

50376
1990
27

68 844

50376
1990
27

N° d'ordre : 516

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

THESE DE DOCTORAT

Présentée à l'université de Lille I pour l'obtention du titre
de Docteur en SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

CATHERINE CHAMPAGNE



APPROCHE BIOCHIMIQUE
DE LA
REPONSE FONCTIONNELLE
DES
POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES
DANS LA PATHOLOGIE DES
MALADIES PARODONTALES

Présentée le 6 avril 1990 devant la commission d'examen :

Président : Professeur M. PORCHET
Rapporteurs : Professeur J. KREMBEL
Docteur M. JOSEPH
Examineurs : Professeur A. CAPRON
Docteur J. CHARON

L'ensemble de ce travail a été réalisé

au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire

Unité mixte INSERM UA 167 - CNRS 624

Institut Pasteur de Lille

1, rue du Professeur Calmette, 59 019 LILLE Cédex

sous la direction de

Monsieur le Professeur André CAPRON

Je dédie ce travail

à *GUY et COLETTE*

à *JEAN et BERTHE*

à *MARIE-LOUISE*

à *ARISTE et ELISABETH*

à *MARGUERITE*

à *JEAN-MARIE*

à *PATRICK*

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à :

Monsieur le Professeur A. CAPRON qui m'a accueillie dans son laboratoire. Que ce mémoire soit un témoignage de mon respect et de toute ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur M. Porchet, Monsieur le Professeur J. Krembel et Monsieur le Docteur M. Joseph qui ont accepté de juger ce travail. Soyez assurés de toute mon estime et de ma sincère gratitude.

Monsieur le Docteur J. Charon qui est à l'origine de ce travail. Veuillez croire à ma profonde reconnaissance.

Merci à tous, compagnons de travail et amis

à JOSETTE

pour ton amitié précieuse, tes conseils judicieux, ton aide toujours efficace

à JEAN-MARC

pour ta passion de la recherche et de la vie

à VALERIE

pour ton amitié et la chaleur de ton accueil

à JOEL

pour l'examen critique de ce mémoire, tes conseils justes et ton soutien

à COLETTE et JEAN-PAUL

pour vos critiques et vos conseils pertinents et formateurs

à BRIGITTE, ISABELLE, JEAN-PIERRE, SYLVIE et

PHILIPPE

pour votre présence et votre participation aux bons et aux moins bons instants

à CLAUDINE et SYLVIE-ANNE

pour votre amitié et votre aide infiniment précieuse

à GENEVIEVE et JACQUES

pour vos compétences et votre disponibilité dans l'accomplissement de ma formation

à JACKLYNE et CHRISTIAN

pour la qualité de vos services

Le travail présenté dans ce mémoire a donné lieu aux publications et communications suivantes :

Charon J., Joachim F., Champagne C., Torpier G. & Capron A.
(1987) Effect of dental plaque on the oxidative metabolism of normal neutrophils.
Oral. Microbiol. Immunol. 2, 92.

Charon J., Champagne C., Joachim F., Nuyts J.P. & Capron A.
(1988) Le parodonte et les neutrophiles dans la granulomatose septique (à propos d'un cas) *J. Parodontol.* 7, 29.

Champagne C., Balloul J.M., Fontaine J., Charon J. & Capron A.
(1989) Peptides synthesized by neutrophils from patients with severe attachment loss. *67th General Session International Association for Dental Research*, communication orale.

Champagne C., Balloul J.M., Fontaine J., Charon J. & Capron A.
(1990) Selective reduction of a 46 kDa polypeptide synthesis by neutrophils from patients with periodontal diseases. *soumis à publication.*

SOMMAIRE

RESUME	p. 10
GENERALITES	p. 13
I. Historique.....	p. 14
II. Myélopoïèse et maturation des polynucléaires neutrophiles	p. 17
III. Réponse fonctionnelle du polynucléaire neutrophile	p. 25
IV. Altération des fonctions du polynucléaire neutrophile en pathologie humaine.....	p. 45
V. Les maladies parodontales.....	p. 51
VI. Rôle du polynucléaire neutrophile dans les maladies parodontales.....	p. 63
OBJECTIFS DE NOTRE TRAVAIL	p. 66
RESULTATS	p. 67
I. Réponse du polynucléaire neutrophile dans la cavité buccale.....	p. 68
II. Réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles d'un patient atteint de granulomatose septique chronique	p. 79
III. Réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles de patients atteints de maladies parodontales.....	p. 82
IV. Début de caractérisation du polypeptide. P46.....	p. 100
DISCUSSION	p. 104
CONCLUSION	p. 112
MATERIEL ET METHODES	p. 113
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p. 124
TABLE DES MATIERES	p. 137

Liste des abréviations

Cellules ou substances cellulaires

- CD**déterminants antigéniques présents à la surface des leucocytes, reconnus par des anticorps spécifiques
- C5a**.....Petit fragment issu du clivage du composé C5 du complément
- CFU**.....*Colony Forming Unit* = unité de formation de colonie
- CFU-S**.....*Specialized Colony Forming Unit* = unité de formation de colonie spécialisée, spécifique d'une lignée (**CFU-GM**, **CFU-G**, **CFU-M**, **CFU-E**, **CFU-Eo**, **CFU-Bas**, **CFU-Meg**)
- CR1**.....Récepteur pour le fragment C3b du complément
- CR3**.....Récepteur pour le fragment C3bi du complément
- CSF**.....*Colony Stimulating Factor* = facteur de croissance hématopoïétique (**IL3**, **GM-CSF**, **G-CSF**, **M-CSF**, **Ep**)
- DG**Diacylglycérol
- FcγR**.....Récepteur pour les fragments Fc des immunoglobulines G
- IL**Interleukine
- IP₃**Inositol 1,4,5-triphosphate
- LTB₄**Leukotriène B₄
- PAF**.....*Platelet Activating Factor* = facteur d'activation des plaquettes
- PIP₂**.....Phosphatidylinositol 4,5-diphosphate
- TNF***Tumor Necrosis Factor*

Milieux de culture et réactifs chimiques

- DMSO**.....Diméthylsulfoxyde
- DTT**Dithiothréitol
- fMLP**.....formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine
- HBSS***Hank's Balanced Salt Solution*
- luminol**...5 amino-2,3 dihydro-1,4 phtalazinedione
- MEM***Minimum Eagle's Medium*

Met.....Méthionine

NP-40.....Nonidet P-40

PBS.....Tampon phosphate 10 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM

PMA.....Phorbol myristate acétate

PMSF.....Phénylméthanesulfonyle fluorure

PPO.....2.5-diphényl oxazole

TCA.....Acide trichloroacétique

Constantes et unités de mesure

Da, kDa ..Daltons, kilo-Daltons

ED₅₀.....Concentration d'activateur pour laquelle la réponse cellulaire obtenue est égale
à la moitié de la réponse cellulaire maximale

K_DConstante de dissociation

RESUME

RESUME

Le polynucléaire neutrophile constitue l'une des premières défenses de l'organisme face à une infection bactérienne. Cette cellule a pour fonction essentielle d'éliminer les micro-organismes envahisseurs. Pour accomplir sa mission, le polynucléaire neutrophile est attiré à partir de la circulation périphérique, il se déplace à travers les tissus jusqu'au foyer infectieux où il phagocyte les bactéries, les tue et les élimine.

De nombreuses bactéries, d'espèces variées, sont présentes dans la cavité buccale : elles constituent la flore buccale. Ces bactéries adhèrent facilement sur les dents et sur la gencive, constituant ainsi la plaque dentaire. Ces bactéries et les substances qu'elles libèrent attirent de nombreux polynucléaires neutrophiles qui affluent dans les tissus. Ainsi, les tissus gingivaux sont le théâtre perpétuel de l'affrontement des polynucléaires neutrophiles et des bactéries de la plaque dentaire.

Dans ce contexte, les maladies parodontales sont des pathologies infectieuses caractérisées par une destruction des tissus de soutien de la dent. Si on ne connaît pas la cause exacte de leur apparition, on peut toutefois avancer qu'elles sont associées à l'accumulation des bactéries de la flore buccale et à une diminution des mécanismes de défense de l'organisme avec, en particulier, une altération de la réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles.

Au cours de ce travail, nous nous sommes attachés à caractériser l'altération de la réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles de patients atteints de maladies parodontales. L'abord classique du problème avec l'utilisation des tests cellulaires fonctionnels (chimiotactisme, chimioluminescence) confirme la diminution de la capacité de réponse des polynucléaires neutrophiles des patients. Dans le but d'identifier le(s) marqueur(s) protéique(s) impliqué(s) dans ce défaut fonctionnel, nous avons effectué un marquage métabolique des cellules de patients et de témoins, en situation ou non d'activation (activateur précoce : fMLP, activateur tardif : Interféron- γ), et nous avons analysé par électrophorèse bidimensionnelle les produits peptidiques de ce marquage. Nos résultats montrent que les polynucléaires neutrophiles des patients sont spontanément plus activés que ceux des témoins, puisqu'ils ont un taux basal de marquage métabolique plus élevé. Par contre, la synthèse d'un polypeptide de

46 kDa est diminuée chez une majorité de patients. Nous nous sommes intéressés particulièrement à ce polypeptide parce qu'en outre, son taux d'expression est augmenté dans les polynucléaires neutrophiles des témoins stimulés. Le rôle de ce polypeptide dans le déclenchement de la réponse cellulaire et son implication éventuelle dans le déficit du polynucléaire neutrophile associé à la pathologie des maladies parodontales est discuté.

Nos résultats suggèrent que la diminution de l'expression du polypeptide P46 pourrait être un marqueur spécifique des lésions parodontales actives.

GENERALITES

GENERALITES

Après un bref rappel historique introductif, nous nous proposons de décrire successivement les processus de formation des polynucléaires neutrophiles matures à partir de leurs précurseurs médullaires, les mécanismes intracellulaires mis en œuvre au cours de la réponse fonctionnelle et enfin les altérations fonctionnelles du polynucléaire neutrophile en pathologie humaine et en particulier dans les maladies parodontales.

I. HISTORIQUE

C'est à partir des découvertes faites au cours du 19^{ème} siècle, démontrant l'importance des micro-organismes infectieux dans les maladies humaines, que l'étude de la réponse de l'organisme à l'infection s'est développée. L'observation au microscope des cellules du sang permit à Paul Ehrlich dès 1886 d'identifier et de décrire le polynucléaire neutrophile : "corpuscule blanc, avec un noyau polymorphe et un cytoplasme neutrophile - qui n'a aucune affinité pour un colorant qu'il soit basique (aniline) ou acide (éosine)" [1]. Mais c'est incontestablement Elie Metchnikoff (1845-1916) qui décrivit le premier le rôle fondamental de cette cellule dans l'immunité naturelle :

"The diapedesis of the white corpuscles, their migration through the vessel wall into the tissues is one of the principal means of defense possessed by the animal. As soon as the infective agents have penetrated into the body, a whole army of white corpuscles proceed towards the menaced spot, there entering into a struggle with the microorganisms... The leukocytes, having arrived at the spot where the intruders are found, seize them after the manner of Amoebae and within their bodies subject them to intracellular digestion ." [2]

Parallèlement, Ehrlich décrivait le rôle des anticorps et du complément. Ainsi en 1905, Metchnikoff et Ehrlich obtiennent conjointement le prix Nobel en reconnaissance de l'importance de leurs travaux sur l'immunité naturelle et acquise dans la réponse de l'organisme à une agression.

Très tôt, la présence de granules dans le cytoplasme et les processus d'exocytose de ces granules dans la vacuole de phagocytose ont été décrits. Puis les protéases et les lipases

contenues dans les granules ont été progressivement identifiées et caractérisées. Parallèlement, des auteurs ont montré que la phagocytose s'accompagne d'une véritable "respiration" de la cellule, avec consommation d'oxygène et libération de gaz carbonique. De plus, la description de la réponse fonctionnelle du polynucléaire neutrophile s'est affinée avec la mise en œuvre de techniques permettant d'évaluer cette réponse. Notons toutefois que si le système bactéricide du polynucléaire neutrophile est très efficace, il peut aussi devenir dangereux pour l'organisme, lorsque les produits toxiques du polynucléaire neutrophile sont libérés dans le milieu extracellulaire, et agressent les tissus environnants. Par ce biais, le polynucléaire neutrophile peut participer à l'installation d'une situation pathologique avec développement d'une inflammation chronique. Actuellement, nous connaissons de mieux en mieux la biochimie et la physiologie du polynucléaire neutrophile. Toutefois, ces quinze dernières années les progrès les plus significatifs ont été accomplis dans le domaine de l'étude du couplage signal d'activation-réponse cellulaire.

La figure 1 schématise les différentes phases de la réponse fonctionnelle du polynucléaire neutrophile : activation de la cellule par des facteurs émis sur le lieu de l'invasion bactérienne, migration chimiotactique vers ce lieu, phagocytose et bactéricidie. La destruction intracellulaire des micro-organismes s'effectue selon un processus indépendant de l'oxygène faisant intervenir les enzymes lysosomiales libérées à l'intérieur du phagolysosome après fusion des granules, et un processus dépendant de l'oxygène avec production de dérivés toxiques de l'oxygène par le système oxydase et lyse des bactéries par la myéloperoxydase.

Sur le plan clinique, il convient en premier lieu de vérifier si le nombre des polynucléaires neutrophiles présents dans le sang circulant est normal, et s'il n'y a pas de transformation maligne de leurs précurseurs. L'exploration fonctionnelle de la réponse des polynucléaires neutrophiles n'est abordée que chez les enfants et les adultes qui présentent une susceptibilité accrue à des infections sévères et récurrentes. De tels patients peuvent légitimement être suspectés d'être porteurs d'un déficit congénital grave de la fonction du polynucléaire neutrophile. Cependant ces dernières années, un regain d'intérêt s'est manifesté pour l'étude clinique du polynucléaire neutrophile avec la découverte de l'implication de cette cellule dans des pathologies inflammatoires non-infectieuses beaucoup plus répandues telles que : le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte, la glomérulonéphrite, la polyarthrite rhumatoïde

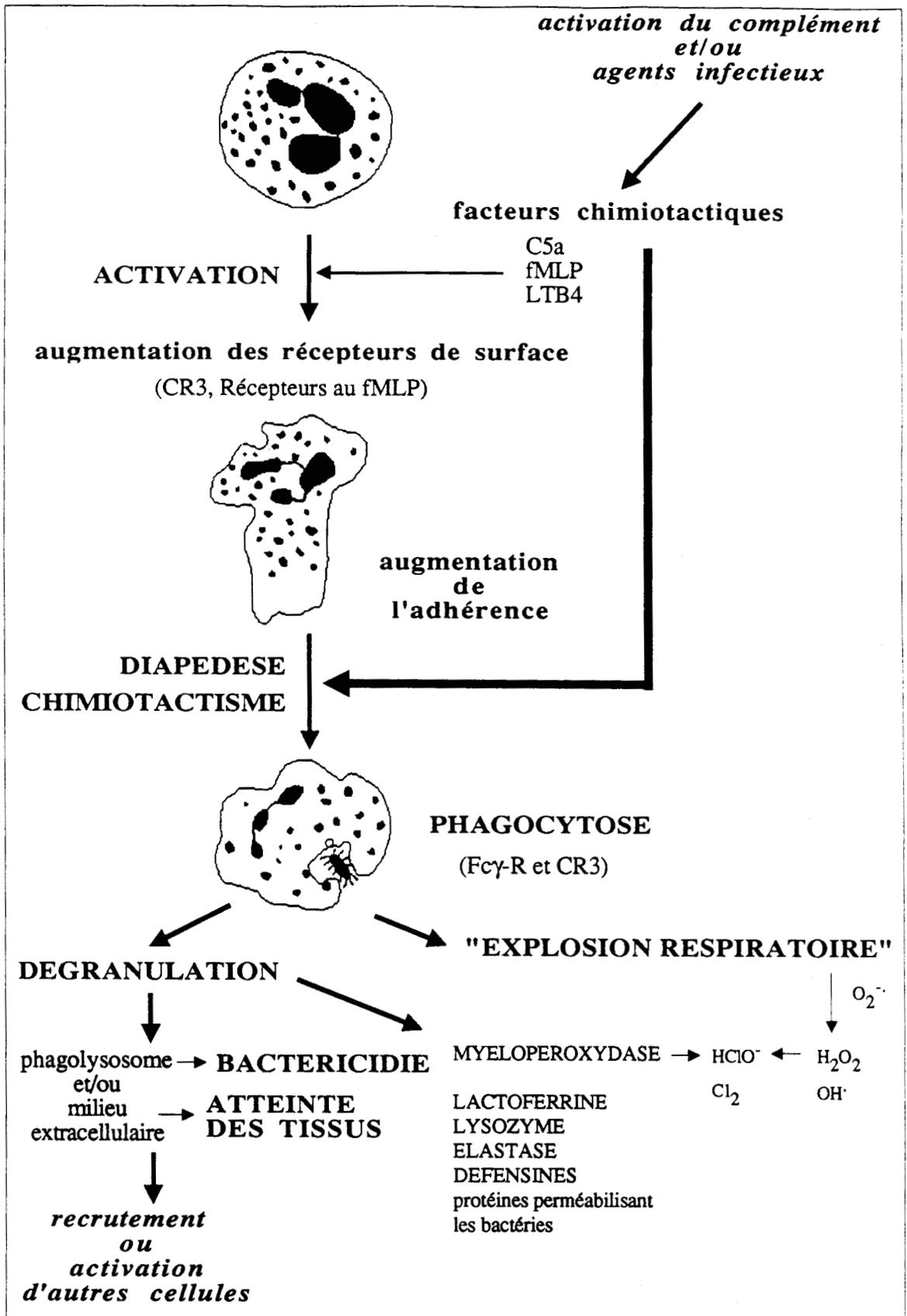


Figure 1: Réponse du polynucléaire neutrophile à une infection ou à une autre cause d'inflammation (d'après Malech H.L. & Gallin J.I. 1987 [3])

et l'infarctus du myocarde. Ces pathologies pourraient bien être associées à un déficit du polynucléaire neutrophile qui ne bloquerait pas complètement l'une des fonctions de la cellule, mais qui en diminuerait l'efficacité ou qui en détournerait la fonction protectrice vers une fonction destructrice pour les tissus. Ainsi, les efforts se sont focalisés également sur l'éclaircissement des mécanismes effecteurs de la réponse cellulaire.

II. MYELOPOIESE ET MATURATION DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES

II-1. Régulation de la myélopoïèse

II-1/a. Le système myélopoïétique

Le processus de formation des cellules sanguines s'effectue à partir de quelques cellules souches maintenues en nombre constant, **les cellules souches hématopoïétiques pluripotentes**. Outre leur capacité à s'auto-renouveler, ces cellules peuvent aussi donner naissance à des cellules plus différenciées : ce sont des cellules précurseurs appelées **unités de formation de colonies** ou CFU (*Colony Forming Units*). Ces CFU sont capables de proliférer et de se différencier pour produire finalement chacune une colonie de cellules matures du sang circulant. La maturation représente l'étape finale de la différenciation, et ne commence que lorsqu'un caractère morphologique spécifique d'une lignée apparaît.

In vivo, la myélopoïèse se déroule essentiellement au niveau de la moëlle osseuse, dans laquelle les cellules hématopoïétiques sont intimement liées avec les cellules du stroma (cellules endothéliales, adipocytes et cellules réticulées) et des macrophages médullaires. Ces cellules du stroma sont indispensables pour le développement du système hématopoïétique *in vivo* et dans des cultures *in vitro* à long terme de cellules médullaires. En effet, elles forment une matrice extra-cellulaire qui constitue un support pour les cellules souches et leur descendance, elles synthétisent des facteurs régulateurs, et elles facilitent la réponse des cellules hématopoïétiques à ces facteurs et à des facteurs externes tels que l'érythropoïétine. Par contre, dans le cas de cultures à court terme de cellules médullaires *in vitro*, les cellules du stroma ne sont pas nécessaires si les facteurs régulateurs sont apportés dans le milieu de culture.

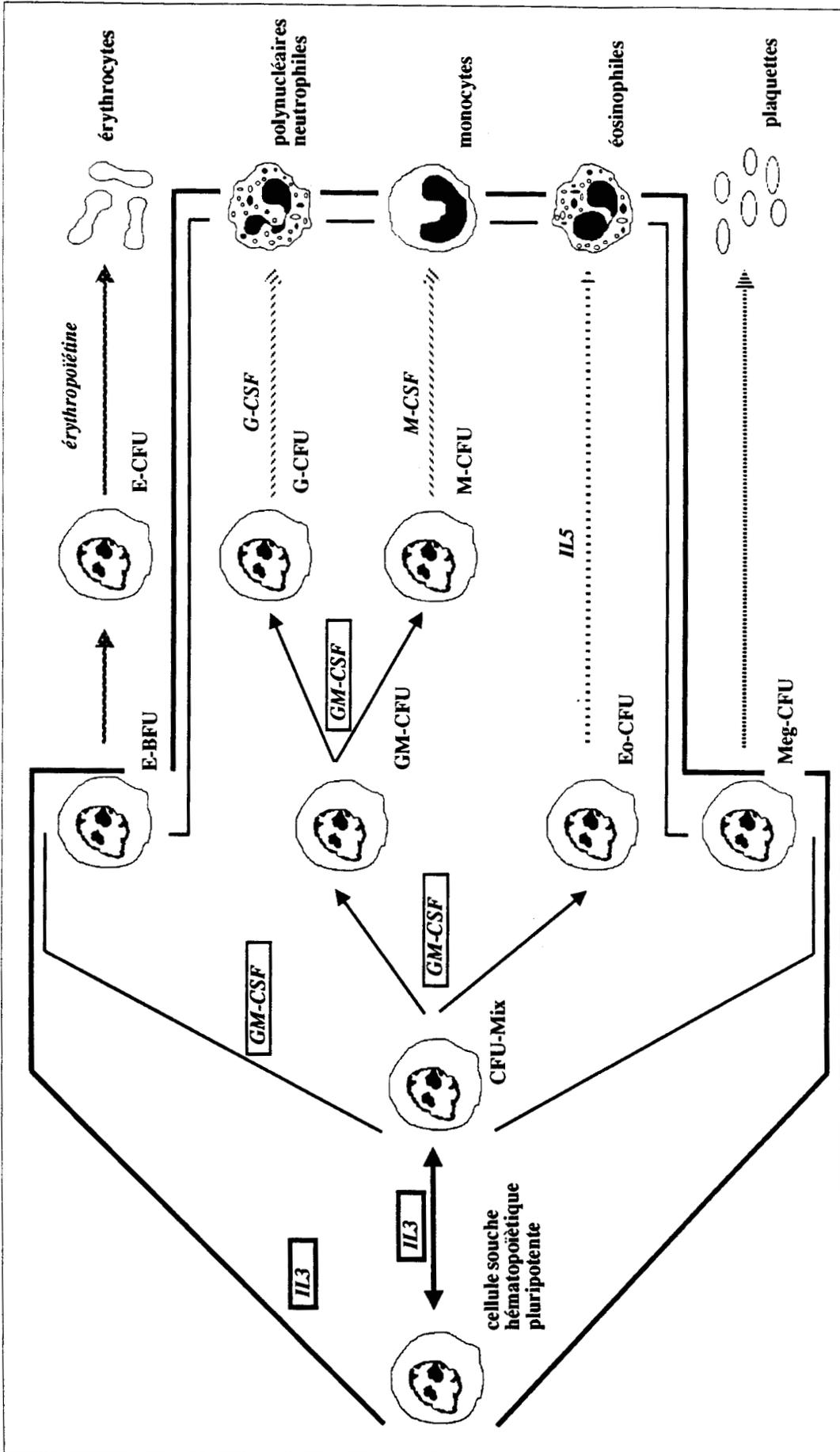


Figure 2 : Cellules et facteurs du système de myélopoïèse.
(d'après Sieff C.A. 1987 [4])

La croissance et le développement du système hématopoïétique sont régis par des facteurs de croissance hormonaux de nature glycoprotéique : ce sont **les facteurs de croissance hématopoïétiques** ou CSF (*Colony-Stimulating Factors*). La figure 2 représente l'ensemble des cellules impliquées dans le système hématopoïétique et les champs d'action des différents facteurs CSF.

II-1/b. Les facteurs de croissance hématopoïétiques

Les différents facteurs intervenant dans le développement du système myélopoïétique humain ont été identifiés et clonés (pour revue, [4]). Le tableau 1 résume les caractéristiques de chacun de ces facteurs. Notons que les activités de plusieurs facteurs se recoupent par leurs cellules cibles et par leurs actions sur ces cellules. Bien que leurs effets soient difficiles à analyser séparément, on peut distinguer deux types de facteurs : *i*) le multi CSF (ou IL3) et le GM-CSF qui agissent sur les cellules souches pluripotentes ou sur des cellules précurseurs immatures, et ne sont pas spécifiques d'une lignée ; *ii*) le G-CSF, le M-CSF et l'érythropoïétine qui agissent sur des cellules plus matures, les cellules précurseurs spécialisées, et assurent le développement de lignées spécifiques. Quel que soit leur niveau d'action, ces facteurs contrôlent la survie, la prolifération et la différenciation de leurs cellules cibles.

Les récepteurs membranaires des facteurs de croissance présents sur les cellules cibles ont été bien caractérisés chez la souris, et sont en cours de caractérisation chez l'homme. La distribution des récepteurs est restreinte aux cellules indifférenciées et en cours de maturation de la lignée cellulaire cible appropriée. Le nombre de récepteurs par cellule est faible (de l'ordre de 100 à 5 000, sauf pour le M-CSF où le nombre de récepteurs peut atteindre 15 000) et les constantes d'affinité sont élevées (de l'ordre de 10^9 à 10^{12} M⁻¹). Ainsi, les cellules cibles sont activées en présence de concentrations très faibles de CSF.

Le contrôle de la synthèse des facteurs de croissance est encore mal connu chez l'homme, sauf en ce qui concerne l'érythropoïétine. Plusieurs organes sont capables de synthétiser les CSF, et les activités CSF sont décelées dans des cultures cellulaires purifiées de lymphocytes T, de monocytes, de cellules endothéliales et de fibroblastes. Les techniques d'hybridation avec des sondes oligonucléotidiques ont montré d'une part que les cellules endothéliales, les fibroblastes et les monocytes ont des ARN messagers codant pour le GM-CSF, le M-CSF et le G-CSF mais pas pour l'IL3, alors que seuls quelques lymphocytes T médullaires sont capables

	<i>multi-CSF IL3</i>	<i>GM-CSF</i>	<i>G-CSF</i>	<i>M-CSF</i>	<i>érythropoïétine</i>
<i>masse moléculaire</i>	20 - 26 000	23 000	25 000	70 000 (2 x 35 000)	34 - 39 000
<i>gène cloné</i>	1 gène protéine mature = 133 aa chromosome 5	1 gène cDNA = 432 nucléotides protéine mature = 127 aa chromosome 5q21-5q32	1 gène protéine mature = 177 aa	1 gène protéine mature = 189 aa	1 gène protéine mature = 166 aa chromosome 7q11-q22
<i>glycosylation</i>	N-glycosylé	N-glycosylé	O-glycosylé	N-glycosylé	N-glycosylé et O-glycosylé
<i>cibles d'action</i>	CFU-Mix BFU-E CFU-GM CFU-G CFU-M CFU-Eo CFU-Meg	CFU-GM (vers G en conc. élevée vers M en conc. faible) BFU-E CFU-MIX CFU-EO CFU-Meg neutrophiles monocytes éosinophiles	CFU-G lignée HL-60	CFU-M monocytes	CFU-E (en conc. faible) (BFU-E en conc. élevée)

Tableau 1 : Les facteurs de croissance hématopoïétiques

d'après Sieff C.A., 1987 [4].

de synthétiser l'IL3. Le taux basal d'hématopoïèse est probablement maintenu par la production locale de facteurs de croissance par les cellules fixes du stroma. Durant une infection bactérienne, l'endotoxine stimule les monocytes qui libèrent de l'interleukine 1 (IL1) et/ou du TNF (*Tumor Necrosis Factor*), cytokines qui augmentent la libération de GM-CSF et de G-CSF par les cellules du stroma, et la libération d'IL3 et de GM-CSF par les lymphocytes T.

II-1/c. Intervention d'interleukines

Notons enfin que d'autres molécules qui n'ont pas à elles seules une activité de facteur de croissance hématopoïétique, peuvent toutefois agir en synergie avec un ou plusieurs des CSF décrits plus haut. C'est le cas de l'interleukine 6 (IL6) qui peut participer à la formation de colonies granulocytes-macrophages ou de mégacaryocytes en association avec le G-CSF ou l'IL3 respectivement, l'interleukine 5 (IL5) qui peut participer à la formation de colonies éosinophiles en association avec l'IL3 et l'IL1, et l'interleukine 4 (IL4) qui peut participer à la formation de colonies d'érythrocytes en association avec l'IL6 et l'érythropoïétine [5].

II-2. Régulation de la lignée neutrophile

Les polynucléaires neutrophiles et les monocytes dérivent d'un précurseur commun, le GM-CFU, qui est spécialisé car il ne peut pas donner naissance à des cellules d'un autre type.

La survie de ce GM-CFU est contrôlée par le GM-CSF. Une culture *in vitro* de cellules souches de la moëlle réalisée en présence de GM-CSF donne naissance à des colonies très nombreuses de polynucléaires neutrophiles et de monocytes. Si la même expérience est réalisée à partir d'une cellule unique, le clone cellulaire qui en dérive est constitué préférentiellement de polynucléaires neutrophiles si la concentration en GM-CSF est élevée, ou de monocytes si la concentration en GM-CSF est faible. Ceci suggère qu'il existe une étape dans le développement du précurseur GM-CFU où celui-ci se trouve engagé dans l'une ou l'autre des deux voies, et que le choix est déterminé par la concentration de GM-CSF présente dans l'environnement. Le G-CSF participe également au développement de la lignée des polynucléaires neutrophiles. N'oublions pas que *in vivo* les différents CSF sont présents et il est probable qu'ils agissent en synergie [6].

Au cours d'une infection bactérienne, les concentrations sériques de GM-CSF et de G-CSF sont augmentées, par le biais de la libération d'IL1 et de TNF par les monocytes. Un tel processus (que nous avons déjà décrit), permet à l'organisme de réguler en permanence les besoins en cellules effectrices matures. Des travaux récents ont montré que le GM-CSF agit également sur les polynucléaires neutrophiles matures, induisant la synthèse d'IL1 [7], et de TNF, de G-CSF et de M-CSF [8]. Ces observations laissent supposer que le polynucléaire neutrophile pourrait lui aussi jouer un rôle dans la régulation de la granulopoïèse.

II-3. Maturation et apparition des granules

Le processus de maturation est marqué par l'apparition des granules et des enzymes qu'ils renferment. La figure 3 représente les différentes étapes et les différents types cellulaires impliqués.

II-3/a. Nature des granules

Les granules "**primaires**" (appelés ainsi car ils apparaissent en premier) sont décelables au stade **myéloblaste**. Ce sont de gros granules colorés en bleu (d'où leur autre appellation de granules "azurophiles"), qui contiennent la myéloperoxydase cellulaire, des protéines cationiques de faible poids moléculaire, des hydrolases acides (β -glucuronidase, phosphatase acide, α -mannosidase, N-acétyl- β -glucosaminidase), et des protéases neutres (élastase, cathepsine G et cathepsine D).

Les granules "**secondaires**" apparaissent à partir du stade **promyélocyte**. Ils sont également appelés "spécifiques" car ils sont spécifiques de la lignée neutrophile par rapport aux lignées éosinophile et basophile. Ils contiennent du lysozyme (que l'on retrouve également dans les granules primaires), de la phosphatase alcaline chez certaines espèces animales (lapin et cobaye), de la collagénase, de la protéine ayant une affinité pour la vitamine B12 et de la lactoferrine.

Un troisième type de granules contenant de la gélatinase a été décrit : ce sont les granules "**tertiaires**" appelés par certains auteurs **granules de sécrétion**, car ils peuvent être exocytés vers le milieu extracellulaire dès que la cellule est stimulée [10]. On ne sait pas encore à quel stade de la maturation ils apparaissent.

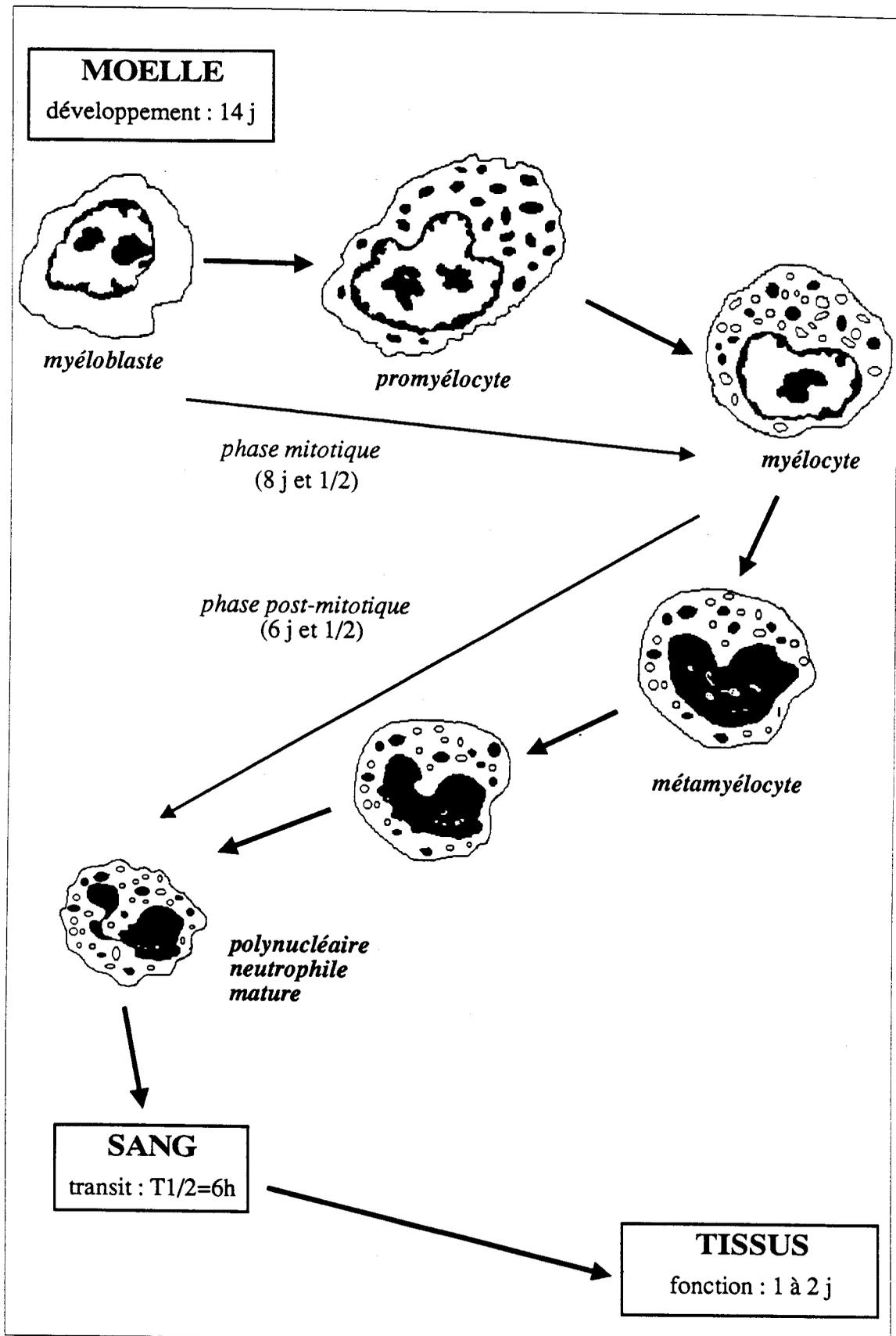


Figure 3: Maturation du polynucléaire neutrophile

(d'après Bainton D.F. et al. 1971 [9])

Récemment, plusieurs auteurs ont identifié un compartiment intracellulaire contenant de la phosphatase alcaline qu'ils appellent **phosphasome** [11], mais il semble prématuré de dire s'il s'agit d'un nouveau type de granules.

II-3/b. Mécanismes de formation des granules

Les granules se forment à partir du système de synthèse des protéines, par accumulation des enzymes dans des saccules d'ergastoplasme et il est tout à fait remarquable de noter que les deux types de granules sont formés à partir de zones différentes de l'ergastoplasme. Au fur et à mesure que la maturation s'avance, l'appareil de synthèse des protéines régresse : ribosomes, corps de Golgi et ergastoplasme. De même, les mitochondries deviennent petites et peu nombreuses. Le noyau large au début (pour faciliter les échanges à travers la membrane nucléaire au cours de la synthèse protéique), se réduit en même temps que la chromatine se condense. Au stade du polynucléaire neutrophile mature, le noyau apparaît segmenté en plusieurs lobes (généralement 3 à 5), reliés par un filament de chromatine.

III. REPOSE FONCTIONNELLE DU POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE

Le rôle essentiel du polynucléaire neutrophile est incontestablement d'éliminer les micro-organismes envahisseurs. Traditionnellement, l'accomplissement de cette fonction est divisée en plusieurs phases : sensibilisation et orientation, déplacement vers le foyer inflammatoire, phagocytose et bactéricidie (figure 1). Ainsi, le polynucléaire neutrophile mature qui arrive dans le sang circulant ne semble pas être engagé dans des interactions significatives avec les autres cellules du système immunitaire. Toutefois, des observations récentes ont mis en évidence une synthèse protéique *de novo* du polynucléaire neutrophile dans certaines conditions d'activation. Alors, le polynucléaire neutrophile pourrait être capable lui aussi de synthétiser et de sécréter des messages à l'intention d'autres cellules du système immunitaire, et de moduler la réponse de ces cellules, comme nous l'avons déjà signalé dans le cas du GM-CSF. Toutefois aucune évidence physiologique significative d'un tel rôle du polynucléaire neutrophile n'a encore pu être établie avec certitude.

Au cours de cet exposé, nous avons choisi de présenter la réponse cellulaire sous forme d'étapes successives, dans l'ordre chronologique de leur déroulement, et de décrire les différentes molécules impliquées à chacune de ces étapes.

III-1. Activation du polynucléaire neutrophile : rôle des marqueurs membranaires

III-1/a. Mise en évidence des récepteurs

Récepteurs pour le fMLP

Le tripeptide synthétique **N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP)**, au même titre que toute une famille d'oligopeptides ayant une extrémité N-formyl-Met, est un puissant activateur des fonctions du polynucléaire neutrophile. L'activité biologique du fMLP et sa capacité de liaison à la surface de la cellule se manifestent pour des concentrations analogues, ce qui indique l'existence de récepteurs spécifiques pour cette substance à la surface de la cellule. L'existence de tels récepteurs a été confirmée par des études de fixation à l'équilibre de fMLP radiomarqué sur la cellule (technique de "*binding*") [12]. Ce n'est qu'ultérieurement que

ces oligopeptides ayant une extrémité N-formyl-Met se sont avérés être des substances naturelles produites par les bactéries porteuses d'une activité chimiotactique pour différentes cellules sanguines : polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, monocytes et macrophages [13]. Ainsi, ces oligopeptides semblent jouer un rôle physiologique dans l'activation des polynucléaires neutrophiles.

Il existe environ $55\,700 \pm 4\,800$ récepteurs pour le fMLP par cellule ; 10 à 30% d'entre eux sont des récepteurs d'affinité plus élevée ($K_D = 0,53 \pm 0,01$ nM), par rapport aux autres qui sont des récepteurs de faible affinité ($K_D = 24,4 \pm 1,2$ nM) [14]. Ainsi, la liaison du fMLP sur ses récepteurs peut initier des réponses cellulaires différentes : les fonctions liées à la mobilité cellulaire interviennent à des doses faibles de stimulus et font donc appel aux récepteurs de forte affinité, alors que les fonctions liées à la bactéricidie et à la cytotoxicité interviennent pour des doses 10 à 50 fois supérieures par l'intermédiaire des récepteurs de faible affinité.

Ces récepteurs sont partiellement interconvertibles d'un état d'affinité à l'autre par l'intermédiaire d'une protéine régulatrice appelée **protéine G** car elle est capable de fixer le GTP. Un modèle du fonctionnement de cette protéine G a été proposé par Koo *et al.* [15]. Ces différences d'affinité et la possibilité d'interconversion pour une partie de ces récepteurs d'un état d'affinité à l'autre sont des processus qui jouent probablement un rôle dans les mécanismes de transmission intra-membranaire du signal d'activation. En effet, le blocage de l'activité de la protéine G par la toxine de *Bordetella pertussis* inhibe fortement la chémotaxie, le métabolisme de l'oxygène et la dégranulation des granules spécifiques, alors qu'il inhibe faiblement la phagocytose et la dégranulation des granules primaires.

D'autre part, Gallin *et al.* ont émis l'hypothèse de l'existence d'un **pool intracellulaire de réserve de récepteurs** ; en effet, lors d'une préincubation en présence du phorbol ester PMA stimulant la dégranulation des granules spécifiques, la capacité de liaison du fMLP est multipliée par 2 [16]. Des récepteurs de faible affinité sont présents dans la membrane des granules spécifiques et viennent s'exprimer à la surface de la cellule par fusion de la membrane des granules avec la membrane cytoplasmique au cours d'un processus d'exocytose des granules spécifiques (pour revue [17]).

Le récepteur pour le fMLP a été purifié : il s'agit d'une glycoprotéine de masse apparente 50 à 70 kDa, et de point isoélectrique compris entre 6,0 et 6,5 [18].

Récepteurs pour le C5a

Le facteur chimiotactique identifié le premier pour le polynucléaire neutrophile a été le C5a. Il s'agit du produit du clivage de l'extrémité N-terminale de la chaîne α du composé C5 du système du complément par la C5-convertase. Le C5a est une glycoprotéine formée d'une chaîne de 74 acides aminés avec une arginine en position C-terminale et un groupement oligosaccharidique de 3000 Da. L'activité biologique de cette anaphylatoxine est étendue : elle stimule plusieurs fonctions du polynucléaire neutrophile (margination et migration chimiotactique, stimulation du métabolisme oxydatif et libération de leukotriènes), elle augmente la perméabilité vasculaire, induit la dégranulation des mastocytes et provoque une contraction des muscles lisses. La présence de récepteurs spécifiques pour le C5a sur le polynucléaire neutrophile a été démontrée ; le nombre de récepteurs par cellule est compris entre 100 000 et 300 000, et la concentration qui déclenche une réponse cellulaire égale à la moitié de la réponse maximale est $ED_{50} = 3 \text{ à } 7 \text{ nM}$ [19].

Récepteurs pour le leukotriène B₄

Le polynucléaire neutrophile est capable non seulement de synthétiser des substances chimiotactiques pour lui-même mais aussi de métaboliser ces mêmes substances, processus qui peut avoir une importance capitale dans le déroulement de la réaction inflammatoire ; c'est le cas du leukotriène B₄ (LTB₄) et du facteur d'activation des plaquettes (PAF).

Les leukotriènes sont des médiateurs puissants induits lors des épisodes inflammatoires et de réactions allergiques. Le **leukotriène B₄ (LTB₄)** est chimiotactique pour les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, il induit la dégranulation et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Le LTB₄ (ou acide 5(S),12(R)-dihydroxy-éicosa-6,14cis-8,10trans-tétraénoïque) est synthétisé à partir de l'acide arachidonique par la voie de la 5-lipoxygénase, dans plusieurs types cellulaires dont le polynucléaire neutrophile. Le LTB₄ est un facteur chimiotactique pour le polynucléaire neutrophile ; il stimule également l'adhérence, l'agrégation inter-cellulaire et la libération d'enzymes lysosomiales en présence de cytochalasine B. Des récepteurs spécifiques pour le LTB₄ sont présents sur le polynucléaire neutrophile [20], et sont de deux types : récepteurs de forte affinité (4 400 sites de liaison par cellules avec $K_D = 0,4 \text{ nM}$) et récepteurs de faible affinité (270 000 sites de liaison par cellule avec $K_D = 61 \text{ nM}$) [21]. La liaison du

LTB₄ sur les récepteurs de forte affinité déclenche la migration chimiotactique, alors que la liaison sur les récepteurs de faible affinité déclenche la libération des enzymes lysosomiales. Les récepteurs de faible affinité sont composés d'une protéine de 60 kDa, qui renferme le site de liaison pour le LTB₄ ; les récepteurs de forte affinité sont composés de la même unité de liaison en association avec une protéine de 40 kDa capable de lier le GTP [22] ; de même que pour les récepteurs du fMLP, l'état d'affinité des récepteurs est déterminé par les interactions entre ces deux protéines et par la concentration en GTP : il existe 3 états d'affinité interconvertibles suivant un modèle proposé par Goldman *et al.* [22]. Ces différents états d'affinité sont bien réels puisqu'ils ne sont pas reconnus de façon identique par des anticorps monoclonaux, et puisqu'ils ne déclenchent pas les mêmes réponses cellulaires.

Récepteurs pour le facteur d'activation plaquettaire

Notons également la présence de récepteurs pour le facteur d'activation plaquettaire (PAF) sur le polynucléaire neutrophile. Le PAF est un phospholipide de structure générale 1-O-Alkyl-2-O-Acéthyl-sn-Glycéryl-3-Phosphorylcholine. En réponse à différents stimuli, il peut être synthétisé *in vitro* par les monocytes et macrophages, les neutrophiles, les plaquettes, les basophiles et les cellules endothéliales. Le PAF induit une augmentation de la réponse chimiotactique et stimule la dégranulation du polynucléaire neutrophile ; ces effets sont transmis par des récepteurs spécifiques qui sont de deux types : des récepteurs de forte affinité qui induisent une perméabilité au calcium et des récepteurs de faible affinité qui sont associés à une protéine G et qui stimulent la phospholipase C [23]. Le PAF peut également avoir un effet de "*priming*" c'est-à-dire qu'il est capable de produire une pré-activation du polynucléaire neutrophile telle que la capacité de réponse à un deuxième stimulus est augmentée. Ainsi le PAF est capable d'amplifier le métabolisme oxydatif induit par le fMLP ou par le PMA [24].

Récepteurs pour des cytokines

Des cytokines ont aussi une activité chimiotactique pour le polynucléaire neutrophile, qui passe par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

Des auteurs ont montré récemment l'existence de récepteurs spécifiques de l'**Interleukine 1 (IL1)** sur le polynucléaire neutrophile (900 récepteurs par cellule et K_D estimé à 3,0 x 10⁻¹⁰ M) [26]. Cette observation confirme le rôle de l'IL1 comme activateur du

polynucléaire neutrophile, alors que les effets de l'IL1 sur la réponse cellulaire ne sont pas décrits unanimement par les différents auteurs.

Le facteur hématopoïétique **GM-CSF** agit également sur les polynucléaires neutrophiles matures et manifeste des effets très variés. Il stimule l'expression d'antigènes de surface (récepteurs pour le fragment C3bi du complément [27]), il induit la synthèse d'ARNm pour différentes cytokines (l'IL1 [7] et TNF, G-CSF et M-CSF [8]) et il induit une synthèse protéique [27]. Au point de vue fonctionnel, le GM-CSF seul stimule faiblement le polynucléaire neutrophile. Par contre, il manifeste un effet notable de "*priming*" ; ainsi, la préincubation en présence de GM-CSF augmente la production d'anions superoxydes [28], la phagocytose et la cytotoxicité dépendante d'anticorps [29], en réponse à des facteurs chimiotactiques comme le fMLP et le PAF. Des récepteurs pour le GM-CSF sont présents en nombre réduit sur la membrane des neutrophiles (70 à 350/cellule), avec une constante d'affinité comprise entre 10^9 et 10^{12} M^{-1} [30].

Glycoprotéines d'adhésion

Il s'agit d'une famille de glycoprotéines, les intégrines, présentes dans la membrane des polynucléaires neutrophiles, des lymphocytes et des monocytes. Elles sont constituées de deux sous-unités liées de façon non-covalente, la sous-unité β qui est commune et la sous-unité α qui diffère [31]. La sous-unité β a un poids moléculaire de 95 kDa et correspond au marqueur **CD 18**. Les trois sous-unités α des trois glycoprotéines d'adhésion présentes dans la membrane du polynucléaire neutrophile sont le **LFA-1** ou **CD 11a** (PM 177 kDa), le **Mac-1** ou **CD 11b** (PM 165 kDa) et le **CD 11c** du **p150-95** (PM 150 kDa). Le marqueur prédominant du polynucléaire neutrophile est le Mac-1 qui correspond au récepteur **CR3** pour le fragment **C3bi** du complément. Ces molécules ont été clonées et séquencées [32].

Ces glycoprotéines sont impliquées dans les fonctions d'adhésion, agrégation, de chimiotactisme et de phagocytose. Le rôle particulier de chacune des glycoprotéines d'adhésion est étudié à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre différents déterminants antigéniques de ces molécules. Les polynucléaires neutrophiles non activés sont capables d'adhérer sur une monocouche de cellules endothéliales en culture par l'intermédiaire de LFA-1, alors que lorsqu'ils sont stimulés par un facteur chimiotactique, l'adhésion se fait par l'intermédiaire des Mac-1 [33]. De plus, la stimulation des polynucléaires neutrophiles par les facteurs

chimiotactiques entraîne une augmentation du nombre de CR3 exprimés sur la membrane, consécutive à la mobilisation d'un pool intracellulaire de réserve de ces récepteurs, localisé au niveau de la membrane des granules spécifiques [34]. Les CR3 interviennent également dans les processus de liaison et de phagocytose des particules opsonisées, en relation avec les Fc γ récepteurs [35].

Le **syndrome de déficience de l'adhésion des leucocytes** correspond à un défaut de synthèse de la sous-unité β , qui entraîne la non-fonctionnalité de toutes les glycoprotéines de la famille [36]. Du point de vue clinique, les infections des muqueuses, de la peau et des poumons sont fréquentes. Il n'y a pas de formation de pus, alors que le nombre de polynucléaires neutrophiles circulants est élevé. Ce fait traduit l'incapacité des cellules à adhérer à la paroi de l'endothélium et à migrer au travers de cette paroi par diapédèse vers les tissus inflammatoires (pour revue, [37]).

Récepteurs pour les fragments Fc des immunoglobulines G : Fc γ R_{III} = CD 16

Plusieurs types de récepteurs pour les fragments Fc des immunoglobulines G ont été décrits : le Fc γ R_I est celui qui présente l'affinité la plus élevée, le Fc γ R_{II} (CD 32) et le Fc γ R_{III} (CD 16) qui ont une affinité plus faible. Seuls les Fc γ R_{II} et les Fc γ R_{III} sont présents sur le polynucléaire neutrophile au repos [38], et l'expression du Fc γ R_I est induite par l'Interféron- γ [39]. Notons également qu'il y a 3 à 6 fois plus de Fc γ R_{III} que de Fc γ R_{II} exprimés à la surface de la cellule [40]. Les polynucléaires neutrophiles ne sont pas capables de fixer les IgG monomériques, mais ils fixent les complexes d'IgG renfermant des IgG1 ou des IgG3. La liaison s'établit préférentiellement sur les Fc γ R_{III} ; entre 100 000 et 300 000 Fc γ R_{III} sont présents sur le polynucléaire neutrophile ; l'affinité pour les dimères IgG1 est voisine de 11×10^{-7} M et l'affinité pour les dimères IgG3 de 20 à 60×10^{-7} M. Le Fc γ R_{III} représente une bande de 50 à 73 kDa sur des gels d'électrophorèse monodimensionnels, et il a été purifié ; il s'agit d'une sialoglycoprotéine, avec une longue chaîne de type mannoside extra membranaire qui facilite l'engagement de l'IgG dans le site de liaison [41] et une partie protéique qui montre l'existence de deux allèles (NA1 et NA2) [42]. La fonction du Fc γ R_{III} présent sur les polynucléaires neutrophiles consiste d'une part à éliminer les complexes immuns, et d'autre part à fixer et déclencher la phagocytose des bactéries opsonisées. Le clonage du gène correspondant par plusieurs équipes [43, 44 et 45] confirme qu'il existe deux gènes très

proches localisés sur le chromosome 1, et que la protéine est ancrée dans la membrane cytoplasmique par un lien de type phosphatidyl inositol qui lui confère une grande mobilité latérale au sein de la membrane. Cette mobilité permet l'établissement d'interactions avec le $Fc\gamma R_{II}$ qui déclenche les processus de phagocytose et d'activation du métabolisme oxydatif.

Récepteurs pour le fragment C3b / C4b du Complément : CR1

Le récepteur pour le complément de type 1, **CR1**, lie les fragments C3b du complément. C'est une glycoprotéine membranaire composée d'une chaîne simple polypeptidique de poids moléculaire égal à 250 kDa [46]. Le CR1 est capable de lier et d'internaliser des complexes immuns et des particules opsonisées par les fragments C3b et C4b du complément [47]. Toutefois, la phagocytose par l'intermédiaire des CR1 nécessite une co-stimulation des polynucléaires neutrophiles par le fMLP ou le PMA, dans des conditions telles que le CR1 soit phosphorylé [48]. Le PMA étant capable de moduler l'expression et le recyclage des récepteurs CR1 à la surface de la cellules [49].

Récepteurs pour le facteur chimiotactique des polynucléaires neutrophiles produit par les monocytes ou IL8

Un nouveau facteur chimiotactique spécifique du polynucléaire neutrophile a été récemment mis en évidence dans les surnageants de culture de monocytes stimulés par de l'endotoxine [50 et 51]. Le cDNA correspondant a été cloné et la séquence en acides aminés en a été déduite : la forme mature comporte 72 acides aminés [52]. Ce *Monocyte-Derived Neutrophil Chemotactic Factor* (**MDNCF**) ou **IL8** est chimiotactique pour les polynucléaires neutrophiles, et il stimule la dégranulation et l'activation du métabolisme oxydatif [53]. Le mode d'action de ce facteur fait intervenir des récepteurs spécifiques présents sur la membrane des polynucléaires neutrophiles : la technique de binding révèle la présence de 20 000 sites récepteurs par cellule, tous de forte affinité ($K_D = 80 \times 10^{-9}$ M) [54]. L'analyse électrophorétique des peptides qui lient l'IL8 radiomarquée met en évidence deux bandes à 67 et à 59 kDa [54].

III-1/b. Fonction des récepteurs

Les différents activateurs des fonctions du polynucléaire neutrophile que nous venons de passer en revue, agissent tous par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Ces récepteurs sont capables d'induire trois grandes catégories de réponse cellulaire : déclenchement de l'adhésion

et de la migration, déclenchement des fonctions de la bactéricidie (phagocytose, libération du contenu des granules et métabolisme de l'oxygène) et effet de "*priming*" ou de pré-activation cellulaire. L'analyse globale de la réponse fonctionnelle du polynucléaire neutrophile peut paraître complexe car chaque signal et chaque molécule réceptrice peut induire plusieurs des catégories de réponse cellulaire définies plus haut. L'orientation de la réponse vers une catégorie plutôt qu'une autre va être réalisée au cours des processus de la **transmission intracellulaire du signal d'activation**.

Outre leur position clé dans l'initiation de ces processus, l'expression de ces récepteurs à la surface de la cellule obéit à une dynamique particulière liée aux mouvements des structures membranaires. Par exemple, au cours d'une première stimulation par le fMLP, la liaison s'établit préférentiellement sur les récepteurs de forte affinité. Alors la membrane cellulaire se plisse, la cellule change de forme et devient polarisée (avec un large front membranaire antérieur et un uropode postérieur étiré). Les complexes ligand-récepteur sont rapidement rassemblés à l'uropode et internalisés [55], de sorte que l'on enregistre une diminution rapide du nombre de récepteurs exprimés à la surface de la cellule (processus de "dé-activation" de la réponse cellulaire ou de "down-regulation" c'est-à-dire de répression de l'expression des récepteurs). Toutefois, cette diminution est transitoire, et dans un deuxième temps, si la stimulation persiste, on observe une augmentation du nombre de récepteurs exprimés en surface. En effet, c'est à ce moment qu'intervient la mobilisation du pool intracellulaire de réserve en récepteurs, par fusion de la membrane des granules spécifiques avec la membrane cytoplasmique.

Ainsi, une gêne dans la dynamique des récepteurs pourrait se traduire par une diminution de la capacité de réponse fonctionnelle de la cellule. Une bonne démonstration clinique d'un tel processus est étayée par le déficit congénital en granules spécifiques.

Toutefois, la diminution de l'expression en surface des récepteurs n'est observée que très rarement. Ceci tendrait à prouver l'importance des processus de transduction du signal d'activation.

III-2. Transmission intracellulaire du signal d'activation

La figure 4 représente schématiquement les processus connus impliqués dans la transduction trans-membranaire du signal d'activation cellulaire.

III-2/a. Protéines G

La liaison d'un ligand sur son récepteur spécifique déclenche l'activation d'une protéine G qui présente la double caractéristique d'être associée au récepteur et de pouvoir fixer le GTP. Des protéines G ont été décrites dans plusieurs types cellulaires et elles manifestent une activité régulatrice dans de nombreux processus de transduction du signal de l'organisme [57]. La protéine G présente dans la membrane plasmique des polynucléaires neutrophiles a été purifiée : la sous unité α a une masse de 40 kDa et elle diffère des autres sous unités α déjà connues [58 et 59].

Il s'agit d'une famille de protéines constituées de 3 sous-unités : α , β et γ . Seule la sous-unité α diffère et c'est elle qui porte l'activité de la protéine G. Lorsqu'elle lie le GTP, elle se dissocie du complexe ligand-récepteur-protéine G et active la phospholipase C membranaire [60]. La toxine de *Bordetella pertussis* provoque une ADP-rybosylation de la sous-unité α qui ne peut plus se dissocier et devient inactive [61]. Ce processus bloque les effets du fMLP, du LTB₄ et du C5a.

III-2/b. La Phospholipase C

Lorsqu'elle est activée par la sous-unité α de la protéine G, la phospholipase C hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) en diacylglycérol (DG) qui reste dans la membrane et en inositol 1,4,5 triphosphate (IP₃) qui est soluble dans le cytosol. Le DG et l'IP₃ sont des seconds messagers et ils vont activer respectivement la protéine kinase C et la mobilisation du calcium intracellulaire. Notons que l'activation de la phospholipase C par la sous-unité α de la protéine G dépend de la concentration en calcium [62].

III-2/c. Rôle du diacylglycérol

L'incubation du polynucléaire neutrophile en présence de fMLP déclenche la production rapide de diacylglycérol dès les 10 premières secondes, suivie d'une augmentation progressive pendant environ 5 minutes et d'un retour rapide au taux normal [63]. Le DG est hydrophobe et

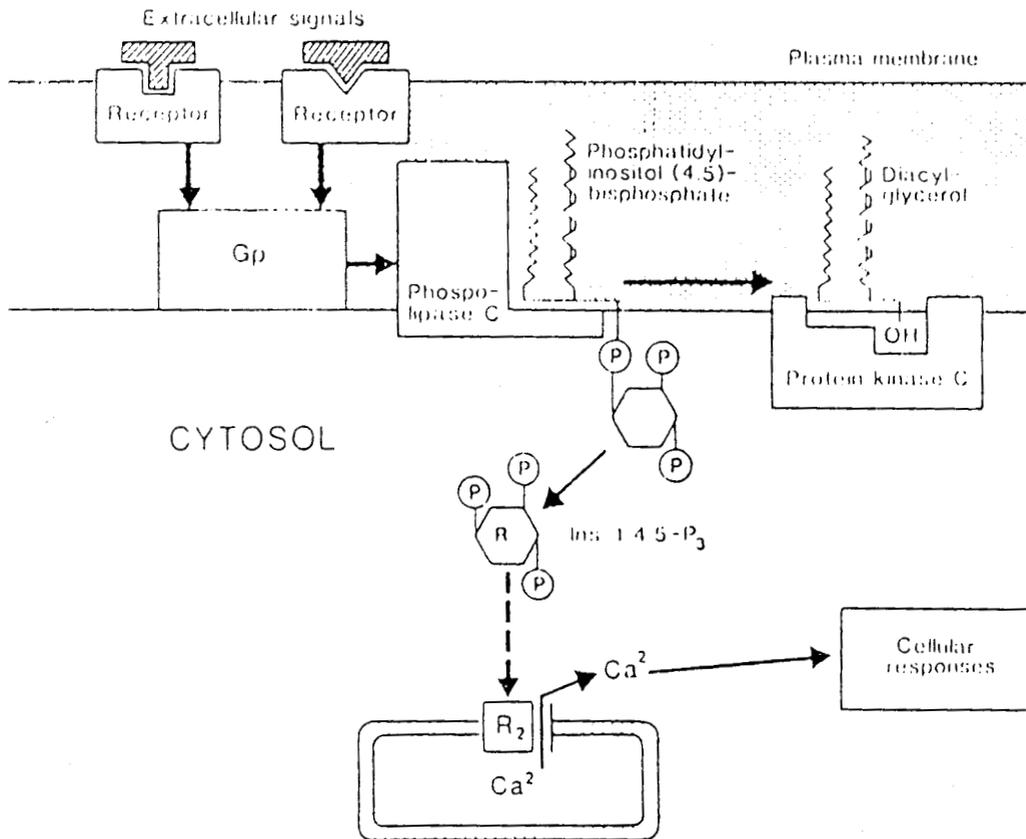


Figure 4 : Processus membranaires de transduction du signal d'activation

(d'après Borregaard N. 1988 [56])

reste associé à la membrane cytoplasmique. Il induit la translocation de la protéine kinase C vers la membrane et provoque l'activation de cette enzyme [64].

III-2/d. La protéine kinase C

Dans les cellules quiescentes, cette enzyme est localisée sous forme inactive sur la face cytosolique de la membrane cytoplasmique. Mais la fixation du DG provoque un changement de conformation et une translocation dans la membrane cytoplasmique sous une forme activée [64]. Cette translocation dépend également des phospholipides membranaires et du calcium [64]. Les molécules de phorbol ester ont une conformation proche de celle des phospholipides membranaires, ce qui leur permet de se fixer sur le site de liaison des phospholipides membranaires de la Protéine kinase C : c'est pourquoi la protéine kinase C est considérée comme le récepteur des phorbols esters [65].

Plusieurs substrats éventuels de la protéine kinase C ont été suspectés, mais on ne connaît pas encore complètement le rôle de cette enzyme. Toutefois, son implication dans l'activation du métabolisme oxydatif a d'abord été fortement suspectée : les doses de PMA sont les mêmes pour l'activation maximale de la protéine kinase C et du métabolisme oxydatif [66] ; cette implication a été récemment confirmée (voir les processus d'activation de la NADPH oxydase).

III-2/e. Rôle de l'IP3

Lorsque les polynucléaires neutrophiles sont activés par le fMLP, la quantité d'IP3 formée augmente très rapidement dès les 5 premières secondes, atteint un maximum à 20-30 secondes, puis décroît sur 2 minutes. En effet, l'IP3 est très rapidement métabolisé en IP4, particulièrement en présence de calcium. Ce mécanisme instaure la possibilité d'un feed-back négatif [67 et 68].

III-2/f. Rôle du calcium

Le calcium est un élément clé de la propagation du signal d'activation vers la mise en oeuvre de la réponse cellulaire (pour revue, voir [69]). L'IP3 induit une augmentation de la concentration intra-cytoplasmique en calcium par la mobilisation de pools calciques intracellulaires.

Le calcium régule de nombreuses activités enzymatiques (phospholipase C et protéine kinase C, en particulier) et il contrôle les modifications du cytosquelette.

Sous son action, les mouvements cellulaires actifs redeviennent possibles : redistribution des récepteurs dans la membrane, capping et internalisation des complexes ligand-récepteur, changements de forme et orientation de la cellule. Le calcium influence également l'exocytose des granules de sécrétion qui dépend de la transformation gel/solution du cytosol ; ce processus, qui peut se produire au cours de la diapédèse, permet la translocation des récepteurs à la membrane plasmique et la libération de gélatinase, de collagénase, d'héparinase et de petites quantités de radicaux oxygène qui perméabilisent les vaisseaux et entretiennent le développement de la réaction inflammatoire.

III-3. Chimiotactisme

Dans les vaisseaux sanguins le polynucléaire neutrophile mature peut se répartir de façon réversible entre deux populations distinctes : certains polynucléaires neutrophiles sont portés par le flot sanguin et font partie du **pool circulant**, alors que d'autres sont fixés sur la paroi endothéliale des capillaires et représentent le **pool marginé**. Ces derniers sont capables de migrer par chimotaxie à travers la paroi des vaisseaux vers les tissus où se développe un foyer inflammatoire. Les polynucléaires neutrophiles sont attirés par les produits protéiques et lipidiques issus de la dégradation des bactéries, par des produits bactériens du type fMLP, et par le C5a et le LTB₄ produits sur le lieu de l'inflammation. Le signal d'activation de la plupart de ces facteurs chimiotactiques fait intervenir des récepteurs spécifiques, que nous avons déjà décrits.

Dans des expériences *in vitro*, la locomotion du polynucléaire neutrophile s'effectue à la vitesse de 20 μm par minute. Le déclenchement de la migration se réalise par la faculté de la cellule à déceler un changement transitoire et localisé de la concentration en agent chimiotactique. Si cette concentration est homogène dans l'environnement cellulaire, la migration s'effectue au hasard. Pourtant, le polynucléaire neutrophile est capable de déceler des différences de concentration entre deux pôles cellulaires et de s'orienter dans un gradient de concentration.

Le mouvement cellulaire est de type amibien, et s'effectue par cycles répétés en continu. La cellule émet une large protubérance de matériel membranaire et cytoplasmique vers le front de

migration : c'est le **lamellipodium antérieur**. Ce lamellipodium adhère à la surface du support de migration. Enfin, la partie postérieure de la cellule, **l'uropode**, s'étire et se rétracte, provoquant ainsi un mouvement du matériel cytoplasmique vers l'avant. Des longs filaments de traînée s'étirent à l'uropode, et se détachent progressivement du support, le matériel membranaire les constituant étant ensuite recyclé pour reproduire un nouveau cycle.

In vivo, l'orientation de la cellule se réalise probablement par émission du lamellipodium dans l'interstice entre les cellules endothéliales.

Plusieurs structures cellulaires sont impliquées dans la migration cellulaire. Bien sûr, les récepteurs pour les facteurs chimiotactiques sont essentiels. Toutefois, lors de déficits de la fonction chimiotactique des polynucléaires neutrophiles, il n'est généralement pas observé de diminution du nombre de récepteurs exprimés, ni de modification de la constante d'affinité. Ainsi la diminution de la réponse chimiotactique semble être due à des processus qui modulent la mobilité et/ou l'expression des récepteurs [70]. Par contre, les glycoprotéines d'adhésion sont tout à fait indispensables pour le bon déroulement de la migration, puisque ce sont elles qui établissent les points d'ancrage de la cellule sur son support. Ainsi dans le syndrome de déficience en glycoprotéines d'adhésion, la migration cellulaire est fortement altérée.

III-4. Phagocytose

La phagocytose se produit pour des particules sur lesquelles la membrane plasmique du polynucléaire neutrophile peut adhérer. Ainsi, le polynucléaire neutrophile est capable de phagocyter des particules recouvertes par des fragments du complément ou par des IgG : ces particules sont dites "opsonisées". La membrane du polynucléaire neutrophile adhère sur de telles particules par l'intermédiaire des récepteurs CR3 et/ou des Fc γ R. Progressivement, la membrane entoure la particule et l'enveloppe complètement dans une vacuole de phagocytose : le phagosome. Si l'objet à phagocyter est trop volumineux, la vacuole de phagocytose ne peut pas se refermer et on assiste à ce que l'on appelle la phagocytose frustrée.

Parallèlement, les granules se déplacent à l'intérieur du cytoplasme et viennent fusionner avec la membrane du phagosome, libérant ainsi leur contenu enzymatique à l'intérieur du phagolysosome : c'est le processus de dégranulation, que nous décrirons plus loin.

Les mécanismes de contrôle de la phagocytose sont encore mal connus. Il semble toutefois que l'augmentation du taux de calcium intracellulaire soit largement impliqué, de même que l'activation de la protéine kinase C et la transformation de l'état de gel à l'état de solution du cytoplasme.

Un défaut clinique de la phagocytose et de la dégranulation est le syndrome de Chédiak-Higashi.

III-5. Microbicidie

Le polynucléaire neutrophile va ensuite devoir tuer la particule qu'il a phagocyté. Pour accomplir cette tâche, le polynucléaire neutrophile dispose de plusieurs outils que l'on peut regrouper en deux groupes distincts : la bactéricidie dépendante de l'oxygène qui fait appel à la machinerie du métabolisme oxydatif, et la bactéricidie indépendante de l'oxygène qui met en jeu le contenu lytique des granules.

III-5/a. Activation du métabolisme oxydatif

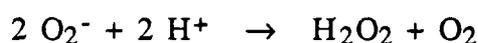
L'explosion respiratoire ("*respiratory burst*") a été décrite en premier par Baldrige et Gérard en 1933 [71] : ils ont observé une augmentation de la consommation d'oxygène et une augmentation de la libération de gaz carbonique par les polynucléaires neutrophiles en train de phagocyter.

Les réactions chimiques du métabolisme oxydatif

La première étape du métabolisme oxydatif est une réduction de l'oxygène atmosphérique O_2 en anion superoxyde O_2^- . Cette réaction est accomplie par le complexe oxydase qui réalise le transfert de 2 électrons à partir du NADPH selon le modèle :



L'anion superoxyde peut participer à la bactéricidie. Toutefois, ce composé instable peut subir une dismutation (spontanée ou catalysée par la **superoxyde dismutase**) en hydroperoxyde :



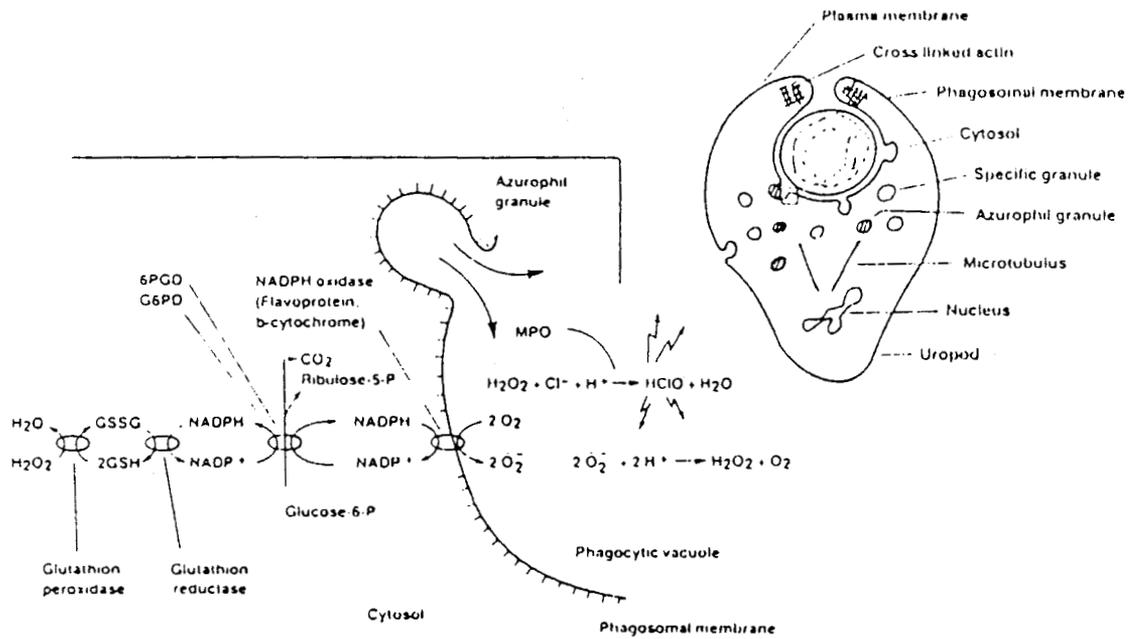


Figure 5 : Représentation schématique des évènements métaboliques associés à la bactéricidie

(d'après Borregaard N. 1988 [56])

L'hydroperoxyde est également un composé très toxique. C'est aussi le substrat de la **myéloperoxydase**. Cette enzyme peut combiner l'hydroperoxyde avec un halogène tel que le chlore (présent en quantité suffisante pour cette réaction dans les granules du polynucléaire neutrophile) pour former de l'hypochlorite HClO :



Outre sa forte capacité bactéricide, le composé HClO provoque également une alcalinisation du phagolysosome qui est favorable à l'atteinte de l'activité maximale des enzymes lysosomiales.

Le NADPH donneur d'électrons provient du shunt des hexoses monophosphates.

Le déroulement de ces différentes opérations est schématisé sur la figure 5.

Le complexe oxydase

L'enzyme NADPH-oxydase responsable de la réduction de l'oxygène moléculaire est spécifique des cellules phagocytaires spécialisées : polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, monocytes et macrophages. Cette enzyme est un assemblage de plusieurs constituants, dont le cytochrome b₂₄₅ et une flavoprotéine [72]. Le cytochrome b₂₄₅ est composé de 2 chaînes polypeptidiques, une glycosylée de 91 kDa et une non glycosylée de 22 kDa [73]. La glycoprotéine 91 kDa a été clonée [74] ; son gène n'est pas exprimé normalement dans la forme liée au chromosome sexuel X de la granulomatose chronique. La flavoprotéine à FAD n'est pas encore caractérisée bien que son appartenance au système oxydase soit tout à fait admise [75]. Un déficit d'expression de cette flavoprotéine a pu être décelé dans certains cas de granulomatose chronique.

Aucune activité du système oxydase n'est décelée dans les cellules non stimulées, les éléments du système étant répartis dans différents compartiments cellulaires. L'association des différents éléments conduit à l'apparition de la forme active du système oxydase. Le cytochrome b₂₄₅ et la flavoprotéine sont localisés dans la membrane des granules spécifiques et des granules de sécrétion, et une exocytose de ces granules est nécessaire pour obtenir l'assemblage du système dans la membrane plasmique ou plutôt dans la membrane du phagolysosome (pour revue, [56]). L'assemblage seul des différents éléments n'est pas suffisant pour que le système soit actif : il faut qu'une protéine présente dans la membrane

plasmique de 47 kDa soit phosphorylée [76 et 77]. Cette phosphorylation activatrice est probablement effectuée par la protéine kinase C [78]. Nous avons déjà expliqué que la protéine kinase C est active lorsqu'elle est liée à la membrane plasmique. Ainsi, la protéine kinase C active le système oxydase exclusivement au niveau de la membrane plasmique, soit à la surface cellulaire, soit à la surface du phagolysosome.

Le fMLP et le LTB4 provoquent peu d'exocytose des granules primaires et spécifiques, mais ils provoquent l'exocytose des granules de sécrétion. Ainsi une partie seulement de l'oxydase est assemblée au niveau de la membrane plasmique, et elle ne déclenche qu'un faible taux de production des métabolites de l'oxygène. Par contre, le PMA et le calcium ionophore A23187 induisent la dégranulation massive des granules primaires et spécifiques. La totalité de l'oxydase est ainsi assemblée dans la membrane plasmique, et de plus, ces mêmes agents activent la protéine kinase C. La stimulation du métabolisme oxydatif qui en découle est maximale.

La myéloperoxydase

La myéloperoxydase est une métalloenzyme et représente un constituant majeur des granules primaires. Elle est composée de deux groupes formés chacun de deux sous-unités : une glycoprotéine de 60 kDa qui porte la molécule de fer et une protéine de 12 kDa. La biosynthèse et les processus de maturation de cette enzyme sont particuliers, et leur étude pourrait fournir des éléments particulièrement intéressants pour la compréhension des phénomènes de maturation du polynucléaire neutrophile ; les résultats récents de la littérature ont été compilés dans la revue de Nauseef *et al.* [79].

Déficits du métabolisme oxydatif

Le déficit congénital de l'expression de la myéloperoxydase existe, mais il n'a pas de conséquences trop sévères pour la bactéricidie : en effet, les bactéries phagocytées sont tuées au même taux que dans les cellules normales, mais après un temps de latence. Tout se passe comme si les processus dépendant de la fusion des granules avec le phagolysosome prenaient le relais (après un certain temps nécessitant leur mise en place) du système dépendant de la myéloperoxydase [80].

<i>famille d'enzyme</i>	<i>granules primaires</i>	<i>granules spécifiques</i>	<i>granules de sécrétion</i>
enzymes bactéricides	myéloperoxydase lysozyme	lysozyme	
sérine protéases neutres	élastase cathepsine G protéinase 3		
métalloprotéinases		collagénase	gélatinase
hydrolases acides	N-acétyl- β -glucosaminidase cathepsine B cathepsine D β -glucuronidase β -glycerophosphatase α -mannosidase		
autres	protéines cationiques bactéricides	lactoferrine protéine liant la vitamine B12 cytochrome b flavoprotéine récepteurs fMLP CR3	cytochrome b flavoprotéine récepteurs fMLP CR3

Tableau 2 : Contenu enzymatique des granules du polynucléaire neutrophile

(d'après Borregaard, 1988 [56])

Le déficit en NADPH-oxydase se manifeste sous la forme d'une maladie sévère : la **granulomatose septique chronique**. Cette pathologie caractérisée par des infections multiples récurrentes sévères, démontre l'importance du système oxydase dans la bactéricidie.

III-5/a. Dégranulation et action du contenu des granules

Le tableau 2 récapitule la distribution des différentes enzymes dans les granules du polynucléaire neutrophile.

Les enzymes bactéricides

Le **lysozyme** est retrouvé à la fois dans les granules primaires et dans les granules spécifiques. Il hydrolyse les protéoglycanes de la paroi cellulaire de certaines bactéries.

La **myéloperoxydase** participe aux réactions du métabolisme oxydatif (voir paragraphe précédent).

La **BPI** ou **protéine bactéricide augmentant la perméabilité bactérienne** ("*Bactericidal/permeability-increasing protein*") a été décrite par Weiss *et al.* en 1978 [81]. Il s'agit d'une protéine de 59 kDa, présente dans les granules primaires des polynucléaires neutrophiles [82]. Cette protéine a la capacité de se fixer sur la membrane externe des bactéries gram négatives encapsulées. Cette fixation a pour effet d'augmenter la perméabilité aux molécules hydrophobes et d'activer la Phospholipase A bactérienne. Elle permet ainsi de tuer plusieurs espèces de bactéries gram négatives.

Les **protéines cationiques de faible poids moléculaire** ou **défensines** sont capables d'augmenter la perméabilité vasculaire, de provoquer la libération d'histamine, d'augmenter la phagocytose et d'exercer une activité bactéricide. Les **défensines** représentent une famille de molécules de faible poids moléculaire, constituées d'une chaîne polypeptidique de 33 à 34 acides aminés riche en cystéines et en arginine [83 et 84]. Elles sont présentes dans des granules primaires de forte densité, où elles représentent 50% du contenu total. Elles ont une activité bactéricide pour un large spectre de micro-organismes : bactéries gram négatives et gram positives, mycoses et virus. 4 protéines différentes ont été décrites jusqu'à ce jour (pour revue, [85]).

Les hydrolases acides et les protéases neutres

Les hydrolases acides (β -glucuronidase, phosphatase acide, α -mannosidase, N-acétyl- β -glucosaminidase, cathepsine D) et les protéases neutres (élastase, cathepsine G ou chymotrypsine-like protéase) ont à la fois une activité bactéricide et la capacité à lyser les tissus environnants. Ces enzymes sont stockées dans les granules primaires.

L'**élastase** est une sérine protéase, de poids moléculaire égal à 34 kDa, dont le gène a été récemment cloné [86 et 87]. Elle exerce une action protéolytique sur les fibres de fibrinogène des tissus [88].

La **cathepsine G** a un poids moléculaire de 26 kDa. Elle hydrolyse les protéoglycanes du cartilage et le collagène insoluble [89].

Gélatinase

C'est l'enzyme marqueur des granules tertiaires. Il s'agit d'une métalloprotéinase qui poursuit la dégradation des fibres de collagène initiée par la collagénase [90].

Collagénase

Cette enzyme des granules spécifiques joue un grand rôle dans l'inflammation, puisqu'elle est capable en association avec une protéase neutre d'hydrolyser les fibrilles de collagène ; c'est une métalloenzyme, de poids moléculaire compris entre 70 et 76 kDa ; elle est aussi capable de cliver le C1q. Récemment, 3 collagénases ont été isolées des polynucléaires neutrophiles avec des poids moléculaires de 75, 57 et 22 kDa [91].

La protéine liant la vitamine B12

C'est un marqueur des granules spécifiques, mais sa fonction dans le polynucléaire neutrophile est peu documentée.

La lactoferrine

La **lactoferrine** est une glycoprotéine de 80 kDa capable de lier le fer nécessaire à la croissance des bactéries, ce qui lui confère des propriétés bactériostatiques [92].

IV. ALTERATIONS DES FONCTIONS DU POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE EN PATHOLOGIE HUMAINE

Des anomalies quantitatives (neutropénie) ou qualitatives (troubles fonctionnels) des polynucléaires neutrophiles se traduisent par une sensibilité accrue aux infections, les microorganismes envahisseurs n'étant plus éliminés correctement. Les altérations fonctionnelles peuvent affecter aussi bien les capacités liées à la migration cellulaire (adhésion, locomotion, chimiotactisme) que la bactéricidie (phagocytose, dégranulation, activation du métabolisme oxydatif). L'origine de ces anomalies peut être congénitale ou acquise.

Dans la plupart des cas, les bases moléculaires du déficit sont inconnues, et les relations entre ce déficit et les manifestations cliniques ne sont pas toujours clairement établies. Toutefois, les personnes ayant une neutropénie marquée ou une anomalie fonctionnelle grave du polynucléaire neutrophile peuvent présenter toute une série de manifestations pathologiques à localisations diverses (abcès cutanés, angines ulcéro membraneuses, gingivites et parodontites, pneumonies récurrentes) ou généralisées (septicémie), associées ou non à des infections bactériennes ou fongiques.

Pour un petit nombre d'anomalies congénitales affectant le polynucléaire neutrophile, un déficit biochimique spécifique a pu être décrit. C'est le cas pour le déficit en glycoprotéines d'adhésion, la granulomatose septique chronique, le déficit en myéloperoxydase et le déficit en granules spécifiques. Ces maladies ont permis de mieux appréhender les bases moléculaires de certaines fonctions du polynucléaire neutrophile.

Bien que la protection antimicrobienne soit la fonction essentielle du polynucléaire neutrophile, certaines de ses propriétés peuvent également jouer un rôle néfaste pour l'environnement tissulaire (contribution des enzymes lysosomiales et des métabolites toxiques de l'oxygène).

Nous ne faisons ici que mentionner différents exemples cliniques où ont été décrits des déficits du polynucléaire neutrophile (pour revue [3 et 93]).

IV-1. Neutropénies

Les déficits affectant les polynucléaires neutrophiles sont le plus souvent liés à un trouble quantitatif. Une neutropénie peut être le résultat d'une **aplasie générale** (trouble central) ou bien d'une **agranulocytose** (trouble périphérique qui ne touche que les éléments de la lignée neutrophile), et peut être liée soit à un **trouble congénital**, soit à un **phénomène exogène**.

IV-1/a. Neutropénies congénitales

Ce sont des maladies graves qui se révèlent dès les premières semaines de la vie, et qui sont le plus souvent mortelles dès la prime enfance. Nous en citons ici deux exemples.

- La **Neutropénie cyclique** est une maladie exceptionnelle qui touche essentiellement les femmes, caractérisée par une diminution cyclique du nombre des polynucléaires neutrophiles [94]. Ces cycles durent en moyenne 21 jours et à chacun est associée une période de 8 à 10 jours d'expression clinique buccopharyngée (stomatites, gingivites, pharyngites, abcès dentaires) ou cutanée. Des infections plus graves peuvent survenir et être mortelles. La transmission serait autosomique, récessive et d'expression variable liée à une dysfonction de la granulopoïèse.

- L'**agranulomatose de Kostmann** est une maladie congénitale rare, de transmission autosomique récessive, caractérisée par une neutropénie constante, dès les premières semaines de la vie [95].

IV-1/b. Neutropénies acquises

Des agranulocytoses peuvent être le résultat d'une destruction des polynucléaires neutrophiles par des anticorps. Ce sont des maladies autoimmunes telles que le **lupus érythémateux disséminé** et les **maladies autoimmunes**.

Des agents toxiques (benzène) et des médicaments (cas des **cytopénies médicamenteuses**) peuvent aussi entraîner une agranulocytose. En particulier, les chimiothérapies anticancéreuses sont basées sur l'utilisation de drogues antimitotiques qui agissent sur des cellules à index mitotique élevé dont font partie les cellules souches hématopoïétiques.

IV-2. Déficits de l'adhérence

La fonction d'adhésion joue un rôle déterminant dans la réponse du polynucléaire neutrophile, puisqu'elle est impliquée dans la margination, la locomotion et la phagocytose.

Des agents pharmacologiques comme les **corticostéroïdes** et les salicylates affectent la fonction d'adhésion des polynucléaires neutrophiles (les corticostéroïdes entraînent une augmentation du pool circulant).

Un défaut congénital de la fonction d'adhésion a été décrit : c'est le **déficit en glycoprotéines d'adhésion**. Cette maladie congénitale est relativement rare et elle est transmise de façon autosomale récessive à partir du chromosome 21 [96]. Les polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes et les monocytes des patients sont dépourvus de toutes les glycoprotéines d'adhésion, en raison d'un défaut d'expression de la sous-unité commune β [95]. Du point de vue clinique, les patients ont une réponse inflammatoire diminuée, une chute du cordon retardée, des infections cutanées, muqueuses et des otites fréquentes pendant l'enfance, ainsi que des gingivites et des parodontites.

IV-3. Défauts de la migration

La fonction de migration conditionne l'afflux des polynucléaires neutrophiles au site inflammatoire. Ainsi, un retard de migration de ces cellules sur le lieu de l'invasion bactérienne peut se traduire par des infections récurrentes et le développement d'abcès dans les tissus mous. L'association de ces symptômes est caractéristique du **syndrome du leucocyte "paresseux"** [98, 99].

IV-4. Défauts du chimiotactisme

Une altération de la migration chimiotactique peut être due à un déficit intrinsèque du polynucléaire neutrophile, ou à un facteur exogène. Les bases moléculaires des déficits intrinsèques sont encore assez mal connues. La présence d'inhibiteur sérique du chimiotactisme a pu être démontrée dans la maladie de Hodgkin et dans certaines cirrhoses. Certaines substances d'origine bactérienne peuvent également inhiber le chimiotactisme ; c'est le cas pour

une forme de parodontite, la parodontite juvénile qui est associée à la présence du germe fortement pathogène *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Notons également que certains déficits en complément peuvent entraîner une altération du chimiotactisme (rôle du C5a et du C5b67).

IV-4/a. Dermatoses

Des dermatoses sévères telles que des ichtyoses sont fréquemment associées à une chémotaxie réduite des polynucléaires neutrophiles. C'est le cas pour des ichtyoses présentant des abcès à *Staphylococcus aureus* ou à *Trichophyton rubrum* [100, 101].

IV-4/b. Syndrome de Job ou syndrome à hyper-immunoglobulinémie E ou maladie de Buckley

Ces patients ont des dermatites chroniques (candidoses) et des abcès récurrents staphylococciques sévères pulmonaires et cutanés [102]. Cette maladie est souvent associée à une dysmorphie faciale caractéristique. Le taux sérique d'immunoglobulines E (IgE) est très anormalement élevé avec en particulier des IgE anti-candida. La fonction chimiotactique des polynucléaires neutrophiles et des monocytes est réduite de façon inconstante [103]. Cette maladie est grave et se déclare dès les premières semaines de la vie. Toutefois, elle n'est pas toujours mortelle et l'état clinique peut être notablement amélioré par des traitements antibiotiques adéquats. La locomotion des polynucléaires neutrophiles n'est pas affectée et la diminution de la chémotaxie pourrait être due à la présence d'un inhibiteur sérique [104].

IV-4/c. Parodontites

Nous décrirons plus loin le déficit observé dans les maladies parodontales.

IV-4/d. Autres pathologies

Des anomalies de la fonction chimiotactique des polynucléaires neutrophiles ont également été décrites dans diverses pathologies, telles que le syndrome de Kartagener (fonction ciliaire anormale du tractus respiratoire) et le syndrome de Schwachman (insuffisance pancréatique).

IV-5. Déficits de la bactéricidie

IV-5/a. Granulomatose septique chronique

La granulomatose septique chronique de l'enfant est la maladie associée au déficit congénital en NADPH oxydase (pour revue [105]). Elle se traduit par l'incapacité des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles et des monocytes à synthétiser des anions superoxydes, défaut qui est facilement décelé par la mesure de la chimioluminescence et les tests de réduction du nitrobleu de tétrazolium. Sur le plan clinique, cette maladie se caractérise d'une part, par des infections fongiques et bactériennes qui affectent la peau, les poumons, le foie et les os, et d'autre part, par la formation de granulomes.

La fréquence de cette maladie est de 1 pour 1 million. Plusieurs formes congénitales ont été décrites. 66% des cas sont transmis par le chromosome X et sont associés à un défaut d'expression du cytochrome b₂₄₅, et plus précisément à un défaut d'expression de la sous-unité glycoprotéique de 91 kDa [106, 74]. Pour 35% des cas, la transmission est autosomale récessive ; le taux d'expression du cytochrome b₂₄₅ est normal, mais la protéine activatrice de 44 kDa du système oxydase n'est pas phosphorylée [76], probablement suite à la non expression d'un facteur cytosolique (non encore identifié) qui jouerait un rôle dans cette phosphorylation.

IV-5/b. Syndrome de Chédiak-Higashi

Le syndrome de Chédiak-Higashi est caractérisé par un albinisme oculocutané, des granules géants dans toutes les cellules granuleuses et des infections à pyogènes récidivantes [107]. D'autres cellules, telles que les cellules NK, présentent des anomalies fonctionnelles. Cette maladie assez rare est grave et souvent mortelle. Les granules géants présents dans le cytoplasme des polynucléaires neutrophiles seraient à l'origine d'un défaut de la migration chimiotactique de ces cellules. Ces granules sont faiblement exocytés et sont déficients en certaines enzymes, telles que la cathepsine G et l'élastase [108].

IV-5/c. Déficit en myéloperoxydase

Le déficit congénital en myéloperoxydase est relativement fréquent, qu'il soit complet (1/4000) ou partiel (1/2000) [109]. La transmission est autosomique récessive, liée au chromosome 17 [110]. Ce déficit est souvent asymptomatique. Les polynucléaires neutrophiles

de ces patients ont pourtant une capacité bactéricide diminuée, mais ils manifestent en compensation une stimulation prolongée du métabolisme oxydatif [111].

IV-5/d. Déficit en granules spécifiques

Les patients porteurs de ce déficit congénital ont une réponse inflammatoire diminuée et développent des infections bactériennes récurrentes et sévères de la peau et des tissus profonds [112]. Plusieurs marqueurs du polynucléaire neutrophile ne sont pas exprimés : la lactoferrine, la protéine liant la vitamine B12, les défensines et la gélatinase. Les pools intracellulaires de réserve en CR3 et en récepteurs pour le fMLP sont absents. L'origine de cette maladie congénitale, probablement autosomique récessive, repose sur l'absence de synthèse du contenu des granules spécifiques et d'autres marqueurs pendant la différenciation et la maturation des polynucléaires neutrophiles dans la moëlle osseuse.

IV-6. Maladies inflammatoires non-infectieuses

Dans ces maladies, les dérivés bactéricides produits par le polynucléaire neutrophile agissent sur les tissus de l'hôte et contribuent au développement de la pathologie. Un modèle expérimental le plus démonstratif de ce rôle néfaste du polynucléaire neutrophile est le **phénomène d'Artus** dans lequel des phénomènes pathogènes sont induits lors des réactions d'hypersensibilité à complexes immuns "locaux" (citons par exemple, des alvéolites d'hypersensibilité : maladie du poumon de fermier, maladie des éleveurs d'oiseaux ; ou encore des glomérulonéphrites [113], ou des vascularites d'origine médicamenteuse : angéite, leucocytoclasique et périartérite noueuse [114]).

L'implication pathogénique du polynucléaire neutrophile est également particulièrement bien documentée dans plusieurs affections pulmonaires, telles que le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte [115], l'emphysème [116] et l'asthme [117]. Les produits toxiques pour les tissus libérés par le polynucléaire neutrophile sont issus de l'activation du métabolisme oxydatif (radicaux libres) et de l'exocytose des granules spécifiques (élastase, collagénase, etc...).

V. LES MALADIES PARODONTALES

Les parodontites sont des maladies infectieuses du **parodonte**, c'est-à-dire de l'ensemble des tissus de soutien de la dent, et sont caractérisées par une destruction plus ou moins rapide de ces tissus.

Ces maladies sont initiées et entretenues par une accumulation de bactéries qui constituent la **plaque dentaire**. La nature de la flore bactérienne présente dans la cavité buccale a été analysée [118] : on peut ainsi dire qu'il existe une flore compatible avec la santé parodontale [119], dont la nature diffère de celle associée à la pathologie. Notons également que la constitution qualitative et quantitative de la flore prélevée chez les patients atteints de maladies parodontales varie d'un individu à l'autre [118]. De plus, des variations sont observées pour un même individu selon le site, et pour un même site selon le stade d'évolution de la pathologie [120].

Toutefois, l'accumulation de la flore n'est pas la seule raison de déclenchement d'une maladie parodontale, puisque 5 à 15% des individus seulement développent ce type de pathologies [121 et 122].

Ainsi, on peut considérer que les maladies parodontales sont des infections locales bénignes (puisque'elles sont sans conséquences graves pour l'état de santé général des patients) qui ne peuvent se développer que chez certains sujets pour lesquels les systèmes de défenses sont ou sont devenus diminués, les bactéries de la flore buccale devenant alors agressives pour les tissus.

V-1. Pathogénèse de la lésion inflammatoire

Différents stades ont été décrits par Page et Schroeder et sont présentés dans le tableau 3 [123].

V-1/a. Santé parodontale

Elle est associée à un état stable des 4 tissus qui soutiennent la dent : la **gencive**, le **cément**, l'**os alvéolaire** et le **ligament parodontal**. Ces tissus sont attachés sur toute la surface de la **racine**. La figure 6 représente schématiquement la structure des tissus qui constituent le parodonte.

	<i>I</i> <i>initial</i>	<i>II</i> <i>précoce</i>	<i>III</i> <i>établi</i>	<i>IV</i> <i>avancé</i>
<i>Diagnostic clinique</i>	santé ou légère gingivite	gingivite modérée	gingivite avancée	parodontite
<i>nature infiltrat cellulaire</i>	polynucléaires neutrophiles	PN+ lymphocytes T	PN+LcT+ plasmocytes	PN+LcT+ plasmocytes
<i>évolution des atteintes tissulaires</i>	augmentation de la perméabilité tissulaire aux cellules du sang	destruction des fibres de collagène périvasculaires	prolifération apicale de l'épithélium	destruction du tissu osseux et formation poche parodontale

Tableau 3 : Pathogénèse de la lésion parodontale

d'après Page R.C. & Schreoder H.E., 1976 [123]

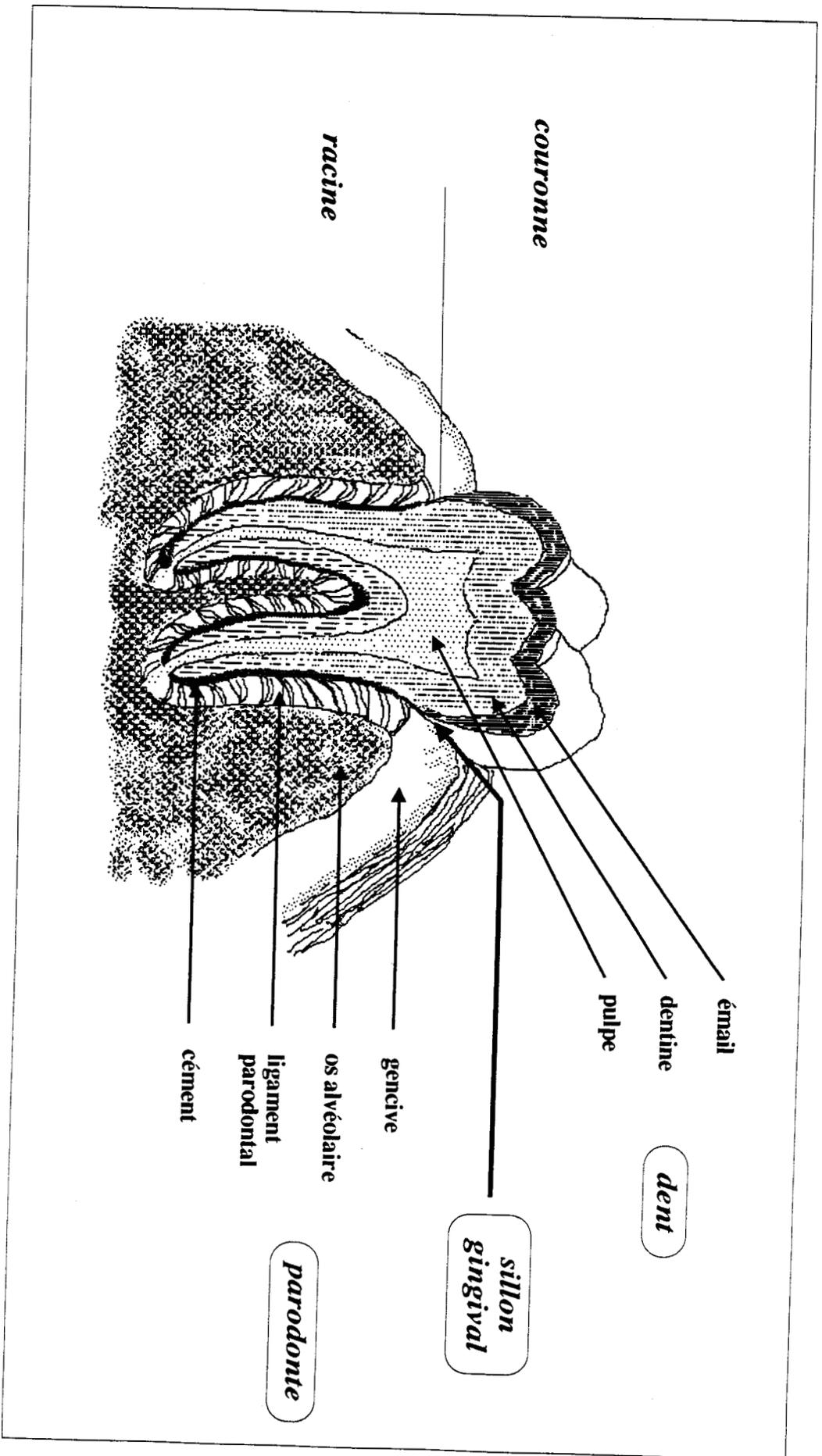


Figure 9 : Structure des tissus de soutien de la dent

La gencive (seul tissu visible) est saine lorsqu'elle présente les caractéristiques suivantes : elle est fermement attachée aux structures sous-jacentes, son aspect est rose pâle (piqueté en peau d'orange), et elle ne saigne ni au brossage, ni à la mastication, ni à l'introduction d'une sonde dans le **sillon gingival** (Figure 7-A). Du point de vue cytologique, les tissus ne présentent pas d'inflammation, mais des infiltrats de polynucléaires neutrophiles et de lymphocytes T sont observés. La flore est constituée de cocci et de filaments gram positifs aérobis en nombre peu important. Le nettoyage mécanique régulier de la surface des dents d'une part, la desquamation et le renouvellement rapide du tissu gingival d'autre part, évitent un dépôt bactérien trop important qui pourrait évoluer vers l'accumulation de plaque dentaire et de tartre. Enfin, les réactions immunologiques de défense de l'hôte évitent l'invasion des tissus par les bactéries. Cette défense est assurée par l'intermédiaire de la **salive** et du **fluide gingival** qui est exsudé en continu du sillon gingival. Ces fluides renferment les mêmes types de substances bactéricides que le sérum (opsonines et immunoglobulines, en particulier des IgA sécrétoires, [124]), des lymphocytes et de nombreux polynucléaires neutrophiles attirés par les facteurs chimiotactiques libérés par les bactéries [125]. Ainsi, la santé parodontale résulte d'un **équilibre** établi entre la flore bactérienne et les mécanismes de défense de l'hôte.

V-1/b. Inflammation gingivale

Une variation des conditions de l'environnement bucco-dentaire peut faire basculer l'équilibre des interactions hôte-bactéries en faveur des bactéries. Soit qu'il se produit une accumulation de plaque dentaire et/ou une variation de la composition de la microflore, soit que les défenses de l'organisme sont affaiblies. Alors une réaction inflammatoire se développe, avec afflux de polynucléaires neutrophiles et destruction concomitante des fibres de collagène périvasculaire. La gencive devient rouge, gonflée et saigne lorsqu'on introduit une sonde dans le sillon gingival (figure 7-B). Ce processus inflammatoire n'affecte cependant que le parodonte superficiel : épithélium gingival et conjonctif. Une telle évolution représente peut-être une réponse normale défensive des tissus du parodonte à l'accumulation massive des bactéries (plaque dentaire et tartre).

Figure 7 : Vues frontales de parodontes superficiels

A : Parodonte sain

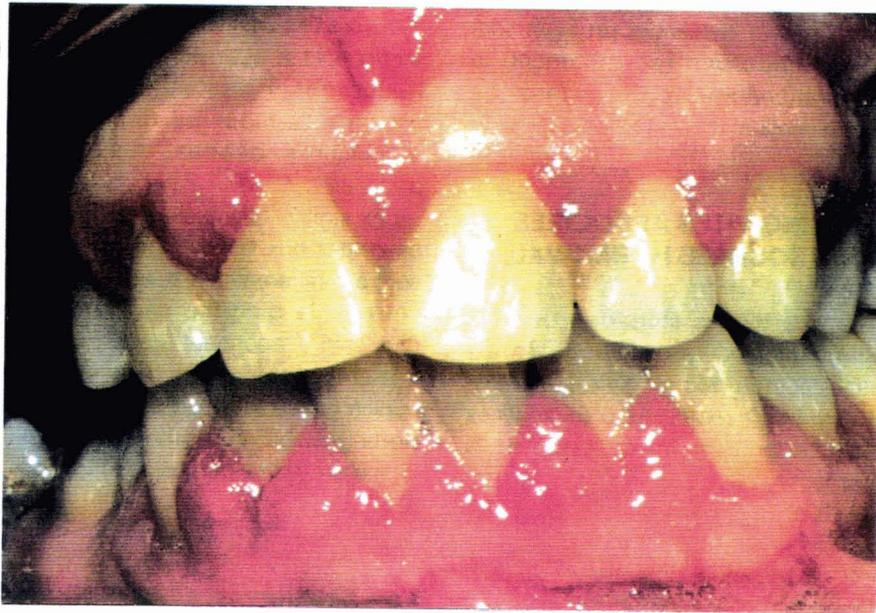
B : Parodonte inflammatoire d'une gingivite

C : Parodonte d'un patient atteint de parodontite à progression rapide

A



B



BU
LILLE

C



Les manifestations cliniques de la gingivite sont des phénomènes épisodiques caractérisés par des poussées interrompues d'inflammation aiguë, la plupart des lésions étant passagères et réversibles ou persistant sans être évolutives [126]. Notons que les gingivites sont des affections très répandues.

Les gingivites n'évoluent pas toutes en parodontites. Toutefois, le passage de lésions gingivales à des lésions parodontales peut se produire et se produit dans un certain nombre de cas. Mais les gingivites et les parodontites sont des pathologies différentes, associées à des espèces bactériennes différentes et les phénomènes responsables de la conversion de la gingivite en parodontite sont hélas inconnus.

V-1/c. Lésions de type parodontal

La lésion devient de type parodontal lorsque la totalité des tissus parodontaux est atteinte : gencive, ligament, os et cément. Ces lésions sont caractérisées par des **pertes d'attaches** plus ou moins importantes, facilement décelables, entre la racine de la dent et la gencive. Il est difficile toutefois de détecter et/ou de prévoir les lésions qui sont ou vont devenir actives avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité. Du point de vue histo-pathologique, le passage de la gingivite à la parodontite est une conversion d'une lésion de type III à une lésion de type IV selon Page et Schroeder. Bien que les causes de cette conversion ne soient pas connues, on peut dire qu'il y a altération de la réponse de l'hôte et/ou colonisation massive des tissus par des agents pathogènes. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer le phénomène du développement d'une lésion de type parodontal : *i)* les bactéries ou des substances qu'elles libèrent provoquent la destruction des tissus ; *ii)* une hyperréactivité du système immunitaire peut participer au développement pathologique de la réaction inflammatoire ; *iii)* une déficience des polynucléaires neutrophiles ou de la réponse autologue mixte des lymphocytes peut contribuer à la colonisation des tissus par les bactéries.

Notons également que les transitions d'un type de lésion à l'autre ne se produisent généralement pas de façon progressive continue. L'évolution s'effectue par **cycles** avec des périodes de rémission qui peuvent être longues et un retour rapide à la phase active de la maladie. De plus, les différents stades de santé et de pathologie peuvent coexister chez un même individu et même sur les différentes faces d'une dent. Enfin la susceptibilité individuelle à la maladie et au traitement est très variable (pour revue [127]).

V-2. Etiologie

Des **infections bactériennes** de longue durée semblent bien représenter la cause primaire des parodontites. Or, environ 300 espèces bactériennes ont pu être identifiées dans la flore buccale, et seulement 20% d'entre elles ont pu être associées aux parodontites [128]. Ainsi, il ne semble pas que les diverses formes de parodontopathies soient chacune liées à la présence d'une bactérie spécifique, mais plutôt à l'action potentialisatrice de plusieurs espèces pathogènes [129]. En particulier, certains microorganismes sous-gingivaux sont fréquemment retrouvés dans certaines formes de parodontites (Tableau 4). Mais généralement, une distribution au hasard de morphotypes variés est observée, suggérant une introduction passive ou opportuniste des bactéries [130]. L'étude du statut immunologique des patients montre une augmentation du taux d'anticorps dirigés contre plusieurs espèces bactériennes résultant d'une activation polyclonale.

Cette difficulté à établir une relation directe entre une espèce bactérienne et un type de pathologie laisse supposer que les agents bactériens ne représentent pas la seule cause de développement d'une lésion pathologique. Ainsi d'autres facteurs relatifs à l'hôte peuvent participer à l'installation d'une lésion. C'est le cas de variations hormonales et d'anomalies fonctionnelles des leucocytes et en particulier des polynucléaires neutrophiles. Cet aspect sera développé dans le paragraphe concernant le rôle du polynucléaire neutrophile dans les maladies parodontales.

V-3. Moyens diagnostiques et traitements

Les transitions de la santé à la gingivite et à la parodontite sont difficiles à identifier, de même qu'il est parfois assez difficile de déterminer si la lésion est en phase active ou en phase de rémission. Le clinicien doit évaluer plusieurs paramètres pour déterminer le type de lésion.

Une description locale de l'état inflammatoire de la **gencive** comprenant la couleur, le gonflement et le saignement, est utile, mais n'est pas spécifique des parodontites, puisque les mêmes types de modifications sont observés dans les gingivites.

parodontite juvénile	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> <i>Bacteroides gingivalis</i> <i>Eikenella corrodens</i>
parodontite à progression rapide	<i>Bacteroides gingivalis</i> <i>Bactéries fusiformes</i> <i>Spirochètes</i>
parodontite de l'adulte	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> <i>Bacteroides gingivalis</i> <i>Bacteroides intermedius</i>
gingivite (parodontite) ulcéro-nécrotique	<i>Treponema</i> <i>Bacteroides intermedius</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Selenomona</i>

Tableau 4 : Maladies parodontales et bactéries pathogènes associées

d'après Huynh C. *et al.* 1987 [131]

L'importance de la **perte d'attache** peut être mesurée sur des **radiographies**, et représente un élément diagnostique indispensable qui caractérise la sévérité de la lésion ; toutefois, outre les erreurs d'interprétation possibles [132], les destructions osseuses décelables à la radiographie présentent un retard de 4 à 6 mois par rapport aux pertes d'attache mesurées par sondage [133]. Le **sondage** consiste à introduire une sonde dans la poche parodontale et permet d'évaluer la profondeur des poches parodontales, le niveau clinique de l'attache et les saignements associés. Bien que l'évaluation de ces paramètres soit tout à fait essentielle en parodontologie, leur interprétation est délicate et de nombreuses contradictions sont décrites dans la littérature [131].

Enfin, l'**examen microscopique** de la plaque prélevée sur la lésion et la mesure quantitative du dépôt de plaque (**indice de plaque**) sont des critères importants pour l'évaluation de la maladie. En effet, l'accumulation de plaque dentaire ou de tartre peut être à l'origine du développement d'une lésion pathologique. De même, la composition de la flore bactérienne évolue parallèlement à la lésion pathologique, et l'examen microscopique, s'il ne permet pas de faire d'évaluation quantitative, peut permettre de déceler la présence de certains germes pathogènes.

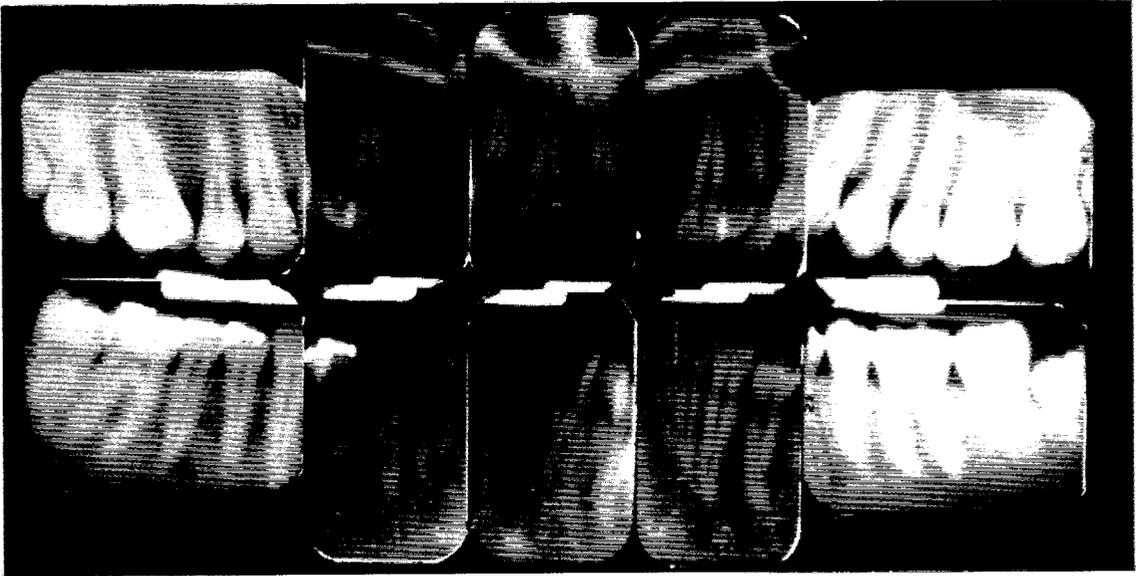
Par leur nature même, l'évaluation de ces différents paramètres pris chacun séparément est peu précise et leur interprétation est sujette à caution. Mais ces paramètres sont les seuls dont dispose le clinicien actuellement, et leur utilisation **associée** reste indispensable.

La figure 8 présente des radiographies d'un sujet sain et d'un patient.

Le **traitement** idéal serait celui qui répondrait aux exigences suivantes : *i*) induction d'un gain d'attache au niveau des sites atteints, *ii*) arrêt de la progression de la maladie au niveau des sites actifs, *iii*) prévention des épisodes de destruction ultérieurs, *iv*) non induction d'effets délétères au niveau des sites sains. Dans la plupart des cas, le traitement le plus efficace consiste sans aucun doute à contrôler la composition de la plaque dentaire et la manifestation du tartre déposés sur les dents et dans les poches parodontales. Souvent, en ce qui concerne les formes adultes de parodontites, ce contrôle est réalisé avec l'utilisation d'agents antibactériens locaux appliqués directement dans les poches parodontales [134, 135]. Pour les parodontites juvéniles

Figure 8 : Radiographies d'un parodonte sain (A) et d'un parodonte présentant des pertes d'attache importantes (B)

A



B



et à progression rapide, une antibiothérapie dirigée contre les germes pathogènes (*Actinobacillus actinomycetemcomitans* et *Bacteroides gingivalis*) est souvent nécessaire, l'élimination locale de ces germes n'étant généralement pas complète [136]. Un autre aspect pourrait consister à rétablir par l'usage de drogues appropriées les défenses immunologiques de l'organisme.

V-4. Classification

Une première classification ancienne était basée sur une description des facteurs locaux. Mais la compréhension progressive de la pathogénèse de la maladie a permis d'établir un classement plus en rapport avec les causes de la maladie, par types de pathologies :

- parodontites chroniques de l'adulte
- parodontites à début précoce :
 - parodontites à progression rapide de type A
 - parodontites à progression rapide de type B
- parodontites juvéniles
 - parodontites juvéniles localisées
 - parodontites post juvéniles
- parodontites prépubertaires

Le tableau 5 résume les caractéristiques de chacune des pathologies (pour revue, [137]).

Globalement, on peut distinguer la parodontite chronique de l'adulte des autres formes de parodontites ; la première évolue relativement lentement, elle est associée à des dépôts de plaque importants sans prédominance d'un germe pathogène particulier, et une diminution éventuelle des mécanismes de défense de l'hôte n'est pas observée ; par contre, dans les autres pathologies, l'évolution est rapide et sévère, la présence de germes pathogènes est fréquemment décelée, et des altérations de caractère héréditaire du système de défense de l'hôte semblent être impliquées.

	<i>parodontite chronique de l'adulte</i>	<i>parodontite à progression rapide type A</i>	<i>parodontite à progression rapide type B</i>	<i>parodontite juvénile</i>	<i>parodontite post juvénile</i>	<i>parodontite prépubertaire</i>
<i>age</i>	35 et +	14-26	26-35	12-26	26-35	<14
<i>sexe (F/M)</i>	1/1	2-3/1	?	3/1	3/1	1/1
<i>localisation des lésions</i>	variable	généralisée	généralisée	1ères molaires incisives	1ères molaires incisives	généralisées ou localisées
<i>dépôts dentaires</i>	oui	minimal	oui	minimal	oui	minimal
<i>susceptibilité à la carie</i>	variable	variable	variable	basse	variable	basse
<i>chimiotactisme des PN</i>	normal	diminué	diminué ou normal	diminué	?	diminué ou normal
<i>AMLR</i>	normale	diminuée	normale	augmentée	augmentée	?
<i>hérédité</i>	?	oui	?	oui	oui	oui

Tableau 5 : Les différentes formes de parodontites

(d'après Suzuki J.B. & Charon J.A., 1976 [137])

VI. ROLE DU POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE DANS LES MALADIES PARODONTALES

Sil n'est généralement pas encore possible de dire avec certitude quelle est la cause du développement d'une lésion de type parodontal, une diminution des mécanismes de défense de l'organisme apparaît cependant être un facteur déterminant de la rupture de l'équilibre, compatible avec la santé parodontale. Parmi les mécanismes de défense de l'organisme, plusieurs observations laissent supposer que le rôle du polynucléaire neutrophile est déterminant :

1. les polynucléaires neutrophiles sont présent en nombre élevé dans la cavité buccale
2. ces polynucléaires neutrophiles buccaux sont fonctionnels
3. les patients porteurs d'un déficit fonctionnel grave du polynucléaire neutrophile présentent des lésions parodontales associées
4. certaines fonctions du polynucléaire neutrophile sont altérées chez les patients atteints de maladies parodontales.

Reprenons chacune de ces observations et voyons qu'elle approche d'étude nous avons choisie.

VI-1. Présence de polynucléaires neutrophiles dans la cavité buccale

Quelle que soit la phase clinique de n'importe quel site de la cavité buccale, des infiltrats riches en polynucléaires neutrophiles sont observés dans les tissus gingivaux [123]. La présence de ces infiltrats peut s'expliquer par l'attraction continue des polynucléaires neutrophiles par les substances chimiotactiques libérées directement ou indirectement par les bactéries de la plaque dentaire [138]. Ces polynucléaires neutrophiles poursuivent leur progression vers la cavité buccale et sont exsudés des tissus dans le fluide gingival, au niveau du sillon gingivo-dentaire [125]. De même, de nombreux polynucléaires neutrophiles sont également retrouvés dans la salive. Ainsi, des millions de polynucléaires neutrophiles affluent régulièrement dans la cavité buccale. Il ne serait donc pas surprenant d'observer qu'une diminution de la capacité fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles faciliterait l'invasion des

tissus par les bactéries de la plaque dentaire. Des prélèvements de salive ou de fluide gingival permettent de recueillir un nombre suffisant de polynucléaires neutrophiles buccaux et d'en analyser la réponse fonctionnelle.

VI-2. Réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles buccaux

Des études préliminaires [125 et 139] ont montré que les polynucléaires neutrophiles isolés de la cavité buccale d'individus en bonne santé sont capables de développer une réponse fonctionnelle normale en ce qui concerne l'activation du métabolisme oxydatif, mais légèrement diminuée en ce qui concerne la migration chimiotactique et la phagocytose.

VI-3. Statut parodontal des patients porteurs de déficits fonctionnels graves du polynucléaire neutrophile

Une prévalence accrue au développement de lésions des tissus gingivaux est observée chez des patients qui ont un déficit congénital sévère du polynucléaire neutrophile. C'est le cas pour le syndrome de Chédiak-Higashi associé à des inflammations gingivales et à des pertes d'attache importantes [140]. Le Lazy leucocyte Syndrome est caractérisé par des stomatites, des gingivites et l'apparition d'ulcères récurrents [141 et 142]. La granulomatose septique chronique est associée à des infections orale sévères et à des parodontites à progression rapide [143].

Notons également que les patients qui souffrent de neutropénies congénitales (neutropénies cycliques [144]) ou acquises (agranulomatoses médicamenteuses [145]) présentent des destructions sévères des tissus parodontaux.

VI-4. Altération de certaines fonctions des polynucléaires neutrophiles dans certaines parodontopathies

Un défaut de la fonction chimiotactique des polynucléaires neutrophiles a pu être mis en évidence chez 75% de patients atteints de parodontites juvéniles localisées [146]. Ce déficit du polynucléaire neutrophile est intrinsèque et héréditaire. Le défaut de la migration chimiotactique semble être lié à une diminution de la capacité de liaison du fMLP sur la cellule, consécutive à une diminution du nombre de récepteurs exprimés [147]. Les fonctions de phagocytose et de bactéricidie sont également altérées dans les parodontites juvéniles [148 et 149].

Une diminution de la réponse chimiotactique des polynucléaires neutrophiles est également observée dans certains cas de parodontite à progression rapide [150], et de parodontite pré-pubertaire [151]. Notons enfin que la production de radicaux oxygènes par les polynucléaires gingivaux est diminuée chez les patients atteints de parodontites à progression rapide [152].

Objectifs de notre travail

Le rôle déterminant du polynucléaire neutrophile dans le maintien de la santé des tissus parodontaux est fortement suggéré par diverses observations. Si l'existence d'un déficit du polynucléaire neutrophile n'a pas pu être démontrée dans tous les cas de parodontites, par contre, lorsque la capacité fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles est altérée, des lésions parodontales se développent. Au cours de ce travail, nous nous sommes attachés à caractériser la réponse fonctionnelle du polynucléaire neutrophile dans la pathologie des maladies parodontales.

Dans un premier temps, nous avons étudié les caractéristiques d'une réponse fonctionnelle (l'activation du métabolisme oxydatif) des polynucléaires neutrophiles présents dans la cavité buccale d'individus sains, à l'état spontané ou en réponse à l'agent stimulant local : la plaque dentaire. Puis, conformément aux résultats de la littérature, nous avons confirmé que la réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles est altérée chez les patients.

Nous avons déjà signalé que l'évolution des maladies parodontales s'effectue par paliers successifs. Si le développement de lésions pathologiques découle d'un déficit du polynucléaire neutrophile, il est possible que ce déficit ne soit décelable que de façon transitoire. C'est pourquoi nous avons choisi d'analyser des patients en phase active de la maladie, n'ayant subi aucun traitement préalable. D'autre part, sans négliger ou minimiser le désagrément causé par la perte des dents, les maladies parodontales ne mettent pas en jeu la vie des patients atteints. Aussi, le déficit du polynucléaire neutrophile impliqué dans ces pathologies ne touche probablement pas une fonction cellulaire majeure, mais on peut imaginer qu'il affecte, par exemple, les processus de transduction du signal d'activation.

Dans le but de caractériser le déficit des polynucléaires neutrophiles des patients, nous avons étudié la capacité de marquage métabolique des polynucléaires neutrophiles de témoins et de patients, et nous avons analysé les profils électrophorétiques des produits du marquage métabolique. Nous avons alors mis en évidence un défaut de synthèse d'un polypeptide de 46 kDa chez les neutrophiles des patients.

Enfin, nous avons essayé de caractériser ce polypeptide 46 kDa.

RESULTATS

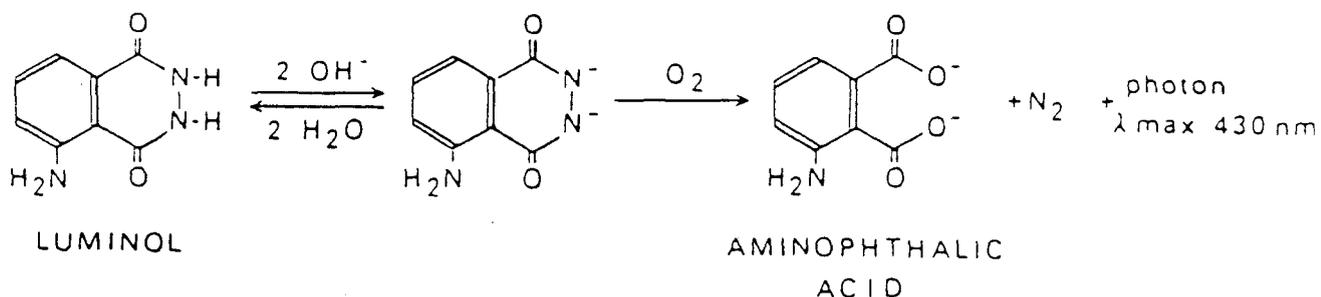
RESULTATS

I. REPONSE FONCTIONNELLE DU POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE DANS LA CAVITE BUCCALE

I-1. Mesure de la chimioluminescence

I-1/a. Principe

La chimioluminescence représente la lumière émise par les dérivés actifs de l'oxygène produits lors de l'"explosion respiratoire" des polynucléaires neutrophiles stimulés. La quantité de chimioluminescence émise étant relativement faible et difficile à mesurer directement, une substance chimique non toxique est ajoutée dans le milieu d'incubation pour amplifier le signal de chimioluminescence. Nous avons utilisé le **luminol** (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione), parce que cette molécule semble être l'une des plus représentatives pour amplifier les signaux émis par la totalité des dérivés actifs de l'oxygène. En effet, le luminol peut être oxydé aussi bien par H_2O_2 que par $OH\cdot$ ou $O_2\cdot^-$. La réaction d'oxydation par H_2O_2 est la suivante :



Ainsi, si la concentration de luminol est constante et en excès, la quantité de lumière émise est proportionnelle à la quantité de H_2O_2 présente dans le milieu.

I-1/b. Définition des conditions de mesure :

Le luminomètre que nous avons utilisé mesure la quantité de lumière émise à 425 nm. Nous avons choisi le mode de mesure en **intégration sur 30 secondes**, pour lequel l'appareil calcule l'intégrale de la somme des coups émis pendant 30 secondes, à partir du début de la mesure. Le résultat est exprimé en coups par minutes (cpm).

La cinétique de production de chimioluminescence en absence de stimulus (figure 9-A) montre qu'il existe un taux basal d'émission de chimioluminescence, légèrement supérieur au bruit de fond de l'appareil, qui varie peu au cours du temps. Par contre, la cinétique en présence de l'activateur PMA montre une augmentation rapide de l'émission de chimioluminescence avec un pic précoce à 5 minutes suivi d'un plateau stable pendant 30 minutes et d'une décroissance lente et progressive. Ainsi, lorsque **la mesure est effectuée après 15 minutes d'incubation**, les cellules sont proches de l'état maximum d'émission de chimioluminescence.

De plus, dans ces conditions de mesure, l'émission de chimioluminescence est proportionnelle au nombre de cellules présentes dans le tube (figure 9-B). Nous avons retenu le nombre de 150 000 polynucléaires neutrophiles/test qui correspond à une concentration initiale de la suspension cellulaire égale à $1,5 \times 10^6$ cellules/ml. Ainsi, la chimioluminescence émise est suffisamment élevée pour un nombre de cellules relativement faible.

Notons également que l'émission de chimioluminescence varie en fonction de la concentration en activateur. En présence de concentrations croissantes de PMA, l'émission de chimioluminescence augmente régulièrement (figure 9-C). Par contre, en présence de concentrations croissantes de fMLP, l'émission de chimioluminescence augmente progressivement jusqu'à un plateau pour la concentration de 10 μ M (figure 9-D). La forme différente des courbes dose-réponse traduit probablement un processus d'activation différent pour les deux activateurs, le fMLP faisant intervenir des récepteurs membranaires spécifiques et saturables.

Rappelons enfin que l'émission de chimioluminescence est fonction de la température.

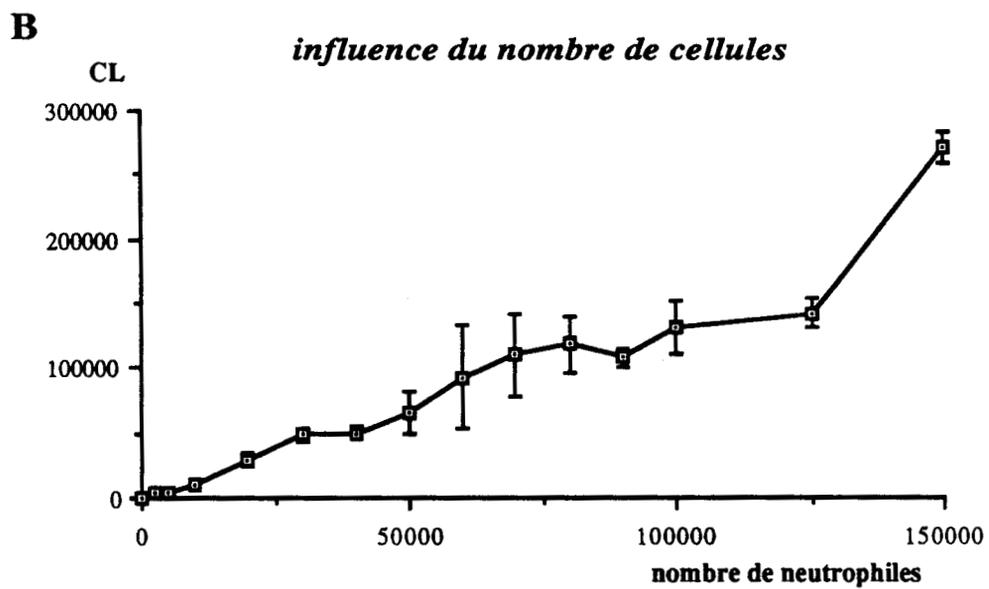
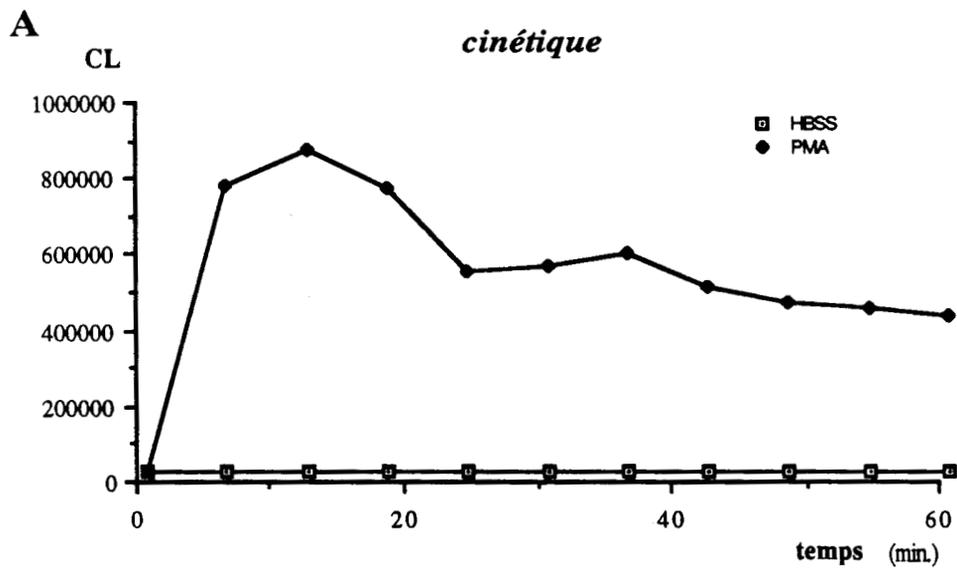
En résumé, la mesure est effectuée à la température stabilisée à 37°C, après une incubation de 15 minutes à 37°C des cellules avec l'activateur et le luminol. Dans ces conditions, la chimioluminescence mesurée est proportionnelle au nombre de cellules et au taux d'activation de ces cellules.

**Figure 9 : Caractéristiques de la chimioluminescence émise
par les polynucléaires neutrophiles sanguins**

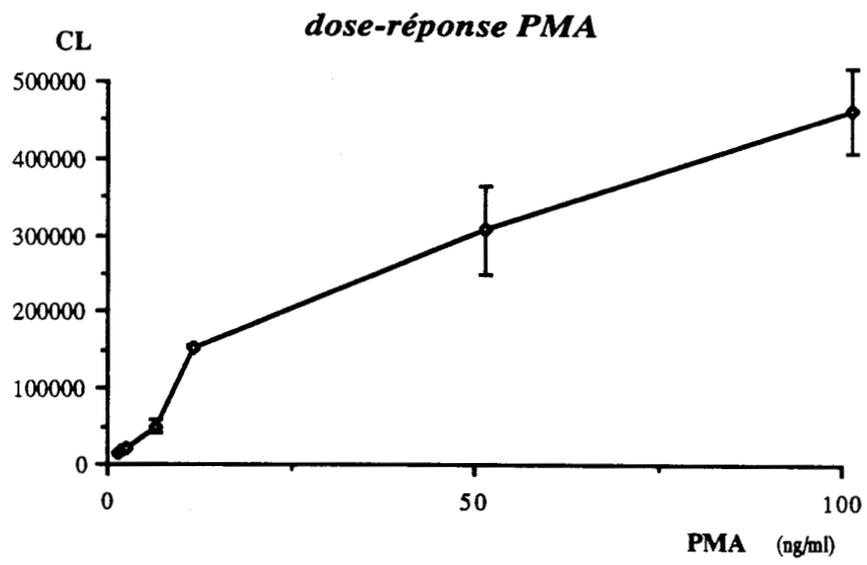
Figure 9-A : cinétique

Figure 9-B : augmentation de l'émission de chimioluminescence induite par le
PMA en fonction du nombre de polynucléaires neutrophiles

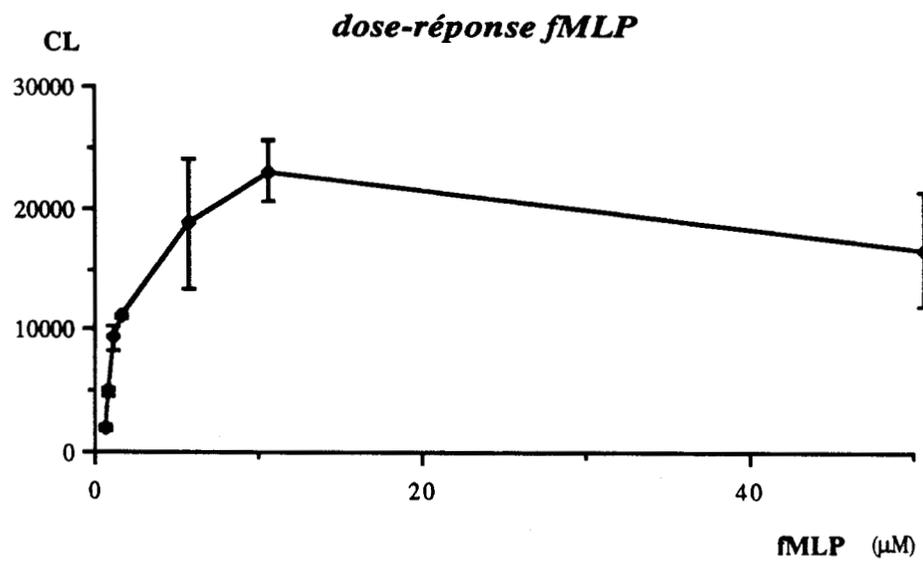
Figure 9-C et 9-D : courbes dose-réponse du fMLP et du PMA



C



D



I-2. Sous-populations des polynucléaires neutrophiles buccaux

Deux populations différentes de polynucléaires neutrophiles ont été recueillies par deux techniques différentes. La première consiste à rincer le sillon gingivo-dentaire par une goutte de tampon phosphate (pH 7,5) à l'aide d'une seringue Hamilton® et de réaspirer cette goutte enrichie en fluide gingival et en **polynucléaires neutrophiles crévicaux**. Les cellules ainsi recueillies viennent tout juste d'être exudées des tissus gingivaux [Charon et al. 1982]. La deuxième méthode consiste à demander au donneur de se rincer la bouche avec du tampon phosphate. La solution recueillie est riche en salive, en cellules épithéliales et en **polynucléaires neutrophiles salivaires**. Les cellules recueillies par cette deuxième technique ont déjà séjourné plus ou moins longtemps dans la cavité buccale, et leur état de maturité est généralement plus avancé que celui des polynucléaires neutrophiles crévicaux. Pour chacune de ces deux populations de polynucléaires neutrophiles buccaux, nous avons mesuré le taux de base d'émission de chimioluminescence d'une part, et d'autre part le taux émis en réponse à divers activateurs (tableau 6).

I-2/a. Taux basal

Les deux populations de polynucléaires neutrophiles buccaux ont un taux basal d'émission de chimioluminescence beaucoup plus élevé que celui des polynucléaires neutrophiles sanguins (tableau 6). Ainsi, si l'on admet que le taux basal d'émission de chimioluminescence traduit l'état d'activation de la cellule, les polynucléaires neutrophiles buccaux sont activés par rapport aux polynucléaires neutrophiles sanguins. Les méthodes de préparation des polynucléaires neutrophiles buccaux sont bien moins longues et bien plus douces que la méthode de préparation des polynucléaires neutrophiles sanguins. Il est donc peu probable que la différence d'état d'activation soit dû à la méthode de préparation. Par contre, les polynucléaires neutrophiles buccaux ont quitté la circulation sanguine et ont migré vers les tissus gingivaux en réponse à des facteurs chimiotactiques. Ainsi, la migration chimiotactique à travers les tissus se traduirait par une activation de la cellule, qui persiste et qui est décelable par la mesure de la chimioluminescence.

	<i>neutrophiles sanguins</i>	<i>neutrophiles créviculaires</i>	<i>neutrophiles salivaires</i>
<i>tampon</i>	385 ± 60	8 666 ± 654	7 620 ± 1 024
<i>PMA</i>	31 111 ± 5 529	29 176 ± 1 469	30 168 ± 3 012
<i>zymosan opsonisé</i>	133 729 ± 10 050	54 625 ± 3 165	66 546 ± 7 114

Tableau 6 : Chimiluminescence émise par les sous-populations de polynucléaires neutrophiles buccaux

Les résultats sont exprimés en cpm et représentent la moyenne ± l'écart type des différentes mesures effectuées pour une expérience type.

I-2/b. Capacité de réponse à des activateurs

Les polynucléaires neutrophiles buccaux répondent de façon analogue aux polynucléaires neutrophiles sanguins à une stimulation par le PMA (tableau 6). Par contre, leur capacité de réponse au zymosan opsonisé est diminuée de moitié par rapport aux polynucléaires neutrophiles sanguins (tableau 6). Deux critères peuvent différencier le zymosan opsonisé du PMA : non seulement le zymosan est un activateur particulière qui déclenche le processus de phagocytose, mais encore, il déclenche le processus d'activation cellulaire via des récepteurs membranaires spécifiques. Ainsi, on peut considérer que les polynucléaires neutrophiles buccaux présentent soit un défaut de la phagocytose, soit un déficit des processus de transmission membranaire du signal.

I-3. Effet de la plaque dentaire sur l'émission de chimioluminescence par les polynucléaires neutrophiles du sang circulant

I-3/a. Effet de la plaque dentaire sur les polynucléaires neutrophiles sanguins

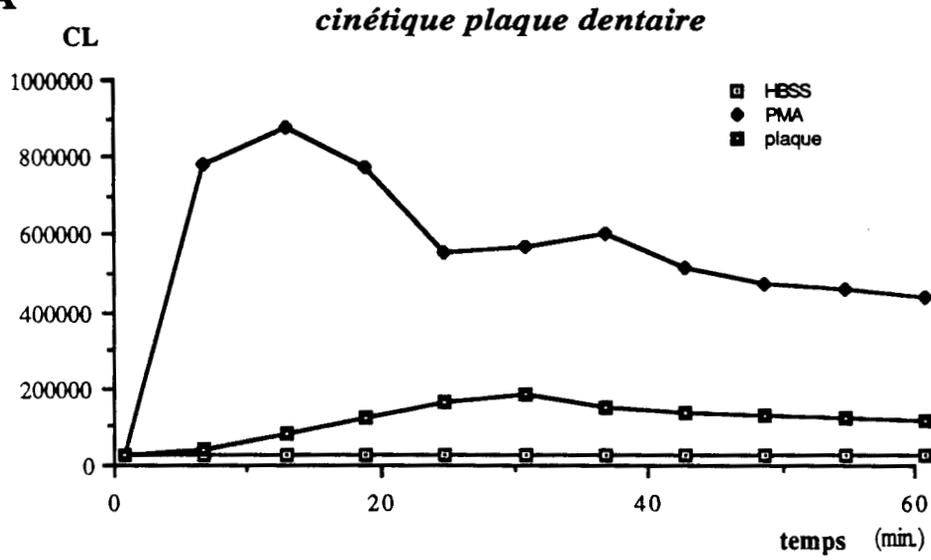
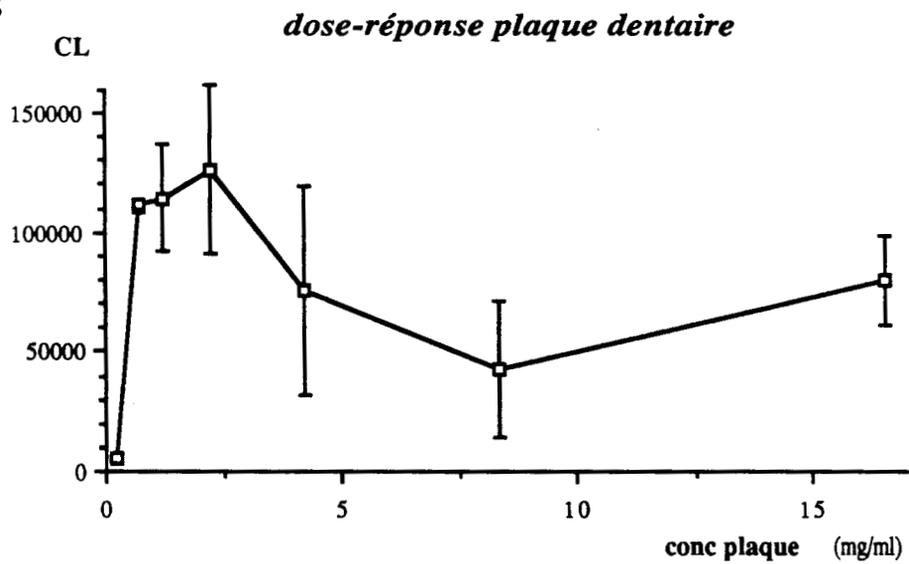
La plaque dentaire est prélevée sur les dents d'un sujet n'ayant pas subi de traitement parodontal et présentant une banale gingivite en relation avec des accumulations de plaque dentaire. Elle est maintenue à 4°C, et après détermination de sa concentration en protéines, elle est remise en suspension dans du tampon.

La plaque dentaire se comporte comme un véritable activateur des polynucléaires neutrophiles sanguins, et induit une augmentation de l'émission de chimioluminescence. Cette augmentation est progressive pendant 30 minutes (figure 10-A). De plus, l'effet de la plaque dentaire est dose-dépendant avec un maximum pour la concentration de 80 µg protéines/ml (figure 10-B).

**Figure 10 : Induction par la plaque dentaire de l'émission
de chimioluminescence des polynucléaires neutrophiles
sanguins**

Figure 10-A : cinétique

Figure 10-B : courbe dose-réponse

A**B**

I-3/b. Influence de divers traitements de la plaque dentaire (tableau 7)

Des traitements physiques forts tels que le chauffage (15 minutes à 60 °C), la sonication (20 secondes à 20 kHz) et des traitements par un acide (TCA 25 %) ou une base (NaOH 1N) concentrés diminuent fortement la capacité activatrice de la plaque dentaire (plus de 80% d'inhibition). De tels traitements tuent les bactéries de la plaque et provoquent une dénaturation de leurs constituants moléculaires.

Par contre, l'irradiation (1 100 rads/minute pendant 15 minutes) affecte peu la capacité activatrice de la plaque (inhibition 19%), probablement parce qu'un tel traitement tue les bactéries mais ne modifie presque pas la nature de leurs constituants.

Ainsi, l'activation des polynucléaires neutrophiles semble dépendre essentiellement de l'intégrité des constituants de la plaque dentaire, plus que de la survie des bactéries.

I-3/c. Effet de la cytochalasine B (tableau 8)

La cytochalasine B est une substance d'origine fongique qui affecte l'assemblage des microfilaments d'actine, gênant ainsi les processus cellulaires liés à la phagocytose. Lorsque cette substance est ajoutée au milieu d'incubation (10 µg/ml), elle diminue fortement (85 à 90%) l'effet inducteur de la plaque dentaire. Cette observation laisse supposer que l'effet inducteur de la plaque dentaire passe en grande partie par une induction de la phagocytose.

<i>traitement</i>	<i>CL avant</i>	<i>CL après</i>	<i>% d'inhibition</i>
Chauffage	251 986 ± 65 961	52 991 ± 8 207	79 %
Sonication	287 552 ± 16 012	41 252 ± 8 207	85,6 %
TCA	471 446 ± 83 625	71 797 ± 19 118	84,8 %
NaOH	370 116 ± 46 312	146 836 ± 15 344	60,3 %
Irradiation	406 277 ± 41 946	329 181 ± 38 216	19 %

Tableau 7 : Inhibition par différents traitements de l'effet de la plaque dentaire sur l'émission de chimioluminescence par les polynucléaires neutrophiles sanguins

	<i>CL sans Cyt.B</i>	<i>CL avec Cyt.B</i>	<i>% d'inhibition</i>
PMA	136 238 ± 7 237	72 641 ± 2 413	47 %
zymosan opsonisé	367 005 ± 43 326	165 716 ± 49 724	54 %
plaque dentaire	150 730 ± 17 345	12 549 ± 3 994	90 %

Tableau 8 : Inhibition par la cytochalasine B de l'effet de la plaque dentaire sur l'émission de chimioluminescence par les polynucléaires neutrophiles sanguins

Les résultats sont exprimés en cpm et représentent la moyenne ± l'écart type des différentes mesures effectuées pour une expérience type.

I-4. Effet de la plaque dentaire sur l'émission de chimioluminescence par les polynucléaires neutrophiles buccaux

In vivo, la plaque dentaire agit sur les polynucléaires neutrophiles présents dans la cavité buccale. Nous avons donc mesuré l'émission de chimioluminescence par les deux sous-populations de polynucléaires neutrophiles buccaux induite par la plaque dentaire.

L'effet de la plaque dentaire n'est pas identique pour les deux sous-populations de polynucléaires neutrophiles buccaux : elle active légèrement les polynucléaires neutrophiles crévicaux, mais elle n'active plus les polynucléaires neutrophiles salivaires (tableau 9). Ces observations ne dépendent ni du temps d'incubation (figure 11), ni de la dose de plaque dentaire (figure 11).

Ainsi, bien que les polynucléaires neutrophiles buccaux soient encore fonctionnels et capables de répondre à une stimulation, ils ne sont peu ou plus capables de répondre à une stimulation par la plaque dentaire. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait qu'ils ont déjà été stimulés une première fois par les facteurs de la plaque dentaire (soit au cours de leur migration chimiotactique dans les tissus, soit au cours de leur séjour dans la cavité buccale), et ils ne sont pas capables de répondre à ces facteurs lors d'une deuxième stimulation.

	<i>neutrophiles sanguins</i>	<i>neutrophiles crévicaux</i>	<i>neutrophiles salivaires</i>
<i>tampon</i>	385 ± 60	8 666 ± 654	7 620 ± 1 024
<i>plaque dentaire</i>	29 857 ± 3 095	25 849 ± 3 220	5 413 ± 945

Tableau 9 : Chimioluminescence émise par les sous-populations de polynucléaires neutrophiles buccaux en réponse à la plaque dentaire

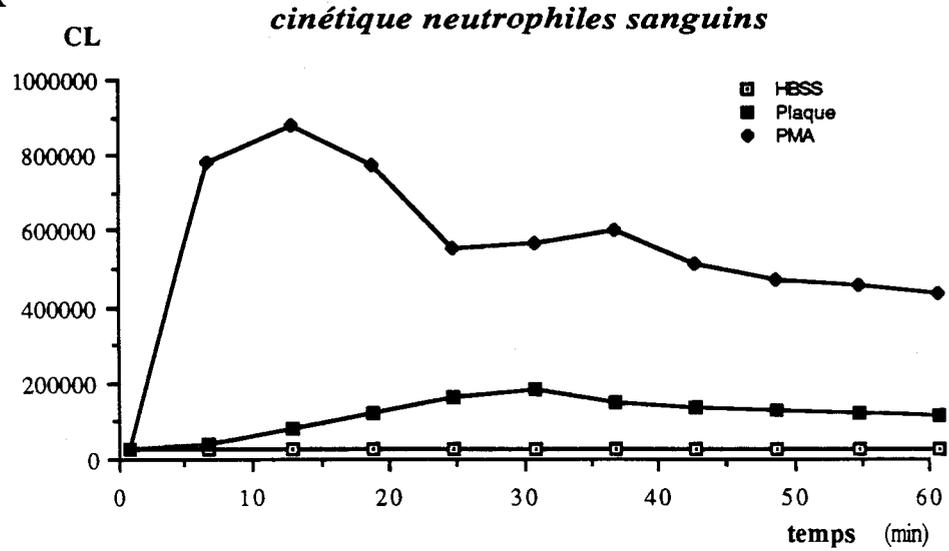
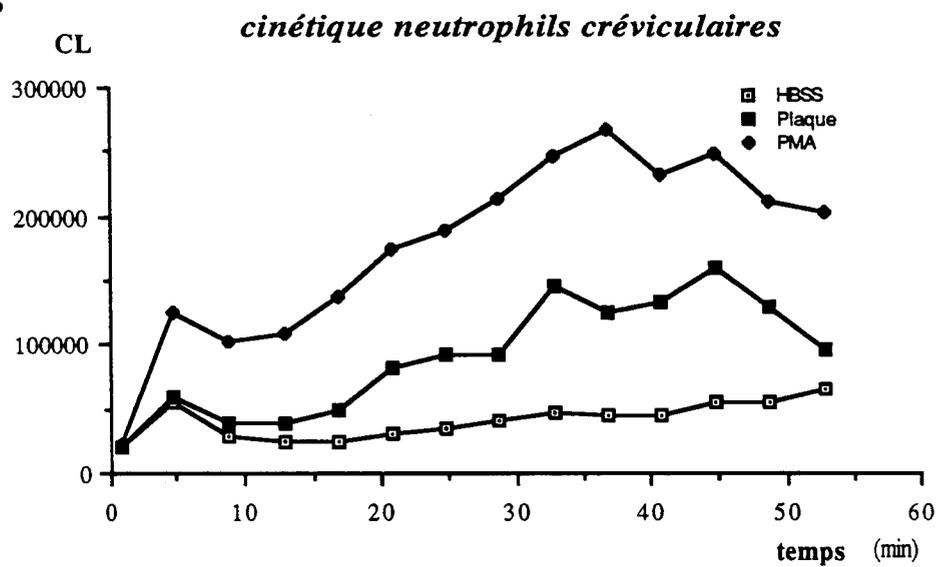
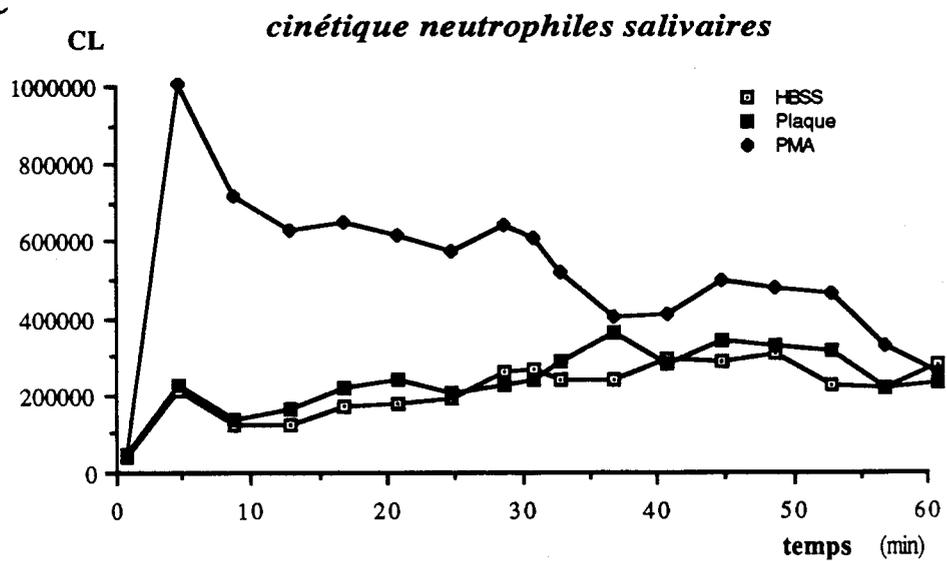
Les résultats sont exprimés en cpm et représentent la moyenne ± l'écart type des différentes mesures effectuées pour une expérience type.

**Figure 11 : Cinétique d'induction par la plaque dentaire de
l'émission de chimioluminescence des polynucléaires
neutrophiles buccaux**

Figure 11-A : polynucléaires neutrophiles sanguins

Figure 11-B : polynucléaires neutrophiles créviculaires

Figure 11-C : polynucléaires neutrophiles salivaires

A**B****C**

II. REPOSE FONCTIONNELLE DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES D'UN PATIENT ATTEINT DE GRANULOMATOSE SEPTIQUE CHRONIQUE

La granulomatose septique chronique est une maladie relativement rare (1/1 000 000^o) mais elle découle d'un déficit congénital sévère du polynucléaire neutrophile. Chez ces patients, un des constituants de la NADPH-oxydase n'est pas synthétisé normalement et la NADPH-oxydase n'est pas fonctionnelle. Ce déficit est décelé par l'absence de synthèse de radicaux oxygènes par les polynucléaires neutrophiles de ces patients. Cette pathologie constitue un bon modèle de l'étude de l'implication des métabolites de l'oxygène en relation avec l'état clinique du parodonte.

II-1. Données cliniques

Le patient est un garçon de 19 ans, issu d'une famille pour laquelle le diagnostic de granulose septique familiale a été établi. Souffrant dès sa jeune enfance de troubles infectieux sévères, particulièrement cutanés, le patient a reçu dès l'âge de 3 ans et demi jusqu'à ce jour du Bactrim[®].

L'examen parodontal révèle une inflammation gingivale importante, ainsi qu'une sensibilité à la douleur et des saignements (figure 12). Le bilan radiologique montre qu'il n'y a pas de perte d'attache cliniquement décelable.

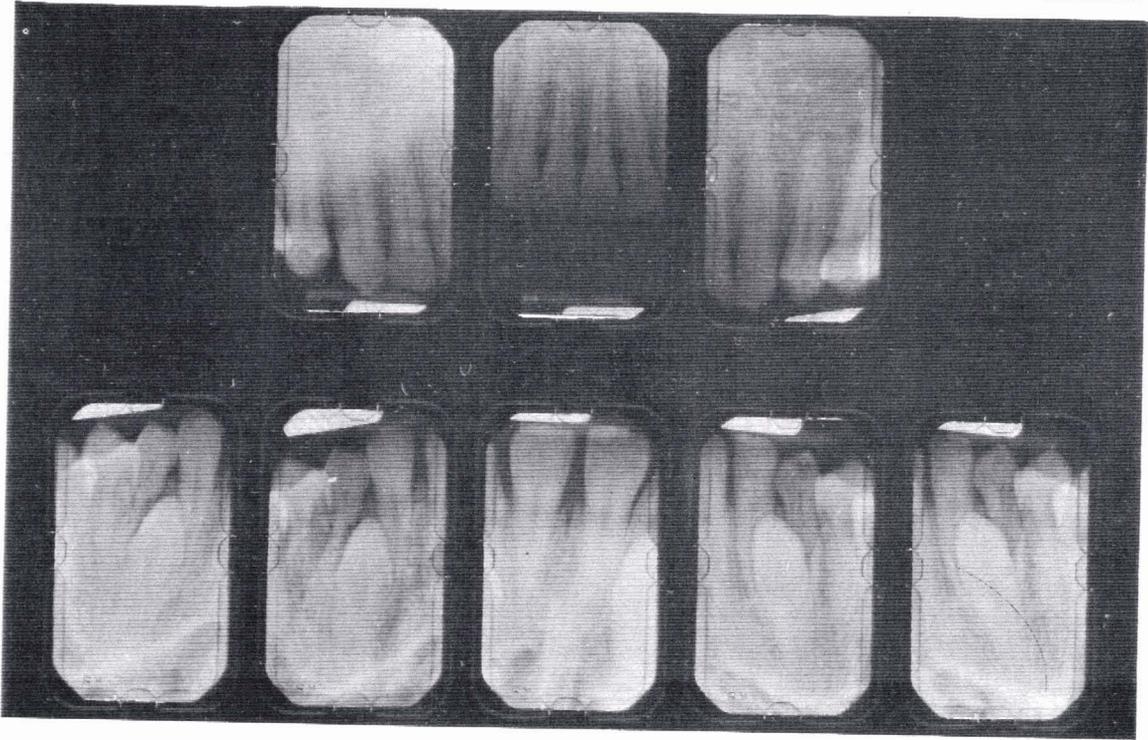
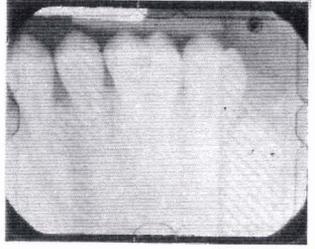
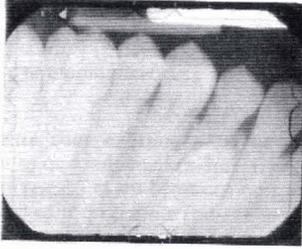
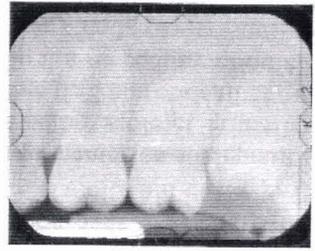
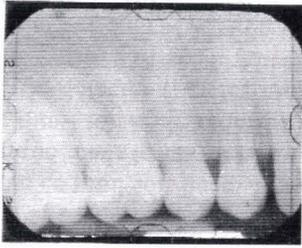
II-2. Chimiluminescence des polynucléaires neutrophiles

Le tableau 10 montre clairement que les polynucléaires neutrophiles sanguins et salivaires du patient ne sont pas capables de répondre à une stimulation par le PMA, le zymosan ou la plaque dentaire.

**Figure 12 : Statut parodontal d'un patient atteint de
granulomatose septique chronique**

Figure 12-A : Vue frontale du parodonte superficiel montrant l'état inflammatoire hyperplasique et les accumulations de plaque gingivale.

Figure 12-B : Radiographies montrant l'intégrité des structures parodontales profondes.



B



A

A-Polynucléaires neutrophiles sanguins

	<i>Patient</i>	<i>Témoin</i>
<i>tampon</i>	476	455
<i>PMA</i>	823	216 952
<i>zymosan opsonisé</i>	1 277	305 560
<i>plaque dentaire</i>	1 197	133 768

B-Polynucléaires neutrophiles salivaires

	<i>Patient</i>	<i>Témoin</i>
<i>tampon</i>	869	75 040
<i>PMA</i>	1 689	295 570
<i>zymosan opsonisé</i>	5 230	380 102
<i>plaque dentaire</i>	3 010	140 370

Tableau 10 : Chimiluminescence des polynucléaires neutrophiles d'un patient atteint de granulomatose septique chronique

Les résultats sont exprimés en cpm et représentent la moyenne \pm l'écart type des différentes mesures effectuées pour une expérience.

III. REPONSE FONCTIONNELLE DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES DE PATIENTS ATTEINTS DE MALADIES PARODONTALES

III-1. Tests fonctionnels

III-1/a. Chimiotactisme

Le tableau 11 présente les résultats obtenus pour une expérience type. La réponse chimiotactique au fMLP des polynucléaires neutrophiles sanguins des patients apparaît souvent diminuée par rapport à la réponse des polynucléaires neutrophiles des témoins (4 cas/6). Cette diminution est plus ou moins importante et varie d'un patient à un autre. Toutefois, globalement, ce résultat est conforme à ceux décrits dans la littérature.

III-1/b. Chimioluminescence

En ce qui concerne l'émission de chimioluminescence, l'interprétation est beaucoup plus sujette à caution. En effet, des différences sont observées dans la capacité de réponse à différents stimuli, avec des fluctuations importantes d'un sujet à un autre et d'un stimulus à un autre. Il apparaît donc délicat de se prononcer sur l'existence de différences spécifiques et significatives.

Ainsi, nous voyons que les résultats obtenus sont disparates en fonction du type de réponse fonctionnelle testé, reflétant assez bien les observations contradictoires décrites dans la littérature par les différentes équipes. Cette disparité et l'abondance des études déjà publiées nous ont amené à aborder le problème suivant une approche plus biochimique, et à analyser les profils électrophorétiques des constituants protéiques du polynucléaire neutrophile.

		<i>Patient</i>	<i>témoin</i>
<i>Tampon</i>		21,75 ± 0,96	21,00 ± 0,82
	<i>10⁻⁹</i>	25,75 ± 3,77	30,50 ± 2,52
<i>fMLP</i>	<i>10⁻⁸</i>	24,75 ± 2,87	46,75 ± 9,47
	<i>10⁻⁷</i>	33,50 ± 0,58	58,50 ± 4,43
	<i>10⁻⁶</i>	27,50 ± 6,40	43,00 ± 5,16

Tableau 11 : Réponse chimiotactique des polynucléaires neutrophiles sanguins d'un patient atteint de maladie parodontale

Le résultat est exprimé en nombre moyen de polynucléaires neutrophiles par champs ± l'écart type

III-2. Analyse électrophorétique des extraits cellulaires totaux

Afin de mettre en évidence d'éventuelles différences d'expression de protéines, nous avons comparé les profils protéiques totaux des polynucléaires neutrophiles de patients avec ceux des témoins. L'existence d'un éventuel déficit congénital des polynucléaires neutrophiles des patients atteints de maladies parodontales n'étant pas à exclure.

Les cellules sanguines fraîchement isolées sont lysées et sont impérativement maintenues à 4°C pendant toute la procédure de lyse. Une incubation de 10 minutes en présence du détergent Nonidet P-40 dilué à 0,5% et d'un inhibiteur de protéases (PMSF 1 mM) provoque la lyse des membranes cellulaires tout en préservant la membrane nucléaire. Les noyaux sont sédimentés par une centrifugation de 10 minutes à 1000 x g, le lysat cytosolique est recueilli et préparé pour l'analyse électrophorétique.

Les profils monodimensionnels des témoins (figure 13, pistes A, B et C) et des patients (figure 13, pistes D, E et F) sont similaires. Des variations individuelles sont visibles dans la zone des hauts poids moléculaires, mais ne sont pas spécifiques d'un groupe.

La figure 14 représente un profil bidimensionnel typique des constituants protéiques du polynucléaire neutrophile. L'analyse comparée des profils des témoins et des patients permet de déceler de nombreuses variations individuelles qualitatives et quantitatives. Mais là encore, ces différences ne sont pas représentatives d'un groupe clinique de sujets.

Cette approche de l'analyse électrophorétique des constituants protéiques totaux des polynucléaires neutrophiles ne nous a pas permis de mettre en évidence des différences significatives entre les témoins et les patients. Ainsi, dans un deuxième temps, nous avons décidé d'appliquer cette approche biochimique à l'analyse de la réponse fonctionnelle.

Figure 13 : Profils électrophorétiques monodimensionnels d'extraits cellulaires totaux de polynucléaires neutrophiles

Les pistes A, B et C représentent les profils de trois témoins

les pistes D, E et F les profils de trois patients atteints de parodontites.

Les extraits cellulaires totaux correspondant à 15 µg de protéines sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE sur un gel d'acrylamide 10%, et colorés par le nitrate d'argent.

Des marqueurs de poids moléculaire sont séparés en parallèle ; leur valeurs de poids moléculaire sont indiquées en kDa.

**Figure 14 : Profil électrophorétique bidimensionnel
d'extrait cellulaire total de polynucléaire neutrophile**

L'extrait cellulaire total correspondant à 200 µg de protéine est séparé selon la technique d'électrophorèse bidimensionnelle en gradient de pH préformé. La première migration selon le gradient de pH est réalisée de la gauche vers la droite du gel. La deuxième migration SDS-PAGE est réalisée du haut vers le bas du gel. Des marqueurs de poids moléculaire sont séparés en parallèle. Les polypeptides sont colorés successivement par le Bleu de Coomassie et par le nitrate d'argent.

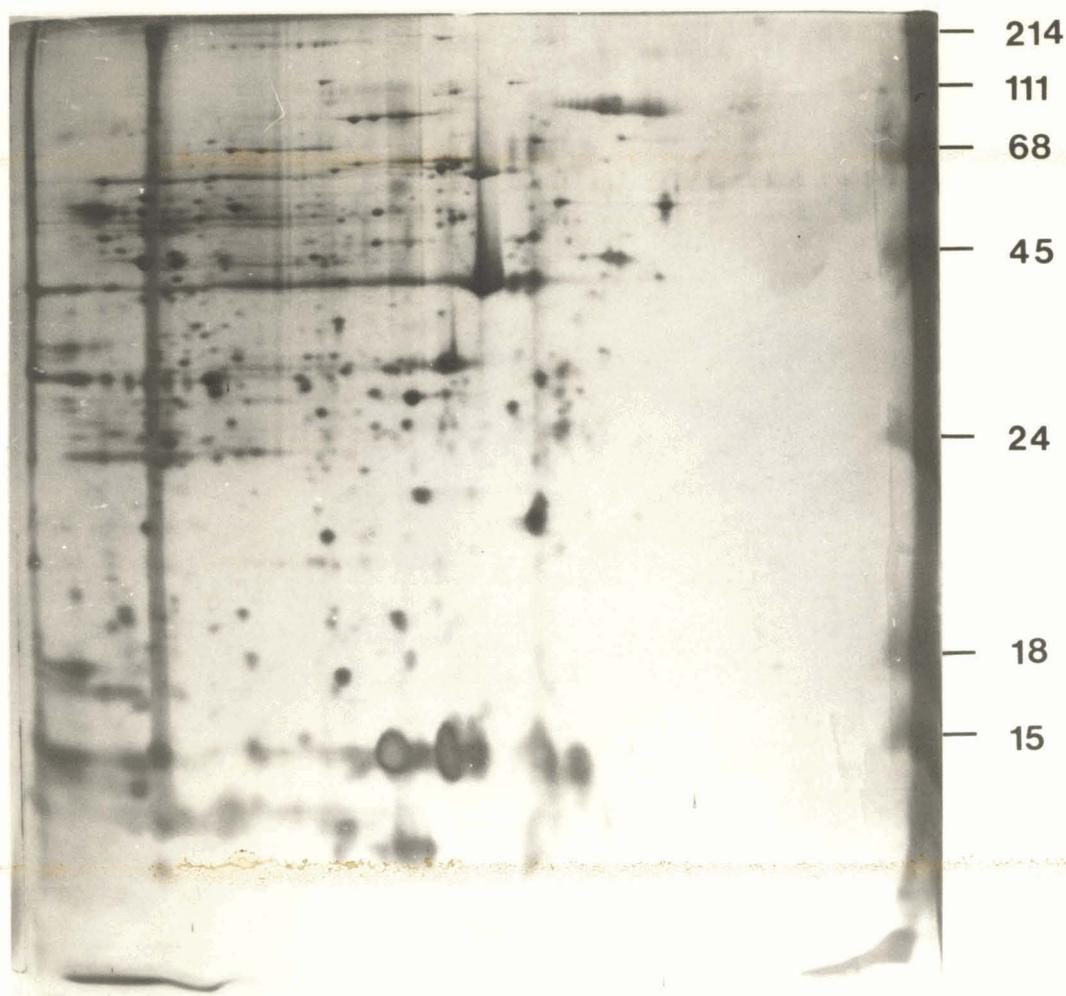
IEF →

PM

NaOH

H₃PO₄

(kDa)





III-3. Approche biochimique de la réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles en réponse à différents stimuli : Analyse comparée des polynucléaires neutrophiles des témoins et des patients

Nous avons réalisé un **marquage métabolique** des polynucléaires neutrophiles sanguins par la méthionine radiomarquée au soufre [^{35}S]. Les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère humide + 5% de CO_2 , avec de la [^{35}S] Met, en présence ou en absence de stimulus. A la fin de l'incubation, le surnageant de culture est recueilli et les cellules sont lysées à 4°C par le Nonidet P-40 dilué à 0,5% en présence de PMSF. Le taux d'incorporation de la radioactivité est mesuré par précipitation au TCA d'une fraction aliquote du surnageant et du lysat cellulaire. Puis les extraits cellulaires sont préparés pour l'analyse électrophorétique mono et bidimensionnelle.

III-3/a. Taux d'incorporation de méthionine radiomarquée

Le taux de marquage augmente progressivement au cours du temps à partir de la deuxième heure. Environ 0,2 à 1% de la [^{35}S] Met sont incorporés dans le matériel précipitable par le TCA ; la majeure partie (80 à 90%) est retrouvée dans le lysat cellulaire et le reste (20 à 10%) dans le surnageant de culture.

***polynucléaires neutrophiles d'individus témoins* (tableau 12)**

Les valeurs mesurées du taux de marquage de base varient entre 100 000 et un 1 000 000 cpm incorporés pour 4 heures d'incubation, et entre 400 000 et 1 800 000 cpm incorporés pour 20 heures d'incubation. Ainsi, des variations importantes sont observées d'un individu à l'autre, traduisant probablement l'état métabolique et physiologique de chaque sujet le jour du prélèvement. Toutefois, dans la majorité des cas (9 cas/11), le taux de marquage au bout de 4 heures est inférieur à 600 000 cpm incorporés, la moyenne étant égale à 286 000. Deux témoins présentent cependant un taux beaucoup plus élevé, d'environ 1 000 000 cpm incorporés.

	4 heures			20 heures		
	<i>NS</i>	<i>fMLP</i>	%	<i>NS</i>	<i>IFn-γ</i>	%
	442	369	-16	998	1504	+50
	229	337	+47	1820	1630	-10
	1105	812	-26	883	1746	+97
	114	235	+106	465	654	+40
	205	287	+40	1266	816	-35
	144	259	+79	600	590	-1
	153	173	+13	836	924	+10
				302	438	+45
	318	425	+33			
	997	569	-43			
	207	256	+23			
	571	771	+35			
	480	551	+15			
A	457	420		880	1011	
	(±354)	(±211)		(±454)	(±486)	
B	286	366		680	977	
	(±159)	(±178)		(±269)	(±531)	

Tableau 12 : Taux individuels de marquage métabolique des polynucléaires neutrophiles sanguins de témoins

Les résultats sont exprimés en cpm x 10⁻³ incorporés dans le matériel précipitable par le TCA correspondant à 5 x 10⁶ polynucléaires neutrophiles.

A: les moyennes (± les écarts types) sont calculés pour l'ensemble des individus.

B : les moyennes (± les écarts types) sont calculés pour l'ensemble moins les deux individus dont le taux est le plus élevé

Nous avons analysé la réponse des polynucléaires neutrophiles à deux agents dans des conditions d'incubations différentes. Nous avons choisi de tester l'effet du fMLP parce qu'il représente la famille des agents chimiotactiques issus des bactéries. Le fMLP active la cellule par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques, dès les premiers instants de l'incubation. Le fMLP a donc été testé à la concentration de 10^{-6} M et au bout de 4 heures d'incubation. Par contre, l'Interféron- γ est un agent d'activation qui a une cinétique d'action plus lente. C'est une molécule synthétisée par le système immunitaire au cours d'une infection. Il est probable que cette cytokine soit synthétisée dans le cadre des infections chroniques liées à l'accumulation de plaque dentaire dans la pathologie des maladies parodontales. l'Interféron- γ a été testé à la concentration de 500 U/ml pour des temps plus longs d'incubation.

Globalement, quelles que soient les conditions, ni le fMLP ni l'Interféron γ n'induisent une augmentation significative ($p > 0,05$ selon le test de Student) du taux de marquage des polynucléaires neutrophiles (tableau 12). Mais cette observation peut être nuancée si les taux sont analysés individu par individu. Ainsi, le fMLP n'induit une diminution importante du taux de marquage que pour les deux individus qui ont un taux de base très élevé ($> 800\ 000$ cpm). Si les résultats obtenus pour ces deux sujets sont éliminés de nos calculs de moyenne, le fMLP semble augmenter le taux de marquage.

Les mêmes observations peuvent être décrites pour l'Interféron- γ (tableau 12).

polynucléaires neutrophiles de patients (tableau 13)

Le taux d'incorporation de [³⁵S] Met est très variable d'un individu à l'autre, reflétant probablement le statut métabolique et physiologique de chaque sujet. Les valeurs sont comprises entre 100 000 et 1 200 000 cpm incorporés pendant 4 heures et par 5×10^6 polynucléaires neutrophiles.

Toutefois, si l'on considère la moyenne du taux de marquage calculée pour chaque groupe de patients (tableau 13), il n'y a pas de différence significative entre le groupe des témoins et le groupe des gingivites, alors que le taux de marquage moyen du groupe des parodontites est significativement plus élevé.

Lorsque les cellules sont incubées en présence de 10^{-6} M de fMLP, les mêmes variabilités individuelles sont observées, et le calcul de la moyenne du taux de marquage ne permet pas de mettre en évidence une différence entre les cellules non-activées et activées (tableau 13). Toutefois, l'analyse individuelle des résultats montre que, lorsque le taux de base est inférieur à 700 000 (6/14), le fMLP induit toujours une augmentation du taux de marquage ; lorsque le taux de base est supérieur à 700 000 (8/14), le fMLP induit une diminution du taux de marquage pour 5 patients/8 et une augmentation pour 3 patients/8 (tableau 13). Ainsi, une tendance à l'augmentation du taux de marquage semble également se dessiner pour les patients du groupe des parodontites.

<i>témoins</i>		<i>gingivites</i>		<i>parodontites</i>	
<i>NS</i>	<i>fMLP</i>	<i>NS</i>	<i>fMLP</i>	<i>NS</i>	<i>fMLP</i>
114	235	217	132	189	284
144	259	254	339	288	236
153	173	295	329	304	404
205	287	557	574	385	538
207	256	602	480	566	904
229	337	642	833	675	722
318	425			734	415
442	369			933	807
480	551			973	783
571	771			1023	715
997	569			1150	798
1105	812			888	1307
983				1177	1849
				1296	1392
457±354	420±211	427±192	447±241	755±363	796±454

Tableau 13 : Taux individuels de marquage métabolique des polynucléaires neutrophiles sanguins des patients et des témoins

Les résultats sont exprimés en cpm x 10⁻³ incorporés par 5 x 10⁶ cellules pendant 4 heures d'incubation en présence (A) ou en absence (B) de 10⁻⁶ M de fMLP.

Les moyennes et les écart-types sont calculés pour chaque groupe d'individus.

La significativité des différences entre les moyennes de deux groupes est déterminée par le test de Student. Deux moyennes sont significativement différentes lorsque la valeur p calculée est inférieure à 0,05.

III-3/b. Analyse électrophorétique des produits de marquage métabolique

Afin d'éliminer la variabilité individuelle du taux de marquage métabolique, l'analyse électrophorétique a été réalisée sur une quantité fixe de radioactivité incorporée : 20 000 cpm pour les gels monodimensionnels et 200 000 cpm pour les gels bidimensionnels.

Lorsque les polynucléaires neutrophiles sont incubés en absence d'activateur, l'analyse électrophorétique monodimensionnelle ne permet pas de différencier les polynucléaires neutrophiles des patients de ceux des témoins. De même, lorsque les polynucléaires neutrophiles sont incubés en présence d'activateurs, aucune différence significative n'est observée entre les patients et les témoins.

Par contre, l'analyse électrophorétique bidimensionnelle des produits de marquage métabolique s'est avérée plus intéressante

La figure 15 représente un profil électrophorétique bidimensionnel total des produits de marquage métabolique du polynucléaire neutrophile non-activé. Un grand nombre de polypeptides apparaissent radiomarqués. De nombreuses variations inter-individuelles sont observées traduisant probablement des variations génétiques.

Comme le montre la figure 16, plusieurs variations quantitatives du taux de synthèse sont induites par le fMLP pour différents polypeptides chez les individus témoins. Notons en particulier l'induction de la synthèse d'un polypeptide de 46 kDa.

Lorsqu'on compare les profils des obtenus pour les différents groupes d'individus, plusieurs variations sont observées, mais la plupart ne sont pas spécifiques de l'un des trois groupes d'individus.

Toutefois, l'analyse globale des profils par groupe clinique montre que la majorité des patients du groupe des parodontites (9 sur 14) manifestent une capacité diminuée à synthétiser

un polypeptide de masse moléculaire égale à 46 kDa et de point isoélectrique voisin de 7,4, par rapport aux patients du groupe des gingivites et aux témoins (figure 17). De plus, chez tous les témoins, ce polypeptide P46 semble être l'un des marqueurs les plus abondants.

Lorsque les cellules sont incubées en présence de fMLP, plusieurs variations inter-individuelles sont observées, comme nous l'avons déjà décrit pour les individus témoins. Notons toutefois que la synthèse de ce même polypeptide de 46 kDa est accrue, chez les individus témoins d'une part (figure 16), mais aussi chez certains patients.

Signalons également que deux patients qui présentaient une capacité diminuée de synthèse du polypeptide de 46 kDa avant tout traitement ont retrouvé un taux normal de synthèse de ce polypeptide, alors qu'ils répondaient favorablement au traitement parodontal.

L'ensemble de ces observations nous a conduit à nous intéresser plus spécialement à ce polypeptide de 46 kDa.

Notons enfin que l'effet de l'incubation en présence d'Interféron- γ a été étudié chez certains patients. L'analyse bidimensionnelle des produits du marquage métabolique montre des différences significatives entre le profil des polynucléaires neutrophiles non stimulés et stimulés par l'Interféron- γ (figure 18). Une incubation de 20 heures en présence d'Interféron- γ induit la synthèse d'un triplet de polypeptides qui ont une masse apparente de 54 kDa ; le polypeptide majeur est le plus basique ; les deux autres polypeptides, moins importants, sont légèrement plus acides. Ces trois polypeptides ont un point isoélectrique située dans une zone de pH allant de 6,75 à 7,25. Cette observation a été reproduite pour tous les témoins analysés. Une étude cinétique a montré que si le triplet est visible à 20 heures, il n'est pas encore induit à 4 heures ou à 6 heures d'incubation.

III-3/c. Analyse électrophorétique des produits de traduction *in vitro*

La figure 19 présente les modifications induites par l'Interféron- γ dans le profil électrophorétique bidimensionnel des produits de traduction *in vitro*. Le polypeptide de 46 kDa semble être présent dans le profil des polynucléaires neutrophiles. Par contre, le polypeptide de 54 kDa est difficile à repérer.

Figure 15 : Profil électrophorétique bidimensionnel des produits de marquage métabolique de polynucléaires neutrophiles sanguins d'un témoin

L'extrait cellulaire du marquage métabolique de polynucléaires neutrophiles incubés 4 heures en absence d'activateur correspondant à 200 000 cpm est séparé selon la technique d'électrophorèse bidimensionnelle en gradient de pH préformé. La première migration selon le gradient de pH est réalisée de la gauche vers la droite du gel. La deuxième migration SDS-PAGE est réalisée du haut vers le bas du gel. Des marqueurs de poids moléculaire sont séparés en parallèle. Des valeurs de pH, mesurées dans le gel de première dimension, sont indiquées sur le haut du gel. Les polypeptides sont révélés après autoradiographie.

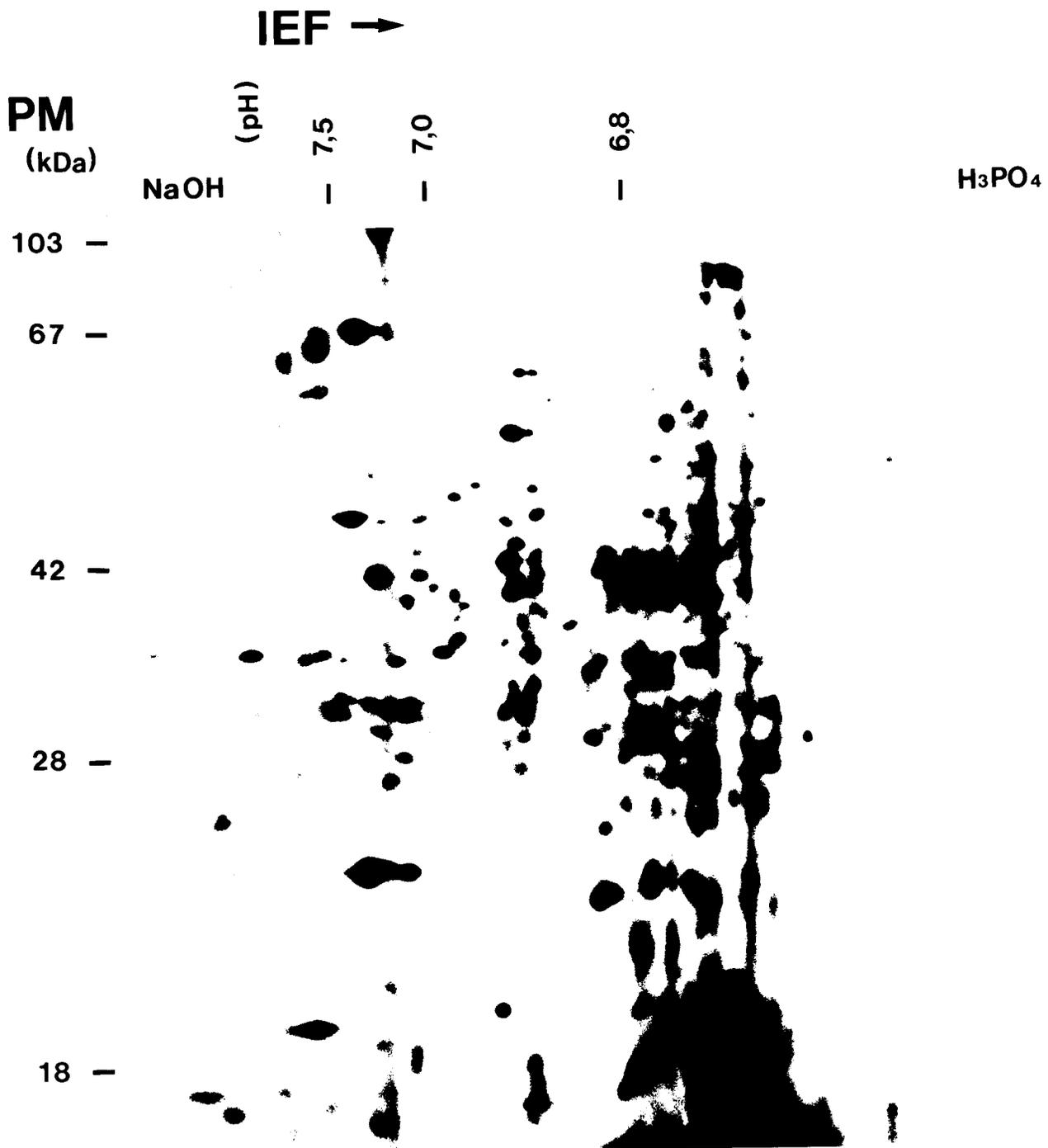
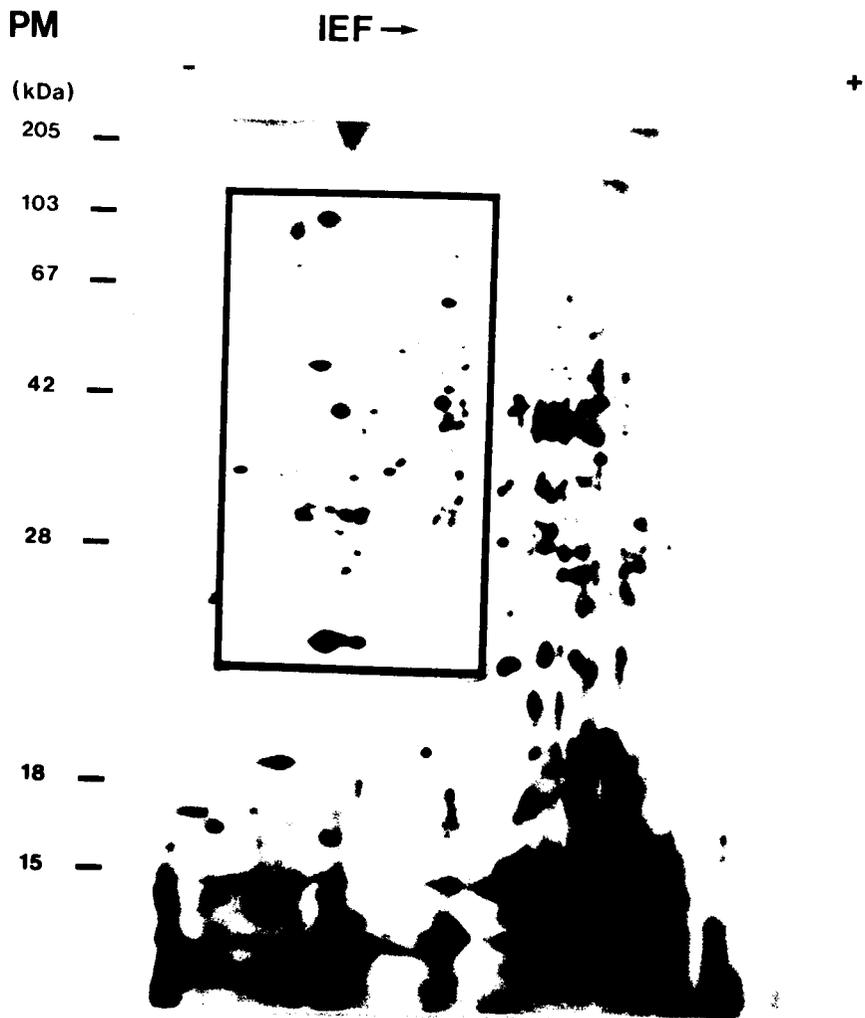


Figure 16 : Modifications induites par le fMLP sur le profil électrophorétique bidimensionnel des produits du marquage métabolique de polynucléaires neutrophiles sanguins d'un individu témoin

Les encadrés représentent une zone agrandie du profil des produits de marquage métabolique de polynucléaires neutrophiles incubés 4 heures en l'absence d'activateur (A) ou en présence de fMLP 1 μ M (B). Les flèches indiquent les modifications induites par le fMLP. Les conditions de séparation sont identiques à celles décrites pour la figure 10.



A

B

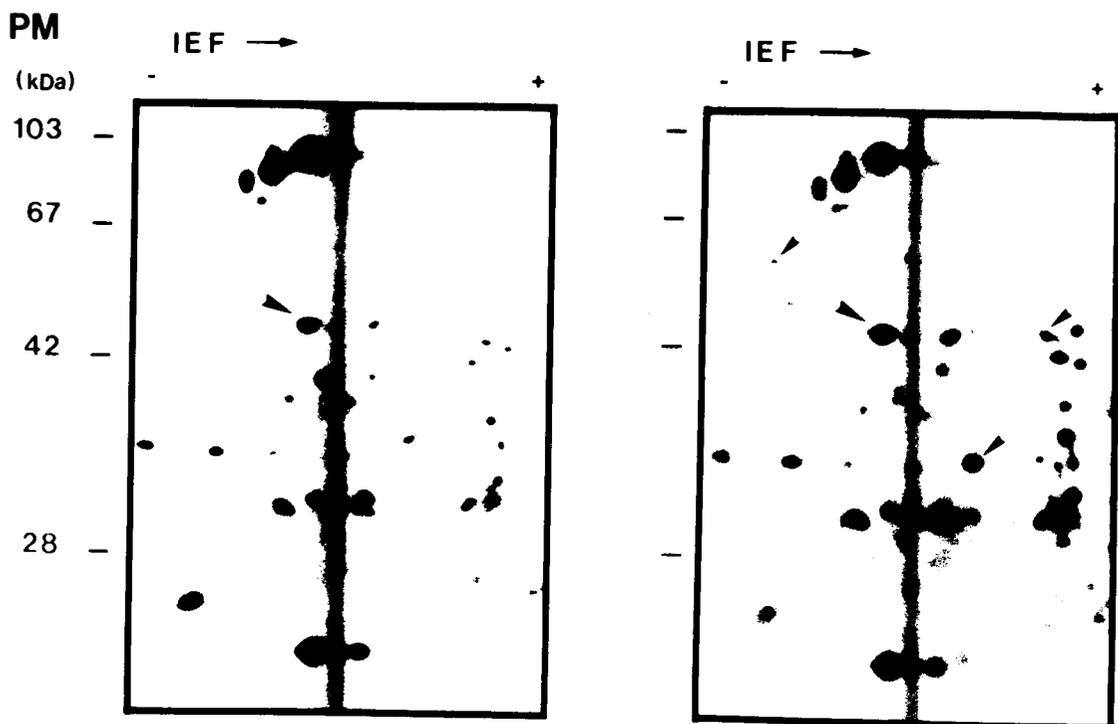


Figure 17 : Comparaison des profils électrophorétiques bidimensionnels des produits du marquage métabolique de polynucléaires neutrophiles de témoins et de patients

Les encadrés représentent une zone agrandie du profil des produits de marquage métabolique de polynucléaires neutrophiles incubé 4 heures en l'absence d'activateur isolés d'un témoin (A), d'un patient ayant une gingivite (B) et d'un patient ayant une parodontite (C). Les flèches indiquent la position du polypeptide de 46 kDa. Les conditions de séparation sont identiques à celles décrites pour la figure 10.

IEF →

PM

(k Da)

pH

7,5

7,0

6,8

—

—

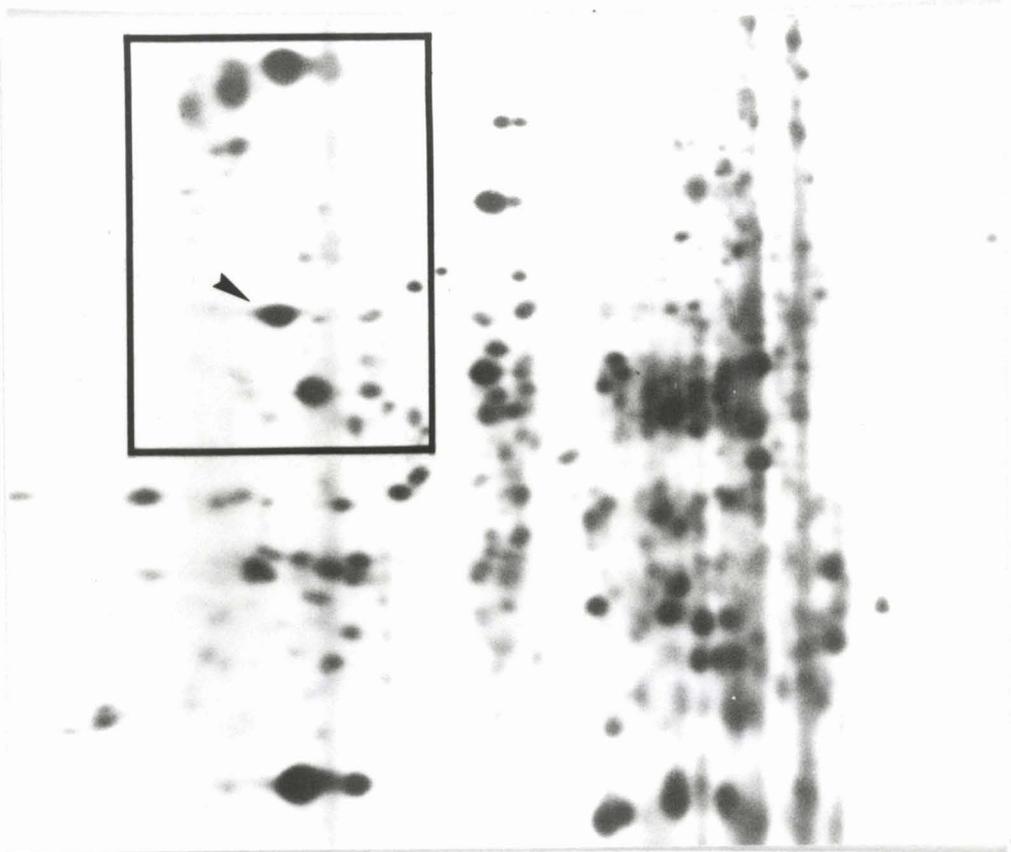
—

103 —

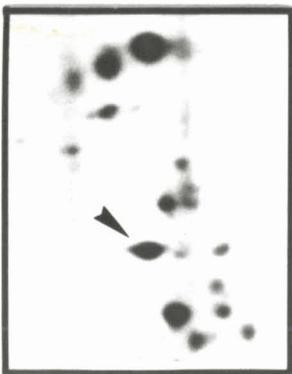
67 —

42 —

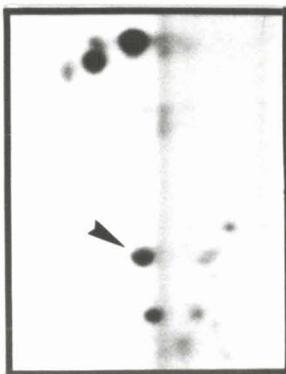
28 —



A



B



C

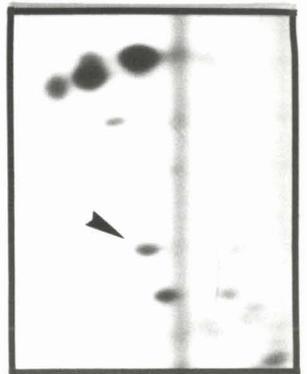


Figure 18 : Modifications induite par l'Interféron γ sur le profil électrophorétique bidimensionnel des produits du marquage métabolique de polynucléaires neutrophiles sanguins d'un individu témoin

Le gel A représente le profil des produits de marquage métabolique de polynucléaires neutrophiles incubés 20 heures en l'absence d'activateur.

Le gel B représente le profil des produits de marquage métabolique de polynucléaires neutrophiles incubés 20 heures en présence d'Interféron- γ à 500 U/ml. La flèche indique la position des polypeptides de 54 kDa dont la synthèse est induite par l'Interféron- γ .

ERRATUM :

valeurs des poids moléculaires : 100 \rightarrow 67

68 \rightarrow 42

42 \rightarrow 28

25 \rightarrow 18

18 \rightarrow 15

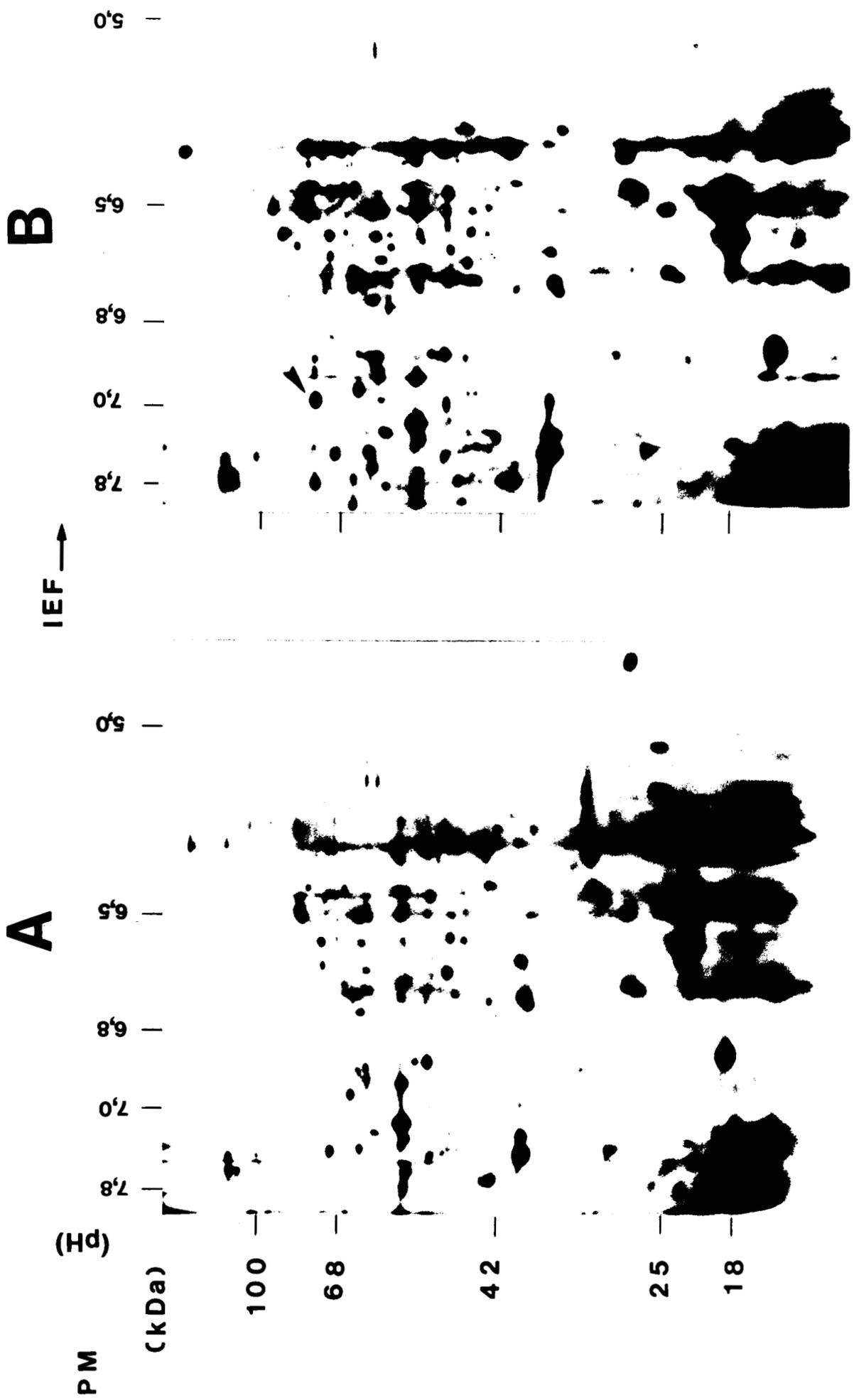




Figure 19 : Modifications induites par l'Interféron- γ sur le profil électrophorétique bidimensionnel des produits de traduction *in vitro* de polynucléaires neutrophiles témoins

Le gel A représente le profil des produits de traduction *in vitro* de polynucléaires neutrophiles incubés 20 heures en l'absence d'activateur.

Le gel B représente le profil des produits de traduction d'un polynucléaire neutrophile incubé 20 heures en présence d'Interféron- γ à 500 U/ml.

La flèche indique la position des polypeptides de 54 kDa dont la synthèse est induite par l'Interféron- γ .

A

PM

(kDa)

205 —

103 —

67 —

42 —

28 —

18 —

15 —

IEF →

+



B

+



IV. DEBUT DE CARACTERISATION DU POLYPEPTIDE P46

Dans le but de caractériser ce polypeptide de 46 kDa, nous avons entrepris de préparer des sondes anticorps polyclonales dirigées contre ce polypeptide purifié.

IV-1. Préparation de polypeptide P46 purifié

Dans un premier temps, nous avons vérifié que le polypeptide P46 identifié sur les profils des produits de marquage métabolique était visible après coloration du gel au bleu de Coomassie. Ainsi, une quantité non négligeable de polypeptide P46 a pu être préparée par électroélution des spots correspondant au P46 découpés dans des gels d'électrophorèse bidimensionnelle d'extraits totaux de PMN témoins.

La qualité du matériel électro-élué a été contrôlée par électrophorèse monodimensionnelle (Figure 20).

IV-2. Préparation de sérum polyclonal spécifique du polypeptide P46

Une partie du matériel préparé a été utilisée pour immuniser 4 souris en présence de deux adjuvants; l'Adjuvant Complet de Freund (ACF) ou le BCG, avec une première injection par voie intradermique suivie de deux rappels par voie sous-cutanée à 3 semaines et à 8 semaines.

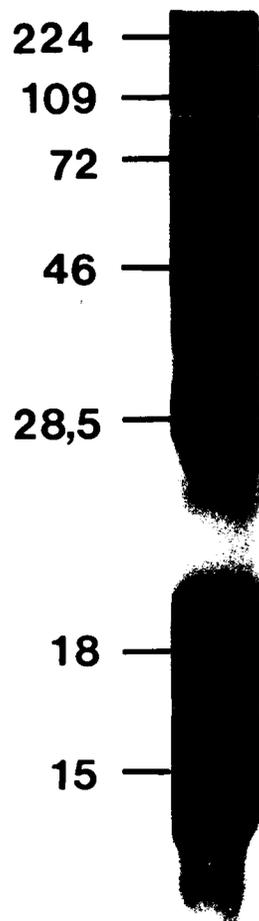
L'apparition d'anticorps dirigés contre la P46 a été suivie au cours du temps par la technique d'immunoempreinte (*Western-blot*) avec des extraits cellulaires totaux ou avec le matériel préparé par électroélution (Figure 21). Des anticorps dirigés contre le polypeptide P46 apparaissent dans le sérum des souris immunisées en présence d'ACF dès 6^{ème} semaines après la première injection et la 3^{ème} semaines après le premier rappel (Figure 21, piste C). Le sérum des souris immunisées parallèlement par l'ACF seul ne contient pas d'anticorps dirigés contre le polypeptide P46 purifié. Les animaux immunisés par la P46 en présence de BCG n'ont pas développé de réponse anticorps contre ce polypeptide.

Figure 20 : Profil électrophorétique monodimensionnel de préparations du polypeptide de 46 kDa

La piste A représente le profil électrophorétique d'un extrait total de polynucléaires neutrophiles

La piste B représente le profil d'une préparation de polypeptide de 46 kDa.

PM (kDa)



A



B



Figure 21 : Reconnaissance par western-blot du polypeptide de 46 kDa par les sérums de souris immunisées

Le polypeptide de 46 kDa a été déposé sur les pistes A, B et C. L'extrait cellulaire total de polynucléaire neutrophile a été déposé sur les pistes D, E et F. Les pistes A et D sont colorées par le Bleu de Coomassie, les pistes B et E ont été révélées par un sérum de souris immunisée avec l'ACF seul et les pistes C et F par le sérum de souris immunisées par le polypeptide de 46 kDa.

PM (kDa)

109 —

72 —

46 —

28,5 —

18 —

A

B

C

D

E

F



IV-3. Recherche de la localisation du polypeptide P46

Des expériences de marquage en cytofluorométrie de flux réalisées sur des cellules en suspension n'ont pas permis de montrer une augmentation spécifique de la fluorescence dans le sérum des souris immunisées avec le P46 purifié. On peut en déduire que l'antigène correspondant au P46 n'est pas exprimé sur la membrane de la cellule.

De plus, des expériences d'immunofluorescence sur des cellules fixées sur lames n'ont pas non plus permis de mettre en évidence une fluorescence spécifique en présence du sérum des souris immunisées par le P46. Cette observation peut s'expliquer par le fait que le site antigénique du P46 n'est pas accessible directement sur les cellules entières.



DISCUSSION

DISCUSSION

Au cours de ce travail, nous nous sommes attachés à caractériser la nature de la réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles de patients atteints de maladies parodontales. Pour cela, nous avons utilisé la technique de la mesure de la chimioluminescence produite par les polynucléaires neutrophiles, et plus particulièrement dans la cavité buccale. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à caractériser les constituants cellulaires qui interviennent dans le déroulement de la réponse fonctionnelle du polynucléaire neutrophile. Pour cela, nous avons réalisé un marquage métabolique des cellules et nous avons analysé les profils électrophorétiques bidimensionnels des produits du marquage métabolique.

I. Réponse fonctionnelle de polynucléaires neutrophiles témoins dans la cavité buccale

Nos résultats montrent que la plaque dentaire induit une augmentation de l'émission de chimioluminescence par les polynucléaires neutrophiles sanguins d'individus témoins. D'autres études ont montré que des bactéries de la plaque dentaire pouvaient induire l'émission de chimioluminescence d'une part [152], mais également la dégranulation [125] des polynucléaires neutrophiles. Nous avons également réalisé des expériences en présence de cytochalasine B et en vue de la préparation de coupes en microscopie électronique. Ces expériences montrent que l'émission de la chimioluminescence est associée à la phagocytose des bactéries de la plaque dentaire. De plus, le traitement de cette plaque dentaire par divers agents chimiques ou physiques montre que l'intégrité des constituants de la plaque dentaire est nécessaire pour avoir une induction maximale de l'émission de la chimioluminescence.

Parallèlement à la réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles sanguins, nous avons pu étudier la réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles présents dans la cavité buccale. Nous avons purifié les polynucléaires neutrophiles crévicaux et des polynucléaires neutrophiles salivaires.

Des expériences de mesure de l'émission de chimioluminescence montrent que ces deux populations de polynucléaires neutrophiles présents dans la cavité buccale sont fonctionnelles.

Ils sont capables d'émettre spontanément de la chimioluminescence à un niveau beaucoup plus élevé que les polynucléaires neutrophiles sanguins, surtout en ce qui concerne les polynucléaires neutrophiles salivaires. Cette observation tend à prouver que les polynucléaires neutrophiles buccaux sont activés. Cela peut s'expliquer par le fait qu'ils ont migré à travers les tissus jusqu'à la cavité buccale en réponse à des activateurs, soit issus de la plaque dentaire, soit produits par le système immunitaire. Or, il a déjà été montré que la diapédèse est associée à une dégranulation des granules de sécrétion. Ce dernier phénomène, associé à des mouvements membranaires, s'accompagne d'une activation partielle de la NADPH-oxydase et de la production de radicaux oxygène.

Ainsi, l'émission spontanée de chimioluminescence que nous observons pour les polynucléaires neutrophiles buccaux traduit une activation préalable de ces cellules *in vivo*. Bien que ces polynucléaires neutrophiles soient spontanément activés, ils sont encore capables de répondre à une stimulation par divers agents, avec une augmentation de l'émission de chimioluminescence tout à fait comparable à celle produite pour les polynucléaires neutrophiles sanguins.

Toutefois, ces polynucléaires neutrophiles buccaux ne sont plus capables de répondre à une stimulation par la plaque dentaire, particulièrement les polynucléaires neutrophiles salivaires. Nous venons de signaler que ces polynucléaires neutrophiles buccaux avaient déjà subi une activation *in vivo*, probablement en réponse au stimulus de la plaque dentaire. Des phénomènes de désactivation ont déjà été décrits pour les récepteurs au fLMP, en particulier le fLMP est un représentant de cette famille de substances libérées par les bactéries qui activent le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles. Dans le cas de la plaque dentaire, on peut très bien imaginer que le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles soit déclenché via des substances du type du fLMP. Ainsi une désactivation des cellules par de telles substances pourrait être envisageable. Parallèlement à l'analyse de la réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles de témoins, nous avons cherché à analyser la réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles isolés de patients.

II. Réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles des patients

Nos résultats ne montrent pas de différences significatives entre la chimioluminescence émise par les polynucléaires neutrophiles des patients et celle émise par les polynucléaires neutrophiles des témoins. Certains auteurs avancent l'hypothèse que la production de radicaux oxygène par les polynucléaires neutrophiles pourrait participer à la destruction des tissus parodontaux. Nous avons eu l'opportunité de pouvoir étudier un patient atteint de granulomatose septique chronique. Dans cette pathologie, la production de radicaux oxygène est absente puisque le système de la NADPH oxydase est complètement déficient. Bien que les polynucléaires neutrophiles de ce patient ne produisent pas de chimioluminescence et présentent donc une capacité réduite à éliminer les bactéries de la plaque dentaire, il n'a pas été possible cliniquement d'observer une atteinte sévère des tissus parodontaux. Cette observation va en faveur de l'hypothèse du rôle néfaste des métabolites de l'oxygène et la destruction des tissus parodontaux. Toutefois, nous avons montré que les polynucléaires neutrophiles des témoins isolés de la cavité buccale ont un taux basal de production de dérivés de l'oxygène élevé. On peut donc penser qu'il existe malgré tout un taux de production de radicaux oxygène compatible avec la santé parodontale. Ces premières observations montrent combien il est difficile d'analyser les déficits de la réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles qui sont présents dans la pathologie des maladies parodontales. Nous devons rappeler également que s'il existe un déficit des polynucléaires neutrophiles dans la pathologie des maladies parodontales, ce déficit n'entraîne pas, dans la très grande majorité des cas, de conséquences graves pour l'état de santé général des patients. Ceci tendrait à prouver que ce déficit ne touche pas l'une des fonctions essentielles du polynucléaire neutrophile. Afin de vérifier si l'expression de certains constituants du polynucléaire neutrophile n'était pas modifiée chez les patients atteints de maladies parodontales, nous avons analysé les profils électrophorétiques bidimensionnels d'extraits cellulaires totaux de cellules isolées de ces patients.

III. Déficit constitutif des polynucléaires neutrophiles des patients atteints de maladies parodontales

Bien que plusieurs variations inter-individuelles soient observées dans les profils électrophorétiques bidimensionnels des extraits cellulaires des polynucléaires neutrophiles, nous n'avons pas pu différencier les polynucléaires neutrophiles des patients par rapport à ceux des témoins. Ainsi, s'il existe un déficit congénital ou acquis des polynucléaires neutrophiles chez les patients, l'analyse électrophorétique d'extraits protéiques totaux n'est pas suffisante pour déceler ce déficit. De plus, nous avons travaillé sur des cellules au repos, et il se pourrait que ce déficit se manifeste dans les cellules activées. C'est pourquoi nous avons ensuite réalisé des marquages métaboliques de cellules isolées de patients et de témoins.

IV. Mesure du taux d'incorporation de méthionine radiomarquée au [³⁵S]

Nos résultats montrent qu'il est possible de mesurer un taux de synthèse protéique *de novo* dans les polynucléaires neutrophiles, aussi bien lorsque les cellules sont quiescentes que lorsqu'elles sont stimulées. Cette observation est en accord avec plusieurs études récentes et tend à confirmer le rôle d'une synthèse protéique dans le polynucléaire neutrophile dès les premiers instants de la réponse fonctionnelle. En effet, une synthèse protéique *de novo* a été mesurée directement dans le cas d'une stimulation par le fMLP [153], l'Interféron- γ [154] et le GM-CSF [27]. La synthèse d'ARN messenger a pu également être mise en évidence *in vitro* en réponse au GM-CSF [155], et *in vivo* pour des polynucléaires neutrophiles isolés de sites inflammatoires [156].

Dans les conditions d'incubation que nous avons retenues, la biosynthèse de protéines semble débiter rapidement, et elle devient quantifiable dès la deuxième heure. Le groupe des individus témoins que nous avons analysés met en évidence une grande variabilité du taux basal de marquage lorsque les cellules sont incubées en absence d'activateur. Le taux de marquage peut varier entre 100 000 et 1 000 000 cpm incorporés pour 4 heures d'incubation, et entre 400 000 et 1 800 000 cpm incorporés pour 20 heures d'incubation. Toutefois, dans la majorité

des cas (9 cas/11), le taux de marquage au bout de 4 heures est inférieur à 600 000 cpm incorporés, la moyenne étant égale à 286 000. Deux témoins présentent cependant un taux beaucoup plus élevé, d'environ 1 000 000 de cpm incorporés (tableau 12). Malgré toutes les précautions que nous avons prises pour le choix des témoins, il se peut que ces deux sujets n'étaient pas de bons témoins, le jour où nous les avons analysés, peut-être en relation avec le développement d'une réaction inflammatoire ou la présence d'une infection autre que de type parodontale. L'établissement systématique d'une numération-formule pour tous les individus analysés permettrait d'éliminer les faux témoins.

La même variabilité du taux de base du marquage métabolique est retrouvée pour le groupe des gingivites et pour le groupe des parodontites. Toutefois, la moyenne calculée pour le groupe des parodontites ($755\ 000 \pm 363\ 000$) est supérieure à celle calculée pour le groupe des gingivites ($427\ 000 \pm 192\ 000$) qui est elle même supérieure à celle calculée pour le groupe des témoins ($286\ 000 \pm 159\ 000$) (tableau 13). Notons que 10 patients sur 14 atteints de parodontites ont un taux de marquage de base supérieur à 500 000 cpm incorporés. Ainsi, si l'on admet que le taux de marquage métabolique représente un critère de l'état d'activation de la cellule, les polynucléaires neutrophiles des patients semblent être spontanément plus activés que les polynucléaires neutrophiles des témoins.

Nous savons toutefois que la nature des bactéries qui constituent la plaque dentaire est très variable, à la fois au point de vue quantitatif et qualitatif, d'un individu à l'autre et pour un même individu au cours du temps et suivant les sites parodontaux observés. Cette variabilité de la plaque dentaire peut également expliquer la variabilité observée dans le taux d'incorporation de méthionine radiomarquée. L'état d'activation spontanée des polynucléaires neutrophiles des patients pourrait être lié au caractère chronique du développement de la lésion parodontale. La stimulation prolongée du système immunitaire liée à une accumulation de plaque dentaire pourrait déclencher la libération de cytokines activatrices du métabolisme des polynucléaires neutrophiles circulants. Ainsi, le taux basal de marquage des polynucléaires neutrophiles des patients peut être rapproché de l'augmentation tardive du taux de marquage observée pour les polynucléaires neutrophiles des témoins en réponse à l'Interféron- γ (tableau 12).

Dans les différents groupes d'individus que nous avons étudiés, nous n'avons pas pu établir de corrélation directe entre le taux de marquage de base et l'importance de l'inflammation

gingivale ou la sévérité de la lésion parodontale. Le nombre d'individus analysés n'est peut-être pas suffisant, particulièrement pour le groupe des gingivites, et il serait intéressant d'affiner ces résultats en augmentant le nombre d'individus testés. Un autre paramètre intéressant à analyser serait l'évaluation de stade actif ou au repos de l'évolution de la lésion parodontale.

Globalement, le fMLP ne semble pas modifier le taux de marquage de base pour aucun des trois groupes d'individus. Mais cette observation peut être nuancée si les taux sont analysés individu par individu. Ainsi, pour le groupe des témoins, le fMLP n'induit une diminution importante du taux de marquage que pour les deux individus qui ont un taux de base très élevé (> à 800 000 cpm). Si les résultats obtenus pour ces deux sujets sont éliminés de nos calculs de moyenne, le fMLP semble augmenter le taux de marquage.

Pour le groupe des patients, lorsque le taux de base est inférieur à 700 000 (6/14), le fMLP induit toujours une augmentation du taux de marquage ; lorsque le taux de base est supérieur à 700 000 (8/14), le fMLP induit une diminution du taux de marquage pour 5 patients/8 et une augmentation pour 3 patients/8. Ainsi, une tendance à l'augmentation du taux de marquage semble également se dessiner pour les patients du groupe des parodontites.

V. Analyse des profils électrophorétiques bidimensionnels

L'analyse électrophorétique bidimensionnelle des polypeptides synthétisés *de novo* met en évidence des variations individuelles entre les différents sujets. Ces variations peuvent refléter des différences génétiques inter-individuelles spécifiques, ou bien elles peuvent traduire des variations mineures de l'état d'activation des cellules au moment du prélèvement. Cependant, les profils observés sont globalement reproductifs.

Tous les sujets du groupe des témoins synthétisent normalement un polypeptide de 46 kDa (P46), qui semble être un des composants majeurs de la cellule. Par contre, 9 patients/14 présentent une capacité diminuée à synthétiser ce polypeptide (figure 17). Si l'on essaie de relier la capacité de synthèse du polypeptide P46 au taux de marquage de base des cellules, la diminution de la capacité de synthèse de P46 semble être plus fréquente chez les patients qui ont un taux de marquage de base élevé. De plus, le fMLP induit une augmentation du taux de synthèse de P46 pour les polynucléaires neutrophiles témoins (figure 16). Cette observation

peut indiquer l'implication du polypeptide P46 dans les processus d'activation cellulaire liés au fMLP.

L'Interféron- γ ne semble pas modifier le taux de synthèse de P46 des polynucléaires neutrophiles des témoins, ni pour des temps courts d'incubation, ni pour des temps plus longs. Par contre, il induit la synthèse d'un triplet polypeptidique de 54 kDa dans les polynucléaires neutrophiles des témoins pour des temps longs d'incubation (20 heures, [figure 18](#)). Notons enfin que ce triplet de polypeptides P54 ne semble pas être synthétisé par les polynucléaires neutrophiles des patients.

VI. Début de caractérisation du polypeptide P46

Nous avons préparé un sérum polyclonal spécifique du polypeptide P46 purifié par électrophorèse bidimensionnelle. Toutefois, ce sérum ne semble pas être mono-spécifique puisqu'il réagit avec plusieurs bandes protéiques d'un extrait cellulaire total séparé par électrophorèse monodimensionnelle ([figure 21](#)). On peut imaginer que le site antigénique du P46 reconnu par le sérum est présent sur d'autres polypeptides de la cellule.

Les expériences de cytofluorométrie de flux indiquent que le polypeptide P46 n'est pas exprimé à la surface du polynucléaire neutrophile. L'absence de fixation des anticorps du sérum anti-P46 sur des cellules fixées peut s'expliquer par le fait que le site antigénique de P46 reconnu n'est pas accessible dans la cellule entière. En effet, le mode de purification du polypeptide P46 par électrophorèse est réalisé dans des conditions dénaturantes qui modifient la conformation des polypeptides.

Les expériences de purification de l'ARN total des polynucléaires neutrophiles et de traduction *in vitro* des peptides correspondants n'ont pas donné de résultats suffisamment reproductibles. Toutefois, une analyse électrophorétique bidimensionnelle des produits de traduction a pu être réalisée à partir de cellules incubées ou non en présence d'Interféron- γ ([figure 19](#)). Sur les profils obtenus, le polypeptide P46 semble pouvoir être identifié, ce qui n'est pas le cas pour le polypeptide P54. Notons que le message du polypeptide P46 semble être diminué dans le profil correspondant aux cellules incubées en présence d'Interféron- γ .

Conclusion

L'induction de la synthèse du polypeptide P46 par le fMLP pour les polynucléaires neutrophiles des témoins et la diminution transitoire de la capacité de synthèse de ce même polypeptide P46 pour les polynucléaires neutrophiles des patients, suggèrent qu'il puisse se produire une déactivation *in vivo* spécifique dans les polynucléaires neutrophiles des patients atteints de maladie parodontales. Ce polypeptide P46 pourrait également s'avérer être un bon marqueur des phases actives de ces maladies.

Le taux élevé de synthèse *de novo* pour les polynucléaires neutrophiles des patients indique que les polynucléaires neutrophiles des patients sont actifs et activés, mais il se produit une modification qualitative de leur capacité de réponse.

Le poids moléculaire de ce polypeptide P46 est proche du poids moléculaire de la protéine activatrice du système de la NADPH-oxydase. Il serait particulièrement intéressant de vérifier s'il ne s'agit pas de la même molécule, par l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine activatrice de la NADPH oxydase, ou si le P46 pourrait être un substrat de la protéine kinase C. Si tel était le cas, nous aurions un élément explicatif de la diminution de production de radicaux oxygène observée chez certains patients.

Des études récentes ont par ailleurs mis en évidence une molécule associée à la fonction chimiotactique des polynucléaires neutrophiles dans les mêmes zones de poids moléculaire. Il serait donc également intéressant de vérifier si des anticorps monoclonaux dirigés contre cette molécule ne reconnaîtraient pas le polypeptide P46.

Qu'il intervienne dans la réponse chimiotactique des polynucléaires neutrophiles ou dans l'activation du métabolisme oxydatif de ces cellules, le polypeptide P46 pourrait être impliqué dans les processus de transduction du signal d'activation et sa caractérisation pourrait fournir un élément supplémentaire dans la compréhension de ces processus.

**MATERIEL ET
METHODES**

MATERIEL ET METHODES

I. Population des individus analysés

Les patients proviennent de la clientèle privée d'un parodontologue. Ils ont tous été soumis à un interrogatoire médical complet, et à un examen clinique et radiologique. Vingt-et-un patients ont été étudiés le jour de leur première consultation, avant tout traitement contre l'inflammation gingivale ou la progression de la perte d'attache parodontale. Aucun d'entre eux n'a suivi récemment de traitement antibiotique ou anti-inflammatoire.

La population étudiée se compose de 12 femmes et 8 hommes, âgés de 19 à 60 ans. Cet échantillon est représentatif de l'ensemble de la clientèle (tableau 14).

Au point de vue clinique (tableau 14), 13 patients souffrent de parodontites infectieuses sévères (PPR pour la plupart), 2 souffrent de parodontites modérées (PCA à évolution lente) et les 6 patients restant développent une inflammation des tissus gingivaux mais ne présentent que peu de perte d'attache (gingivites).

En parallèle, des individus ne présentant pas de signes cliniques de perte d'attache ont été étudiés comme sujets témoins (tableau 14).

	<i>n</i>	<i>age</i>	<i>index gingival</i>	<i>perte d'attache</i>
<i>témoins</i>	13	29,77 (\pm 4,77)	0,95 (\pm 0,41)	3,05 (\pm 0,42)
<i>gingivites</i>	6	41,00 (\pm 10,52)	2,73 (\pm 0,74)	4,12 (\pm 1,15)
<i>parodontites</i>	14	42,47 (\pm 10,22)	2,31 (\pm 1,20)	52,30 (\pm 12,3)

Tableau 14 : Données cliniques des patients

Les résultats représentent la moyenne pour chaque groupe clinique (\pm l'écart type).

L'index gingival est attribué selon les critères définis par Loe & Silness, 1964 [157] et caractérise l'état inflammatoire de la gencive.

La perte d'attache est mesurée directement sur les radios avec la règle de Schei.

II. PREPARATION DES CELLULES

II-1. Polynucléaires neutrophiles sanguins

Les prélèvements de sang veineux sont effectués en présence de calciparine (20 unités calciparine/ml sang). Les polynucléaires neutrophiles sont préparés selon la technique décrite par Bøyum [158], qui permet de séparer les leucocytes polynucléaires des cellules mononucléées par centrifugation en gradient de densité discontinu. Le sang dilué au 1/2 en tampon PBS est déposé sur un coussin de Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Suède) (2 volumes de sang dilué pour 1 volume de Ficoll), et le tout est centrifugé à 400 x g pendant 30 min à 18°C. Les cellules mononucléées (lymphocytes et monocytes) forment un anneau au-dessus du Ficoll, alors que les hématies et les granuleux sont au-dessous dans le fond du tube (figure 1). Le culot d'hématies et de granuleux est dilué dans du plasma (recueilli dans la partie supérieure du tube) et dans du dextran 3% (1 vol de culot cellulaire + 1 vol de plasma + 2 vol de dextran). Les hématies sédimentent au fond du tube (20 min à 37°C) et le surnageant contenant les cellules polynucléées est recueilli. Les hématies restantes sont éliminées par deux chocs hypotoniques, et les cellules sont remises en suspension dans le tampon adéquat.

Le degré de pureté de la préparation est contrôlé sur une lame de cytocentrifugation colorée selon May-Grunvald-Giemsa (RAL 555, Société chimique Pointet Girard, Clichy, France). Toutes les préparations renferment moins de 5% de cellules mononucléées ou d'éosinophiles contaminants.

La viabilité des polynucléaires neutrophiles est estimée par le test de coloration au Bleu Trypan, et elle est toujours supérieure à 95%.

II-2. Polynucléaires neutrophiles crévicaux

Les polynucléaires neutrophiles crévicaux sont recueillis selon la technique de Skapski & Lehner [159], décrite par Charon et al. [125]. Le sillon gingivo-dentaire est rincé 2 ou 3 fois par 50 µl de PBS à l'aide d'une seringue Hamilton®, permettant ainsi de recueillir les polynucléaires neutrophiles exudés du tissu gingival. Plusieurs dents sont ainsi traitées, permettant le recueil d'environ 1×10^6 polynucléaires neutrophiles.

II-3. Polynucléaires neutrophiles salivaires

Le recueil des polynucléaires neutrophiles salivaires est effectué selon la technique décrite par Charon & coll. [160]. Le donneur se rince la bouche pendant 1 min à l'aide d'une solution de 10 ml de PBS. Le produit de rinçage est centrifugé à 500 x g pendant 5 min à 4°C. Les cellules ainsi recueillies (polynucléaires neutrophiles et cellules épithéliales) sont remises en suspension dans le tampon adéquat. La viabilité est contrôlée par la coloration au bleu Trypan.

III. RECUEIL DE PLAQUE DENTAIRE

La plaque supra-gingivale est prélevée à l'aide d'une curette stérile, sur les dents d'un patient n'ayant pas subi de traitement parodontal et présentant une banale gingivite en relation avec des accumulations de plaque. La plaque fraîchement prélevée est maintenue dans la glace jusqu'à son utilisation. La concentration protéique est estimée selon la méthode décrite par Bradford [161], en utilisant le microdosage Bio-Rad, et la suspension est ajustée à 80 µg de protéines/ml de tampon HBSS.

IV. ANALYSE FONCTIONNELLE

IV-1. Chimiluminescence

La technique utilisée pour mesurer la production de chimiluminescence par les polynucléaires neutrophiles est tirée de celle décrite par Descamps-Latsha & coll [162]. 100 µl d'une suspension de polynucléaires neutrophiles à $1,5 \times 10^6$ cellules/ml en HBSS sont placés dans une cuve de comptage en présence de 50 µl de luminol dilué à 0,2 mg/ml en HBSS. Les cellules sont incubées 15 min dans un bain marie sec à 37°C après avoir ajouté 10 µl de tampon HBSS ou d'une solution activatrice: PMA à 100 ng/ml final, fMLP à 10^{-6} M final, zymosan opsonisé à 1,25 mg/ml final ou plaque dentaire à 80 µg/ml. La lecture est faite au bout des 15 min d'incubation sur un chimiluminomètre (Nucléotimètre 107, Interbio, Paris) en mode intégration sur 30 sec. L'émission de lumière est exprimée en impulsions par minute (cpm). Le

PMA, le fMLP et le luminol sont obtenus chez Sigma (Saint-Louis, Missouri, U.S.A.) et sont conservés à -20°C en solution mère, solubilisés dans du DMSO à des concentrations de 1 mg/ml, 10^{-2} M et 2 mg/ml respectivement. Le zymosan opsonisé est préparé par incubation de 30 min à 37°C de particules de zymosan A (Sigma) dans un sérum humain sain ; il est utilisé à la concentration de 1 mg/ml.

IV-2. Chimiotactisme

La technique de mesure *in vitro* du chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles fut décrite par Boyden [163]. Nous avons utilisé une micro-méthode [164], avec l'emploi d'une microplaque de 48 puits (Neuro Probe, Cabinjohn, Md, USA) dans laquelle les compartiments supérieur et inférieur sont séparés par un filtre polycarbonate dont les pores ont $3\ \mu\text{m}$ de diamètre (Nucléopore Corp., Pleasanton, USA). Dans ce dispositif, l'agent chimiotactique est placé dans le compartiment inférieur et la suspension de polynucléaires neutrophiles (1×10^6 cellules/ml) dans le compartiment supérieur. L'ensemble est incubé 30 min à 37°C en atmosphère humide + 5% CO_2 . Le dispositif est ensuite démonté, le filtre est raclé du côté du compartiment supérieur, fixé et coloré par le colorant de Giemsa.

Le nombre de polynucléaires neutrophiles ayant migré à travers le filtre est déterminé par comptage au microscope de 4 champs par puits.

V. ANALYSE DES PROTEINES CELLULAIRES

V-1. Préparation des extraits cellulaires

Les cellules sont lavées une fois dans le tampon de lyse (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl_2 , 146 mM NaCl et 1 mM PMSF comme inhibiteur de protéases). Puis les polynucléaires neutrophiles sont remis en suspension à 20×10^6 cellules/ml dans ce même tampon de lyse et sont incubés 10 min à 4°C en présence de 0,5% (p/v) de NP-40. Les fragments de membrane cytoplasmique et de noyaux sont culotés par centrifugation à $1000 \times g$ pendant 10 min à 4°C , et le surnageant est recueilli et conservé à -20°C .

La concentration protéique de chaque extrait est estimée selon la méthode décrite par Bradford [161], en utilisant le microdosage Bio-Rad.

V-2. Electrophorèse monodimensionnelle

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (**SDS-PAGE**) est effectuée dans les conditions décrites par Laemmli [165], en utilisant des gels de 1,5 mm d'épaisseur (14 x 16 cm). L'échantillon à analyser est dilué au 1/2 dans le tampon échantillon 1 (125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 6% SDS, 20% (p/v) sucrose, 10% β -mercaptoéthanol, 0,1% (p/v) de bleu de bromophénol). Les protéines sont concentrées dans un gel de polyacrylamide à 5%, puis elles sont séparées dans un gel homogène à 13%. L'acrylamide et la bis-acrylamide proviennent de chez Serva (Heidelberg, R.D.A.) et le SDS de chez Sigma (Saint-Louis, Missouri, U.S.A.).

V-3. Electrophorèse bidimensionnelle

La technique de séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle a été décrite par O'Farrell [166]. Au cours de la première dimension, les protéines sont séparées en fonction de leur point isoélectrique (P_i) dans un gel d'acrylamide-urée dans lequel un gradient de pH a été préformé (focalisation isoélectrique ou **IEF**), puis au cours de la deuxième dimension, elles sont séparées en fonction de leur poids moléculaire (**PM**) dans un gel de polyacrylamide-SDS.

Nous avons utilisé ici une méthode modifiée décrite par Garrells [167]. Les échantillons à analyser sont traités par la RNase (0,05 mg/ml) et la DNase (0,1 mg/ml) dans un tampon Tris en présence de 0,3% de SDS et 1% de β -mercaptoéthanol, lyophilisés et remis en solution dans le tampon échantillon 2 (10 M urée, 4% (p/v) NP-40, 5% Ampholines, 100 mM DTT). La focalisation isoélectrique est réalisée dans des tubes capillaires de diamètre 1,3 mm avec un gradient d'ampholines 3.5-10 (LKB-Pharmacia, Suède). Le gel de première dimension est déposé directement sur le gel de deuxième dimension d'acrylamide 13%. L'urée ultrapure est un produit BRL-Gibco (Angleterre).

V-4. Coloration par le bleu de Coomassie

Les gels sont colorés pendant 2 h sous agitation dans une solution de bleu brillant de Coomassie (0,85% (p/v) de bleu de Coomassie, 45% (v/v) méthanol, 10% (v/v) acide acétique,

45% (v/v) eau), puis sont décolorés par bains successifs dans une solution 20% méthanol, 8% acide acétique.

V-5. Coloration par le nitrate d'argent

Les gels sont colorés par le nitrate d'argent après fixation par la glutaraldéhyde et réduction par le dithiothréitol selon la méthode décrite par Morrissey [168].

VI. EXTRACTION DE L'ARN TOTAL DE LA CELLULE

L'ARN cellulaire total est préparé selon la technique décrite par Chirgwin [169]. Les polynucléaires neutrophiles fraîchement préparés sont centrifugés et remis en suspension dans une solution de guanidium (4 M guanidium thiocyanate, 1 mM EDTA pH 8, 5 mM acétate de sodium pH 5.5, 5% β mercapto éthanol, 2% sarkosyl). Le lysat obtenu est homogénéisé avec la pipette et l'ADN est fragmenté par sonication. Environ 8 ml de lysat contenant l'équivalent de 100×10^6 cellules sont déposés sur un coussin de 2,5 ml de chlorure de césium (5,82 M chlorure de césium, 10 mM EDTA (pH 8), 2,5 mM acétate de sodium (pH 5,5)) dans un tube Beckman polyallomer. Les tubes sont ultracentrifugés à 28 000 tpm pendant 20 hr à 20°C, avec un rotor SW 41 dans une ultracentrifugeuse Beckman L8-M. La pastille d'ARN au fond du tube est remise en suspension dans 2 x 100 μ l d'eau, et l'ARN est précipité pendant 18 h à -20°C en présence de 75% d'éthanol et de 50 mM d'acétate de sodium (pH 5,5). L'éthanol est évaporé par aspiration sous vide et l'ARN est remis en solution dans de l'eau. La concentration en ARN est déterminée par lecture de la DO d'une fraction aliquote de la solution à 260 et 280 nm de longueur d'onde. L'ARN est conservé dans une solution 70% éthanol à -20°C. Le guanidium thiocyanate et le chlorure de césium proviennent de chez BRL-Gibco (Angleterre).

VII. PREPARATION D'EXTRAITS RADIOMARQUES

VII-1. Marquage métabolique

Les polynucléaires neutrophiles sont mis en solution à 5×10^6 cellules/ml en tampon MEM déplété en Méthionine. Ils sont incubés 4 hr à 37°C avec 150 μCi / ml de [^{35}S] Met (Amersham, Grande-Bretagne), en présence ou en absence de fMLP à 10^{-6} M. Le surnageant de culture est recueilli et conservé à -20°C. Les cellules sont lysées par incubation 10 min à 4°C dans le tampon de lyse en présence de 0,5% (p/v) de NP-40. Les fragments membranaires sont culotés par centrifugation à 1 000 x g pendant 5 min, le lysat est prélevé et conservé à -20°C.

Le taux d'incorporation de [^{35}S] Met est mesuré dans le surnageant et dans le lysat sur une fraction aliquote par TCA-précipitation des protéines. 10 μl de lysat ou 100 μl de surnageant dilués dans 500 μl d' H_2O sont pré-incubés 15 min à 37°C en présence de 0,3 N NaOH et de 0,068% (v/v) d' H_2O_2 , avant le traitement 30 min à 4°C par 12,5% (v/v) de TCA. Le matériel précipitable est recueilli par filtration sur papier Watman GF/C. Le filtre est lavé par du TCA 8% puis par de l'eau; il est ensuite déposé dans une fiole de comptage et recouvert par 4 ml d'Aqualyte (Becker Chemicals, Holland). La radioactivité retenue sur le filtre est comptée dans un compteur β à scintillation liquide LKB.

VII-2. Synthèse *in vitro* de polypeptides en lysat de réticulocyte de lapin

Le protocole suivi est celui indiqué par le fournisseur (Amersham, Grande-Bretagne). 2,6 μl d'une solution d'ARN à 3 mg/ml sont incubés 2 h à 30°C en présence de 21 μl de lysat de réticulocytes de lapin, de 3,72 μl de [^{35}S] Met, de 1,5 μl de mélange d'acides aminés sans Met et de 1 μl d'eau. Les produits synthétisés sont conservés à -20°C.

VII-3. Analyse électrophorétique des produits radiomarqués

Pour l'analyse monodimensionnelle, le volume d'échantillon déposé est déterminé pour avoir entre 15 000 et 20 000 cpm incorporés/puits. Pour l'analyse bidimensionnelle, il faut déposer entre 150 000 à 200 000 cpm incorporés/gel. Le traitement des échantillons est identique à celui décrit précédemment. La radioactivité contenue dans les gels est fixée et amplifiée dans une solution à 10% (p/p) de PPO dans du DMSO, puis les gels sont séchés et exposés en autoradiographie à -70°C pendant 2 à 3 semaines en contact avec des films Kodak X-Omat AR.

VIII. FRACTIONNEMENT DES PROTEINES CELLULAIRES

$2\ 500 \times 10^6$ cellules ont été préparées à partir de prélèvements effectués au C.R.T.S. et lysées selon le protocole décrit. Le lysat est dialysé et concentré par passage sur membrane de Centricon[®], puis préparé pour l'électrophorèse bidimensionnelle (traitement à la RNase et à la DNase, lyophilisation et dissolution dans le tampon échantillon). L'équivalent de 10 à 20×10^6 cellules est déposé sur un gel de première dimension. Après la migration en gradient de pH préformé, le gel est découpé à 4 cm du côté de la soude (zone dans laquelle se situent les polypeptides qui nous intéressent), et trois fragments ainsi découpés sont déposés sur le gel de deuxième dimension. Après migration, les gels sont colorés au bleu de Coomassie. Les spots correspondant aux polypeptides qui nous intéressent sont découpés et conservés à -20°C .

Les polypeptides sont ensuite électroélus des morceaux d'acrylamide par électrophorèse inversée : les morceaux de gels d'acrylamide découpés sont placés dans un puits profond formé dans un gel support d'acrylamide 13% et sont recouverts de tampon glycérol (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 40% (v/v) glycérol et 0,1% (p/v) SDS) jusqu'aux 2/3 du puits, et d'une solution 2 M NaCl dans le 1/3 supérieur du puits. L'élution est réalisée sous un voltage constant de 80 V pendant 5 h. Les protéines éluées s'accumulent à l'interface entre le tampon glycérol et la

solution de NaCl. Elles sont recueillies par aspiration douce à l'aide d'une pipette Pasteur, dialysées contre de l'eau bi-distillée puis concentrées.

La qualité du matériel électroélué est contrôlée par électrophorèse monodimensionnelle.

IX. PRODUCTION DE SERUMS POLYCLONAUX

Une partie du matériel préparé par électroélution a été utilisée pour l'immunisation de 4 souris en présence de 2 adjuvants, l'adjuvant complet de Freund (ACF) et le BCG, avec 1 injection principale par voie intra-dermique et 2 rappels par voie sous-cutanée à 3 semaines et à 8 semaines. L'apparition d'immunoglobulines dirigées contre les peptides injectées a été suivie au cours du temps par immunotransfert ou "western-blot" sur le matériel préparé par électroélution et sur des extraits cellulaires totaux.

X. "WESTERN-BLOT" ou TRANSFERT ELECTROPHORETIQUE DE PROTEINES SUR UNE FEUILLE DE NITROCELLULOSE

Le transfert a été réalisé dans les conditions expérimentales décrites par Towbin & coll. [170]. Les protéines sont d'abord séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide, puis le gel est mis en contact avec une feuille de nitrocellulose et l'ensemble est monté en "sandwich" dans la cuve de transfert remplie de tampon de transfert (20 mM Tris, 150 mM glycine, 20% (v/v) méthanol). L'électrotransfert est réalisé en appliquant un courant de 100 mA pendant 2 h à température ambiante.

Après le transfert, la feuille de nitrocellulose est saturée par de la BSA à 5% en solution dans le tampon d'incubation (10 mM Tris-HCl (pH 8), 146 mM NaCl). Après 3 lavages successifs, la nitrocellulose est incubée 2 hr à température ambiante avec les sera des souris dilués au 1/20^e dans le même tampon d'incubation additionné de 0,5% de NP-40, puis elle est de nouveau lavée dans ce même tampon. Ensuite, la nitrocellulose est incubée 2 h en présence d'anti-IgG de souris biotinylés (Amersham, Grande-Bretagne) dilués au 1/1000^e dans le tampon d'incubation sans NP-40, puis 15 min en présence de complexes Streptavidine-peroxydase (Amersham)

dilués également au 1/1000^e dans le même tampon. Les complexes immuns ainsi constitués sont révélés par un mélange de 0,06% (p/v) de 4-Chloro-1-Naphtol et de 0,3% (v/v) d'H₂O₂ en solution dans un tampon 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 146 mM NaCl.

XI. IMMUNOFLUORESCENCE

XI-1. Immunofluorescence sur lame

Une goutte de suspension cellulaire contenant environ 100 000 polynucléaires neutrophiles est déposée sur une lame de microscopie. Les cellules sont fixées dans l'acétone et les lames peuvent être conservées à -20°C. Une goutte de sérum de souris dilué au 1/20^e dans du HBSS est déposée sur les cellules fixées sur la lame et la lame est maintenue 1 h à T° ambiante. Après lavage, les cellules sont mises en contact pendant 30 min avec une solution de F(ab')₂ d'IgG de mouton dirigée contre les IgG de souris et marquée à la fluorescéine. Après lavage les cellules sont contre-colorées au Bleu d'Evans. L'observation de la fluorescence s'effectue au microscope.

XI-2. Cyto-fluorométrie

100 µl de suspension à 10 x 10⁶ cell./ml HBSS sont incubés 1 h à 4°C en présence du sérum de souris dilué au 1/20^e. Après lavage, les cellules sont incubées 30 min à 4°C en présence d'un fragment F(ab')₂ d'IgG de mouton dirigé contre les IgG de souris et marqué à la fluorescéine (Cooper Biomedical, Malvern, USA). Après lavage, la proportion des cellules fluorescentes est déterminée à l'aide d'un cytofluoromètre préalablement calibré (Cytofluorograf 2103 ORTHO Instruments, Westwood, USA). Le bruit de fond dû à la fixation non spécifique du composé fluorescent est évalué en incubant la suspension cellulaire avec le composé fluorescent seul.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Ehrlich P. & Lazarus E. (1898) *Die Anaemie. Wein*, 8, 49.
- 2 Metchnikoff E. (1905) in *Immunity in infective diseases*, pp. 450-451, Cambridge University Press, Cambridge, England.
- 3 Malech H.L. & Gallin J.I. (1987) Neutrophils in human diseases. *N. Eng. J. Med.* 317, 687.
- 4 Sieff C.A. (1987) Hematopoietic growth factors. *J. Clin. Invest.* 79, 1549.
- 5 Rennick D., Jackson J., Yang G., Wideman J., Lee F. & Hudac S. (1989) Interleukin-6 interacts with interleukin-4 and other hematopoietic growth factors to selectively enhance the growth of megacaryocytic, erythroid, myeloid, and multipotential progenitor cells. *Blood* 73, 1828.
- 6 McNiece I., Andrews R., Stewart M., Clark S., Boone T. & Quesenberry P. (1989) Action of interleukin-3, G-CSF, and GM-CSF on highly enriched human hematopoietic progenitor cells: synergistic interaction of GM-CSF plus G-CSF. *Blood* 74, 110.
- 7 Lindemann A., Riedel D., Oster W., Meuer S.C., Blohm D., Mertelsmann R.H. & Herrmann F. (1988) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.* 140, 837.
- 8 Lindemann A., Riedel D., Oster W., Ziegler-Heitbrock L., Mertelsmann R. & Herrmann F. (1989) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces cytokine secretion by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.* 83, 1308.
- 9 Bainton D.F., Ulliot J.L. & Farquhar M.G. (1971) The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. Origin and content of azurophil and specific granules. *J. Exp. Med.* 134, 907.
- 10 Dewald B., Bretz U. & Baggiolini M. (1982) Release of gelatinase from a novel secretory compartment of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 70, 518.
- 11 Borregaard N., Miller L.J. & Springer T.A. (1987) Chemoattractant-regulated mobilization of a novel intracellular compartment in human neutrophils. *Science* 237, 1204.
- 12 Williams L.T., Snyderman R., Pike M.C. & Lefrowitz R.J. (1977) Specific receptor sites for chemotactic peptides on human polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1204.
- 13 Marasco W.A., Phan S.H., Krutzsch H., Showell H.J., Feltner D.E., Nairn R., Becker E.L. & Ward P.A. (1984) Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 259, 5430.

- 14 **Koo C., Lefkowitz R.J. & Snyderman R. (1982)** The oligopeptide chemotactic factor receptor on human polymorphonuclear leukocyte membranes exists in two affinity states. *biochem. Biophys. Res. Commun.* **106**, 442.
- 15 **Koo C., Lefkowitz R.J. & Snyderman R. (1984)** Guanine nucleotides modulate the binding affinity of the oligopeptide chemoattractant receptor on human polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.* **72**, 748.
- 16 **Fletcher M.P., Seligmann B.E. & Gallin J.I. (1982)** Correlation of human neutrophil secretion, chemoattractant receptor mobilization, and enhanced functional capacity. *J. Immunol.* **128**, 941.
- 17 **Gallin J.I. & Seligman B.E. (1984)** Neutrophil chemoattractant fMet-Leu-Phe receptor expression and ionic events following activation. in *Regulation of leukocyte function*, Contemporary topics in immunobiology, vol 14, R. Snyderman Ed., Plenum-Press, New-York and London. Chapitre 3, p 83.
- 18 **Huang C.-K. (1987)** Partial purification and characterization of formylpeptide receptor from rabbit peritoneal neutrophils. *J. Leukocyte. Biol.* **41**, 63.
- 19 **Chenoweth D.E. & Hugli T.E. (1978)** Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3943.
- 20 **Goldman D.W. & Goetzl E.J. (1982)** Specific binding of leukotriene B₄ to receptors on human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* **129**, 1600.
- 21 **Goldman D.W. & Goetzl E.J. (1984)** Heterogeneity of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B₄. *J. Exp. Med.* **159**, 1027.
- 22 **Goldman D.W., Gifford L.A., Marotti T., Koo C.H. & Goetzl E.J. (1987)** Molecular and cellular properties of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B₄. *Fed. Proc.* **46**, 200.
- 23 **Naccache P.H., Molski M.M., Volpi M., Shefcyk J., Molski T.F.P., Loew L., Becker E.L. & Sha'afi R.I. (1986)** Biochemical events associated with the stimulation of rabbit neutrophils by platelet-activating factor. *J. Leukocyte Biol.* **40**, 533.
- 24 **Gay J.C., Beckman J.K., Zaboy K.A. & Lukens J.N. (1986)** Modulation of neutrophil oxidative responses to soluble stimuli by platelet-activating factor. *Blood* **67**, 931.
- 25 **Paganelli Parker K., Benjamin W.R., Kaffka K.L. & Killian P.L. (1989)** Hematopoietic growth factors. *J. Immunol.* **142**, 537.
- 26 **Arnaout M.A., Wang E.A., Clark S.C. & Sieff C.A. (1986)** Human recombinant GM-CSF increases cell to cell adhesion and surface expression of adhesion-promoting surface proteins on mature neutrophils. *J. Clin. Invest.* **78**, 597.
- 27 **Edwards S.W., Holden C.S., Humphreys J.M. & Hart C.A. (1989)** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) primes the respiratory burst and stimulates protein biosynthesis in human neutrophils. *FEBS Letters* **256**, 62.

- 28 Weisbart R.H., Golde D.W., Clark S.C., Wong G.G. & Gasson J.C. (1985) Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a neutrophil activator. *Nature* 314, 361.
- 29 Lopez A., Williamson J., Gamble J., Begley G., Harlan J., Klebanoff S., Waltersdorff A., Wong G.G., Clark S.C. & Vadas M. (1986) Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression and survival. *J. Clin. Invest.* 78, 1986.
- 30 DiPersio J., Billing P., Kaufman S., Egtesday P., Williams R.E. & Gasson J.G. (1988) Characterization of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor. *J. Biol. Chem.* 263, 1834.
- 31 Sanchez-Madrid F., Nagy J.A., Robbins E., Simon P. & Springer T.A. (1983) A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha subunits and a common beta subunit: the lymphocyte-function associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the P150,95 molecule. *J. Exp. Med.* 158, 1785.
- 32 Hickstein D.D., Hickey M.J., Ozols J., Baker D., Back A.L. & Roth G.J. (1989) cDNA sequence for the α M subunit of the human neutrophil adherence receptor indicates homology to integrin α subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 257.
- 33 Smith C.W., Marlin S.D., Rothlein R., Toman C. & Anderson D.C. (1989) Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J. Clin. Invest.* 83, 2008.
- 34 Bainton D.F., Miller L.J., Kishimoto T.K. & Springer T.A. (1987) Leukocyte adhesion receptors are stored in peroxidase-negative granules of human neutrophils. *J. Exp. Med.* 166, 1641.
- 35 Graham I.L., Gresham H.D. & Brown E.J. (1989) An immobile subset of plasma membrane CD11b/CD18 (Mac-1) is involved in phagocytosis of targets recognized by multiple receptors. *J. Immunol.* 142, 2352.
- 36 Dana N., Clayton L.K., Tennen D.G., Pierce M.W., Lachmann P.J., Law S.A. & Arnaout M.A. (1987) Leukocytes from four patients with complete or partial Leu-CAM deficiency contain the common β -subunit precursor and β -subunit messenger RNA. *J. Clin. Invest.* 79, 1010.
- 37 Styrt B. (1989) History and implications of the neutrophil glycoprotein deficiency. *Am. J. Hematol.* 31, 288.
- 38 Huizinga T.W., Van Kemenade F., Koenderman L., Dolman K.M., Von Dem Borne A., Tetteroo P. & Roos D. (1989) The 40-kDa Fc γ receptor (FcRII) on human neutrophils is essential for the IgG-induced respiratory burst and IgG-induced phagocytosis. *J. Immunol.* 142, 2365.
- 39 Perussia B., Dayton E.T., Lazarus R., Fanning V. & Trinchieri G. (1983) Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. *J. Exp. Med.* 158, 1092.
- 40 Huizinga T.W.J., Kerst M., Nuyens J.H., Vlug A., Von Dem Borne A., Roos D. & Tetteroo A.T. (1989) Binding characteristics of dimeric IgG subclass complexes to human neutrophils. *J. Immunol.* 142, 2359.

- 41 **Kimberly R.P., Tappe N.J., Merriam L.T., Redecha P.B., Edberg J.C., Schwatzmam S. & Valinsky J.E.** (1989) Carbohydrates on human Fc γ receptors. *J. Immunol.* **142**, 3923.
- 42 **Ory P.A., Goldstein I.M., Kwoh E.E & Clarkson S.B.** (1989) Characterisation of polymorphic forms of Fc receptor III on human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **83**, 1676.
- 43 **Ravetch J.V. & Perussia B.** (1989) Alternative membrane forms of Fc γ RIII (CD 16) on human natural killer cells and neutrophils. *J. Exp. Med.* **170**, 481.
- 44 **Simmons D. & Seed B.** (1988) The Fc γ receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein. *Nature.* **333**, 568.
- 45 **Peltz G.A., Grundy H.O., Lebo R.V., Yssel H., Barsh G.S. & Moore K.W.** (1989) Human Fc γ RIII : cloning, expression, and identification of the chromosomal locus of two Fc receptors for IgG. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1013.
- 46 **Dykman T.R., Hatch J.A. & Atkinson J.P.** (1984) Polymorphism of the human C3b/C4b receptor. *J. Exp. Med.* **159**, 691.
- 47 **Gigli I. & Nelson R.A.** (1968) Complement-dependent immune phagocytosis I. Requirements for C'1, C'4, C'2 and C'3. *Exp. Cell. Res.* **51**, 45.
- 48 **Changelian P.S., Jack R.M., Collins L.A. & Fearon D.T.** (1985) PMA induces the ligant-independent internalization of CR1 on human neutrophils. *J. Immunol.* **134**, 1851.
- 49 **Malbran A., Siwik S., Frank M.M. & Fries L.F.** (1988) CR1-receptor recycling in phorbol ester-activated polymorphonuclear leukocytes. *Immunology* **63**, 325.
- 50 **Yoshimura T.K., Matsushima K., Oppenheim J.J. & Leonard E.J.** (1987) Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS) stimulated human blood mononuclear leukocytes : partial characterization and separation from interleukin-1 (IL1). *J. Immunol.* **139**, 788.
- 51 **Yoshimura T.K., Matsushima S., Tanaka S., Robinson E.A., Appella E., Oppenheim J.J. & Leonard E.J.** (1987) Purification of a human monocyte derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 9233.
- 52 **Matsushima K., Morishita K., Yoshimura T., Lavu S., Kobayashi Y., Lew W., Appella E., Kung H-F., Leonard E.J. & Oppenheim J.J.** (1988) Molecular cloning of a human monocyte derived-chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **167**, 1883.
- 53 **Pevery P., Waltz A., Dewald B. & Baggiolini M.** (1988) A novel neutrophil activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* **167**, 1547.
- 54 **Samanta A.K., Oppenheim J.J. & Matsushima K.** (1989) Identification and characterization of specific receptors for monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) on human neutrophils. *J. Exp. Med.* **169**, 1185.

- 55 **Davis B.H., Walter R.J., Pearson C.B., Becker E.L. & Oliver J.M.** (1982) Membrane activity and topography of F-Met-Leu-Phe-treated polymorphonuclear leukocytes. Acute and sustained responses to chemotactic peptide. *Am. J. Pathol.* **108**, 206.
- 56 **Borregaard N.** (1988) The human neutrophil. Function and dysfunction. *Eur. J. Haematol.* **41**, 401.
- 57 **Spiegel A.M.** (1987) Signal transduction by guanine nucleotide binding proteins. *Mol. Cell. Endocrinol.* **49**, 1.
- 58 **Gierschik P., Falloon J., Milligan G., Pines M., Gallin J.I. & Spiegel A.** (1986) Immunochemical evidence for a novel pertussis toxin substrate in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **261**, 8058.
- 59 **Dickey B.F., Pyun H.Y., Williamson K.C. & Navarro J.** (1987) Identification and purification of a novel G protein from neutrophils. *FEBS Letters* **219**, 289.
- 60 **Cockcroft S. & Gomperts B.D.** (1985) Role of guanine nucleotide binding protein in the activation of polyphosphoinositide phosphodiesterase. *Nature* **314**, 534.
- 61 **Lad P.M., Olson C.V., Grewa I.S. & Scott S.J.** (1985) A pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein in the human neutrophil regulates multiple receptors, calcium mobilization, and lectin-induced capping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 8643.
- 62 **Cockcroft S.** (1986) The dependence on Ca^{2+} of the guanine nucleotide-activated polyphosphoinositide phosphodiesterase in neutrophil plasma membrane. *Biochem. J.* **240**, 503.
- 63 **Cockcroft S., Bennet J.P. & Gomperts B.D.** (1980) Stimulus-secretion coupling in rabbit neutrophil is not mediated by phosphatidylinositol breakdown. *Nature* **288**, 275.
- 64 **Parker P.J., Coussens L., Totty N., Rhee L., Young S., Chen E., Stabel S., Waterfield M.D. & Ullrich A.** (1986) The complete primary structure of protein kinase C-the major phorbol ester receptor. *Science* **233**, 853.
- 65 **Nishihira J. & O'Flaherty J.T.** (1985) Phorbol myristate acetate receptors in human polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.* **135**, 3439.
- 66 **Parker P.J., Coussens L., Totty N., Rhee L., Young S., Chen E., Stabel S., Waterfield M.D. & Ullrich A.** (1986) The complete primary structure of protein kinase C-the major phorbol ester receptor. *Science* **233**, 853.
- 67 **Lew P.D., Monod A., Krause K.H., Waldvogel F.A., Biden T.J. & Schlegel W.** (1986) The role of cytosolic free calcium in the generation of inositol 1,4,5-triphosphate and inositol 1,3,4-triphosphate in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* **261**, 13121.
- 68 **Burgess G.M., McKinney J.S., Irvine R.F. & Putney J.J.W.** (1985) Inositol 1,4,5-triphosphate and inositol 1,3,4-triphosphate formation in Ca^{2+} -mobilizing-hormone-activated cells. *Biochem. J.* **232**, 237.

- 69 **Di Virgilio F., Treves S., Lew D. & Pozzan T.** (1989) Role of calcium in neutrophil activation. in *The neutrophil cellular biochemistry and physiology*, M.B. Hallet Ed, CRC Press, New-York. Chapitre 8, p199.
- 70 **Coles R.B., Ranney R.R., Freer R.J. & Carchman R.A.** (1989) Thermal regulation of FMLP receptors on human neutrophils. *J. Leukocyte Biol.* **45**, 529.
- 71 **Baldrige C.W. & Gerard R.W.** (1933) The extra respiration of phagocytosis. *Am. J. Physiol.* **103**, 235.
- 72 **Curnutte J.T., Kuver R. & Scott P.J.** (1987) Activation of neutrophil NADPH oxidase in a cell free system. Partial purification of components and characterization of the activation process. *J. Biol. Chem.* **262**, 5563.
- 73 **Parkos C.A., Allen R.A., Cochrane C.G. & Jesaitis A.J.** (1987) Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *J. Clin. Invest.* **80**, 732.
- 74 **Dinauer M., Orkin S.H., Brown R., Jesaitis A.J. & Parkos C.A.** (1987) The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature* **327**, 717.
- 75 **Glass G.A., DeLisle D.M., DeTogni P.D. Gabig T.G., Magee B.H., Marker M. & Barbior B.M.** (1986) The respiratory burst of human neutrophils. Further studies of the purified enzyme. *J. Biol. Chem.* **261**, 13247.
- 76 **Segal A.W., Heyworth P.G., Cockcroft S. & Barrowman M.M.** (1985) Stimulated neutrophils from patients with autosomal recessive chronic granulomatous disease fail to phosphorylate a Mr-44,000 protein. *Nature* **316**, 547.
- 77 **Hayakawa T., Suzuki K., Suzuki S. Andrews P.C. & Barbior B.M.** (1986) A possible role for protein phosphorylation in the activation of the respiratory burst in human neutrophils. Evidence from studies with cells from patients with chronic granulomatous disease. *J. Biol. Chem.* **261**, 9109.
- 78 **Tauber A.I.** (1987) Protein kinase C and the activation of the human NADPH oxidase. *Blood* **69**, 711.
- 79 **Nauseef W.M., Olsson I. & Arnljots K.** (1988) Biosynthesis and processing of myeloperoxidase - a marker for myeloid cell differentiation. *Eur. J. Haematol.* **40**, 97.
- 80 **Kleybanoff S.J.** (1980) Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann. Intern. Med.* **93**, 480.
- 81 **Weiss J., Elsbach P., Olsson I. & Odeberg H.** (1978) Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* **253**, 2664.
- 82 **Weiss J. & Olsson I.** (1987) Cellular and subcellular localization of the bactericidal/permeability-increasing protein of neutrophils. *Blood* **69**, 652.

- 83 Ganz T., Selsted M.E., Szklarek D, Harwig S.S.L., Daher K., Bainton D.F. & Lehrer R.I. (1985) Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **76**, 1427.
- 84 Selsted M.E., Harwig S.S.L., Ganz T., Schilling J.W. & Lehrer R.I. (1985) Primary structures of three human neutrophil defensins. *J. Clin. Invest.* **76**, 1436.
- 85 Gabay J.E., Scott R.W., Campanelli D., Griffith J., Wilde C., Marra M.N., Seeger M. & Nathan C.F. (1989) Antibiotic proteins of human polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5610.
- 86 Takahashi H., Nukiwa T., Yoshimura K., Quick C.D., States D.J., Holmes M.D., Whang-Peng J., Knutsen T. & Crystal R.G. (1988) Structure of the human neutrophil elastase gene. *J. Biol. Chem.* **263**, 14739.
- 87 Farley D., Salvesen G. & Travis J. (1988) Molecular cloning of human neutrophil elastase. *Biol. Chem Hoppe-Seyler* **369**, Suppl. p 3.
- 88 Weitz J.I., Huang A.J., Landman S.L., Nicholson S.C. & Silverstein S.C. (1987) Elastase-mediated fibrinogenolysis by chemoattractant-stimulated neutrophils occurs in the presence of physiologic concentrations of antiproteinases. *J. Exp. Med.* **166**, 1836.
- 89 Senior R.M. & Campbell E.J. (1984) Cathepsin G in human mononuclear phagocytes : comparisons between monocytes and U937 monocyte-like cells. *J. Immunol.* **132**, 2547.
- 90 Collier J.E., Wilhelm S.M., Eisen A.Z., Marmer B.L., Grant G.A., Seltzer J.L., Kronberger A., He C., Bauer E.A. & Goldberg G.I. (1988) H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen. *J. Biol. Chem.* **263**, 6579.
- 91 Farley D., Salvesen G. & Travis J. (1988) Molecular cloning of human neutrophil elastase. *Biol. Chem Hoppe-Seyler* **369**, Suppl. p 3.
- 92 Baggiolini M., DeDuke C., Masson P.L. & Heremans J.F. (1970) Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes. *J. Exp. Med.* **131**, 559.
- 93 Quie P.G. (1986) Phagocytic cell dysfunction. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **77**, 387.
- 94 Lange R.D. & Jones J.B. (1981) Cyclic neutropenia : review of clinical manifestations and management. *Amer. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **3**, 363.
- 95 Kostmann R. (1975) Infantile genetic agranulocytosis. A review with presentation of ten new cases. *Acta Paediatr. Scand.* **64**, 362.
- 96 Anderson D.C. & Springer T.A. (1987) Leukocyte adhesion deficiency : an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Annu. Rev. Med.* **38**, 175.
- 97 Springer T.A., Thomson W.S., Miller J., Schmalstieg F.C. & Anderson D.C. (1984) Inherited deficiency of the Mac-1, LFA-1, p150,95 glycoprotein family and its molecular basis. *J. Exp. Med* **160**, 1901.

- 98 **Miller M.E., Oski F.A. & Harris M.B.** (1971) The lazy leukocyte syndrome : a new disorder of neutrophil function. *Lancet* 1, 1665.
- 99 **Gallin J.I.** (1981) Abnormal phagocyte chemotaxis : pathophysiology, clinical correlations, and management of patients. *Rev. Infect. Dis.* 3, 1196.
- 100 **Pincus S.H., Thomas I.T., Clark R.A. & Ochs H.D.** (1975) Defective neutrophil chemotaxis with variant ichthyosis, hyperimmunoglobulin E, and recurrent infections. *J. Pediatr.* 87, 980.
- 101 **Miller M.E., Norman M.E., Koblenzer P.J. & Schonauer T.** (1973) A new familial defect of neutrophil movement. *J. Lab. Clin. Med.* 82, 1.
- 102 **Davis S.D., Schaller J. & Wedgwood R.J.** (1966) Job's syndrome : recurrent "cold" staphylococcal abscesses. *Lancet* 1, 1013.
- 103 **Buckley R.H., Wray B.B. & Belmaker E.Z.** (1972) Extreme hyperimmunoglobulinemia E and undue susceptibility to infection. *Pediatrics* 49, 59.
- 104 **Donabedian H. & Gallin J.I.** (1982) Mononuclear cells from patients with the hyperimmunoglobulin E recurrent infections syndrome produce an inhibitor of leukocyte chemotaxis. *J. Clin. Invest.* 69, 1155.
- 105 **Gallin J.I. & Fauci A.S.** (1983) Chronic granulomatous disease. in *Advances in host defense mechanisms* vol 3, Raven Press, New-York.
- 106 **Royer-Pokora B., Kunkel L.M., Monaco A.P. Goff S.C., Newburger P.E., Baehner R.L., Cole F.S., Curnutte J.T. & Orkin S.H.** (1986) Cloning the gene for an inherited human disorder -chronic granulomatous disease- on the basis of its chromosomal location. *Nature* 322, 32.
- 107 **Blume R.S., Bennett J.M., Yankee R.A. & Wolff S.M.** (1968) Defective granulocyte regulation in the Chédiak-Higashi syndrome. *N. Engl. J. Med.* 279, 1009
- 108 **Ganz T., Metcalf J.A. & Gallin J.I.** (1987) Two genetic disorders that affect human neutrophils are associated with deficiencies of microbicidal and cytotoxic proteins. *Clin. Res.* 35, 474A.
- 109 **Parry M.F., Root R.K., Metcalf J.A., Delaney K.K., Kaplow L.S. & Richer W.J.** (1981) Myeloperoxidase deficiency : prevalence and clinical significance. *Ann. Intern. Med.* 95, 293.
- 110 **Weil S.C., Rosner G.L., Reid M.S. Chisholm R.L., Farber N.M., Spitznagel J.K. & Swanson M.S.** (1987) cDNA cloning of human myeloperoxidase : decrease in myeloperoxidase mRNA upon induction of HL-60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2057.
- 111 **Rosen H. & Kleybanoff S.J.** (1979) Hydroxyl radical generation by polymorphonuclear leukocytes measured by electron spin resonance spectroscopy. *J. Clin. Invest.* 64, 1725.

- 112 **Gallin J.I., Fletcher M.P., Seligmann B.E., Hoffstein S., Cehrs K. & Mounessa N.** (1982) Human neutrophil-specific granule deficiency : a model to assess the role of neutrophil-specific granules in the evolution of the inflammatory response. *Blood* **59**, 1317.
- 113 **Holdsworth S.R. & Bellomo R.** (1984) Differential effects of steroids on leukocyte-mediated glomerulonephritis in the rabbit. *Kidney Int.* **26**, 162.
- 114 **Fauci A.S., Haynes B.F. & Katz P.** (1978) The spectrum of vasculitis : clinical, pathologic, immunologic, and therapeutic considerations. *Ann. Intern. Med.* **89**, 660.
- 115 **Weiland J.E., Davis W.B. & Holter J.F.** (1986) Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome: clinical and pathophysiologic significance. *Ann. Rev. Respir. Dis.* **133**, 218.
- 116 **Janoff A.** (1985) Elastase in tissue injury. *Ann. Rev. Med.* **36**, 207.
- 117 **Murphy K.R., Marsh W.R., Glezen L.S., Irvin C.G., Wilson M.C. & Larsen G.L.** (1986) Inflammation and the late phase reaction in the asthma : the effect of the polymorphonuclear leukocyte depletion on airways obstruction and bronchial hyperreactivity in an animal model. *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* **22** suppl 7, 48.
- 118 **Slots J.** (1986) Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. *J. Clin. Periodontol.* **13**, 912.
- 119 **Listgarden M.** (1976) Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. *J. Periodontol.* **47**, 1.
- 120 **Slots J. & Listgarden M.** (1988) *Bacteriodes gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* **15**, 85.
- 121 **Baelum V., Ferjerskov O. & Manji F.** (1988) Periodontal diseases in adult kenyan. *J. Clin. Periodontol.* **15**, 445.
- 122 **Papapanou P.N., Wennstrom J.L. & Grondahl K.** (1988) Periodontal status in relation to age and tooth type. A cross sectional radiographic study. *J. Clin. Periodontol.* **15**, 469.
- 123 **Page R.C. & Schroeder H.E.** (1982) in : Periodontitis in man and other animals. A comparative review. Basel, S. Karger.
- 124 **Page R.C. & Schroeder H.E.** (1981) Current status of the host response in chronic marginal periodontitis. *J. Periodontol.* **52**, 477.
- 125 **Charon J.A., Metzger Z., Hoffeld J.T., Oliver C., Gallin J.I. & Mergenhagen S.E.** (1982) An in vitro study of neutrophils obtained from the normal gingival sulcus. *J. Periodont. Res.* **17**, 614.
- 126 **Page R.C.** (1986) Gingivitis. *J. Clin. Periodontol.* **13**, 345.
- 127 **Listgarden M.A.** (1986) Pathogenesis of periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **13**, 418.

- 128 **Slots J. & Dahlen G.** (1985) Subgingival microorganisms and bacterial virulence factors in periodontitis. *Scand. J. Dent. Res.* 93, 119.
- 129 **Theilade E.** (1986) The non specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* 13, 905.
- 130 **Kornman K.S.** (1986) The microbiologic etiology of periodontal disease. *The Comp. Continuing Education in Dent. Suppl.* 7, 173.
- 131 **Huynh C., Charon J., Joachim F., Baehni P. & Meyer J.** (1987) Les concepts actuels en parodontologie. *J. Parodontol.* 6, 311.
- 132 **Goldman H.M. & Stallard R.E.** (1973) Limitation of the radiograph in the diagnosis of osseous defect in periodontal disease. *J. Periodontol.* 44, 626.
- 133 **Tanner A.C.R., Socransky S.S. & Goodson J.M.** (1984) Microbiota of periodontal pockets losing crestal alveolar bone. *J. Periodont. Res.* 19, 279.
- 134 **Ciancio S.C.** (1986) Chemotherapeutic agents and periodontal therapy. Their impact on clinical practice. *J. Periodontol.* 57, 108.
- 135 **Rosling B.G., Slots J., Christersson L.A., Grondahl H.G. & Genco R.J.** (1986) Topical antimicrobial therapy and diagnosis of subgingival bacteria in the management of inflammatory periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 13, 975.
- 136 **Gjerme P.** (1986) Chemotherapy in juvenile periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 13, 982.
- 137 **Suzuki J.B. & Charon J.A.** (1989) Classification actuelle des maladies parodontales. *J. Parodontol.* 8, 31.
- 138 **Lindhe J. & Hellden L.** (1972) Neutrophilic chemotactic activity activity elaborated by dental plaque. *J. Periodont. Res.* 7, 297.
- 139 **Kowolik M.J. & Raeburn J.A.** (1980) Functional integrity of gingival crevicular neutrophil polymorphonuclear leukocytes as demonstrated by nitroblue tetrazolium reduction. *J. Periodont. Res.* 15, 483.
- 140 **Tempel T.R., Kimball H.R., Kakehashi S & Amen C.R.** (1972) Host factors in periodontal manifestation of Chédiak-Higashi syndrome. *J. Periodont. Res.* 7 (suppl. 10), 26.
- 141 **Arnold R.N. & Hoffman D.L.** (1979) Oral management of lazy leukocyte syndrome. A case report. *Quintessence Int.* 10, 9.
- 142 **Rabson A.R., Anderson R. & Glover A.** (1978) Defective neutrophil mobility and recurrent infection. *In vitro* and *in vivo* effect of Levamisole[®]. *Clin. Exp. Immunol.* 33, 142.
- 143 **Quie P. G.** (1969) Chronic granulomatous disease of Childhood. *Adv. Pediatr.* 16, 287.

- 144 **Cohen D. & Morris A.L.** (1961) Periodontal manifestations of cyclic neutropenia. *J. Periodontol.* **32**, 159.
- 145 **Bauer W.H.** (1946) The supporting tissues of the tooth in acute secondary agranulocytosis (arsphenamin neutropenia). *J. Dent. Res.* **25**, 501.
- 146 **Van Dyke T.E., Horoszewicz H.U., Cianciola L.J. & Genco R.J.** (1980) Neutrophil chemotaxis dysfunction in human periodontitis. *Infect. Immun.* **27**, 124.
- 147 **Van Dyke T.E., Levine M.J. & Genco R.J.** (1985) Neutrophil function and oral disease. *J. Oral Pathol.* **14**, 95.
- 148 **Cianciola L.J., Genco R.J., Patters M.R., McKenna J. & Van Oss C.J.** (1977) Defective polymorphonuclear leukocyte function in a human periodontal disease. *Nature* **265**, 445.
- 149 **Suzuki J.B., Park S.K., Nauman R.K. & Falker W.A.** (1983) Lymphocyte AMLR and neutrophil function following periodontal therapy. *J. Dent. Res.* **62** (special issue), 162.
- 150 **Page R.C., Altman L.C., Ebersole J.L., Vandesteen G.E., Dahlberg W.H., Williams B.L. & Osterberg S.K.** (1983) Rapidly progressive periodontitis : a distinct clinical condition. *J. Periodontol.* **54**, 197.
- 151 **Page R.C., Bowen T., Altman L.C., Vandesteen G.E., Ochs H., Mackenzie P., Osterberg S.K., Engel L.D. & Williams B.L.** (1983) Prepubertal periodontitis. I Definition of a clinical disease entity. *J. Periodontol.* **54**, 257.
- 152 **Charon J. Thomas T., Lempereur G., Joachim F. & Capron A.** (1985) Oxydative metabolism during periodontal disease. *Mucosal Immunity, Journées Immunologiques Franco-Allemandes*, 240.
- 157 **Loe H. & Silness J.** (1964) Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta Odontol. Scand.* **21**, 533.
- 158 **Bøyum A.** (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **21** (supp. 97), 77.
- 159 **Skapski H. & Lenher T.** (1975) A crevicular washing method for investigating the immune component of crevicular fluid in man. *J. Periodont. Res.* **11**, 19.
- 160 **Charon J., Joachim F., Champagne C., Torpier G. & Capron A.** (1987) Effect of dental plaque on the oxidative metabolism of normal neutrophils. *Oral. Microbiol. Immunol.* **2**, 92.
- 161 **Bradford M.M.** (1979) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248.
- 162 **Descamps-Latsha B., NGuyen A.T., Golub R. & Feuillet-Fieux M.N.** (1982) Chemiluminescence in microamounts of whole blood for investigation of the human phagocyte oxidative metabolism function. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.* **133C**, 349.

- 163 **Boyden S.** (1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* **115**, 453.
- 164 **Harwarth L., Falk W. & Leonard E.J.** (1980) Rapid quantification of neutrophil chemotaxis: use of a polyvinylpyrrolidone-free--polycarbonate membrane in a multi-well assembly. *J. Immunol. Meth.* **37**, 39.
- 165 **Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680.
- 166 **O'Farrell P.H.** (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007.
- 167 **Garrels J.I.** (1979) Two dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines. *J. Biol. Chem.* **254**, 7961.
- 168 **Morrissey J. H.** (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels; a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* **117**, 307.
- 169 **Chirgwin J.M., Przybla A.E., Mac Donald R.J. & Rutter W.J.** (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294.
- 170 **Towbin H., Staehlin T. & Gordon J.** (1979) Electrophoretic transfert of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

Remerciements	p.2
Publications et communications	p.6
Sommaire	p.7
Liste des abréviations	p.8
RESUME	p.10
GENERALITES	p.13
I. Historique	p.14
II. Myélopoïèse et maturation des polynucléaires neutrophiles	p.17
II-1. Régulation de la myélopoïèse.....	p.17
II-1/a. Le systèmes myélopoïétique	p.17
II-1/b. Les facteurs de croissance hématopoïétiques	p.19
II-1/c. Intervention d'interleukines	p.21
II-2. Régulation de la lignée neutrophile.....	p.21
II-3. Maturation et apparition des granules	p.22
II-3/a. Nature des granules.....	p.22
II-3/b. Mécanismes de formation des granules	p.24
III. Réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles ..	p.25
III-1. Activation des polynucléaires neutrophiles : rôle des marqueurs membranaires	p.25
III-1/a. Mise en évidence des récepteurs.....	p.25
Récepteurs pour le fMLP	
Récepteurs pour le C5a	
Récepteurs pour le leukotriène B ₄	
Récepteurs pour le PAF	
Récepteurs pour des cytokines	
Glycoprotéines d'adhésion	
Récepteurs pour les fragments Fc des immunoglobulines G	
Récepteurs pour le C3b	
Récepteurs pour l'IL8	
III-1/b. Fonction des récepteurs	p.31
III-2. Transmission intracellulaire du signal d'activation.....	p.33
III-2/a. Protéine G.....	p.33

III-2/b. La phospholipase C.....	p.33
III-2/c. Rôle du diacylglycérol.....	p.33
III-2/d. Protéine kinase C	p.35
III-2/e. Rôle de l'IP ₃	p.35
III-2/f. Rôle du calcium.....	p.35
III-3. Chimiotactisme	p.36
III-4. Phagocytose.....	p.37
III-5. Microbicidie	p.38
III-5/a. Activation du métabolisme oxydatif.....	p.38
III-5/b. Dégranulation et action du contenu des granules.....	p.43
IV. Altération des fonctions du polynucléaire neutrophile en pathologie humaine	p.45
IV-1. Neutropénies	p.46
IV-1/a. Neutropénies congénitales	p.46
IV-1/b. Neutropénies acquises.....	p.46
IV-2. Déficits de l'adhérence.....	p.47
IV-3. Défauts de la migration	p.47
IV-4. Défauts du chimiotactisme.....	p.47
IV-4/a. Dermatoses.....	p.48
IV-4/b. Syndrome de Job	p.48
IV-4/c. Parodontites.....	p.48
IV-4/d. Autres pathologies	p.48
IV-5. Déficits de la bactéricidie	p.49
IV-5/a. Granulomatose septique chronique	p.49
IV-5/b. Syndrome de Chédiak-Higashi.....	p.49
IV-5/c. Déficit en myéloperoxydase.....	p.49
IV-6/d. Déficits en granules spécifiques.....	p.50
IV-6. Maladies inflammatoires non-infectieuses	p.50
V. Les maladies parodontales	p.51
V-1. Pathogénèse de la lésion inflammatoire	p.51
V-1/a. Santé parodontale	p.51
V-1/b. Inflammation gingivale.....	p.54
V-1/c. Lésions de type parodontal.....	p.56
V-2. Etiologie.....	p.57
V-3. Moyens diagnostiques et traitements.....	p.57
V-4. Classification.....	p.61
VI. Rôle du polynucléaire neutrophile dans les maladies parodontales	p.63
VI-1. Présence de polynucléaires neutrophiles dans la cavité buccale.....	p.63

VI-2. Réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles buccaux.....	p.64
VI-3. Statut parodontal des patients porteurs de déficits fonctionnels graves du polynucléaire neutrophile.....	p.64
VI-4. Altération de certaines fonctions des polynucléaires neutrophiles dans certaines parodontopathies.....	p.65
Objectifs de notre travail	p.66
RESULTATS	p.67
I. Réponse fonctionnelle du polynucléaire neutrophile dans la cavité buccale	p.68
I-1. Mesure de la chimioluminescence	p.68
I-1/a. Principe.....	p.68
I-1/b. Définition des conditions de mesure.....	p.68
I-2. Sous-populations des polynucléaires neutrophiles buccaux ...	p.71
I-2/a. Taux basal.....	p.71
I-2/b. Capacité de réponse à des activateurs.....	p.73
I-3. Effet de la plaque dentaire sur l'émission de chimioluminescence par les polynucléaires neutrophiles du sang circulant.....	p.73
I-3/a. Effet de la plaque dentaire sur les polynucléaires neutrophiles sanguins	p.73
I-3/b. Influence de divers traitements de la plaque dentaire	p.75
I-3/c. Effet de la cytochalasine B	p.75
I-4. Effet de la plaque dentaire sur l'émission de chimioluminescence par les polynucléaires neutrophiles buccaux	p.77
II. Réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles d'un patient atteint de granulomatose septique chronique ..	p.79
II-1. Données cliniques	p.79
II-2. Chimioluminescence des polynucléaires neutrophiles	p.79
III. Réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles de patients atteints de maladies parodontales	p.82
III-1. Tests fonctionnels.....	p.82
III-1/a. Chimiotactisme.....	p.82
III-1/b. Chimioluminescence.....	p.82
III-2. Analyse électrophorétique des extraits cellulaires totaux.....	p.84
III-3. Approche biochimique de la réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles témoins en réponse à différents stimuli : analyse comparée des polynucléaires neutrophiles des témoins et des patients	p.87
III-3/a. Taux d'incorporation de méthionine radiomarquée	p.87
polynucléaires neutrophiles d'individus témoins	
polynucléaires neutrophiles de patients	

III-3/b. Analyse électrophorétique des produits de marquage métabolique	p.92
III-3/c. Analyse électrophorétique des produits de traduction <i>in vitro</i>	p.94
IV. Début de caractérisation du polypeptide P 46	p.100
IV-1. Préparation du polypeptide P 46 purifié.....	p.100
IV-2. Préparation de sérum polyclonal spécifique du polypeptide P 46	p.100
IV-3. Recherche de la localisation du constituant P46	p.103
DISCUSSION	p.104
I. Réponse fonctionnelle du polynucléaire neutrophile témoin dans la cavité buccale.....	p.105
II. Réponse fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles des patients.....	p.107
III. Déficit constitutif des polynucléaires neutrophiles des patients atteints de maladies parodontales.....	p.108
IV. Mesure du taux d'incorporation de méthionine radiomarkée au [³⁵ S].....	p.108
V. Analyse des profils électrophorétiques bidimensionnels	p.110
VI. Début de caractérisation du polypeptide P46.....	p.111
CONCLUSION	p.112
MATERIEL ET METHODES	p.113
I. Population des individus analysés	p.114
II. Préparation des cellules	p.115
II-1. Polynucléaires neutrophiles sanguins	p.115
II-2. Polynucléaires neutrophiles gingivaux.....	p.115
II-3. Polynucléaires neutrophiles salivaires	p.116
III. Recueil de plaque dentaire	p.116
IV. Analyse fonctionnelle	p.116
IV-1. Chimiluminescence	p.116
IV-2. Chimiotactisme	p.117
V. Analyse des protéines cellulaires	p.117
V-1. Préparation des extraits cellulaires	p.117
V-2. Electrophorèse monodimensionnelle	p.118
V-3. Electrophorèse bidimensionnelle	p.118
V-4. Coloration par le bleu de Coomassie.....	p.118
V-5. Coloration par le nitrate d'argent.....	p.119

VI. Extraction de l'ARN total de la cellule	p.119
VII. Préparation d'extraits radiomarqués	p.120
VII-1. Marquage métabolique	p.120
VII-2. Polypeptides synthétisés <i>in vitro</i> en lysat de réticulocytes de lapin	p.120
VII-3. Analyse électrophorétique des produits radiomarqués.....	p.121
VIII. Fractionnement des protéines cellulaires	p.121
IX. Production de serums polyclonaux	p.122
X. "Western-blot"	p.122
XI. Immunofluorescence	p.123
XI-1. Immunofluorescence sur lame.....	p.123
XI-2. Cyto-fluorométrie	p.123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p.124
TABLE DES MATIERES	p.137
FIGURES ET TRAVAUX	p.143

Figures et Tableaux

Figures

Figure 1	Réponse du polynucléaire neutrophile à une infection ou à une autre cause d'inflammationp.16
Figure 2	Cellules et facteurs du système de myélopoïèse.....p.18
Figure 3	Maturation du polynucléaire neutrophile.....p.23
Figure 4	Processus membranaires de transduction du signal d'activation.....p.34
Figure 5	Représentation schématique des évènements métaboliques associés à la bactéricidie.....p.39
Figure 6	Struture des tissus parodontaux.....p.53
Figure 7	Photographies de parodontes.....p.55
Figure 8	Radiographiesp.60
Figure 9	Caractéristiques de la chimioluminescence émise par les polynucléaires neutrophiles sanguinsp.70
Figure 10	Induction par la plaque dentaire de l'émission de chimioluminescence des polynucléaires neutrophiles sanguinsp.74
Figure 11	Cinétique d'induction par la plaque dentaire de l'émission de chimioluminescence des polynucléaires neutrophiles buccauxp.78
Figure 12	Statut parodontal d'un patient atteint de granulomatose septique chronique.....p.80
Figure 13	Profils électrophorétiques monodimensionnels d'extraits cellulaires totaux de polynucléaires neutrophilesp.85
Figure 14	Profil électrophorétique bidimensionnel d'extrait cellulaire total de polynucléaire neutrophilep.86

- Figure 16** Modifications induites par le fMLP sur le profil électrophorétique bidimensionnel des produits du marquage métabolique de polynucléaires neutrophiles sanguins d'un individu témoinp.96
- Figure 17** Comparaison des profils électrophorétiques bidimensionnels des produits du marquage métabolique de polynucléaires neutrophiles de témoins et de patientsp.97
- Figure 18** Modifications induite par l'Interféron γ sur le profil électrophorétique bidimensionnel des produits du marquage métabolique de polynucléaires neutrophiles sanguins d'un individu témoinp.98
- Figure 19** Modifications induites par l'Interféron- γ sur le profil électrophorétique bidimensionnel des produits de traduction *in vitro* de polynucléaires neutrophiles témoinsp.99
- Figure 20** Profil électrophorétique monodimensionnel de préparations du polypeptide de 46 kDap.101
- Figure 21** Reconnaissance par western-blot du polypeptide de 46 kDa par les sérums de souris immunisées.....p.102

Tableaux

Tableau 1	Facteurs de croissance hématopoïétiques	p.20
Tableau 2	Contenu enzymatique des granules du polynucléaire neutrophile.....	p.42
Tableau 3	Pathogénèse de la lésion inflammatoire	p.52
Tableau 4	Maladies parodontales et bactéries pathogènes associées	p.58
Tableau 5	Les différentes formes de parodontites	p.62
Tableau 6	Chimioluminescence émise par les sous-populations de polynucléaires neutrophiles buccaux	p.72
Tableau 7	Inhibition par différents traitements de l'effet de la plaque dentaire sur l'émission de chimioluminescence par les polynucléaires neutrophiles sanguins	p.74
Tableau 8	Inhibition par la cytochalasine B de l'effet de la plaque dentaire sur l'émission de chimioluminescence par les polynucléaires neutrophiles sanguins.....	p.74
Tableau 9	Chimioluminescence émise par les sous-populations de polynucléaires neutrophiles buccaux en réponse à la plaque dentaire	p.77
Tableau 10	Chimioluminescence des polynucléaires neutrophiles d'un patient atteint de granulomatose septique chronique.....	p.81
Tableau 11	Réponse chimiotactique des polynucléaires neutrophiles sanguins d'un patient atteint de maladie parodontale.....	p.83
Tableau 12	Taux individuels de marquage métabolique des polynucléaires neutrophiles sanguins de témoins	p.88
Tableau 13	Taux individuels de marquage métabolique des polynucléaires neutrophiles sanguins des patients et des témoins.....	p.91
Tableau 14	Données cliniques des patients	p.114

