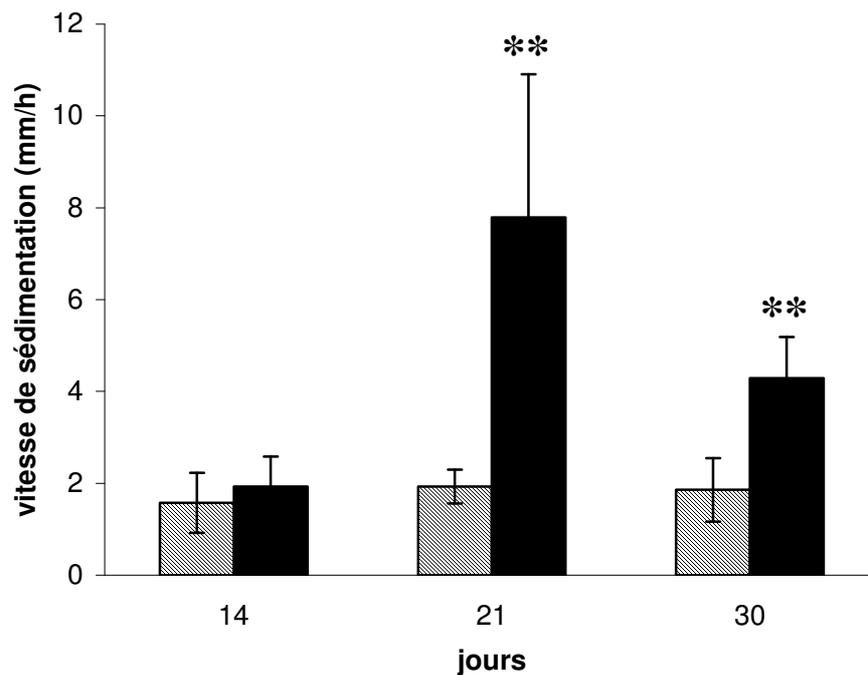


Figure 21: Vitesse de sédimentation (VS). Chez les rats normaux  et arthritiques . Les valeurs sont la moyenne \pm SEM, elles représentent la sédimentation des globules rouge pendant une heure dans des capillaires. Les étoiles représentent la signification selon le test *t* de Student ($p \leq 0.01$).

1.4. Histopathologie

Une vue globale des coupes histologiques réalisés sur les pattes antérieures et postérieures (le 30^{ème} jour) montre la ressemblance des pattes intérieures arthritiques et normales, la seule différence réside dans la prolifération de la membrane synoviale de quelques articulations interphalangiennes (**Figure 22a et b**). Par contre la différence est très nette entre les pattes postérieures. L'inflammation est essentiellement périarticulaire (touchant les tissus environnant les articulations) (**Figure 22c et d**).

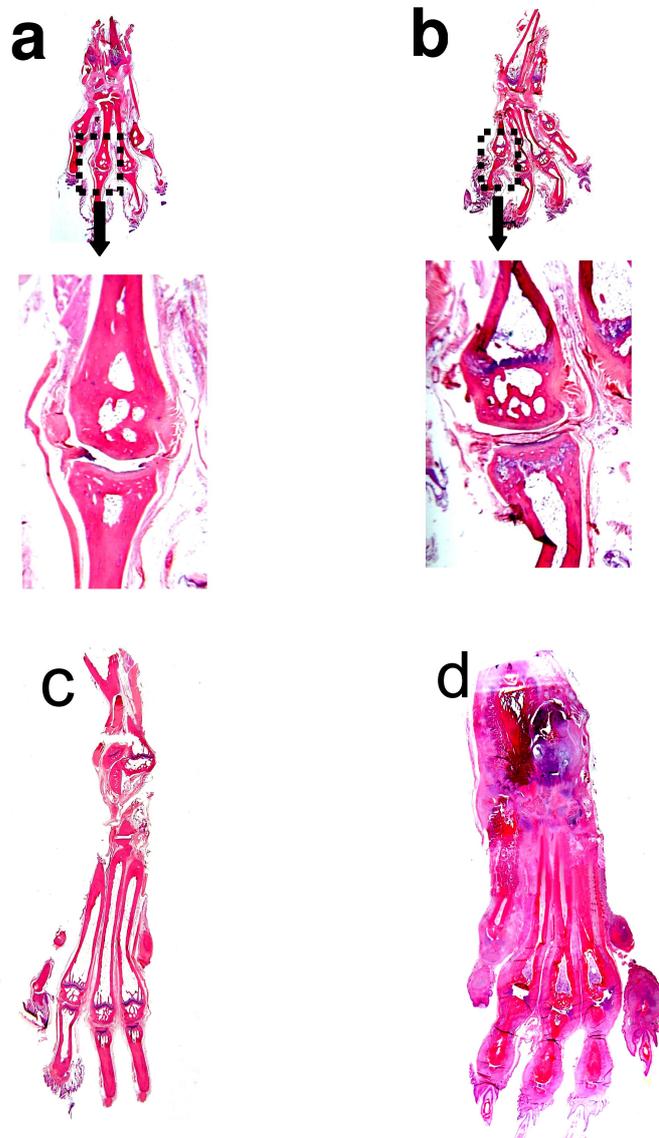


Figure 22: Vue globale des coupes histologiques En (a) patte antérieure de rat arthritique, (b) patte antérieure de témoin non arthritique. En (d) patte postérieure de rat arthritique, (c) témoin non arthritique.

1.4.1. Infiltration des leucocytes

L'œdème et les médiateurs inflammatoires attirent les leucocytes qui infiltrent les tissus articulaires et péri-articulaires. L'infiltration leucocytaire touche la membrane synoviale (**Figure 23b**). La membrane non arthritique contient elle aussi quelques leucocytes (**Figure 23a**). Parmi les leucocytes infiltrants on observe des monocytes et un grand nombre de polynucléaires. La moelle osseuse non arthritique contient des amas de globules rouges facilement identifiables par leur forme en lentilles mais pas de cellules inflammatoires (**Figure 23c, e**). Par contre, celle des arthritiques renferme en plus des globules rouges des leucocytes et des ostéoclastes (**Figure 23d, f**) qui prolifèrent et s'activent sous les conditions inflammatoires de l'articulation (Bolon *et al.*, 2004).

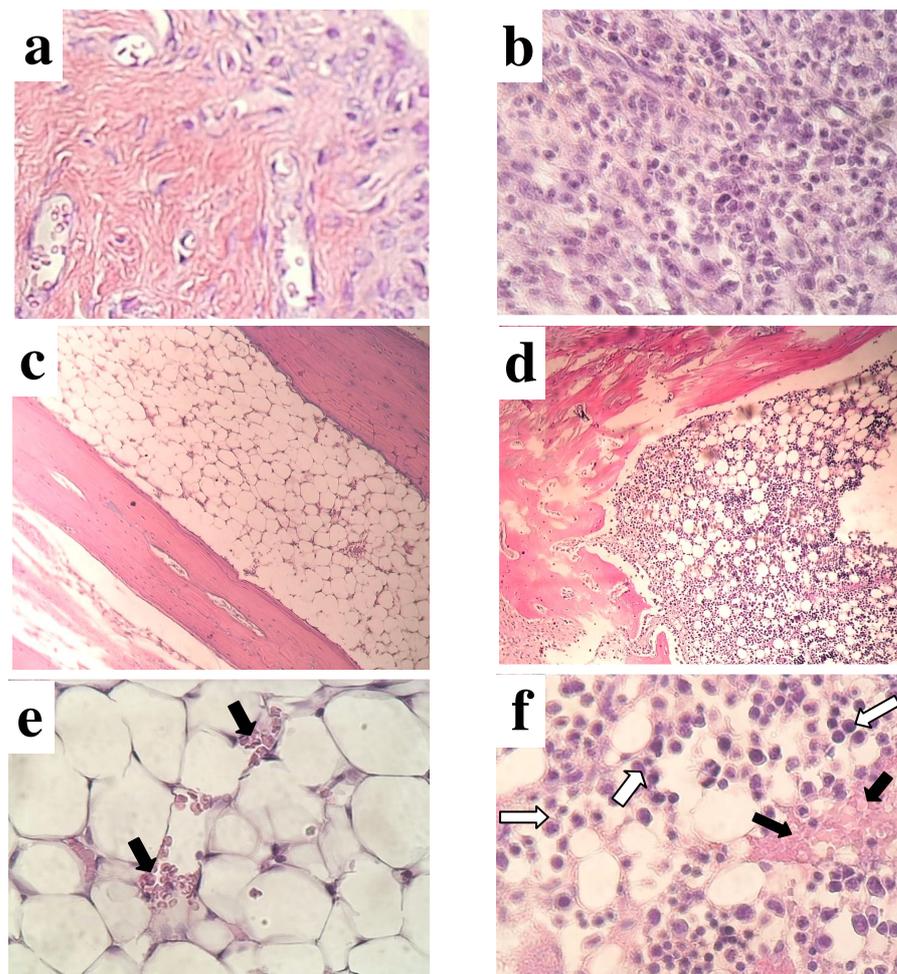


Figure 23: Prolifération et infiltration cellulaire : En (a), (c) et (e) témoin non arthritique. En (b) prolifération de la synovial et son infiltration par les leucocytes (grossissement 100X). En (d) et (f) prolifération des ostéoclastes et invasion de la moelle osseuse (grossissement 100X et 400X respectivement). \Rightarrow Ostéoclastes, \blacksquare Globules rouges.

I.4.2. Formation du pannus et destruction du cartilage et de l'os

Chez le rat arthritique, la prolifération de la membrane synoviale est bien visible (**Figure 24a, b**). On constate même la formation d'un "pannus" qui ressemble beaucoup à celui observé dans la maladie humaine (Brostoff et *al.*, 1993). On note également l'insertion du pannus formé dans la cavité articulaire pour arriver au contact direct avec le cartilage et l'os. Des régions de dégradation du cartilage et de l'os sont très visibles (**Figure 24c, d et e**). Cette observation explique bien les raisons de la lourdeur remarquée dans le mouvement des rats arthritiques.

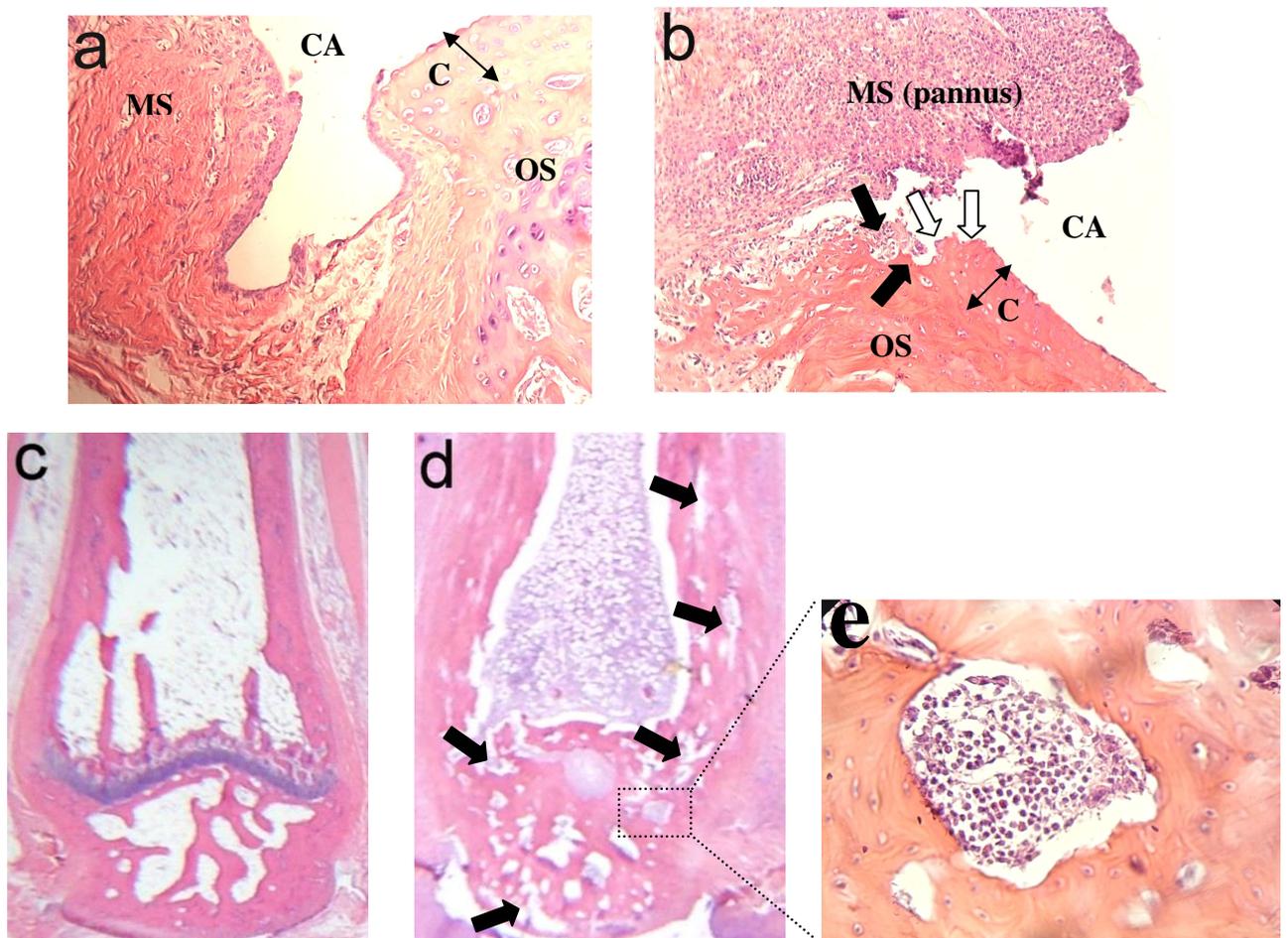


Figure 24: Formation du pannus et dégradation du cartilage et de l'os. (a) témoin non arthritique, (b) dégradation du cartilage et érosion de l'os cortical (grossissement à 100X). (c) témoin non arthritique, (d) et perte de l'os trabéculaire sous l'action des ostéoclaste, (e) grossissement 400X de (d).

⇨ perte du cartilage, ➡ perte de l'os, ↔ épaisseur du cartilage, MS membrane synoviale, C cartilage.

2. Etude de l'effet inhibiteur des anticorps anti-XOR

2.1. Purification de la XOR bovine et humaine

L'extrait brut obtenu à partir du lait après deux précipitations successives au sulfate d'ammonium est passé sur une colonne d'héparine-agarose. L'enzyme bovine est éluée avec 0.2 M NaCl alors que l'enzyme humaine est éluée par 0.4 M NaCl. Cette différence de force ionique nécessaire pour l'éluion est dépendante de l'affinité de l'enzyme de différentes espèces envers l'héparine.

Le spectre d'absorbance UV/Vis des deux enzymes dans l'intervalle 250-700 nm montre trois pics d'absorbance à 280, 330 et 450 nm, caractéristiques de la xanthine oxydoréductase (Bray, 1975) (**Figure 25**).

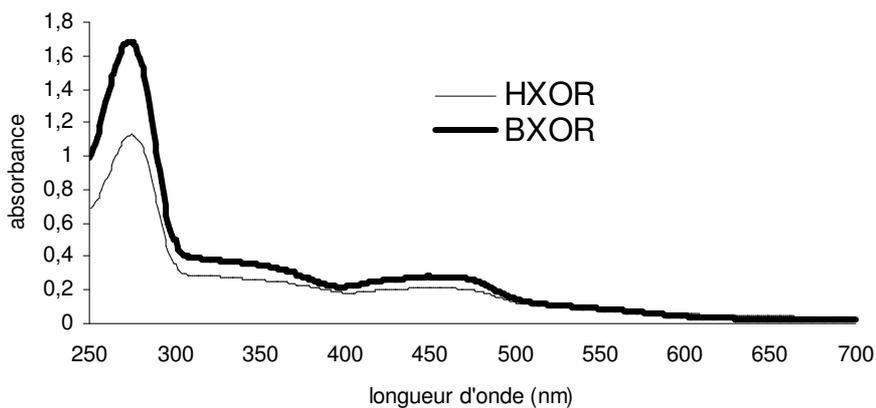


Figure 25: Spectre d'absorbance de la XOR humaine et bovine

La pureté des deux enzymes est estimée par le rapport protéine/flavine (PFR) et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du SDS (SDS-PAGE). Le PFR de la XOR humaine et bovine est de 5.04 et 4.68 respectivement. En SDS-PAGE la BXOR a donnée une bande majeure de PM 149880 Da et une bande mineure de PM 124880 Da qui correspondrait à une dégradation limitée de l'enzyme. La HXOR a donnée une seule bande de PM 148880 Da (**Figure 26**).

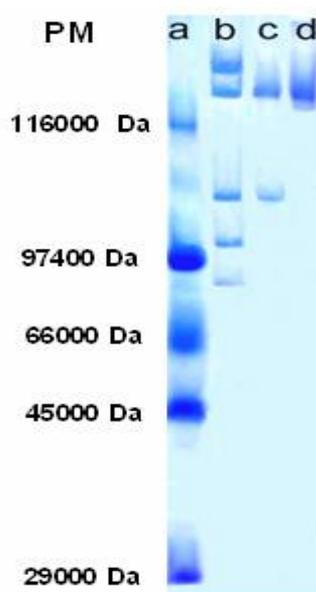


Figure 26: SDS-PAGE de la XOR sur gel de polyacrylamide 7%. (a) témoins de poids moléculaire (Galactosidase 116000 Da, Anhydrase carbonique 97400 Da, Ovalbumine 66000 Da, Albumine bovine 45000 Da, Phosphorylase 29000 Da), (b) extrait brut BXOR, (c) BXOR, (d) HXOR.

Le rendement de la purification est de 3.87 mg/L pour l'enzyme humaine, et entre 6.30 et 9.43 pour l'enzyme bovine (**Tableau 6**). Le faible rendement de la HXOR pouvait être dû à la congélation décongélation. L'activité spécifique xanthine oxydoréductase (XOR) de la HXOR est de 66.72 ± 1.63 mUI/mg, plus de 70% de cette activité est sous la forme oxydase (46.99 ± 1.05 mUI/mg). Par déduction, l'activité xanthine déshydrogénase doit avoisinée 30%. La mesure directe de cette activité n'a donnée que près de 12% (8.62 ± 0.35 mUI/mg). L'activité XOR de l'enzyme bovine qui est supérieure à celle de l'enzyme humaine (en moyenne 1200.5 mUI/mg). 98.9% de cette activité XOR est sous la forme oxydase, la forme déshydrogénase est indétectable par mesure directe.

Tableau 6: Activités enzymatiques de la XOR purifiée, BXOR₁ et BXOR₂ représentent l'enzyme bovine obtenue lors de deux purifications. Les valeurs sont la moyenne \pm SD (3 mesures).

	Concentration (mg/ml)	Rendement mg/litre de lait	PFR	Activité XOR (mUI/ml)	Activité XO (mUI/ml)	Activité XDH (mUI/ml)	Activité NADHO _x (mUI/ml)
BXOR₁	2.265	9.43	4.68	4192 \pm 6.5	4147.2 \pm 5.5	---	---
BXOR₂	0.812	6.30	6.01	446.8 \pm 3.3	432.4 \pm 9.2	8.25 \pm 0.1	5.03 \pm 0.2
BXOR₂ DTT	\	\	\	330.75 \pm 12.02	50.97 \pm 0.1	231.44 \pm 14.17	17.63 \pm 2.4
HXOR	0.894	3.874	5.04	59.65 \pm 1.46	42.01 \pm 1.04	7.71 \pm 0.32	37.83 \pm 0.37

L'activité spécifique NADH oxydase de l'enzyme humaine est de 42.31 ± 0.41 mUI/mg, très proche de son activité xanthine oxydase. Comme l'activité xanthine déshydrogénase, l'activité NADH oxydase de l'enzyme bovine était indétectable. Parmi quatre purifications que nous avons effectués une seule préparation BXOR a montré une activité détectable NADH oxydase (6.19 ± 0.24 mUI/mg) et xanthine déshydrogénase (10.16 ± 0.12 mUI/mg).

Pour pouvoir étudier l'activité xanthine déshydrogénase de l'enzyme bovine utilisée dans les tests d'inhibition, l'enzyme a été transformée par incubation une heure à 37°C avec 10mM dithiothréitol (DTT). La transformation de l'enzyme vers la forme déshydrogénase a causée la perte de 25% de l'activité total (BXOR2 DTT: 407.32 ± 14.8 mUI/mg) (mesuré sans éliminer le DTT du milieu réactionnel pour éviter le retour vers la forme oxydase). La conversion vers la forme xanthine déshydrogénase est proche de 70% (285.02 ± 17.45 mUI/mg). Cette

conversion a induit l'augmentation de plus de 3 fois l'activité NADH oxydase de l'enzyme (21.71 ± 2.95 mUI/mg).

Enfin, nous notons ici que le but de cette partie de l'étude de l'activité enzymatique est d'évaluer le rôle des anticorps anti-XOR dans l'inhibition de cette enzyme.

2.2. Etude de la réactivité des anticorps de rat anti-BXOR

2.2.1. Détermination des titres des sérums anti-XOR

Les sérums récupérés après chaque rappel des rats par la BXOR sont testés par ELISA. **La figure 27** montre les titres des sérums anti-XOR. On constate qu'après chaque rappel le titre sérique en anti-BXOR est le double de celui en anti-HXOR, cela est conséquent à l'immunisation qui a été faite par la BXOR.

Les sérums récupérés après le quatrième rappel ont été utilisés pour l'étude de leur effet sur l'activité de la XOR in vitro.

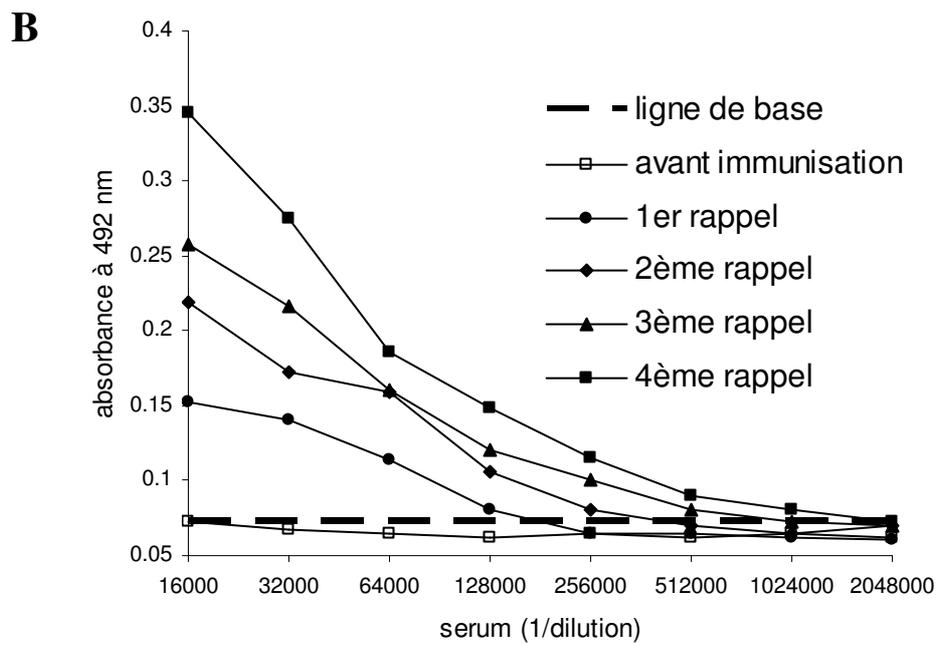
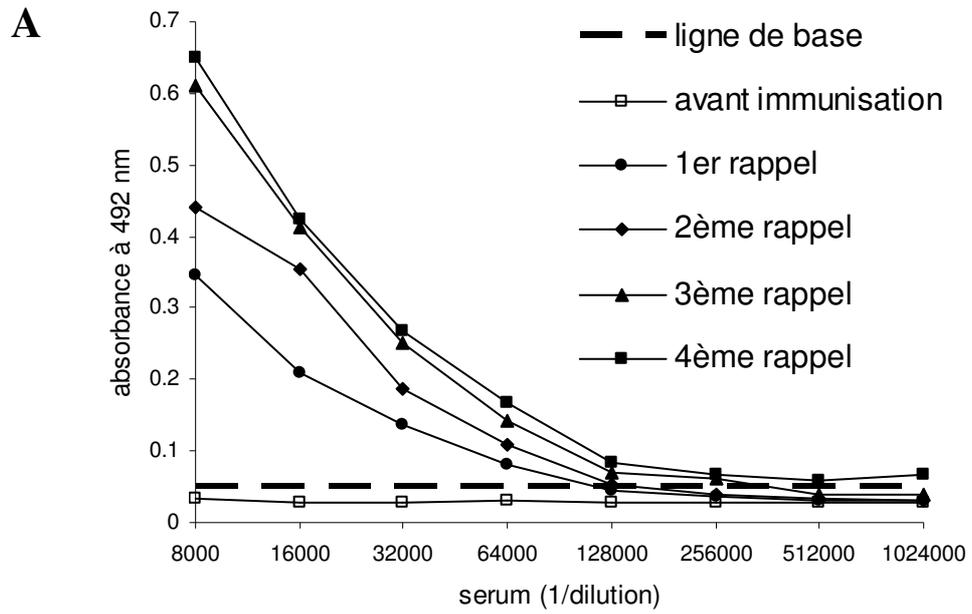


Figure 27: Titration du sérum des rats immunisés par la BXOR₂ contre la HXOR (A) et la BXOR (B).

2.2.2. Purification des IgG anti-XOR

Les IgG de rat ont été précipités au sulfate de sodium 18% (P/V). Il est à noter que malgré que ce protocole est mieux adapté pour la précipitation des IgG humaine et de lapin, nous avons obtenu un rendement important de 9.98 mg/ml à partir du sérum des rat immunisés et de 10.59 mg/ml à partir du sérum des rat non immunisés, ce qui représente respectivement 16.51% et 15.30 % des protéines totaux (**Tableau 7**). Pour plus de pureté, la fraction des IgG, précipités à partir du sérum des rats non immunisés, est passée sur une colonne de protéine A-Agarose (**Figure 28 A**). Malgré le recyclage de 4 heures et le deuxième passage et recyclage de la fraction non adsorbée (pic A), la quantité d'IgG récupérée n'excédait pas 13.69% de la fraction des IgG obtenues par précipitation (1.45 mg/ml). Ce rendement relativement bas est dû à la faible affinité observée entre l'IgG de rat et la protéine A. La protéine G, non disponible dans notre laboratoire, possède une meilleure affinité avec les immunoglobulines G de rat (Åkerström et Björck, 1986)

Pour obtenir les anticorps spécifiques à la BXOR, la fraction des IgG précipités du sérum des rats immunisés, est purifiée sur une colonne BXOR-Agarose directement sans le passage sur la colonne protéine A-Agarose, ce qui nous a évité la perte constatée lors de cette étape. La colonne BXOR-agarose à été préparé par couplage de 43.2 mg de BXOR avec 10 ml de gel d'agarose 4% activé par le bromure de cyanogène (selon le protocole de la firme Sigma). Le rendement du couplage est de 88.9% (3.84 mg/ml de gel). La fraction IgG est passée sur la colonne, est recyclée 4 heures avant l'élution des anticorps. Un deuxième passage de la fraction non adsorbée (pic A) a permis de récupérer le maximum d'IgG (**Figure 28 B**). Les IgG anti-BXOR récupérés représentent 4.47% de l'IgG obtenu par précipitation (447 µg/ml).

Par analyse en SDS-PAGE, toutes les fractions d'IgG purifiées ont donné une seule bande ayant la même distance de migration des IgG humaines commercialisées par Sigma (**Figure 29**).

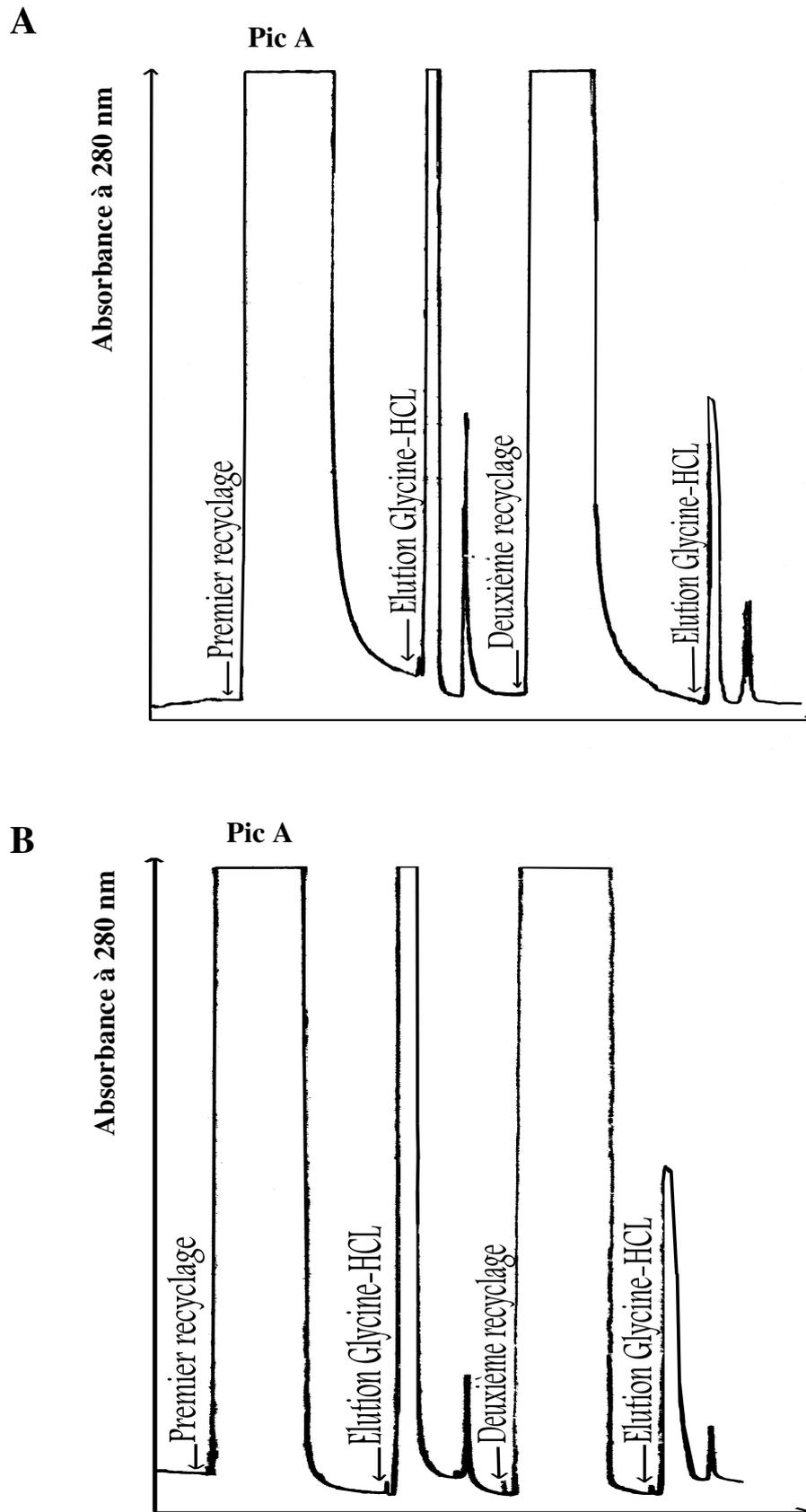


Figure 28: Purification des IgG par chromatographie d'affinité sur protéine A-Agarose (A) et sur BXOR-Agarose (B).

Tableau 7 : Concentration de l'IgG purifié

	Pn totaux (mg/ml)	IgG précipité (mg/ml)	IgG sur PnA-Agarose (mg/ml)	IgG anti-BXOR (mg/ml)
Sérum de rats immunisés	60.44	9.98	---	0.447
Sérum de rats non immunisés	69.19	10.59	1.45	---

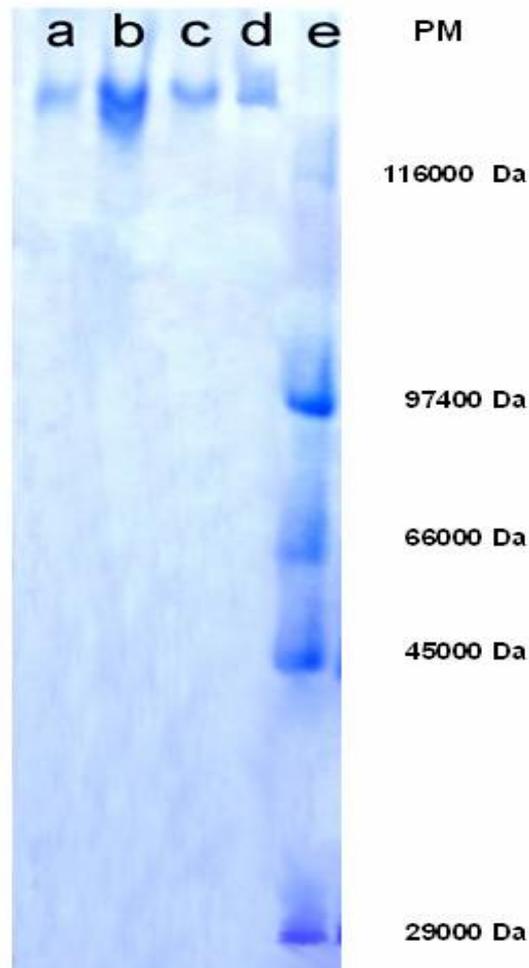


Figure 29: SDS-PAGE des différentes fractions des IgG. (a) IgG rat obtenus par précipitation, (b) IgG rat obtenus sur Protéine A-Agarose, (c) IgG rats anti-BXOR, (d) IgG humain de la firme Sigma, (e) témoins de poids moléculaire (Galactosidase 116000 Da, Anhydrase carbonique 97400 Da, Ovalbumine 66000 Da, Albumine bovine 45000 Da, Phosphorylase 29000 Da).

2.2.3. Réactivité des anticorps préparés

La réactivité des anticorps préparés (447 µg/ml) a été étudiée en plus de l'ELISA, par dot immunobinding, Western blot et la double immunodiffusion d'Ouchterlony.

En dot blot les anticorps anti-BXOR (dilués en 1/100) ont réagit avec la XOR d'origine humaine et bovine (extrait brute et enzyme pure), la réaction (révélée par le chromogène) diminue avec la dilution de l'antigène et elle est moins intense pour la HXOR que pour la BXOR (**Figure 30 A**). Cette différence d'intensité est remarquée aussi dans le Western blot avec, en plus, la réaction de l'anticorps avec les deux bandes de la BXOR (**Figure 30 B**). Ce qui confirme que la bande mineure (PM= 124880 Da) constatée en électrophorèse est issue d'une dégradation partielle de l'enzyme.

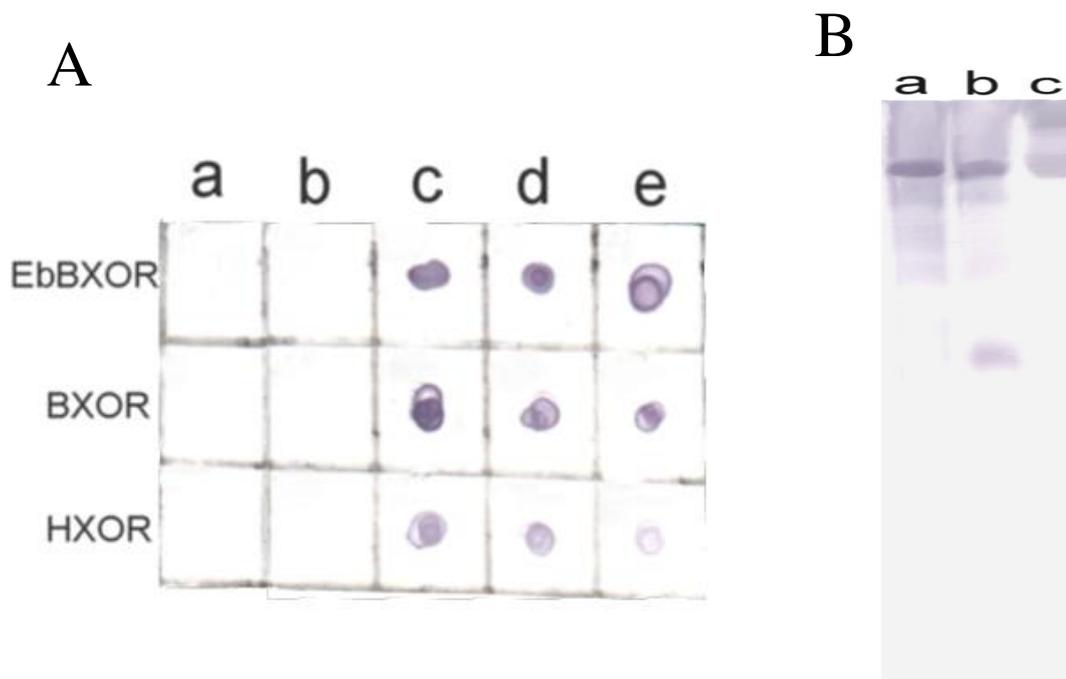


Figure 30: Dot immunobinding (A) et Western blot (B) de la XOR avec les anticorps de rat.

(A) : (a) contrôle deuxième anticorps seul, (b) contrôle antigène, (c, d, e) antigène dilué au 1/10, 1/20, 1/40. (B) : (a) extrait brut BXOR, (b) BXOR, (c) HXOR.

En immunodiffusion les anticorps préparés ont donné un arc de précipitation unique avec l'extrait brute de la BXOR ou avec la BXOR pure (**Figure 31**). Pour l'enzyme humaine aucun arc de précipitation n'a été remarqué malgré l'utilisation de plusieurs concentrations de l'enzyme. Ce qui est étonnant vue la réaction spécifique confirmée (ELISA, dot immunobinding et Western blot) entre l'anticorps et cette enzyme.

Il est à noter qu'un essai de réactivité avec la XOR caprine a donné une réaction positive en ELISA, dot immunobinding, Western blot ainsi qu'en Ouchterlony

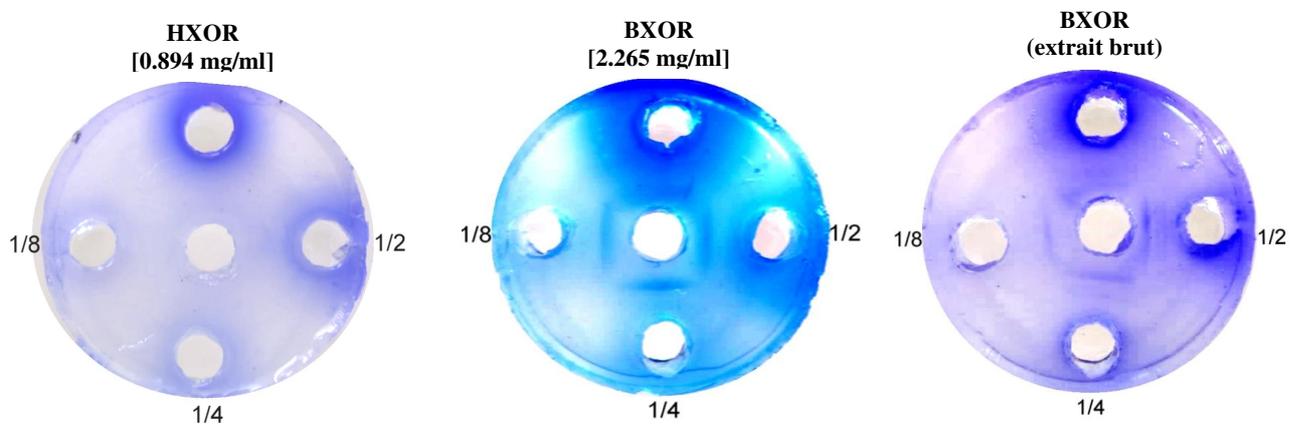


Figure 31: Double immunodiffusion d'Ouchterlony des anti-BXOR de rat avec quatre dilutions (1, 1/2, 1/4, 1/8) de l'enzyme humaine (HXOR) et bovine (BXOR).

2.2.4. Effet des anticorps de rats sur les activités de la Xanthine oxydoréductase

L'effet des anticorps préparés chez les rats sur les activités enzymatiques de la XOR a été testé dans un pH physiologique (7.4). Aucune inhibition des activités xanthine oxydase, xanthine déshydrogénase ou NADH oxydase de la XOR humaine (**Figure 32A**) et bovine (**Figure 32B**) n'a été constatée. Au contraire nous avons observé une augmentation de l'activité xanthine oxydase des deux enzymes après incubation une heure avec les anticorps. L'activité xanthine oxydase augmente avec la concentration de l'anticorps pour atteindre 28% et 12% (HXOR et BXOR respectivement, $p = 0.01$) avec la concentration (83.81 $\mu\text{g/ml}$), puis elle revient à la valeur initial avec une concentration d'anticorps de 223.5 $\mu\text{g/ml}$.

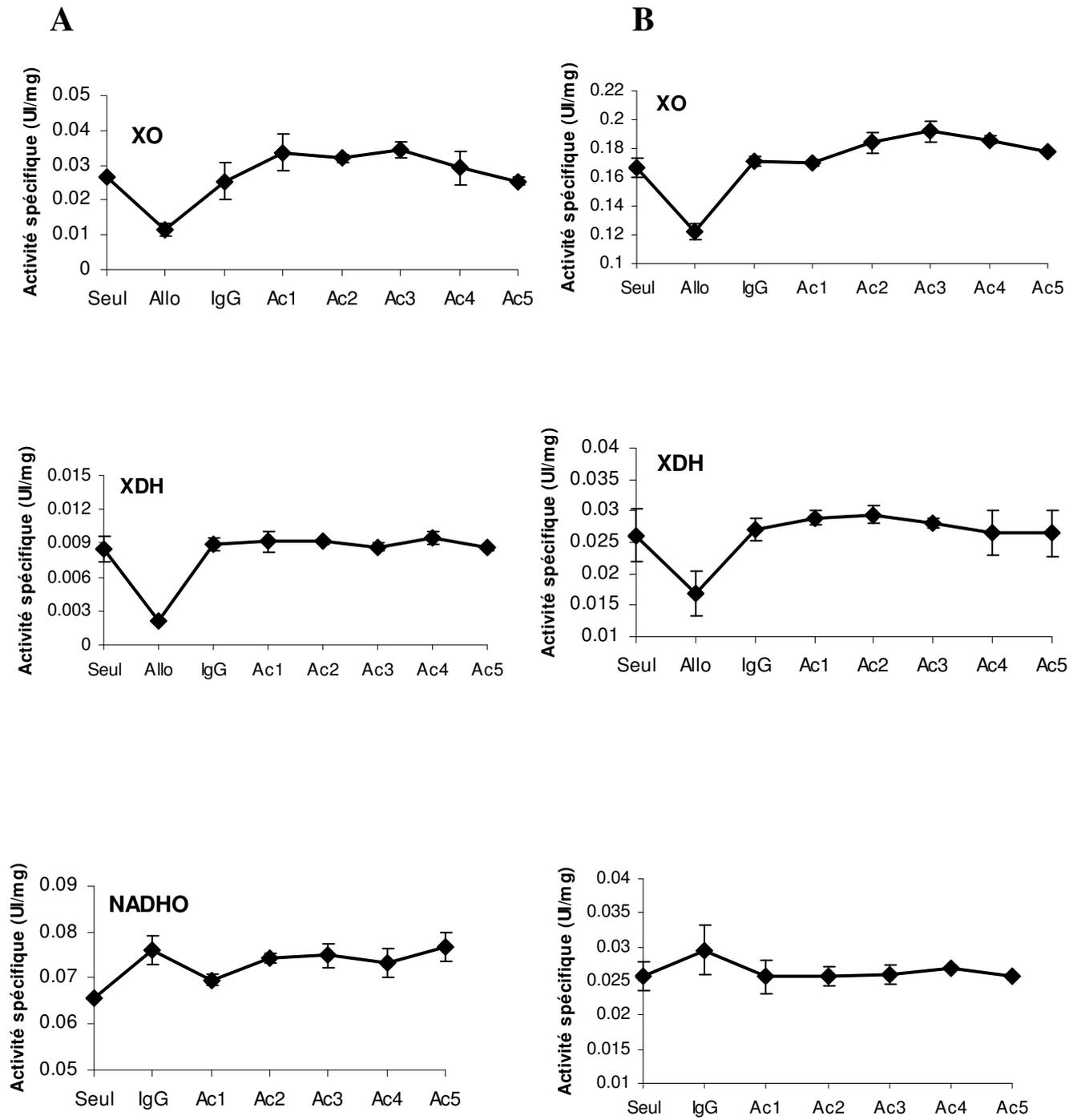


Figure 32: Inhibition des activités enzymatique de la HXOR (A) et la BXOR (B) par les anti-BXOR. Les valeurs sont la moyenne \pm SD.

Pour s'assurer de la cause de cette augmentation de l'activité nous avons incubé l'enzyme avec deux gammes de concentrations similaires des IgG de rat non immunisé et des anticorps anti-BXOR. Les courbes de l'activité en fonction de la concentration de protéines (IgG et anti-BXOR) sont superposées (**Figure 33**). La présence des protéines à basse concentration dans le milieu réactionnel paraît induire une augmentation de l'activité de l'enzyme alors qu'à forte concentration l'activité revient à son état initial. Ce résultat attire l'attention sur le fait que l'activité de l'enzyme dans un milieu physiologique, renfermant des protéines, pourrait être différente que celle de l'enzyme purifiée testée dans un tampon exempt de protéines.

Vu l'absence de l'effet inhibiteur des anticorps de rat envers la XOR nous n'avons pas pu les utiliser chez le rat arthritique. Des anticorps originaires d'autres espèces comme le lapin (Djelili, 1998) ou même humains (Benboubetra et al., 1997) peuvent être utilisés. Ces deux types d'anticorps ont montré des inhibitions pouvant atteindre 30%.

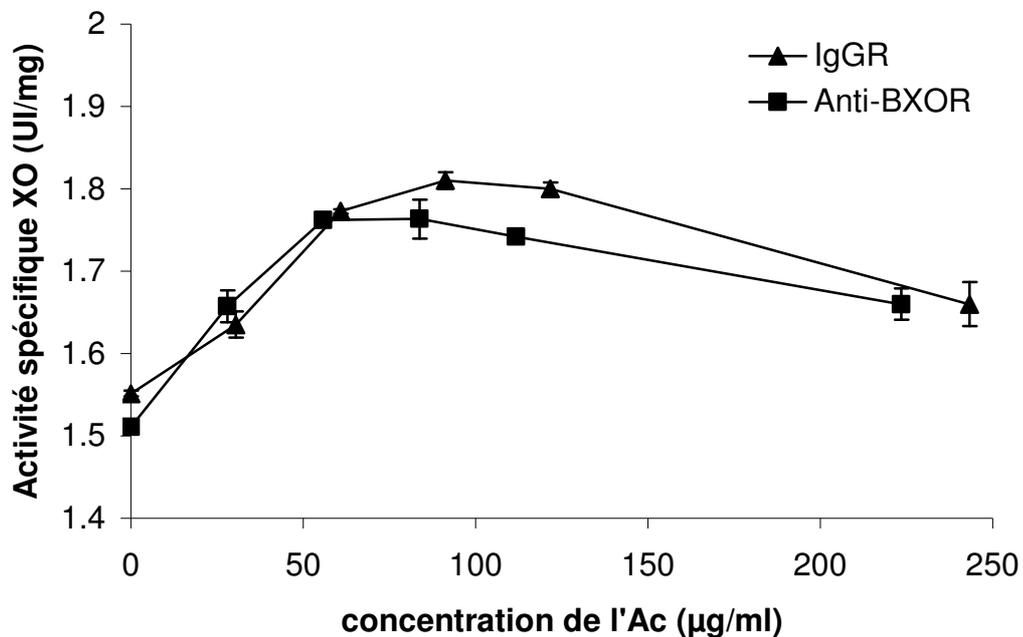


Figure 33: Influence de la concentration des IgG de rat non immunisé (IgG R) sur l'activité xanthine oxydase de la BXOR. Les valeurs représentent la moyenne de trois déterminations \pm SD.

DISCUSSION

1. Le modèle animal de l'arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire chronique touchant les articulations. La recherche de traitement pour cette maladie est souvent handicapée par une étiologie mal définie. Cette recherche étiologique et thérapeutique a bénéficié du développement d'un nombre de modèles animaux dont le plus utilisé est l'arthrite induite par le collagène type II proposée par Trentham *et al.* (1977).

En suivant ce modèle on est parvenu dans cette étude à induire l'arthrite chez les rats Albino Wistar. Après injection de l'émulsion du collagène II et le rappel après 7 jours, les rats ont développé une maladie articulaire chronique s'étalant sur 60 jours. La maladie débute le 14^{ème} jour après immunisation, et atteint son maximum le 21^{ème} jour puis rechute pour finalement disparaître au bout de 60 jours laissant derrière elle des articulations déformées. Dans le modèle proposé par Trentham *et al.*, seulement 41% des rats ont développés la maladie. Dans des travaux plus récents, la maladie a touchée 89 à 100% des rats (Kaibara *et al.*, 1984; Campo *et al.*, 2003). De même, 70% des rats que nous avons immunisés ont développés la maladie. Cette amélioration de l'incidence est en grande partie due au rappel de l'immunisation. Trentham *et al.* ont utilisés une injection intrapéritonéale du collagène II non émulsifié le 21^{ème} jour. Le rappel avec un collagène émulsifié 7 jours seulement après la première injection a augmenté l'incidence.

L'arthrite rhumatoïde est diagnostiquée lorsque quatre des sept critères d'inclusion fixés par l'association américaine de rhumatologie (ARA) sont remplis (Arnett *et al.*, 1988) (**tableaux 9**). La maladie développée chez le rat remplit la plupart de ces critères ce qui permet de l'utiliser comme un modèle de l'arthrite rhumatoïde dans les études étiologiques et thérapeutiques.

Tableau 9: Critères d'inclusion de l'ARA pour le diagnostic de l'AR chez l'homme (Arnett *et al.*, 1988).

- 1- Raideur matinale durant au moins 60 minutes.
- 2- Gonflement d'au moins trois articulations.
- 3- Gonflement du poignet où d'une où plusieurs métacarpophalangiennes où interphalangiennes.
- 4- Gonflement symétrique.
- 5- Atteinte radiologique de la main.
- 6- Nodules sous cutanés.
- 7- Facteur rhumatoïde.

La raideur matinale, premier des sept critères, est difficile à mettre en évidence chez le rat. Ce critère est basé sur la gêne ressentie par le patient en se réveillant après une nuit de repos (immobilisation). Malgré la difficulté d'évaluer cette gêne, sa répercussion est évidente dans la lourdeur du mouvement observée chez l'animal.

Le gonflement d'au moins trois articulations (2^{ème} critère) est observé chez 100% des rats touchés par la maladie. L'atteinte du poignet et des articulations métacarpophalangiennes (3^{ème} critère) est remplacée chez le rat par l'implication de la cheville et les métatarso-phalagienne (pattes postérieures). Les pattes antérieures ne sont touché que dans 28.57% des rats. Le gonflement symétrique (4^{ème} critère) est observé chez 48.85% des rats.

Le cinquième critère est basé sur l'observation de la perte de l'os sur les clichés radiographiques. Les coupes histologiques que nous avons réalisées montrent bien cette perte causée par deux phénomènes : d'une part l'agression chimique et enzymatique de l'os cortical

par le pannus et le liquide synovial inflammatoire, et d'autre part la résorption de l'os trabéculaire par les ostéoclastes activées. En plus de la perte de l'os et du cartilage, les coupes histologiques montrent une intense infiltration leucocytaire de la moelle osseuse et la membrane synoviale ressemblant à celle observée chez l'homme (**Figure 34**).

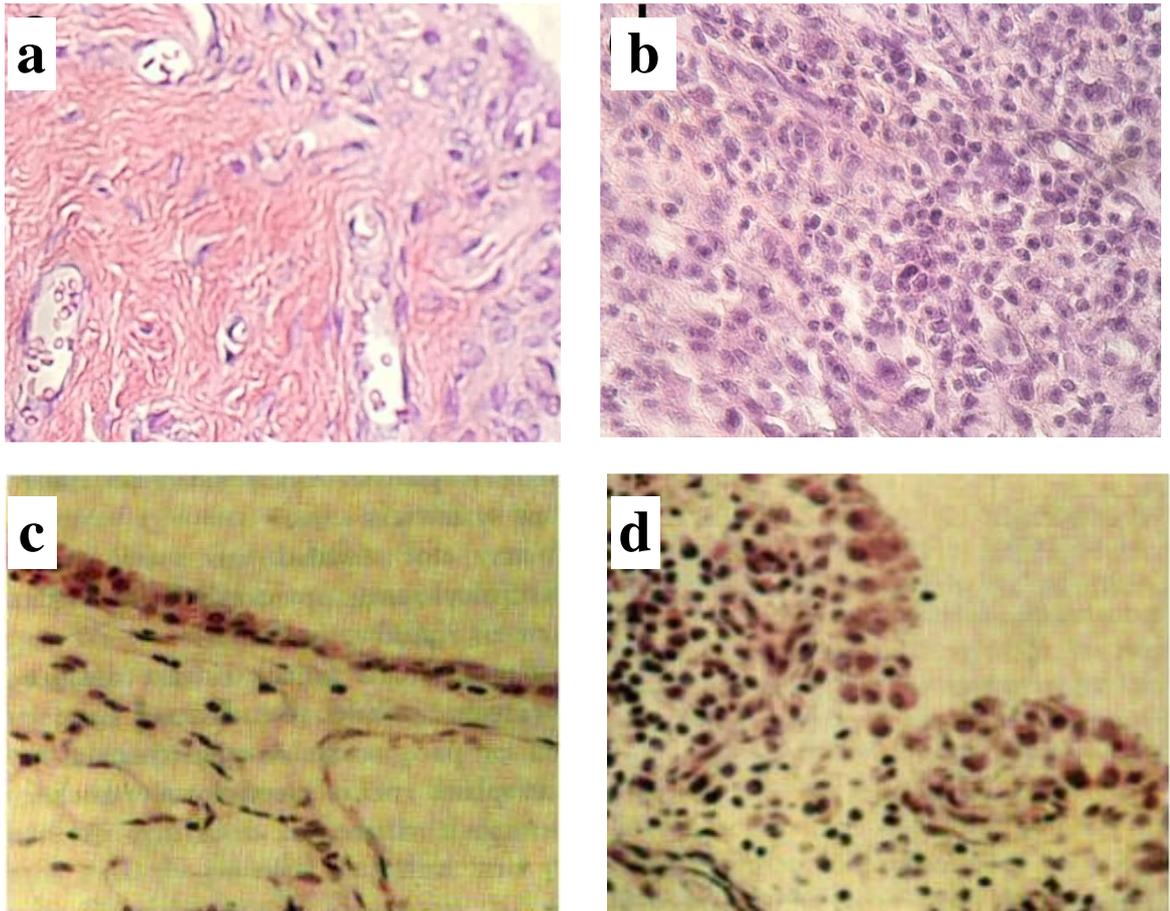


Figure 34: Infiltration leucocytaire de la membrane synoviale chez l'homme (Brostoff, 1993) et le rat. Membrane synoviale saine (a, c) et arthritique de rat (b) et de l'homme (d).

Nous n'avons pas évalué les deux critères restants, nodules sous cutanés et facteurs rhumatoïdes, mais ils ont été mentionnés dans d'autres travaux réalisés chez le rat (Trentham et al., 1977; Harris et al., 1997).

En plus des critères d'inclusion, la maladie a eu des répercussions sur la vitesse de sédimentation des globules rouges et sur le poids corporel ce qui concorde avec des travaux

précédents (Sakai *et al.*, 1999; Hildebrandt *et al.*, 2000). La VS du groupe malade dépasse de 4 fois celle du groupe normal au 21^{ème} jour et reste élevée jusqu'au 30^{ème} jour. La perte de poids a avoisiné le 9% chez le groupe malade alors que le groupe normal a continué de gagner du poids. Les anticorps anti-collagène II générés par l'immunisation sont à l'origine du développement de la maladie. Ces derniers sont capables, une fois purifiés, de transférer passivement la maladie à des rats non immunisés (Stuart *et al.* 1982; Stuart et Dixon, 1983).

La maladie est initiée par la déposition des anticorps spécifiques au collagène II sur la surface articulaire. Ces anticorps sont capables d'activer le complément générant ainsi les puissants chémoattractants C3a et C5a qui attirent les cellules inflammatoires (neutrophiles, éosinophiles, monocytes et macrophages). Le neutrophile est une des cellule importante dans l'installation de la maladie, sa déplétion réduit par 65% l'inflammation (Schrier *et al.*, 1984). Une fois sur place, ces cellules inflammatoires s'activent au contact des complexes immuns formés par les anticorps et le collagène articulaire, ce qui conduit à la génération des médiateurs inflammatoires (enzymes, espèces oxygénés réactives, cytokines). Ces médiateurs induisent le recrutement d'avantage de leucocytes, la prolifération des synoviocytes et l'activation des ostéoclastes conduisant à la destruction du cartilage et de l'os. Les fragment issus de la dégradation du cartilage sont phagocytés et présentés par les cellules présentatrice de l'antigène (CPA) aux lymphocytes T et B, ce qui maintient la stimulation du système immunitaire et assure la chronicité de la maladie (Stuart *et al.*, 1988; Van Den Steen *et al.*, 2002).

2. Le rôle de la xanthine oxydase dans l'arthrite

2.1. Participation de la XOR dans l'arthrite rhumatoïde

La prolifération de la lignée synoviale dans les articulations affectées par l'arthrite rhumatoïde, la vascularisation du tissu et le fait que l'articulation est maintenue par une capsule rigide augmentent la pression intra-articulaire. La mobilisation des articulations

affectés renforce cette pression qui excède la pression des vaisseaux sanguin irriguant la synoviale empêchant ainsi l'arrivée du sang, l'arrêt du mouvement diminue cette pression ce qui facilite le flux sanguin. Cette situation crée les conditions d'ischémie reperfusion responsable de la génération des radicaux libres (Jawed *et al.*, 1997; Bodamyali *et al.*, 1998).

L'une des sources proposées dans la génération de ces radicaux libres est l'enzyme xanthine oxydoréductase (McCord, 1987; Sussman et Bulkley, 1990). Cette enzyme existe dans la membrane synoviale (Allen *et al.*, 1987), elle est localisée dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Stevens *et al.*, 1991). Les cytokines proinflammatoires TNF, IFN et IL1, qui voient leur taux augmenté dans l'arthrite (Westacott *et al.*, 1990; Kaneko *et al.*, 2001; Kagari *et al.*, 2002), augmentent l'activité de l'enzyme (Pfeffer *et al.*, 1994; Page *et al.*, 1998). Cette activité est élevée dans le sérum (Miesel et Zuber, 1993) et le liquide synovial (Hanachi, 2001; Benboubetra *et al.*, 2001) des patients arthritiques.

L'enzyme, sous sa forme oxydase, oxyde l'hypoxanthine et la xanthine présentes dans le liquide synovial (Gudbjornsson *et al.*, 1991; Hanachi, 2001), ce qui génère l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Ce dernier se transforme en peroxyde d'hydrogène sous l'effet de la superoxyde dismutase. Ces deux métabolites génèrent en présence des ions métalliques le puissant radical libre OH^{\cdot} (Winterbourn, 1981; Rowley et Halliwell, 1983; Aruoma et Halliwell, 1987). Ce radical est détectable dans le liquide synovial des rats arthritiques (Kawai *et al.*, 2000). En plus du pouvoir destructeur de ses espèces oxygénés réactives, elles participent au recrutement et l'activation des neutrophiles (Grisham *et al.*, 1986) et ostéoclastes (Bax *et al.*, 1992).

2.2. Inhibiteurs de la XOR

La preuve la plus évidente de la participation de la xanthine oxydase dans les modèles d'ischémie reperfusion est l'amélioration de ses modèles par les inhibiteurs spécifiques de

cette enzyme, dont le plus utilisé reste de loin l'allopurinol. Ce dernier a été utilisé pour confirmer l'importance de l'enzyme dans les modèles animaux de l'insuffisance cardiaque (Landmesser et Drexler, 2002), le diabète type I (Desco *et al.*, 2002), l'ischémie-réperfusion hépatique (Rhoden *et al.*, 2000) et l'arthrite rhumatoïde (Zuber et Miesel, 1994). Il a même été proposé comme option thérapeutique pour les pathologies induites par l'ischémie-réperfusion (Puig et Mateas, 1989).

Cependant, plusieurs travaux confirment que l'amélioration des modèles d'ischémie-réperfusion par l'allopurinol ne peut être attribué à la seule inhibition de la XOR. Son pouvoir scavenger des radicaux libres pourrait aussi y participer (Grootveld *et al.*, 1987; Moorhouse *et al.* 1987; Das *et al.*, 1987; Hoey *et al.*, 1988; Augutin *et al.*, 1994; Miesel *et al.*, 1994).

Le problème que pose l'usage de l'allopurinol dans l'étude du rôle de la XO dans les modèles d'ischémie reperfusion, et l'arthrite en particulier, est du au fait que l'activité xanthine oxydase de l'enzyme est très faible, ce qui implique la génération d'un faible taux d'espèces oxygénés réactives (EOR). En plus la XOR n'est pas le seul système enzymatique responsable de la génération des EOR. Les phagocytes (neutrophile et macrophage), cellule très importantes dans ces maladies, possèdent au moins deux systèmes enzymatiques générateurs d'EOR. La NADPH oxydase qui génère le superoxyde, peroxyde d'hydrogène et comme conséquence le radical hydroxyle, la myeloperoxidase qui génère l'acide hypochlorique (Dröge, 2002). L'allopurinol réagit avec ces quatre EOR et peut nous induire en erreur en surestimant l'importance de la XOR.

Un autre argument joue en défaveur de l'utilisation de l'allopurinol pour étudier le rôle de la XOR. L'enzyme est capable de générer le superoxyde via sont activité NADH-oxydase (Nakamura, 1991; Sanders *et al.*, 1997), et l'oxyde nitrique (NO), un important médiateur inflammatoire, par réduction du nitrite (NO_2^-) (Godber *et al.*, 2000). Ces deux activités ne

sont pas inhibés par l'allopurinol et son métabolite l'oxypurinol, et donc ne sont pas inclus dans l'étude utilisant cet inhibiteur.

Le grand nombre d'inhibiteurs caractérisés pour la XOR (Borges *et al.*, 2002) offre plusieurs alternatives à l'usage de l'allopurinol dans l'étude du rôle de la xanthine oxydase dans les modèles d'ischémie-réperfusion. Mais il faut d'abord s'assurer de la spécificité de l'inhibiteur à utiliser, et de l'absence de propriétés antioxydantes.

2.3. L'approche anticorps anti-XOR

Notre choix d'utiliser les IgG anti-XOR dans le modèle animal de l'arthrite est basé sur leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'enzyme (Benboubetra *et al.*, 1997; Djelili, 1998), en plus de leur capacité d'éliminer l'enzyme de la circulation (clearance). Les études portant sur le pouvoir antioxydant des liquides physiologiques, surtout le plasma n'ont attribué aucune propriété antioxydante à ces molécules (Wasil *et al.*, 1987). En effet, dans un essai en milieu générant les EOR, les IgG n'ont montrés aucune propriété anti-oxydante. En plus, les anticorps, molécules biologiques, sans dépourvues d'effets secondaires une fois utilisés comme traitement, problème qui limite l'utilisation de plusieurs molécules chimiques malgré leur efficacité.

Cependant, la capacité des anticorps à activer le complément via la fraction cristallisable (Fc) peut accentuer l'inflammation en générant des dérivés chimiotactique. Ce problème peut être contourner par l'utilisation des fractions d'anticorps incapable d'activer le complément tel que la Fab et la F(ab)₂'.

2.3.1. Obtention des anticorps anti-XOR

Nous avons choisi de générer des anticorps anti-XOR chez le rat pour éviter le problème de réaction immunitaire contre ces anticorps une fois utilisés chez l'animal. L'utilisation d'anticorps d'espèces différentes peut conduire à la production d'anticorps spécifiques des

IgG (1^{er} anticorps) et aboutir à des phénomènes d'allergie connues sous le nom de phénomène d'Arthus (Roitt *et al.*, 1985).

L'immunisation avec la BXOR (2.26 mg/ml, PFR = 4.68) a donnée une réponse immunitaire avec un titre d'anticorps au dernier rappel très élevé contre la BXOR (1/1024000) et un peu moins contre la HXOR (1/512000) ce qui est normal vu l'enzyme avec la quelle l'immunisation est réalisée. Le titre est proche de celui précédemment obtenu dans notre laboratoire par immunisation des lapins avec la HXOR (Hanachi, 2001). L'enzyme des deux espèces semble être très immunogène contrairement aux observations de Graham *et al.*, 1989 qui n'ont obtenus qu'un faible titre malgré le couplage à la KLH (Keyhole limpet hemocyanine) avec le glutaraldehyde.

6.26 mg d'anti-BXOR ont été obtenu à partir de 14 ml de sérum [447 µg/ml] ce qui correspond à 4.47% de l'IgG récupéré par précipitation au sulfate de sodium. Ce résultat est proche de celui obtenue par Djelili (1998) et Hanachi (2001) (330 µg/ml et 368 µg/ml respectivement). Ces anticorps donnent une seule bande en SDS-PAGE de poids moléculaire d'environ 155 KDa. La spécificité de ces anticorps a été prouvée par leur réaction avec la XOR humaines et bovine dans le dot immunobinding et Western-blot, la double diffusion en milieu gélifié d'Ouchterlouny à donné un seul arc de précipitation avec la BXOR mais aucune précipitation n'est observée avec la HXOR peut être à cause de la concentration de cette dernière qui n'a pas permet d'atteindre la zone d'équivalence nécessaire à la précipitation. Ce test n'a pu être refait à cause de l'épuisement de la HXOR qui nécessite plus de 6 mois pour la préparer de nouveau.

2.3.2. Inhibition des activités de la XO

L'enzyme purifiée était de grande pureté comme témoigne le PFR (BXOR : 4.68, HXOR : 5.04) et l'SDS-PAGE (Sanders *et al.*, 1997). La quantité de l'enzyme récupérée du lait

humain est inférieure à celle récupérée du lait bovin (respectivement 3.87 mg/l et 9.43 mg/l) ce rendement est faible en comparaison avec celui obtenu par Powell (1995) et Benboubetra *et al.* (2004). La congélation-décongélation pourrait participer à cette perte.

L'activité spécifique xanthine oxydoréductase de l'enzyme bovine (1850.77 mUI/mg) est proche des valeurs couramment obtenues, qui sont comprises entre 2000 et 5000 mUI/mg (Bray, 1975). Contrairement à l'enzyme bovine, l'activité de l'enzyme humaine est très faible (66.72 mUI/mg) (27 fois moins que la BXOR). Cela est en grande partie dû à sa présence sous ses formes inactives désulfo et démolebdo (Bray, 1975).

L'activité NADH oxydase de l'enzyme humaine est proche de son activité xanthine oxydase (42.31 mUI/mg). Ce qui montre que le taux du superoxyde généré par cette activité sera proche de celui généré par l'activité xanthine oxydase. Ce fait doit être pris en considération dans les tentatives d'inhiber l'enzyme dans le modèle animal.

L'anticorps préparé n'a exercé aucune inhibition sur les trois activités (xanthine oxydase, xanthine déshydrogénase, NADH oxydase) de l'enzyme humaine et bovine. Cela est en contradiction avec les résultats rapportés par différentes équipes. Ulmann *et al.* (1962) ont montré que l'anticorps préparé chez le lapin a inhibé 70% de l'activité xanthine oxydase. Benboubetra *et al.* (1997) ont montré que l'anticorps purifié du sérum humain normal entraîne une inhibition de 20-30% de l'activité XO. Djelili (1998) a montré que les anticorps dirigés contre la HXOR inhibent 50% de son activité NADH oxydase et ceux dirigés contre la BXOR inhibent 70% de son activité NADH oxydase. Reste que nous n'avons pas tester cet anticorps sur la XOR du rat qui nécessite une préparation à partir du foie de cet animal.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les modèles animaux développés pour les maladies humaines constituent un outil indispensable dans les études étiologiques, physiopathologiques et thérapeutiques. Plusieurs modèles existent à l'heure actuelle pour l'arthrite rhumatoïde dont le plus important est l'arthrite induite par le collagène type II chez différentes espèces mammifères (rat, souris, lapins, singe...).

Dans notre travail, nous avons réussi à provoquer la maladie chez les rats Albino Wistar et suivre son développement. La maladie remplit la plupart des critères d'inclusion fixés par l'association américaine de rhumatologie pour le diagnostic de l'arthrite chez l'homme, ce qui rend ce modèle un outil de valeur dans notre laboratoire pour les futures études de certains aspects de l'arthrite.

D'autre part nous avons produit des anticorps anti-xanthine oxydoréductase (XOR) chez le rat pour évaluer le rôle de cette dernière dans la maladie. Les anticorps anti-XOR bovine n'ont donné aucune inhibition des activités enzymatiques de l'enzyme bovine (BXOR) et humaine (HXOR) dans les tests spectrophotométriques.

En perspective quatre points paraissent intéressants à approfondir:

- Etude des anticorps anti-XOR chez différentes espèces animales en recherche de ceux possédant une inhibition de l'activité enzymatique. Ces anticorps pourraient alors être utilisés pour étudier la participation de cette enzyme dans le modèle animal de l'arthrite.
- Etude histochimique et cytochimique pour la localisation de l'enzyme dans le tissu synovial des rats arthritiques.
- Eclaircissement de certains aspects restant encore obscures dans l'étiologie et la physiopathologie de la maladie humaine dont la participation de la XOR.
- Essais thérapeutiques sur le modèle animal de différents traitements à base de molécules biologiques: anticorps anti-XOR, anti-TNF..., et extraits de plantes médicinales.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références

- Åkerström, B. and Björck, L. (1986). A physicochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties. *J. Biol. Chem.* **261**, 10240-10247.
- Allen, R. E., Outhwaite, J. M., Morris, C. J. and Blake, D. R. (1987). Xanthine oxidoreductase is present in human synovium. *Ann. Rheum. Dis.* **46**, 843-845.
- Amaya, Y., Yamazaki, K., Sato, M., Noda, K., Nishino, T. and Nishino, Ta. (1990). Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type. *J. Biol. Chem.* **265**, 14170-14175.
- Arnett, F.C., Edworthy, S. M., Bloch, D. A., McShane, D. J., Fries, J. F., Cooper, N. S., Healey, L. A., Kaplan, S. R., Liang, M. H. and Luthra, H. S. (1988). The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **31**, 315-24.
- Arrar, L. (1987). Contribution à l'étude de l'organisation de la chromatine dans la spermiogénèse humaine: approche immunochimique. Doctorat 3^{ème} cycle en Biochimie, Université de Lille II France. pp 176
- Arrar, L. (2002). Etude des anticorps anti-xanthine oxydoréductase dans les sérums et liquides synoviaux de sujets atteints de pathologies rhumatoïdes. Thèse de doctorat d'état en Biochimie, Université de Sétif Algérie. pp 93.
- Aruoma, O. I. and Halliwell, B. (1987). Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl-radical generation?. *Biochem. J.* **241**, 273-8.
- Augustin, A. J., Boker, T., Blumenroder, S. H., Lutz, J. and Spitznas, M. (1994). Free radical scavenging and antioxidant activity of allopurinol and oxypurinol in experimental lens-induced uveitis. *Inves. Ophthalm. Visual Science.* **35**, 3897-3904.
- Bäcklund, J., Nandakumar, K. S., Bockermann, R., Mori, L. and Holmdahl, R. (2003). Genetic control of tolerance to type II collagen and development of arthritis in an autologous collagen-induced arthritis model. *J. Immunol.* **171**, 3493-3499.

- Baghiani, A. R., Harrison, R. and Benboubetra, M. (2003). Purification and partial characterization of camel milk xanthine oxidoreductase. *Arch. Physiol. Biochem.* **111**, 407-414.
- Bax, B. E., Alam, A. S., Banerji, B., Bax, C. M., Bevis, P. J., Stevens, C. R., Moonga, B. S., Blake, D. R. and Zaidi, M. (1992). Stimulation of osteoclastic bone resorption by hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 1153-1158.
- Bearne, L. M., Scott, D. L. and Hurley, M. V. (2002). Exercise can reverse quadriceps sensorimotor dysfunction that is associated with rheumatoid arthritis without exacerbating disease activity. *Rheumatology.* **41**, 157 – 166.
- Benboubetra, M. (1989). Characterisation and significance of human antibodies to bovine milk fat globule membrane. Ph. D. Thesis. University of Bath, U. K.
- Benboubetra, M., Arrar, L., Hanachi, N. and Baghiani, A. (2001). Xanthine oxidoreductase activity in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis 674th Meeting of the *Biochem. Soc. Trans.*
- Benboubetra, M., Baghiani, A. R., Atmani, J. and Harrison, R. (2004). Physicochemical and kinetic properties of purified sheep's milk xanthine oxidoreductase. *J. Dairy. Sci.* **87**,1580-1584.
- Benboubetra, M., Gleeson, A., Harris, C. P. D., Khan, J., Arrar, L., Brennand, D., Reid, J., Reckless, J. D. and Harrison R. (1997). Circulating anti-(xanthine oxidoreductase) antibodies in healthy human adults. *Eur. J. Clin. Invest.* **27**, 611-619.
- Bensalem-bendjelloul, M. (1998). Techniques histologiques théorie et pratique. Office des publications universitaires. pp 6-41.
- Berry, C. E. and Hare, J. M. (2004). Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol.* **555**, 589-606.
- Bodamyali, T., Stevens, C. R., Billingham, M. E. J., Ohta, S. and Blake, D. R. (1998). Influence of hypoxia in inflammatory synovitis. *Ann. Rheum. Dis.* **57**, 703-710.

- Bolon, B., Morony, S., Cheng, Y., Hu, Y-L. and Feige, U. (2004). Osteoclast numbers in Lewis rats with adjuvant-induced arthritis: identification of preferred sites and parameters for rapid quantitative analysis. *Vet. Pathol.* **41**, 30-36.
- Borges, F., Fernandes, E. and Roleira, F. (2002). Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **9**, 195-217.
- Boyle, D. L., Kowaluk, E. A., Jarvis, M. F., LEE, C., Bhagwat, S. S., Williams, M. and Firestein G. S. (2001). Anti-inflammatory effects of ABT-702, a novel non-nucleoside adenosine kinase inhibitor, in rat adjuvant arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 495-500.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bradley, D. S., Nabozny, G. H., Cheng, S., Zhou, P., Griffiths, M. M., Luthra, H. S. and David, C. S. (1997). HLA-DQB1 polymorphism determines incidence, onset, and severity of collagen-induced arthritis in transgenic mice, implications in human rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* **100**, 2227-2234.
- Bray, R. C. (1975). Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylases and related enzymes. In "the enzyme" 3rd ed. Vol. 12. P. D. Boyer, Ed. Academic Press, New York. pp 299-419.
- Breedveld, F. C. and Kalden, J. R. (2004). Appropriate and effective management of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **63**, 627-633.
- Brooks, P. M. (1998). The heberden oration 1997 treatment of rheumatoid arthritis: from symptomatic relief to potential cure. *Br. J. Rheumatol.* **37**, 1265-1271.
- Brostoff, J., Scanding, G. K., Male, D., Roitt, I. M. (1993): Immunologie clinique. Ed. Université de Boeck. Belgique. pp 325.
- Brown, M. R. (1985). Corticosteroid Treatment in Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology.* **24**, 380-383.
- Buchanan, H. M., Preston, S. J., Brooks, P. M. and Buchanan, W. W. (1991). Is diet important in rheumatoid arthritis ?. *Br. J. Rheumatol.* **30**, 125-135.

- Burbage, G. S. (2005). Research evidence for implementing subcutaneous methotrexate. *Ann. Rheum. Dis.* **64**, 21-26.
- Campo, G. M., Avenoso, A., Campo, S., Ferlazzo, A., M., Altavilla, D. and Calatroni, A. (2003). Efficacy of treatment with glycosaminoglycans on experimental collagen-induced arthritis in rats. *Arthritis Res. Ther.* **5**, R122-R131.
- Carison, B. C., Jansson, A. M., Larsson, A., Bucht, A. and Lorentzen, J. C. (2000). The endogenous adjuvant squalene can induce a chronic T-cell-mediated arthritis in rats. *Am. J. Pathol.* **156**, 2057-2065.
- Choy, E. H. (2004). Two is better than one? Combination therapy in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* **43**, 1205-1207.
- Clair, E. W. St., Wilkinson, W. E., Lang, T., Sanders, L., Misukonis, M. A., Gilkeson, G. S., Pisetsky, D. S., Granger, D. L. and Weinberg, B. (1996). Increased expression of blood mononuclear cell nitric oxide synthase type 2 in rheumatoid arthritis patients. *J. Exp. Med.* **184**, 1173-1178.
- Clavel. (2004). La polyarthrite rhumatoïde où est-on ?. *Assiphar. Bulletin* n° 15.
- Clunie, G., Voules, S. and Watts, R. (2003). Dose reduction of Etanercept – can we treat more patients using the same budget ?. *Rheumatology.* **42**, 600-601.
- Coates, A. S., Tattersall, M. H., Swanson, C., Hedley, D., Fox, R. M. and Raghavan, D. (1984). Combination therapy with methotrexate and 5-fluorouracil: a prospective randomized clinical trial of order of administration. *J. Clin. Oncol.* **2**, 756 – 761.
- Cole, B. C., Golightly-rowland, L. and Ward, J. R. (1975). Arthritis of mice induced by *Mycoplasma pulmonis*: humoral antibody and lymphocyte responses of CBA mice. *Infect. Immun.* **12**(5), 1083-1092.
- Cope, A. P. (2003). Exploring the reciprocal relationship between immunity and inflammation in chronic inflammatory arthritis. *Rheumatology.* **42**, 716-731.
- Coste, F. (1971). Le rhumatisme. 4^{ème} Ed. Presses Universitaires de France. pp 44-86.

- Danks, L., Sabokbar, A., Gundle, R. and Athanasou, N. A. (2002). Synovial macrophages-osteoclast differentiation in inflammatory arthritis. *Ann. Rheum.* **61**, 916-921.
- Das, D. K., Engelman, R. M., Clement, R., Otani, H., Prasad, M. R. and Rao, P. S. (1987). Role of xanthine oxidase inhibitor as free radical scavenger: a novel mechanism of action of allopurinol and oxypurinol in myocardial salvage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**, 314-319.
- Davies, E. V., Williams, B. D. and Campbell, A. K. (1990). Synovial fluid polymorphonuclear leucocytes from patients with rheumatoid arthritis have reduced MPO and NADPH-oxidase activity. *Br. J. Rheumatol.* **29**, 415-421.
- de Hooge A. S. K., van de Loo, F. A. J., Amtz, O. J. and van den Berg, W. B. (2000). Involvement of IL-6, apart from its role in immunity, in mediating a chronic response during experimental arthritis. *Am. J. Pathol.* **157**, 2081-2091.
- Desco, M-C., Asensi, M., Márquez, R., Martínez-Valls, J., Vento, M., Pallardó, F. V., Sastre, J. and Viña, J. (2002). Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes, protection by allopurinol. *Diabetes.* **51**, 1118-1124.
- Djelili, H. (1998). Etude de la xanthine oxydoréductase et des anticorps anti-xanthine oxydoréductase. Mémoire de Magister. Université de Sétif.
- Dreano, T., Rollet, K., Renaud, B., Le Nen, D., Sevestre, F. X., Guilleux, C., Valtin, B., Siété, G. and Laulan, J. (2002). L'avant-pied rhumatoïde. Table Ronde sous la direction de T. Dreano. *Ann. Orthop. Ouest.* **34**, 251-300.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47-95.
- Eyquem, A. et de Saint Martin, J. (1981). Immuno-rhumatologie. Rhumatismes lupus érythémateux disséminé connectivites. 2^{ème} Ed. Maloine S. A. pp 121-186.
- Fukushima, T., Adachi, T. and Hirano, K. (1995). The heparin-binding site of human xanthine oxidase. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 156-158.
- Gaffney, K. and Scott, D. G. L. (1998). Azathioprine and cyclophosphamide in the treatment of rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.* **37**, 824-836.

- Geiszt, M. and Leto, T. L. (2004). The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. *J. Biol. Chem.* **279**, 51715-51718.
- Godber, B. L. J., Doel, J. J., Sapkota, G. P., Blake, D. R., Stevens, C. R., Eisenthal, R., and Harrison, R. (2000). Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **275**, 7757–7763.
- Graham, K., Fleming, J. E., Young, R. and Bensch, K. G. (1989). Preparation of antibodies against xanthine oxidase from human milk. *Int. J. Biochem.* **21**, 715-722.
- Granger, D. N., Rutili, G., McCord, J. M. (1981). Role of superoxide in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology.* **81**, 22-29.
- Grant, E. P., Picarella, D., Burwell, T., Delaney, T., Croci, A., Avitahl, N., Humbeles, A. A., Gutierrez-Ramos, J-C., Briskin, M., Gerard, C. and Coyle, A. J. (2002). Essential role for the C5a receptor in regulating the effector phase of synovial infiltration and joint destruction in experimental arthritis. *J. Exp. Med.* **196**, 1461-1471.
- Gravallese, E. M. (2002). Bone destruction in arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **61**, 84-86.
- Griendling, K. K. and FitzGerald, G. A. (2003). Oxidative stress and cardiovascular injury: part1: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation.* **108**, 1912-1916.
- Grisham, M. B., Hernandez, L. A. and Granger, D. N. (1986). Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **251**, G567-G574.
- Grootveld, M., Halliwell, B. and Moorhouse, P. C. (1987). Action of uric acid, allopurinol and oxypurinol on the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid. *Free. Radic. Res. Commun.* **4**, 69-67.
- Gudbjornsson, B., Zak, A., Niklasson, F. and Hallgren, R. (1991). Hypoxanthine, xanthine and urate in synovial fluid from patients with inflammatory arthritides. *Ann. Rheum. Dis.* **50**, 669-672.
- Hanachi, N. (2001). Etude de l'enzyme xanthine oxydoréductase dans les sérums et liquides synoviaux de patients atteints de l'arthrite rhumatoïde et d'autres inflammations articulaires. Mémoire de Magister. Université de Sétif.

- Hancock, J. T., Salisbury, V., Ovejero-Boglione, M. C., Cherry, R., Hoare, C., Eisenthal, R. and Harrison, R. (2002). Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3308-3310.
- Hansson, A-S., Lu, S. and Holmdahl, R. (2002). Extra-articular cartilage affected in collagen-induced, but not pristane-induced, arthritis models. *Clin. Exp. Immunol.* **127**, 37-42.
- Harris, H. E., Liljestrom, M. and Klareskog, L. (1997). Characteristics of synovial fluid effusion in collagen-induced arthritis (CIA) in the DA rat; a comparison of histology and antibody reactivities in an experimental chronic arthritis model and rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.* **107**, 480-4.
- Harrison, R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 774-797.
- Harrison, R. (2004). Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug Metabolism Reviews.* **36**, 363-375.
- Hata, H., Sakaguchi, N., Yoshitomi, H., Iwakura, Y., Sekikawa, K., Azuma, Y., Kanai, C., Moriizumi, E., Nomura, T., Nakamura, T. and Sakaguchi, S. (2004). Distinct contribution of IL-6, TNF- α , IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. *J. Clin. Invest.* **114**, 582-588.
- Hawkes, R., Niday, E. and Gordon, J. (1982). A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.* **119**, 142-147.
- Heerebeek, L. V., Meischl, C., Stooker, W., Meijer, C. J. L. M., Niessen, H. W. M. and Roos, D. (2002). NADPH oxidase(s): new source(s) of reactive oxygen species in the vascular system?. *J. Clin. Pathol.* **55**, 561-568.
- Hellsten-Westing, Y. (1993). Immunohistochemical localization of xanthine oxidase in human cardiac and skeletal muscle. *Histochemistry.* **100**, 215-222.
- Hietala, M. A., Jonsson, I-M., Tarkowski, A., Kleinau, S. and Pekna, M. (2002). Complement deficiency ameliorates collagen-induced arthritis in mice. *J. Immunol.* **169**, 454-459.

- Hildebrandt, G., Jahns, J., Hindemith, M., Spranger, S., Sack, U., Kinne, R. W., Madajsterba, P., Wolf, U. and Kamprad, F. (2000). Effects of low dose radiation therapy on adjuvant induced arthritis in rats. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**, 1143-1153.
- Hoey, B. M., Butler, J. and Halliwell, B. (1988). On the specificity of allopurinol and oxypurinol as inhibitors of xanthine oxidase. A pulse radiolysis determination of rate constants for reaction of allopurinol and oxypurinol with hydroxyl radicals. *Free Radic. Res. Commun.*, **4**, 259-63.
- Holm, B. C., Svelander, L., Bucht, A. and Lorentzen, J. C. (2002). The arthritogenic adjuvant squalene does not accumulate in joints, but give rise to pathogenic cells in both draining and non-draining lymph nodes. *Clin. Exp. Immunol.* **127**, 430-435.
- Holt, I., Coer, R. G., Denton, J., Meager, A. and Hopkins, S. J. (1992). Cytokine inter-relationships and their association with disease activity in arthritis. *Br. J. Rheumatol.* **31**, 725-733.
- Huet, G., Flipo, R. M., Richet, C., Thiebaut, C., Demeyer, D., Baldyck, M., Duquesnoy, B. and Degand, P. (1992). Measurement of elastase and cysteine proteinases in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, sero-negative spondylarthropathies, and osteoarthritis. *Clin. Chem.* **38**, 1694-1697.
- Jarasch, E-D., Bruder, G. and Heid, H. W. (1986). Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta. Physiol. Scand.* **548**, 39-46.
- Jarasch, E-D., Grund, C., Bruder, G., Heid, H. W., Keenan, T. W. and Franke, W. W. (1981). Localisation of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell.* **25**, 67-82.
- Jawed, S., Gaffney, K. and Blake, D. R. (1997). Intra-articular pressure profile of the knee joint in a spectrum of inflammatory arthropathies. *Ann. Rheum. Dis.* **56**, 686-689.
- Johnson, S., Sidebottom, D., Bruckner, F. and Collins, D. (2000). Identification of Mycoplasma fermentans in synovial fluid samples from arthritis patients with inflammatory disease. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 90-93.

- Kagari, T., Doi, H. and Shimozato, T. (2002). The importance of IL-1 β and TNF- α , and the noninvolvement of IL-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis. *J. Immunol.* **169**, 1459-1466.
- Kaibara, N., Hotokebuchi, T., Takagishi, K., Katsuki, J., Morinaga, M., Arita, C. and Jingushi, S. (1984). Pathogenetic difference between collagen arthritis and adjuvant arthritis. *J. Exp. Med.* **159**, 1388-1396.
- Kaneko, M., Tomita, T., Nakase, T., Ohsawa, Y., Seki, H., Takeuchi, E., Takano, H., Shi, K., Takahi, K., Kominami, E., Uchiyama, Y., Yoshikawa, H. and Ochi, T. (2001). Expression of proteinases and inflammatory cytokines in subchondral bone regions in the destructive joint of rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* **40**, 247-255.
- Kaplan, C. D., O'Neill, S. K., Koreny, T., Czipri, M. and Finnegan, A. (2002). Development of inflammation in proteoglycan-induced arthritis is dependent on Fc γ R regulation of the cytokine/chemokine environment. *J. Immunol.* **169**, 5851-5859.
- Kawai, Y., Kubota E. and Okabe, E. (2000). Reactive oxygen species participation in experimentally induced arthritis of the temporomandibular joint in rats. *J. Dent. Res.* **79**(7), 1489-1495.
- Kean, W. F., Hart, L. and Buchanan, W. W. (1997). Auranofin, disease-modifying drugs series editor: T. Pullar. *Br. J. Rheumatol.* **36**, 560-572.
- Kleinau, S., Martinsson, P. and Heyman, B. (2000). Induction and suppression of collagen-induced arthritis is dependent on distinct Fc γ receptors. *J. Exp. Med.* **191**(9), 1611-1616.
- Kontinen, Y., Ainola, M., Valleala, H., Ma, J., Ida, H., Mandelin, J., Kinne, R. W., Santavirta, S., Sorsa, T., López-Otin, C. Takagi, M. (1999). Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **58**, 691-697.
- Kooij, A., Schijns, M., Frederiks, W. M., Van Noorden C. J. F. and James, J. (1992). Distribution of xanthine oxidoreductase activity in human tissues – a histochemical and biochemical study. *Virchows Arch. B cell Pathol.* **62**, 143-150.
- Lacaille, D. (2000). Rheumatology: 8. Advanced therapy. *C. M. A. J.* **163**, 721-8.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685.
- Landmesser, U. L. F. and Drexler, H. (2002). Allopurinol and endothelial function in heart failure: future or fantasy?. *Circulation*. **106**, 173-175.
- Lassègue, B. and Clempus, R. E. (2002). Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **285**, R277-R297.
- Lorentzen, J. C. (1999). Identification of arthritogenic adjuvants of self and foreign origin. *Scand. J. Immunol.* **49**, 45-50.
- Lorentzen, J. C. and Klareskog, L. (1996). Susceptibility of DA rats to arthritis induced with adjuvant oil or rat collagen is determined by genes both within and outside the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol.* **44**, 592-598.
- Lorentzen, J. C., Glaser, A., Jacobsson, L., Galli, J., Fakhrai-rad, H., Klareskog, L. and Luthman, H. (1998). Identification of rat susceptibility loci for adjuvant-oil-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 6383-6387.
- Lutz, A. M., Seemayer, C., Corot, C., Gay, R. E., Goepfert, K., Michel, B. A., Marincek, B., Gay, S. and Weishaupt, D. (2004). Detection of synovial macrophages in an experimental rabbit model of antigen-induced arthritis: ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging. *Radiology*. **233**, 149-157.
- Ma, Y., Thornton, S., Duwel, L. E., Boivin, G. P., Giannini, E. H., Leiden, J. M., Bluestone, J. A. and Hirsch, R. (1998). Inhibition of collagen-induced arthritis in mice by viral IL-10 gene transfer. *J. Immunol.* **161**, 1516-1524.
- Macart, M. and Gerbaut, L. (1982). An improvement of coomassie blue dye binding method allowing an equal sensitivity to various proteins : application to cerebro spinal fluid. *Clin. Chem. Acta*. **122**, 93-101.
- Martin, H. M., Hancock, J. T., Salisbury, V. and Harrison, R. (2004). Role of xanthine oxidoreductase as an antimicrobial agent. *Infect. Immun.* **72**, 4933-4939.

- McCord, J. M. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* **312**, 159-163.
- McCord, J. M. (1987). Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed. Proc.* **46**(7), 2402-2406.
- McManaman, J. L., Palmer, C. A., Wright, R. M. and Neville, M. C. (2002). Functional regulation of xanthine oxidoreductase expression and localization in the mouse mammary gland: evidence of a role in lipid secretion. *J. Physiol.* **545**, 567-569.
- Meneshian, A. and Bulkley, G. B. (2002). The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation.* **9**, 161-175.
- Miesel, R., Zuber, M. (1993). Elevated levels of xanthine oxidase in serum of patients with inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Inflammation.* **17**, 551-561.
- Miesel, R., Zuber, M., Sanocka, D., Graetz, R. and Kroeger, H. (1994). Effects of allopurinol on in vivo suppression of arthritis in mice and ex vivo modulation of phagocytic production of oxygen radicals in whole human blood. *Inflammation.* **18**, 597-612.
- Mirshafiey, A., Chitsaz, M., Attar, M., Mehrabian, F. and Razavi, A. R. (2000). Culture filtrate of *Cryptococcus neoformans* var. *Gattii* (Cnef) as a novel anti-inflammatory compound in the treatment of experimental septic arthritis. *Scand. J. Immunol.* **52**, 278-284.
- Moorhouse, P. C., Grootveld, M., Halliwell, B., Quinlan, J. G. and Gutteridge, J. M. C. (1987). Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Letters.* **213**, 23-28.
- Moriwaki, Y., Yamamoto, T., Suda, M., Nasako, Y., Takahashi, S., Agbedana, O. E., Hada, T. and Higashino, K. (1993). Purification and immunohistochemical tissue localisation of human xanthine oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1164**, 327-330.
- Mueller, C. F. H., Laude, K., McNally, J. S. and Harrison, D. G. (2005). Redox Mechanisms in blood vessels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 274-278.
- Nakamura, M. (1991). Allopurinol-insensitive oxygen radical formation by milk xanthine oxidase systems. *J. Biochem.* **110**, 450-456.

- Nakamura, M. and Yamazaki, I. (1982). Preparation of bovine milk xanthine oxidase as a dehydrogenase form. *J. Biochem.* **92**, 1279-1286.
- Nandakumar, K. L., Svensson, L. and Holmdahl, R. (2003). Collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice: description of the disease and the influence of age, sex, and genes. *Am. J. Pathol.* **163**, 1827-1836.
- Niki, Y., Yamada, H., Seki, S., Kikuchi, T., Takishi, H., Toyoma, Y., Fujikawa, K. and Tada, N. (2001). Macrophage and neutrophil dominant arthritis in human IL-1 α transgenic mice. *J. Clin. Invest.* **107**, 1127-1135.
- Nishino, T. and Nishino Ta. (1997). The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene. *J. Biol. Chem.* **272**, 29859-29864.
- Nishino, T., Okamoto, K., Kawaguchi, Y., Hori, H., Matsumura, T., Eger, B. T., Pai, E. F. and Nishino, Ta. (2005). Mechanism of the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **280**, 24888-24894.
- Nishiura, H., Shibuya, Y., Matsubara, S., Tanase, S., Kambara, T. and Yamamoto, T. (1996). Monocyte chemotactic factor in rheumatoid arthritis synovial tissue. *J. Biol. Chem.* **271**, 878-882.
- Olofsson, P., Holmberg, J., Pettersson, U. L. F. and Holmdahl, R. (2003). Identification and isolation of dominant susceptibility loci for pristane-induced arthritis. *J. Immunol.* **171**, 407-416.
- Ouchterlony, O. (1958). Diffusion-in-gel methods of immunological analysis. *Prog. Allergy.* **5**, 1.
- Page, S., Powell, D., Benboubetra, M., Stevens, C. R., Blake, D. R., Selase, F., Wolstenholme, A. J. and Harrison, R. (1998). Xanthine oxidoreductase in human mammary epithelial cells: activation in response to inflammatory cytokines. *Biochim. Biophys. Acta.* **1381**, 191-202.
- Parks, D. A. and Granger, D. N. (1986). Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta. Physiol. Scand.* **548**, 87-99.

- Payne, C. R. (1984). Pulmonary manifestations of rheumatoid arthritis. *Br. J. Hosp. Med.* **32**, 192-197.
- Pettipher, E. R., Higgs, G. A. and Henderson, B. (1986). Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 8749-8753.
- Pettit, A. R., Ji, H., von Stechow, D., Müller, R., Goldring, S. R., Choi, Y., Benoist, C. and Grvallese, E. M. (2001). TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in serum transfer model of arthritis. *Am. J. Pathol.* **159**, 1689-1699.
- Pfeffer, K. D., Huecksteadt, T. P. and Hoidal, J. R. (1994). Xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in renal epithelial cells. Cytokine and steroid regulation. *J. Immunol.* **153**, 1789-1797.
- Powell, D. (1995). Purification, characterisation and regulation of hyman xanthine oxidase. Ph. D. Thesis. University of Bath. U. K.
- Prakken, B. J., Van Der Zee, R., Anderton, S. M., Van Kooten, P. J. S., Kuis, W. and Van Eden, W. (1997). Peptide-induced nasal tolerance for a mycobacterial heat shock protein 60 T cell epitope in rats suppresses both adjuvant arthritis and nonmicrobially induced experimental arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 3284-3289.
- Puig, J. C. and Mateas, F. A. (1989). Inhibition of xanthine oxidase by allopurinol: a therapeutic option for ischaemia induced pathological processes?. *Ann. Rheum. Dis.* **48**, 883-888.
- Quinn, M. A., Conaghan, P. G., O'Connor, P. J., Karim, Z., Greenstein, A., Brown, A., Brown, C., Fraser, A., Jarret, S. and Emery, P. (2005). Very early treatment with infliximab in addition to methotrexate in early, poor-prognosis rheumatoid arthritis reduces magnetic resonance imaging evidence of synovitis and damage, with sustained benefit after infliximab withdrawal: results from a twelve-month randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* **52**, 27-35.
- Rapaport, E. (2000). Erythrocyte sedimentation rate: is it a useful risk marker for coronary heart disease ?. *Eur. Heart J.* **21**, 1567-1569.

- Rau, R., Sander, O. and Wassenberg, S. (2003). Erosion healing in rheumatoid arthritis after anakinra treatment. *Ann. Rheum. Dis.* **62**, 671-673.
- Rhoden, E., Pereira-Lima, L., Lucas, M., Mauri, M., Rhoden, C., Pereira-Lima, J.C., Zettler, C., Petteffi, L., Belló-Klein, A. (2000). The effects of allopurinol in hepatic ischemia and reperfusion: experimental study in rats. *Eur. Surg. Res.* **32**, 215-222.
- Ricciardolo, F. L. M., Sterk, P. J., Gaston, B. and Folkerts, G. (2004). Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol. Rev.* **84**, 731-765.
- Roitt, L., Brostoff, J. and Male, D. (1985). Immunology. Gower Medical Publishing. London.
- Rousseaux-Prévost, R., De Almeida, M., Arrar, L., Hublau, P. and Rousseaux, J. (1989). Antibodies to sperm basic nuclear proteins detected in infertile patients by dot immunobinding and ELISA. *Am. J. Reprod. Immunol.* **20**, 17-20.
- Rowley, D. A. and Halliwell, B. (1983). Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of copper salts: a physiologically significant reaction?. *Arch. Biochem. Biophys.* **225**, 279-84.
- Sakai, A., Hirano, T., Okazaki, R., Okimoto, N., Tanaka, K. et Nakamura, T. (1999). Large-dose ascorbic acid administration suppresses the development of arthritis in adjuvant-injected rats. *Arch. Orthop. Trauma. Surg.* **119**, 121-126.
- Samanta, A., Webb, K., Grindulus, K. A., Fleming, J. and Sheldon, P. J. (1992). Sulphasalazines therapy in rheumatoid arthritis: qualitative changes in lymphocytes and correlation with clinical response. *Rheumatology.* **31**, 259 – 263.
- Sanders, S. A., Eisenthal, R. and Harrison, R. (1997). NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase-generation of superoxide anion. *Eur. J. Biochem.* **245**, 541-548.
- Saravanan, V. and Kelly, C. A. (2004). Reducing the risk of methotrexate pneumonitis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* **43**, 143 – 147.
- Saravanan, V. and Kelly, C. A. (2006). Drug-related pulmonary problems in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* **10**, 1093/rheumatology/ke1075.

- Schrier, D., Gilbertsen, R. B., Lesch, M. and Fantone, J. (1984). The role of neutrophils in tyoe II collagen-induced arthritis in rats. *Am. J. Pathol.* **117**, 26-29
- Schwartz, D. (1992). Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. 3^{ème} Ed. Flammarion Medecine Sciences. Paris, pp 157-162.
- Scotet, E., David-Ameline, J., Peyrat, M-A., Moreau-Aubry, A., Pinczen, D., Lim, A., Even, J., Semana, G., Berthelot, J-M, Breathnach, R., Bonneville, M. and Houssaint, E. (1996). T cell response to Epstein-Barr virus transactivators in chronic rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **184**, 1791-1800.
- Selloum, L., Bouriche, H., Tigrine, C. and Boudoukha, C. (2003). Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Exp. Toxic. Pathol.* **54**, 313-318.
- Sew Hoy, M. D., Williams, J. L. and Kirkham, B. W. (1997). Symmetrical synovial fluid cell cytokine messenger RNA expression in rheumatoid arthritis: analysis by reverse transcription/polymerase chain reaction. *Br. J. Rheumatol.* **36**, 170-173.
- Šimelyte, E., Isomäki, P., Rimpiläinen, M., Zhang, X. and Toivanen, P. (2001). Cytokine production in arthritis susceptible and resistant rat: a study with arthritogenic and non-arthritogenic Lactobacillus cell walls. *Scans. J. Immunol.* **53**, 132-138.
- Simon, L. S. and Yocum, D. (2000). New and future drug therapies for rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, **39**(suppl.1), 36-42.
- Smeets, T. J. M., Barg, E. C., Kraan, M. C., Smith, M. D., Breedveld, F. C. and Tak, P. P. (2003). Analysis of the cell infiltrate and expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in arthroscopic synovial biopsies: comparison with synovial samples from patients with end stage, destructive rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **62**, 635-638.
- Song, X-y., Zeng, L., Jin, W., Thompson, J., Mizel, D. E., Lei, K-j., Billingham, R. C., Poole, R. and Wahl, S. M. (1999). Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis. *J. Exp. Med.* **190**, 535-542.

- Stevens, C. R., Benboubetra, M., Harrison, R., Sahinoglu, T., Smith, E. C. et Blake, D. R. (1991). Localisation of xanthine oxidase to synovial endothelium. *Ann. Rheum. Dis.* **50**, 760-762.
- Stuart, J. M. and Dixon, F. J. (1983). Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice. *J. Exp. Med.* **158**, 378-392.
- Stuart, J. M., Cremer, M. A., Townes, A. S. and Kang, A. H. (1982). Type II collagen-induced arthritis in rats; passive transfer with serum and evidence that IgG anticollagen antibodies can cause arthritis. *J. Exp. Med.* **155**, 1-16.
- Stuart, J. M., Watson, W. C. and Kang, A. H. (1988). Collagen autoimmunity and arthritis. *FASEB J.* **2**, 2950-2956.
- Sussman, M. S. and Bulkley, G. B. (1990). Oxygen-derived free radicals in reperfusion injury. *Methods in Enzymol.* **186**, 711-723.
- Svelander, L., Holm, B. C., Bucht, A. and Lorentzen, J. C. (2001). Responses of the rat immune system to arthritogenic adjuvant oil. *Scand. J. Immunol.* **54**, 599-605.
- Symmons, D. and Harrison, B. (2000). Early inflammatory polyarthritis: results from the Norfolk Arthritis Register with a review of the literature. I. Risk factors for the development of inflammatory polyarthritis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* **39**, 835-843.
- 'T Hart, B. A., Bank, R. A., De Roos, J. A. D. M., Brok, H., Jonker, M., Theuns, H. M., Hakimi, J. and Te Koppele, J. M. (1998). Collagen-induced arthritis in Rhesus monkeys: evaluation of markers for inflammation and joint degradation. *Br. J. Rheumatol.* **37**, 314-323.
- Taneja, V., Taneja, N., Behrens, M., Pan, S., Trejo, T., Griffiths, M., Luthra, H. and David, C. S. (2003). HLA-DRB1*0402 (DW10) transgene protects collagen-induced arthritis-susceptible H2A^q and DRB1*0401 (DW4) transgenic mice from arthritis. *J. Immunol.* **171**, 4431-4438.
- Taniyama, Y. and Griendling, K. K. (2003). Reactive oxygen species in the vasculature: Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* **42**, 1075-1081.

- Thannickal, V. J. and Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **279**, L1005-L1028.
- Thompson, S. J., Francis, J. N., Khai Slew, L., Webb, G. R., Jenner, P. J., Joseph Colston, M. and Elson, C. J. (1998). An immunodominant epitope from mycobacterial 65-kDa heat shock protein protects against pristane-induced arthritis. *J. Immunol.* **160**, 4628-4634.
- Toivanen, P. (2003). Normal intestinal microbiota in the aetiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum.* **62**, 807-811.
- Topham, R. W., Walker, M. C. and Calisch, M. P. (1982a). Liver xanthine dehydrogenase and iron mobilisation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **109**, 1240-1246.
- Topham, R. W., Walker, M. C. and Calisch, M. P. (1982b). Evidence for the participation of intestinal xanthine oxidase in the mucosal processing of iron. *Biochemistry.* **21**, 4529-4535.
- Trentham, D. E., Townes, A. S. and Kang, A. H. (1977). Autoimmunity to type II collagen : an experimental model of arthritis. *J. Exp. Med.* **146**, 857-869.
- Troughton, P. R., Platt, R., Bird, H., El-Manzalawi, E., Bassiouni, M. and Wricht, V. (1996). Synovial fluid interleukin-8 and neutrophil function in rheumatoid arthritis and seronegative polyarthritis. *Br. J. Rheumatol.* **35**, 1244-1251.
- Tsang, V. C. W., Peralta, J. M. and Simons, A. R. (1983). Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* **92**, 377-391.
- Ullmann, J. E., Feigelson, P. and Harris, S. (1962). The effect of specific antibodies on xanthine oxidase from various sources. *J. Immunol.* **88**, 113-20.
- Vaillancourt, G. (1990). Arthrites et rhumatisme. Les Presse de l'Université de Montréal. pp 27-43.
- van de Putte, L. B. A., Rau, R., Breedveld, F. C., Kalden, J. R., Malaise, M. G., van Riel, P. L. C. M., Schattenkirchner, M., Emery, P., Burmester, G. R., Zeidler, H., Moutsopoulos, H. M., Beck, K. and Kupper, H. (2003). Efficacy and safety of the fully human anti-tumour

- necrosis factor monoclonal antibody adalimumab (D2E7) in DMARD refractory patients with rheumatoid arthritis: a 12 week, phase II study. *Ann. Rheum. Dis.* **62**, 1168-1177.
- van den Steen, P. E., Proost, P., Grillet, B., Brand, D. D., Kang, A. H., van Damme, J. and Opdenakker, G. (2002). Cleavage of denatured natural collagen type II by neutrophil gelatinase B reveals enzyme specificity, post-translational modifications in the substrate, and the formation of remnant epitopes in rheumatoid arthritis. *FASEB J.* **16**, 379-389.
- Van Der Heijden, I. M., Wilbrink, B., Schouls, L. M., Van Embden, J. D. A., Breedveld, F. C. and Tak, P. P. (1999). Detection of mycobacteria in joint samples from patients with arthritis using a genus-specific polymerase chain reaction and sequence analysis. *Rheumatology.* **38**, 547-553.
- van Lent, P., Nabbe, K. C., Boross, P., Blom, A. B., Roth, J., Holthuysen, A., Sloetjes, A., Verbeek, S. and van den Berg, W. (2003). The inhibitory receptor FcγRII reduces joint inflammation and destruction in experimental immune complex-mediated arthritides not only by inhibition of FcγRI/III but also by efficient clearance and endocytosis of immune complexes. *Am. J. Pathol.* **163**, 1839-1848.
- van Meurs, J., van Lent, P., Holthuysen, A., Lambrou, D., Bayne, E., Singer, I. and van den Berg, W. (1999). Active matrix metalloproteinases are present in cartilage during immune complex-mediated arthritis: a pivotal role for stromelysin-1 in cartilage destruction. *J. Immunol.* **163**, 5633-5639.
- Waksman, B. H. (2002). Immun regulation in adjuvant disease and other arthritis models: relevance to pathogenesis of chronic arthritis. *Scand. J. Immunol.* **56**, 12-34.
- Wang, J. Y. and Roehrl, M. H. (2002). Glycosaminoglycans are a potential cause of rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 14362-14367.
- Wang, X., Liang, J., Koike, T., Sun, H., Ichikawa, T., Kitajima, S., Morimoto, M., Shikama, H., Watanabe, T., Sasaguri, Y. and Fan, J. (2004). Overexpression of human matrix metalloproteinase-12 enhances the development of inflammatory arthritis in transgenic rabbits. *Am. J. Pathol.* **165**, 1375-1383.
- Wasil, M., Halliwell, B., Hutchison, D. C., and Baum, H. (1987). The antioxidant action of human extracellular fluids. Effect of human serum and its protein components on the

- inactivation of alpha 1-antiproteinase by hypochlorous acid and by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **243**, 219-23.
- Wastacott, C. I., Whicher, J. T., Barnes, I. C., Thompson, D., Swan, A. J. and Dieppe, P. A. (1990). Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* **49**, 676-681.
- Wijngaarden, S., van Roon, J. A. G., Bijlsma, J. W. J. van de Winkel, J. G. J. and Lafeber, F. P. J. G. (2003). Fcγ receptor expression levels on monocytes are elevated in rheumatoid arthritis patients with high erythrocyte sedimentation rate who do not use anti-rheumatic drugs. *Rheumatology.* **42**, 681-688.
- Wildner, G. and Diedrichs-Moehring, M. (2005). Multiple autoantigen mimotopes of infectious agents induce autoimmune arthritis and uveitis in lewis rats. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**, 677-679.
- Winterbourn, C. C. (1981). Hydroxyl radical production in body fluids. Roles of metal ions, ascorbate and superoxide. *Biochem. J.* **198**, 125-31.
- Wipke, B. and Allen, P. M. (2001). Essential role of neutrophils in the initiation and progression of murine model of rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* **167**, 1601-1608.
- Wipke, B. T., Wang, Z., Nagengast, W., Reichert, D. E. and Allen, P. M. (2004). Staging the initiation of autoantibody-induced arthritis: a critical role for immune complexes. *J. Immunol.* **172**, 7694-7702.
- Wordsworth, B. P., Stedeford, J., Rosenberg, W. M. C. and Bell, J. I. (1991). Limited heterogeneity of the HLA class II contribution to susceptibility to rheumatoid arthritis is suggested by positive associations with HLA-DR4, DR1 and DRw10. *Br. J. Rheumatol.* **30**, 178-180.
- Yamamoto, T., Moriwaki, Y., Suda, M., Takahashi, S., Hada, T., Nanahoshi, M., Agbedana, E. O. and Higashino, K. (1992). An immunoreactive xanthine oxidase protein-possessing xanthinuria and her family. *Clin. Chim. Acta.* **208**, 93-98.
- Zhang, H-G., Yang, P., Xie, J., Liu, Z., Liu, D., Xiu, L., Zhou, T., Wang, Y., Hsu, H-C. and Mountz, J. D. (2002). Depletion of collagen II-reactive T Cells and Blocking of B cell

activation prevents collagen II-induced arthritis in DBA/1j mice. *J. Immunol.* **168**, 4164-4172.

Zhang, X., Rimpiläinen, M., Hoffmann, B., Šimelyte, E., Aho, H. Toivanen, P. (2001). Experimental chronic arthritis and granulomatous inflammation induced by Bifidobacterium cell walls. *Scand. J. Immunol.* **54**, 171-179.

Zuber, M. and Miesel, R. (1994). Xanthine-oxidase and sulfhydryls and the antirheumatic action of xanthine-oxidase inhibitor allopurinol in the animal-model of collagen (II)arthritis. *Aktuel. Rheumatol.* **19**, 90-98.

Résumé

L'arthrite rhumatoïde (AR) est une maladie auto-immune touchant les articulations. Les modèles animaux de cette maladie ont participé à la compréhension de son étiologie et physiopathologie ainsi qu'à la recherche de nouveaux traitements. L'arthrite induite chez le rat par le collagène type II est l'un de ces modèles les plus représentatifs de la maladie humaine du fait qu'il remplit la majorité des critères fixés par l'association américaine de rhumatologie pour le diagnostic de l'arthrite rhumatoïde.

L'arthrite induite dans notre travail, par le collagène type II chez le rat est une maladie qui s'est étalée sur 60 jours et qui se caractérise par : (1) une atteinte symétrique des articulations des pattes postérieures où le gonflement donne à la patte 130% de son volume initial au pic de la maladie (21^{ème} jour), (2) perte du poids du groupe malade avoisinant 9%, (3) une augmentation de la vitesse de sédimentation des globules rouges qui atteint 4 fois celle des témoins, (4) une intense infiltration leucocytaire de la membrane synoviale et la moelle osseuse ce qui conduit à la destruction du cartilage et de l'os et à la déformation de l'articulation.

La xanthine oxydoréductase est présente dans l'articulation arthritique et les espèces oxygénées réactives qu'elle génère peuvent contribuer dans le processus inflammatoire ayant lieu. Pour tester cette éventualité nous avons préparé des anticorps spécifiques de cette enzyme chez le rat. Malheureusement, les anticorps à différentes concentrations (27.93-223.5 µg/ml) n'ont donné aucune inhibition d'aucune des trois activités XO, XDH, NADHO de l'enzyme humaine et bovine.

L'utilisation des anticorps d'autres espèces animales pourrait avoir un effet inhibiteur comme indiqué dans la bibliographie. Ces anticorps pourraient alors être utilisés comme traitement dans le modèle animal de l'arthrite.

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is an auto-immune disease implicating joints. Animal models of this disease have participated to the understanding of its etiology and physiopathology as well as to the search of new treatments. Collagen type II induced arthritis in rats is the more representative of the human disease among these models because it fulfill the majority of the criteria fixed by the American Rheumatology Association (ARA) for rheumatoid arthritis diagnosis.

Collagen type II induced arthritis in rat is 60 days lasting disease characterized by: (1) symmetric joints involvement of the hind paws where the swelling reach 130% of the initial volume at the maximum of the disease (day 21), (2) lose of 9% of body weight in the arthritic group, (3) increase in red blood cells sedimentation rate to reach 4 times its of the control, (4) intense leukocytes infiltration of the synovial membrane and bone marrow which lead to cartilage and bone destruction and joint deformation.

Xanthine oxidoreductase (XOR) is present in arthritic joints and reactive oxygen species generated by this enzyme could participate to the inflammatory process occurring there. To test this possibility we have prepared antibodies against this enzyme in rat. Unfortunately these antibodies with different concentration (27.93- 223.5 µg/mL) failed to inhibit any of the three activities XO, XDH, NADHO of the human and bovine enzyme.

The use of antibodies from other species could have an inhibitor effect as mentioned in the bibliography. These antibodies could be then used as treatment in the animal model of arthritis.