



LE POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE

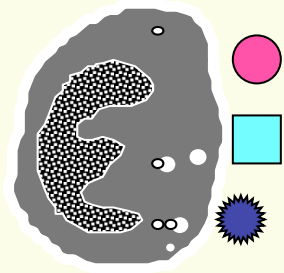
Jamel El Benna

**INSERM U1149, CNRS ERL8250, Centre de Recherche sur
l'Inflammation (CRI)**

**CHU Xavier Bichat, Université Paris7
Paris, France**

DIFFERENTS TYPES DE REponses IMMUNITAIRES

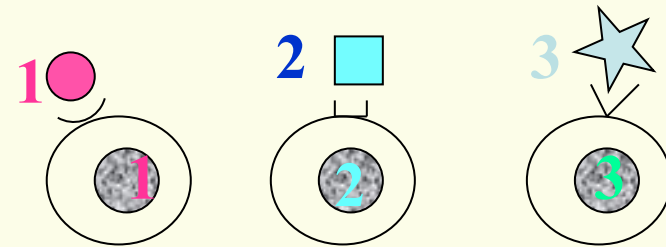
Naturelle = innée
Non spécifique



Immédiate

Barrière cutanéomuqueuse
Substances bactéricides
pH
Equilibre de la flore
Interférons
Syst. Complément
Phagocytes (PN, Monoc...)
Cellules NK
Cellules dendritiques

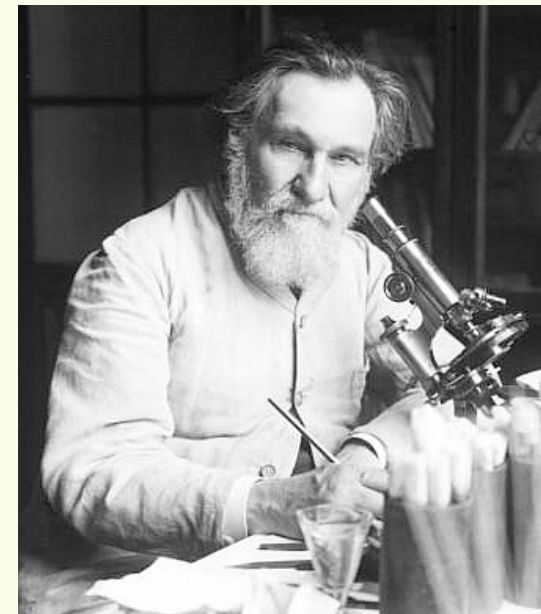
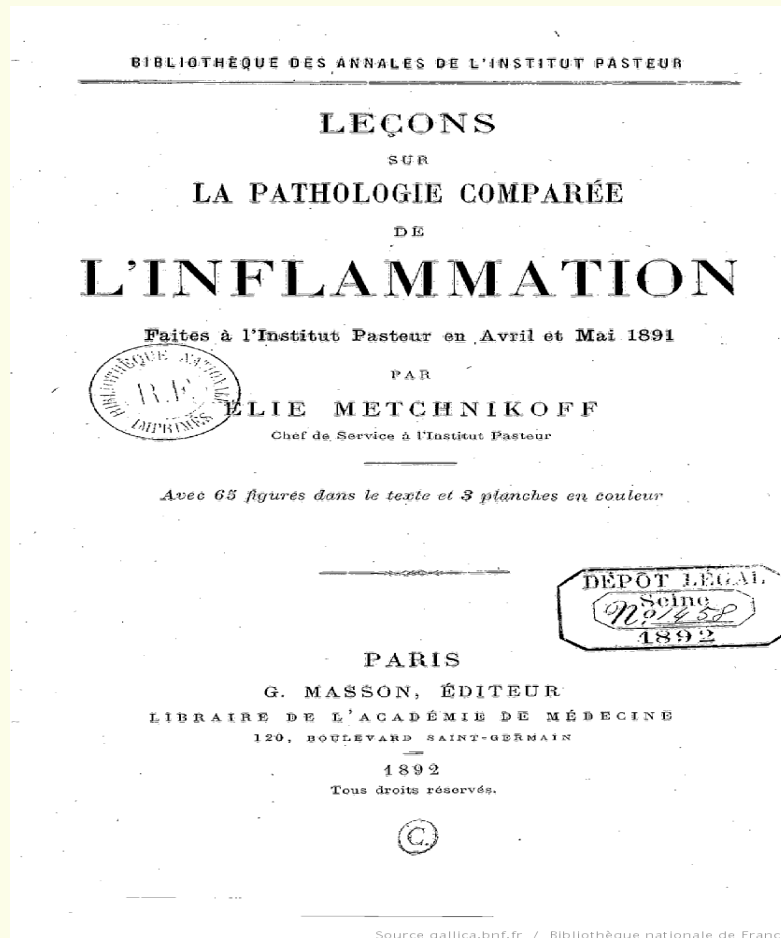
Adaptative
Spécifique



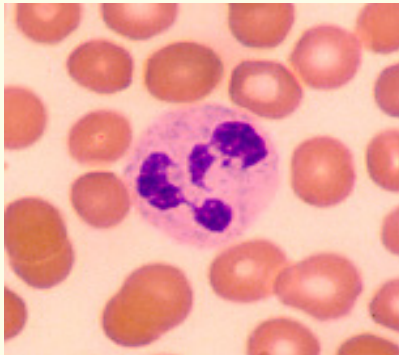
Quelques jours
Possède une mémoire
+efficace lors du 2ème contact
(base des vaccinations)

Lymphos T
Lymphos B
Anticorps

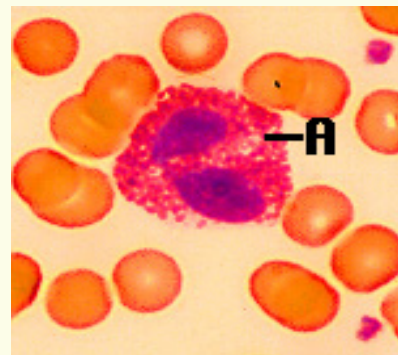
DECOUVERTE DES PHAGOCYTES ET DE L'INFLAMMATION



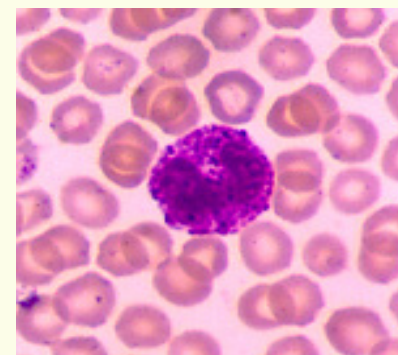
- WHITE BLOOD CELLS**



neutrophil

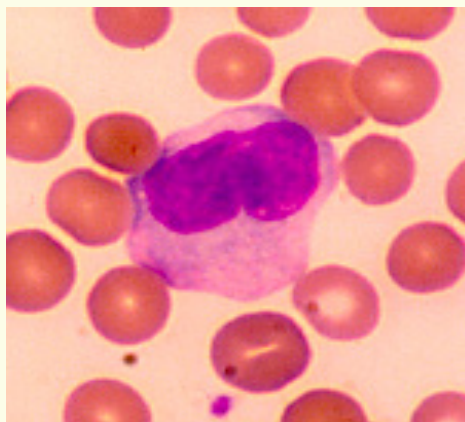


eosinophil

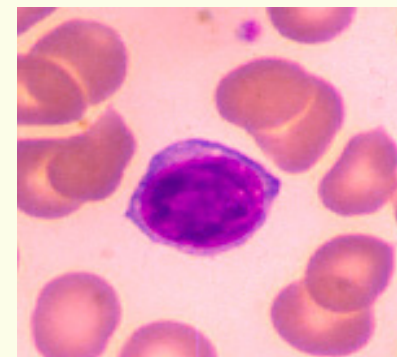


basophil

Granulocytes



monocyte



lymphocyte

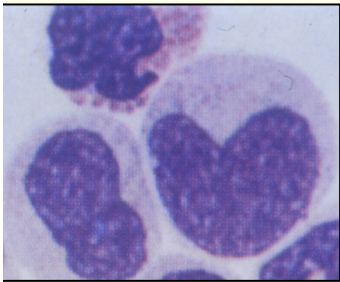
Quelques cellules de l'Immunité Innée



Polynucléaires neutrophiles:

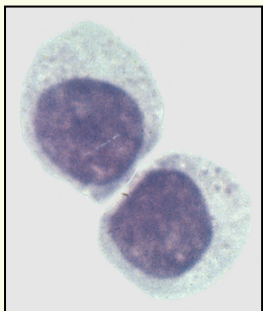
Cellules à granulations neutro, Noyau polylobé, les 1^{ères} à migrer du sang vers le foyer inflammatoire, Action rapide, phagocytaire, tueuse (bactéries à x extracellulaire, champignons), produisent des médiateurs de l'inflammation, 1/2 vie courte.

Mais aussi **poly éosino**: anti parasite, **poly baso**: allergie



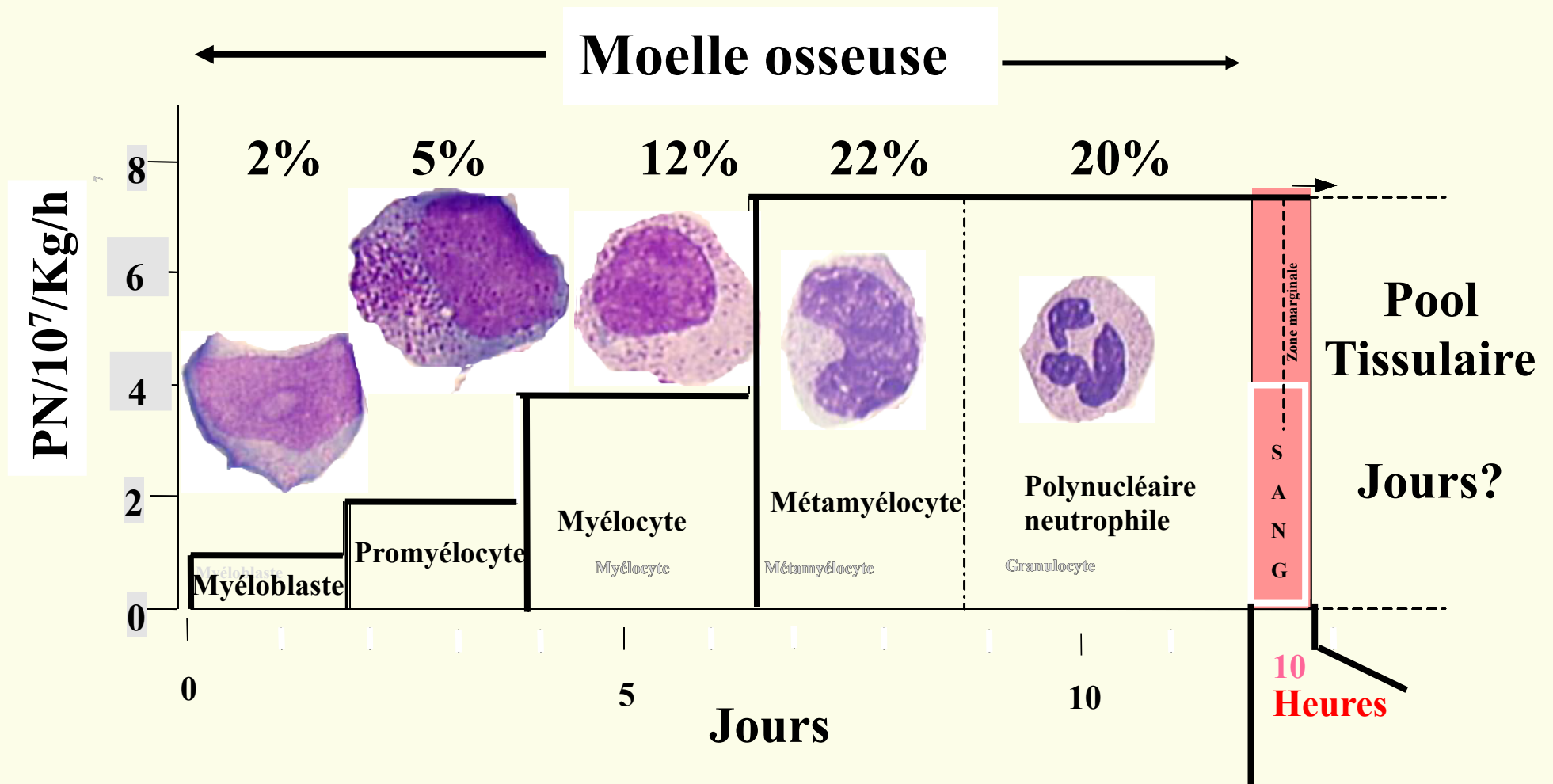
Monocytes:

Cellules mononucléées, Noyau en U, 2^{ème} ligne de défense, tuent bactéries à x intracellulaire, produisent de nombreuses cytokines et médiateurs de l'inflammation, C. Présentatrices d'Ag, se transforment en macrophages résidents dans les tissus qui possèdent des caractères dépendants du microenvironnement.



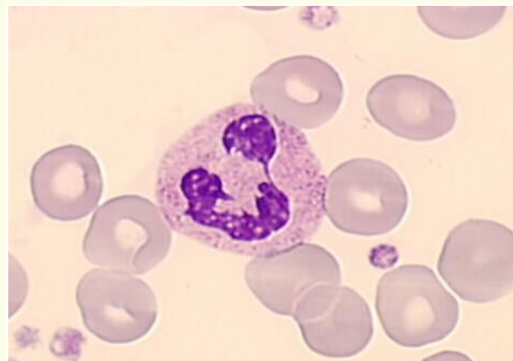
Cellules Natural Killer: Non phagocytaires, Tuent des cellules infectées et malignes ("soi altéré"). Cellules de veille anti-tumorale. Secrètent IFN-g, TNF-a.

PRODUCTION DES PN OU GRANULOPOIESE



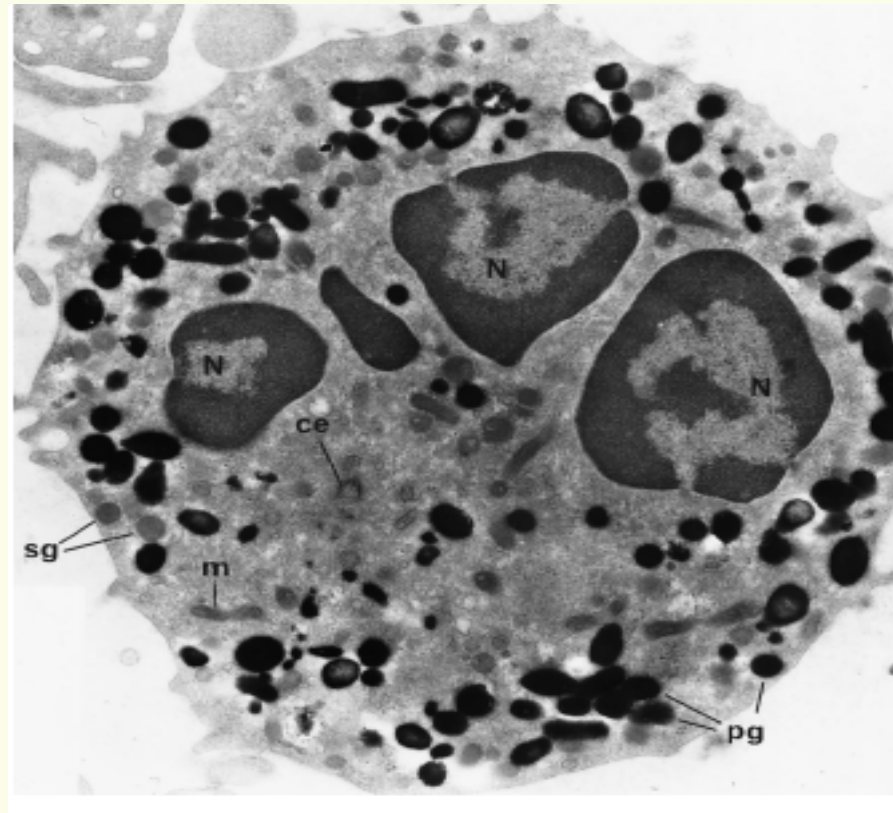
LE POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE (PN ou PMN)

- 60-70% des globules blancs (ou leucocytes)
- 3000-7000 PN/ μ l de sang
- Cellule à demi-vie courte (<10 heures dans le sang et <5 jours dans les tissus)
- Au microscope optique: noyau polylobé, cytoplasme granuleux:



LE POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE (PN):

Au microscope électronique:



pg:granules primaires ou azurophiles
sg:granules secondaires ou spécifiques
N:noyau; ce: centriole,
m:mitochondrie

Table 1. Content of Human Neutrophil Granules and Secretory Vesicles

Azurophil Granules	Specific Granules	Gelatinase Granules	Secretory Vesicles
Membrane	Membrane	Membrane	Membrane
CD63 ^{59,289}	CD11b ^{64,104}	CD11b ^{64,109,327-330}	Alkaline phosphatase ^{23-26,66}
CD68 ²⁹⁰	CD15 antigens ³⁰⁵	Cytochrome b ₅₅₈ ²⁰	CR1 ⁶⁵
V-type H ⁺ -ATPase ²⁹¹	CD66 ³⁰⁶	Diacylglycerol-deacylating enzyme ³³¹	Cytochrome b ₅₅₈ ^{62,333}
	CD67 ³⁰⁶	fMLP-R ^{109,131}	CD11b ^{62,64}
	Cytochrome b ₅₅₈ ^{17,52,105}	SCAMP ¹⁷⁰	CD14 ³³⁴
	fMLP-R ^{131,307,308}	Urokinase-type plasminogen activator-R ³¹⁹	CD16 ^{63,334 *}
	Fibronectin-R ³⁰⁹	VAMP-2 ¹⁷⁰	fMLP-R ¹³¹
	G-protein _α -subunit ^{310,311}	V-type H ⁺ -ATPase ²⁹¹	SCAMP ¹⁷⁰
	Laminin-R ³⁰⁹		Urokinase-type plasminogen activator-R ³¹⁹
	NB 1 antigen ³¹²		V-type H ⁺ -ATPase ²⁹¹
	19-kD protein ³¹³		VAMP-2 ¹⁷⁰
	155-kD protein ³¹⁴		CD10, CD13, CD45 ^{335 *}
	Rap1, Rap2 ^{315,316}		C1q-receptor ^{336 *}
	SCAMP ¹⁷⁰		DAF ^{60 *}
	Thrombospondin-R ³¹⁷		
	TNF-R ³¹⁸		
	Urokinase-type plasminogen activator-R ³¹⁹		
	VAMP-2 ¹⁷⁰		
	Vitronectin-R ³⁰⁹		
Matrix	Matrix	Matrix	Matrix
Acid β-glycerophosphatase ¹¹	β ₂ -Microglobulin ³²⁰	Acetyltransferase ³³²	Plasma proteins ^{24,25} (including tetranectin)
Acid mucopolysaccharide ²⁹²	Collagenase ³²¹	β ₂ -Microglobulin ²⁰	
α ₁ -Antitrypsin ²⁹³	Gelatinase ^{21,322}	Gelatinase ^{16,21,107}	
α-Mannosidase ¹¹	hCAP-18 ¹¹⁷	Lysozyme ⁴⁵	
Azurocidin/CAP37/heparin binding protein ²⁹⁴⁻²⁹⁶	Histaminase ³²³		
Bactericidal permeability increasing protein ²⁹⁷	Heparanase ³²⁴		
β-Glycerophosphatase ⁷	Lactoferrin ³⁰¹		
β-Glucuronidase ^{7,298}	Lysozyme ^{7,8,298}		
Cathepsins ¹¹	NGAL ¹²⁶		
Defensins ^{43,299}	Urokinase-type plasminogen activator ^{319,325}		
Elastase ³⁰⁰	Sialidase ³⁰³		
Lysozyme ^{7,8,298}	SGP28 ⁴⁰		
Myeloperoxidase ³⁰¹	Vitamin B ₁₂ -binding protein ³²⁶		
N-Acetyl-β-glucosaminidase ⁷			
Proteinase-3 ³⁰²			
Sialidase ³⁰³			
Ubiquitin-protein ³⁰⁴			

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

CONTENU DES GRANULATIONS DU PN

Azuropiles

Spécifiques/
Gelatinases

Secrétoires

Mb

H⁺-ATPase

Cyt-b 558/Rap1a

Récepteurs:

Récepteurs:

fMLP-R

CR1

CR3 (CD11b/CD18)

CR3 (CD11b/CD18)

TNF-R

Fibronectine-R

M
a
t
r
i
c
e

Myéloperoxydase

Lysozyme

BPI

Défensines α

Azurocidine

Elastase

Cathepsine G

PR3

Hydrolases acides

Cytokines

Lactoferrine

Lysozyme

Collagénases

Gélatinase

hCAP18

Gélatinase

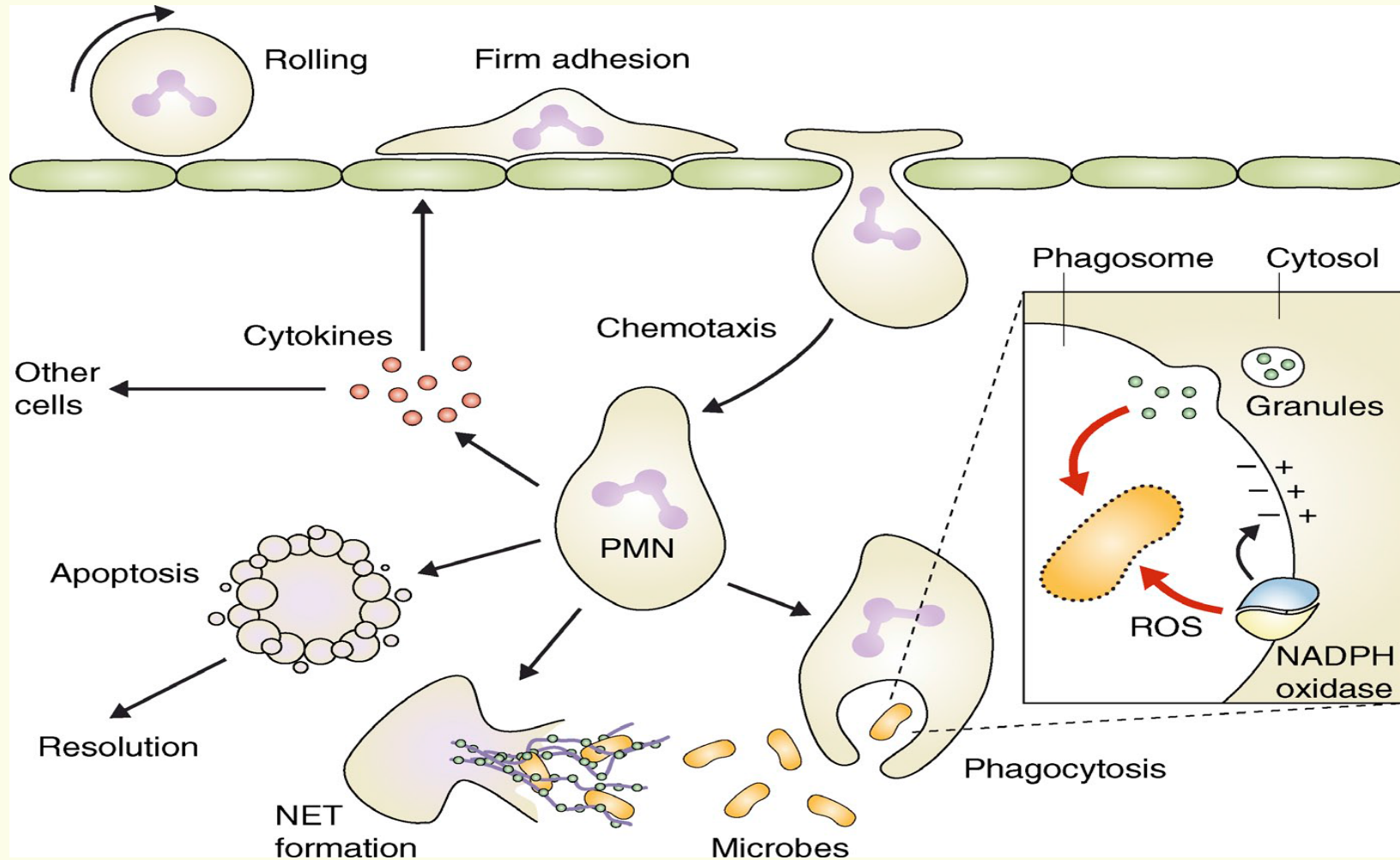
PR3

Azurocidine

Phosphatase

alcaline

LES FONCTIONS DES NEUTROPHILES



II- Les différentes fonctions des neutrophiles:

1- Adhérence

2-Chimiotactisme ou migration tissulaire

3-Phagocytose

4-Production des Formes réactives de l'Oxygène (FRO/ROS)

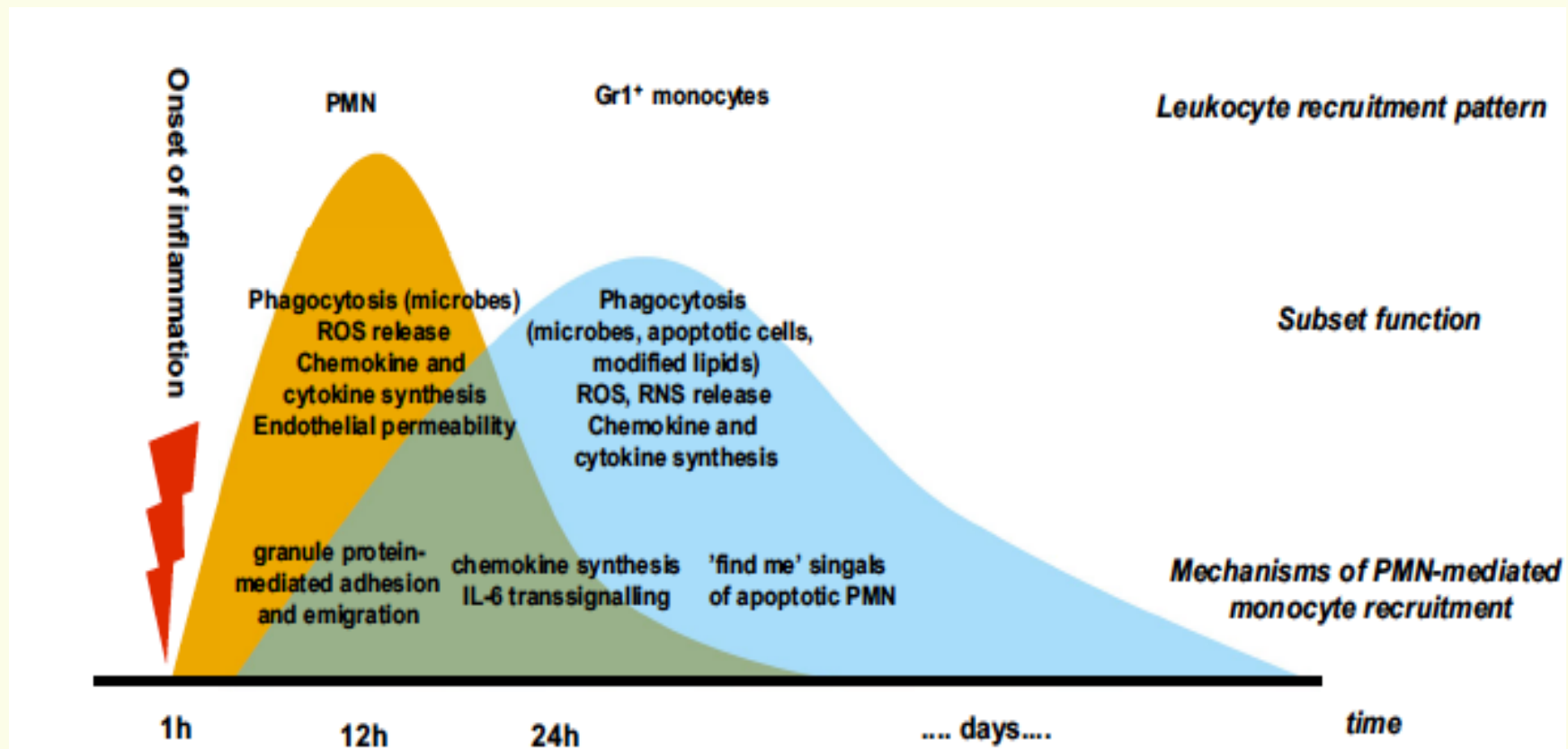
5-Dégranulation ou libération des enzymes et des peptides

6-Libération des NETs (Neutrophil Extracellular Traps)

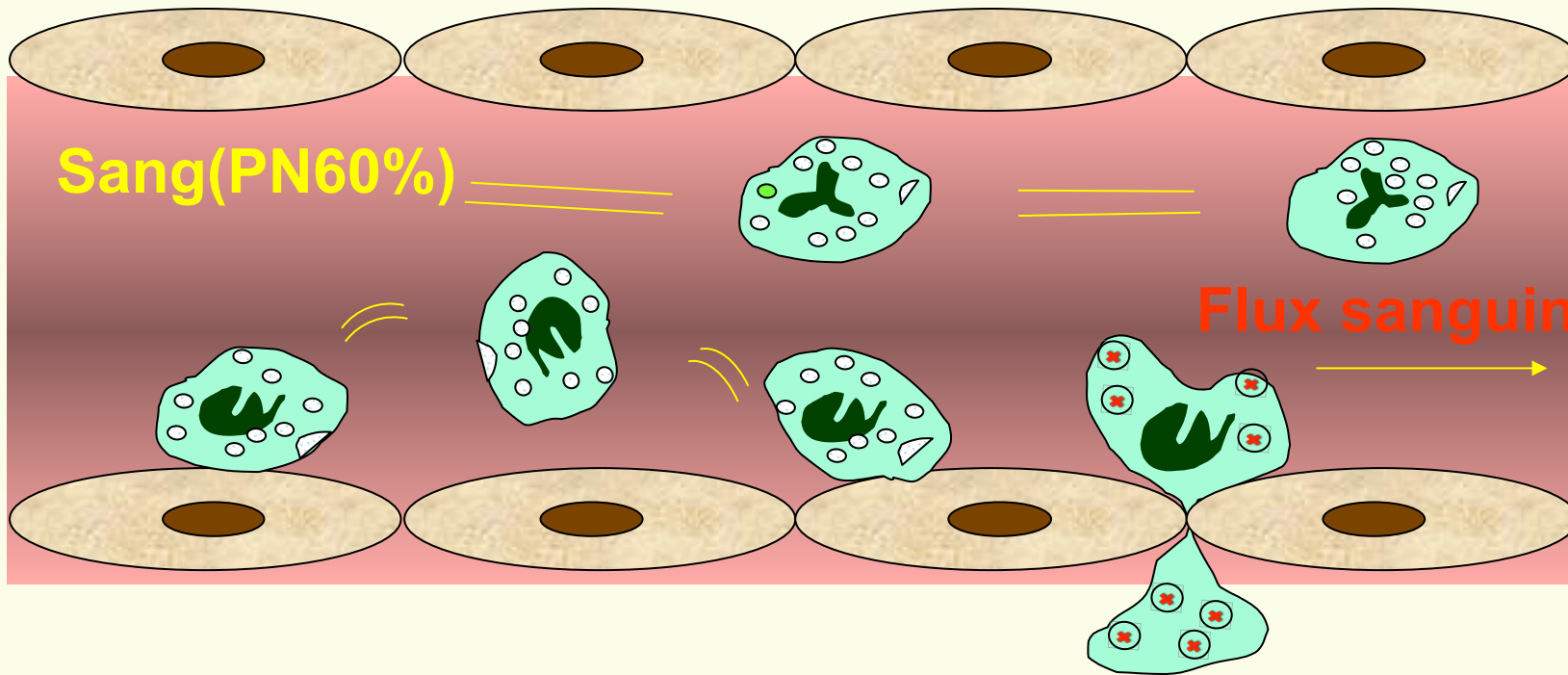
7-Synthèse et libération de cytokines

8- Apoptose, Nécrose, Netose.

Les PN sont les premières cellules à migrer de la circulation au niveau du site inflammatoire



Le polynucléaire neutrophile: De l'état « repos » à l'activation

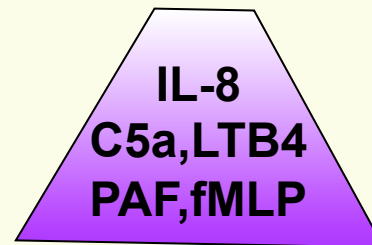


0)-Repos

1)-Adhérence PN-
C.Endothéliale
endothélium

Gradient de substances
chimioattractantes

2)-Migration



Foyer inflammatoire

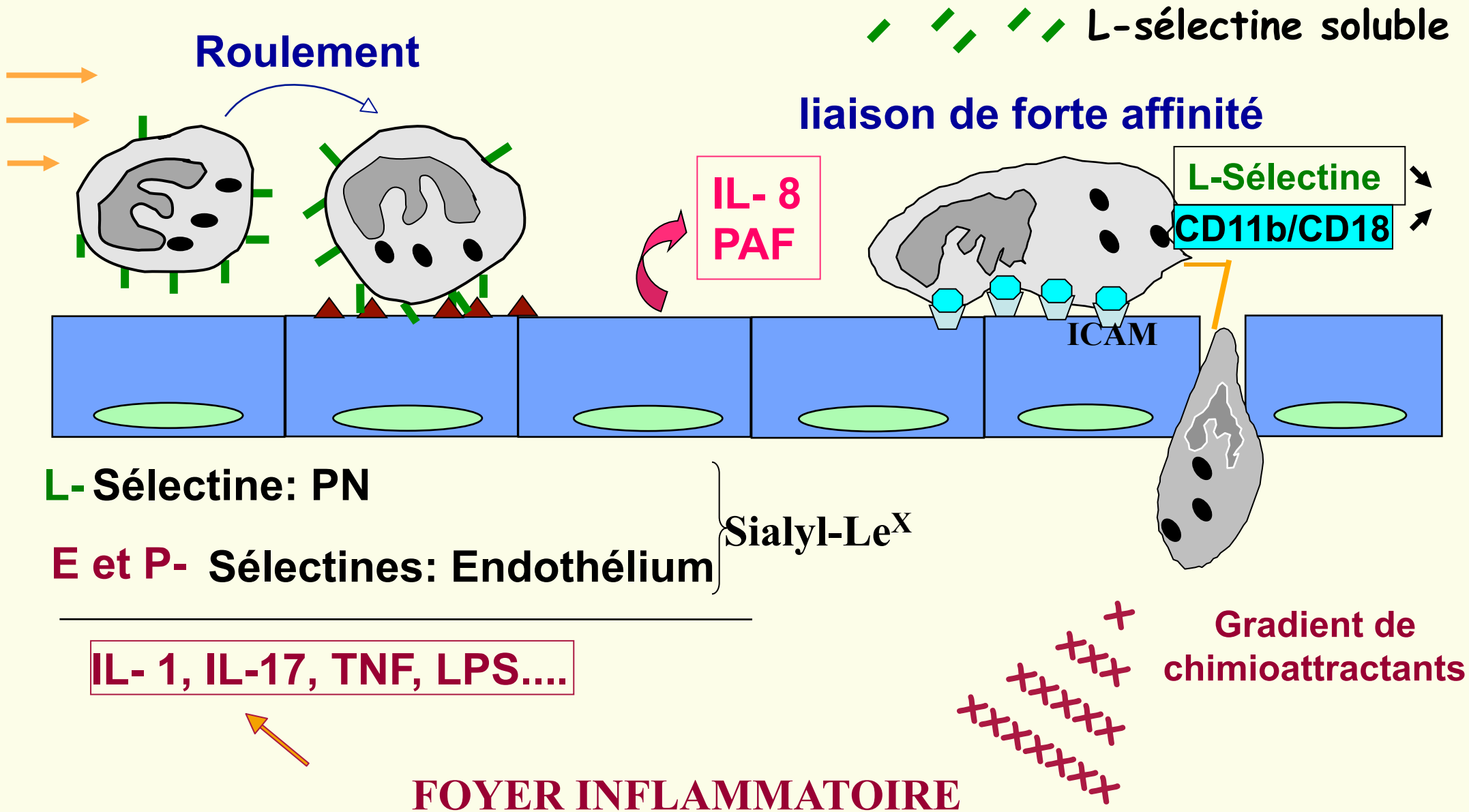
Agent pathogène

Tissus

3)-Phagocytose

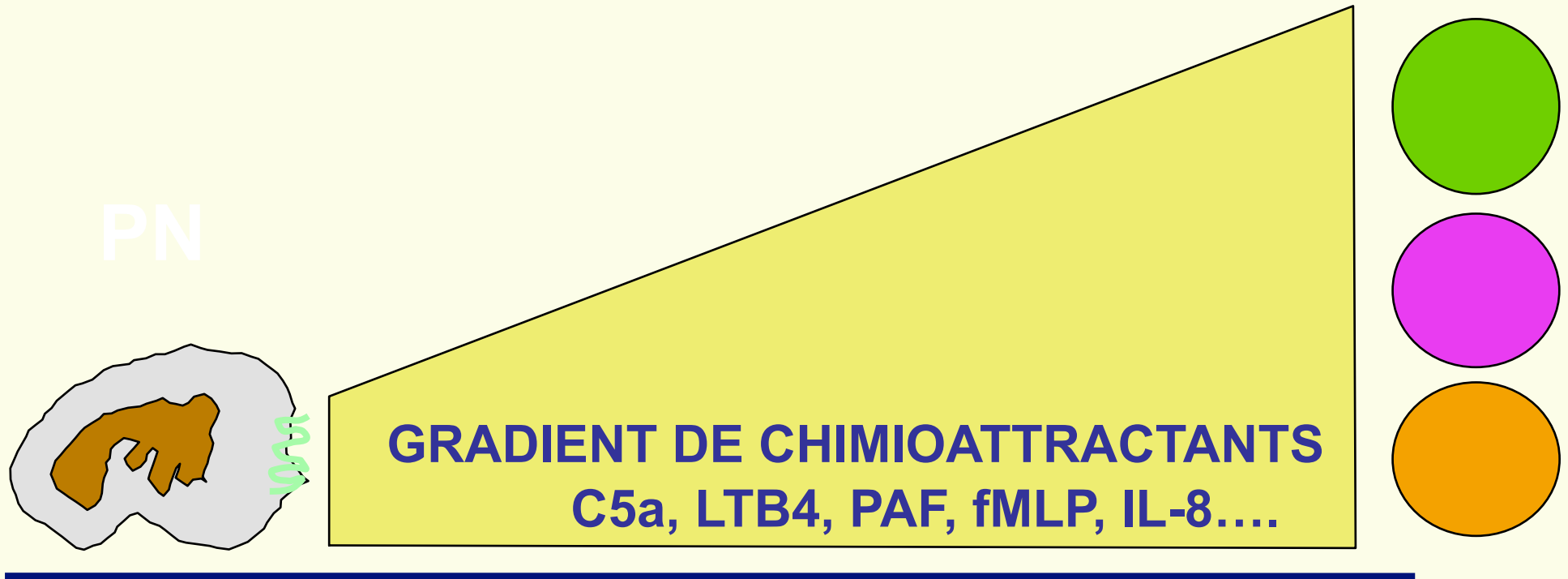
FMLP: Formyl-Met-Leu-Phe
PAF: Platelets Activating Factor
LTB4: leukotriène B4
C5a: Facteur 5 du complément
IL-8: Interleukine 8

MIGRATION TRANS-ENDOTHELIALE DES PN



Migration orientée du PN vers sa cible

CIBLES



Matrice extra-cellulaire

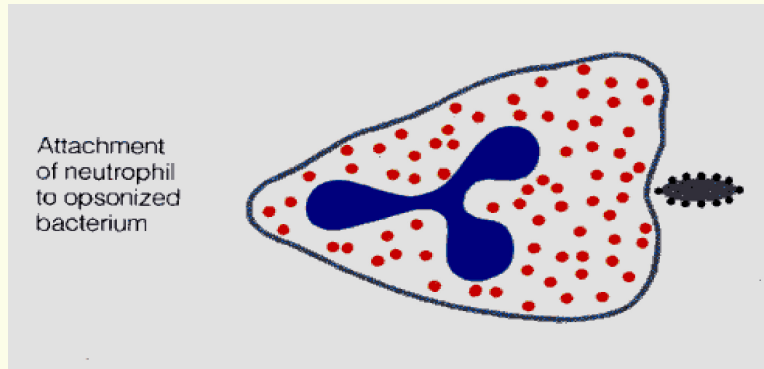
Adhérence et Chimiotactisme

PRINCIPAUX FACTEURS CHIMIOATTRACTANTS

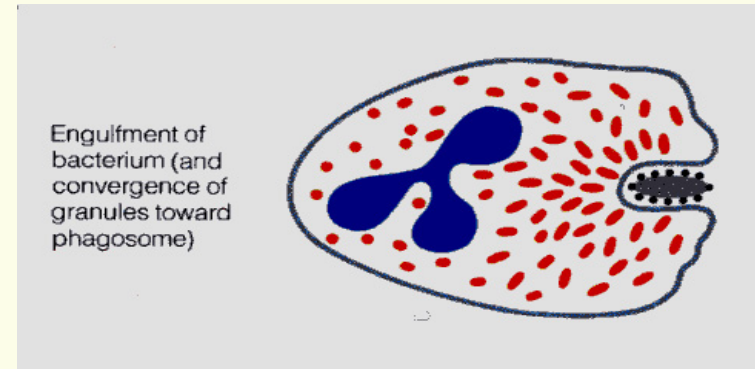
- **Peptides signaux des protéines bactériennes :**
 - N-formyl-peptides : fMLP**
 - **C5a** produit par activation du complément
 - **Médiateurs produits par les cellules du foyer inflammatoire:**
 - **PAF** (PN, monocytes, C. endothéliales,)
 - **Leucotriène B4** (PN, monocytes, mastocytes)
 - **Chimiokines : IL-8, GRO, NAP-2..**
(PN, mono/macro ϕ , CE, fibroblastes, lymphocyte
- ↳ **amplification de la migration phagocytaire**

LA PHAGOCYTOSE:

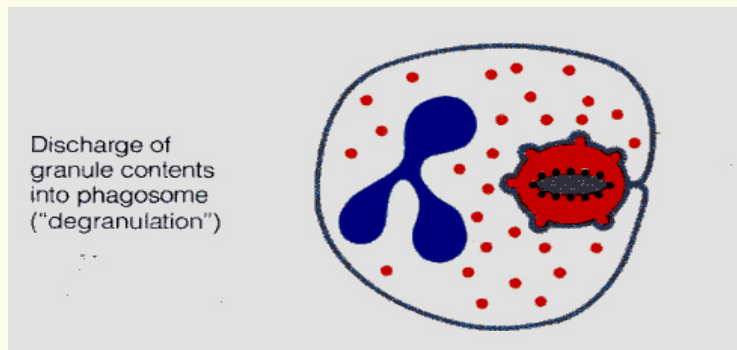
Différentes étapes de la phagocytose



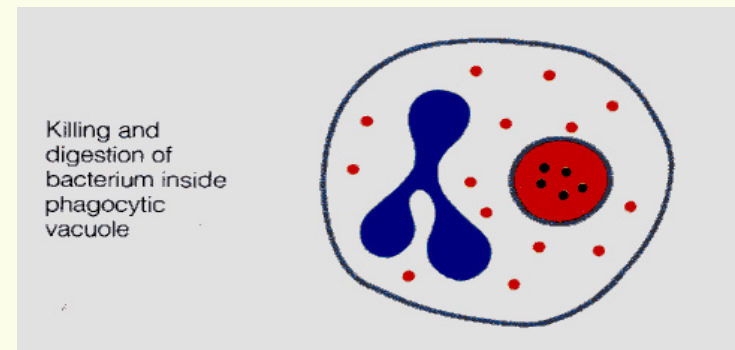
1-Reconnaissance et attachement



2-Englobement de la particule



3-Fusion des lysosomes avec le phagosome : formation du phagolysosome



4-Bactericidie et digestion du microorganisme

Reconnaissance de l'agent pathogène par les neutrophiles pivot de l'immunité innée

II-1

II-1 Pattern Recognition Receptors = PRR: récepteurs de reconnaissance de

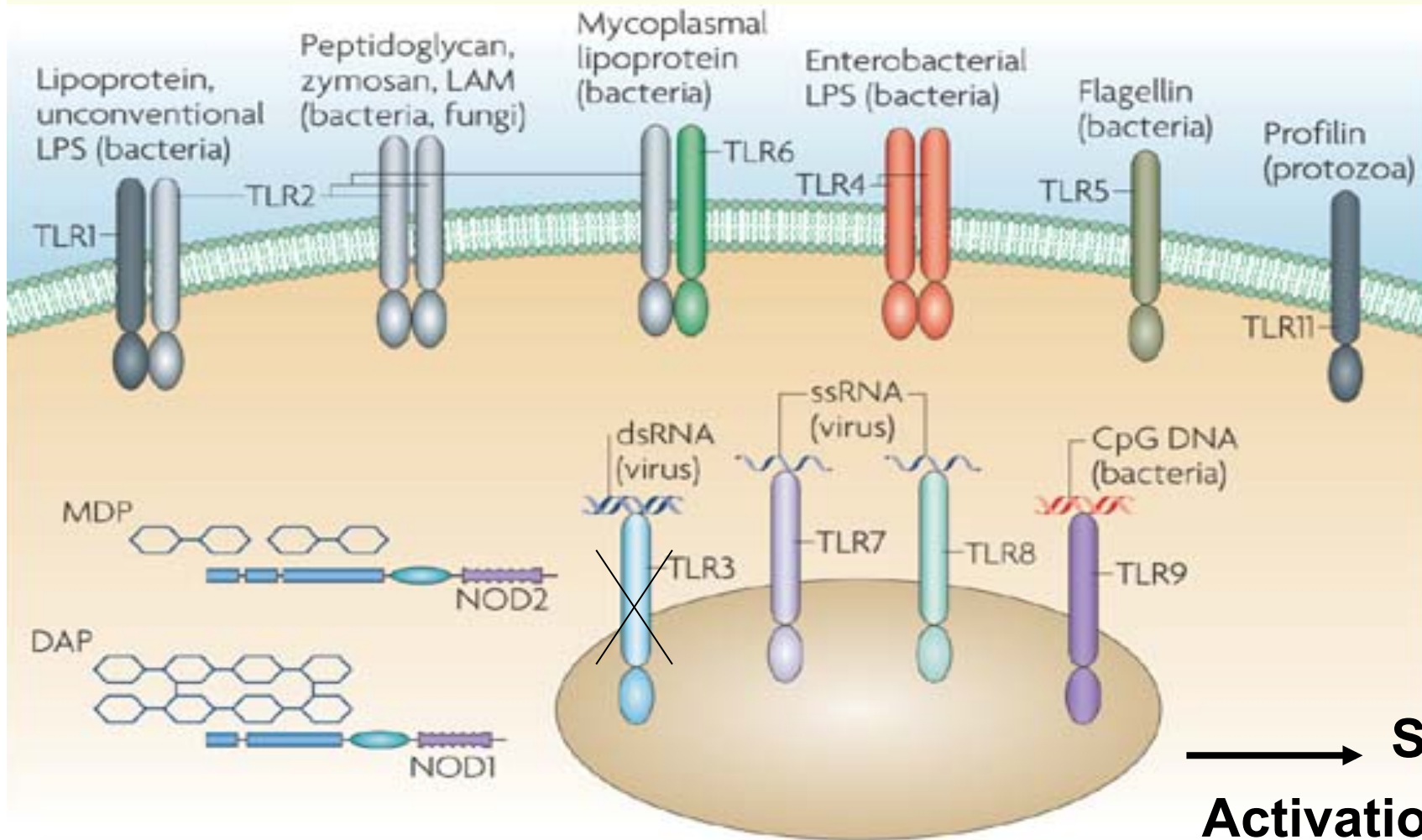
- **Motifs d'agents pathogènes conservés au cours de l'évolution: Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)**
- **Signaux de dangers émis par cellules endogènes stressées ou abimées (DAMPS)**

Par ex:

Ex: TLR4 = B. gram-, LPS, Mycobacterium tuberculosis, glycolipides

**TLR2 = B. gram+, mycobactéries,
lipoarabinomannan, lipoteichoic acid, lipoprotéines,
glycolipides, HSP60, zymosan, c. nécrotiques**

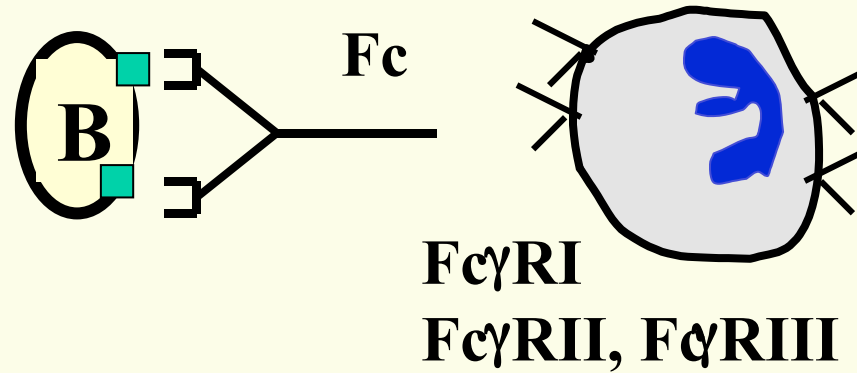
RECONNAISSANCE DES PAMPS ET DAMPS PAR LES « TOLL-LIKE-RÉCEPTORS » ET « NOD-LIKE RECEPTORS »



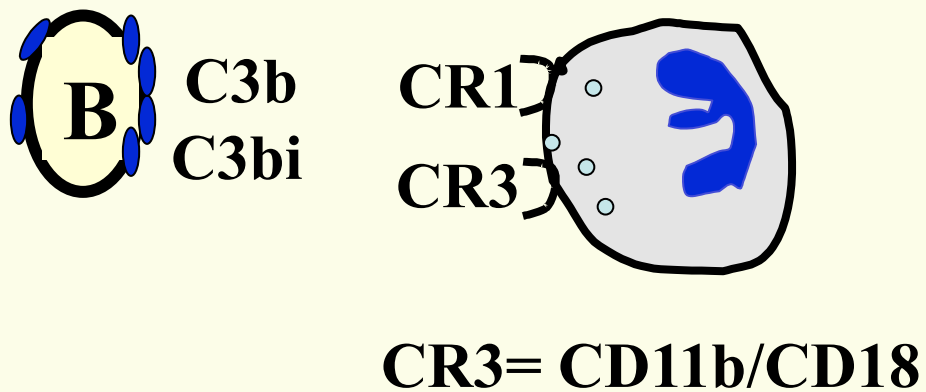
→ **Signalisation**
Activation de kinases
Synthèse de cytokines

ADHÉRENCE FACILITÉE PAR LES OPSONINES

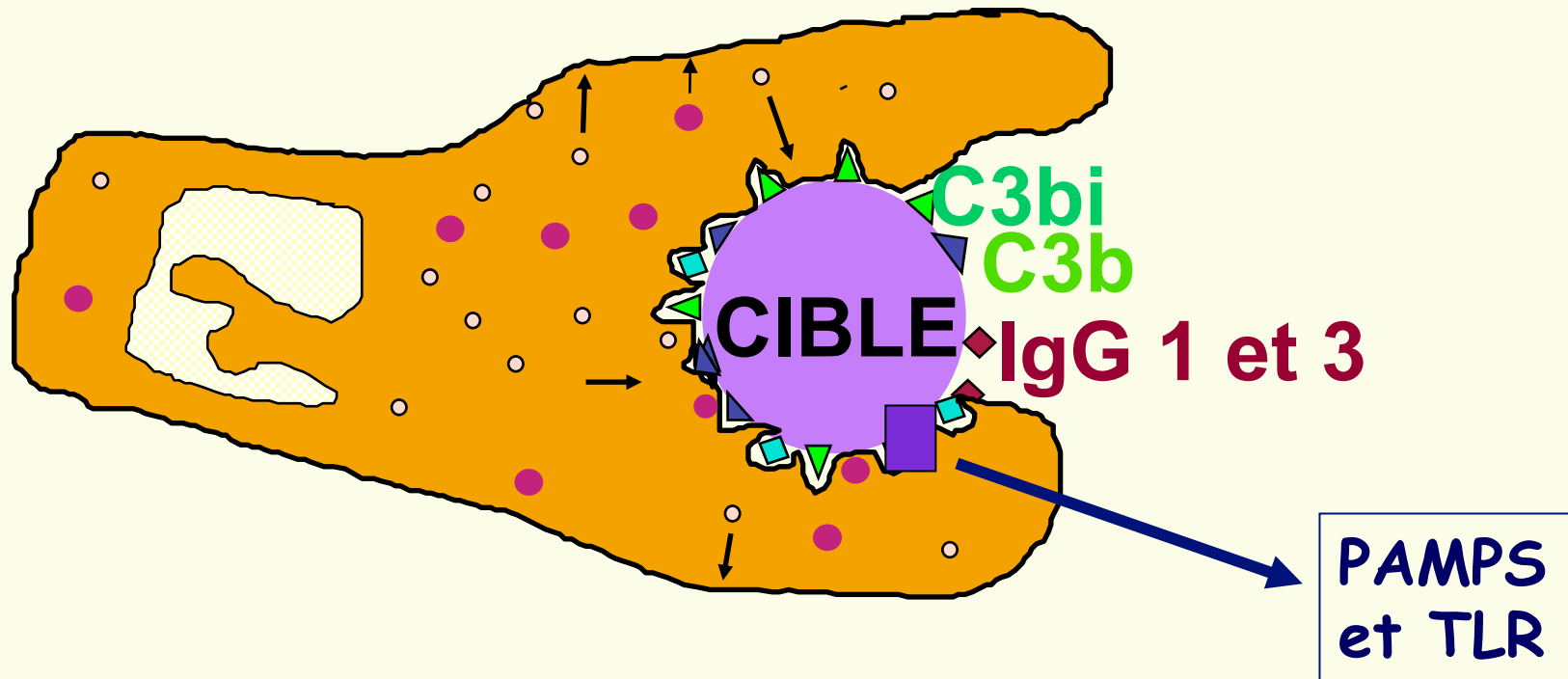
A- Les Immunoglobulines de classe G (IgG1 et IgG 3)



B- Les protéines dérivés du C3 du Complément

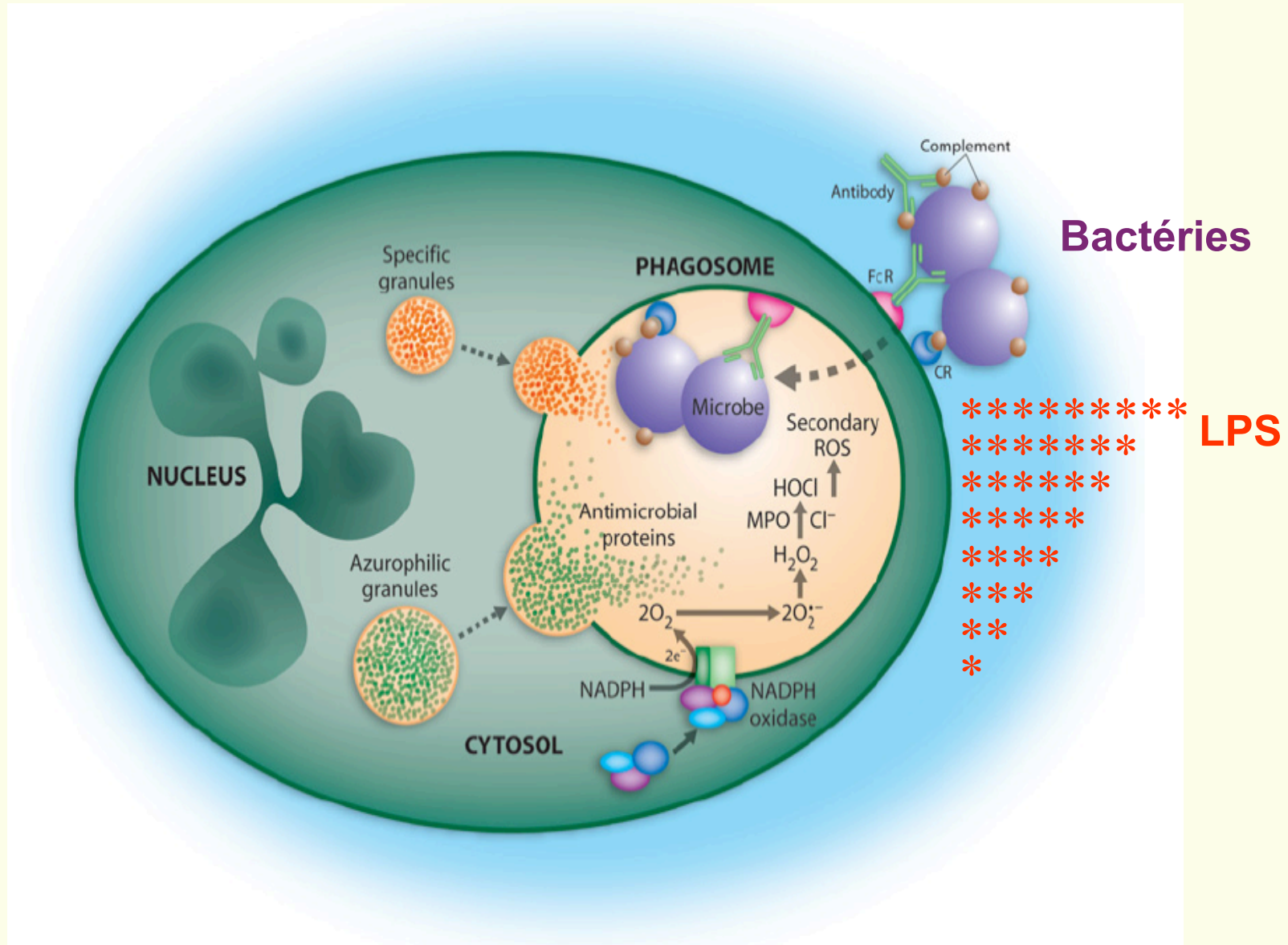


III- ADHERENCE ET ENGLOBEMENT



- Adhérence → Signalisation
- Englobement
 - Fin de la dégranulation
 - Activation des fonctions effectrices

PHAGOCYTOSE ET BACTERICIDIE



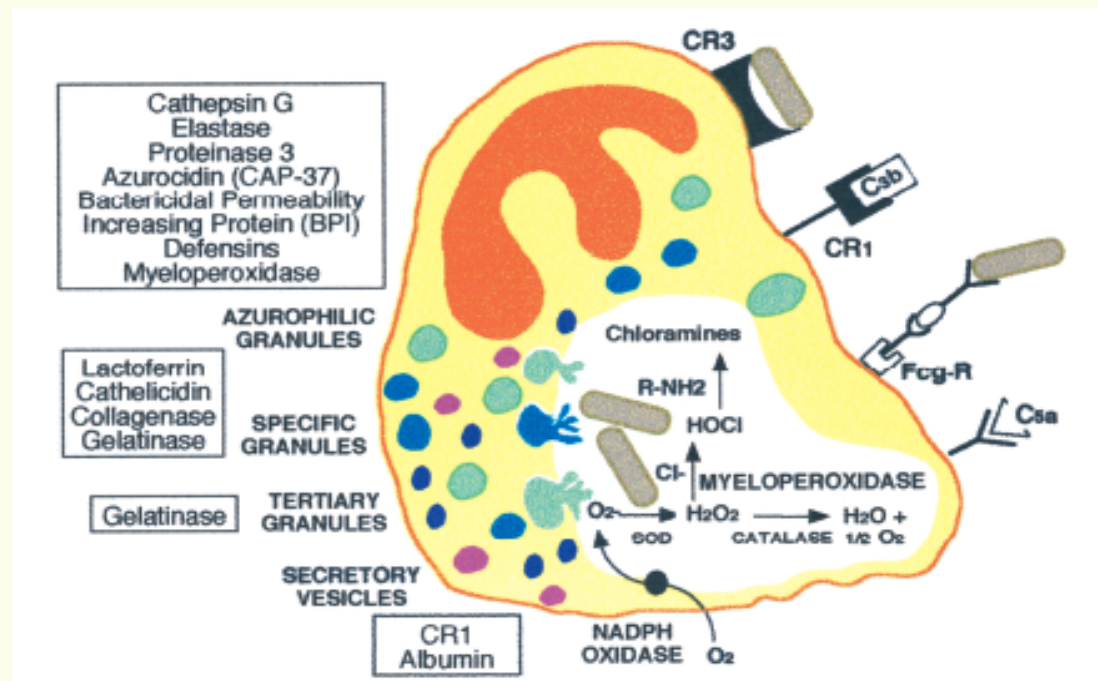
ACTIVITÉ TUEUSE (OU BACTÉRICIDIE):

I)-Reconnaissance et Englobement de la cible: TLR, IgG, C3b et C3bi

II)-Activité Bactéricide (**Avant 2004**):

1-dépendante de l' Oxygène: (FRO/ROS)

2-Indépendante de l' Oxygène: pH acide, Lyzosome, Protéases, Peptides toxiques...



DESTRUCTION DE L' AGENT PATHOGENE

1- Phénomènes indépendants de l'oxygène

A- Dégranulation dans le phagosome

Peptides cationiques à activité bactéricide:

- BPI : (bactericidal/ permeability increasing protein)
- Défensines α (HNP 1-4)
- Azurocidine
- Cathelicidine (LL37)

Enzymes glycolytiques et protéolytiques

- Lysosyme
- Sérine protéases (élastase, PR3, cathepsine G..)

B- Dégranulation à la membrane

↗ expression des récepteurs (fMLP, CD11b/CD18)

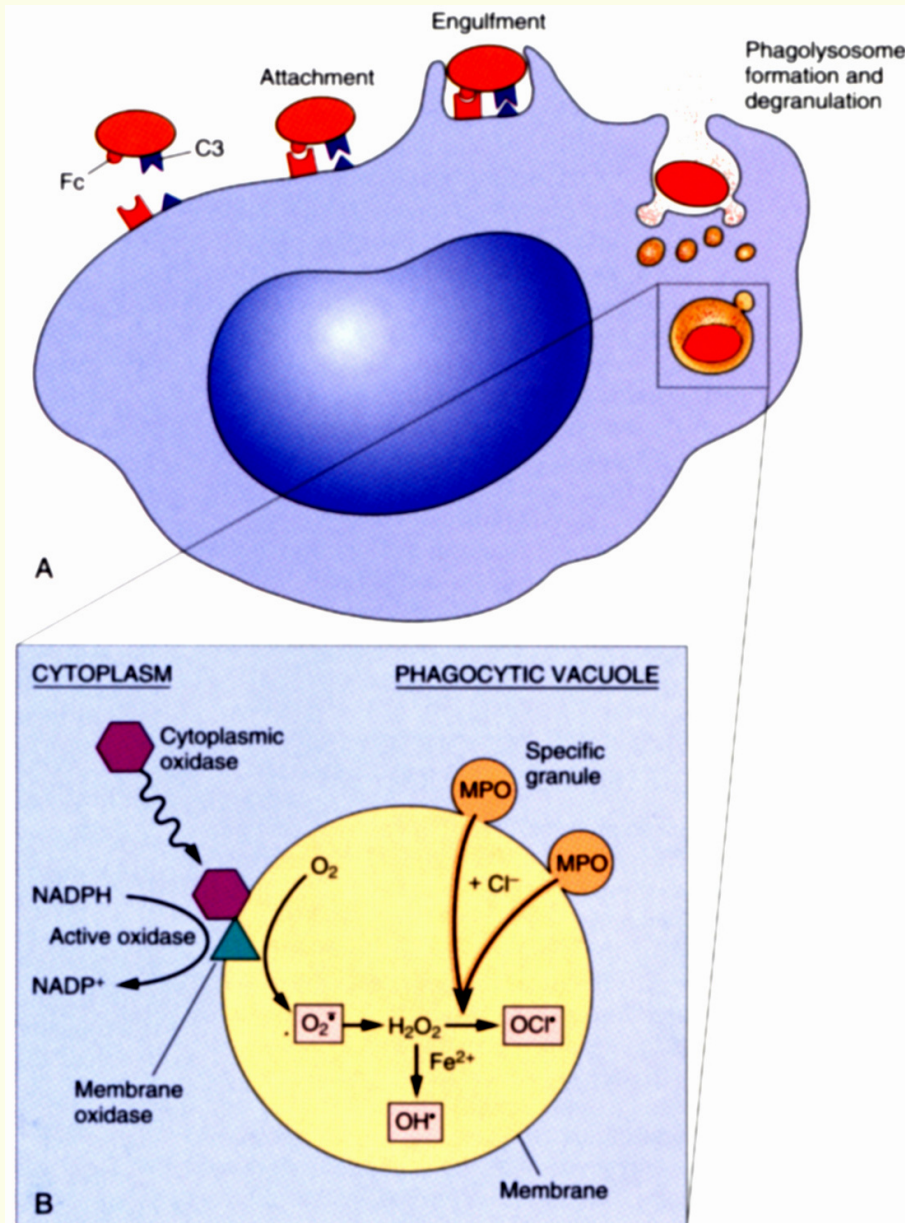
Principales protéines microbicides des granules

Components of the primary granules are released into the infection site by degranulation.

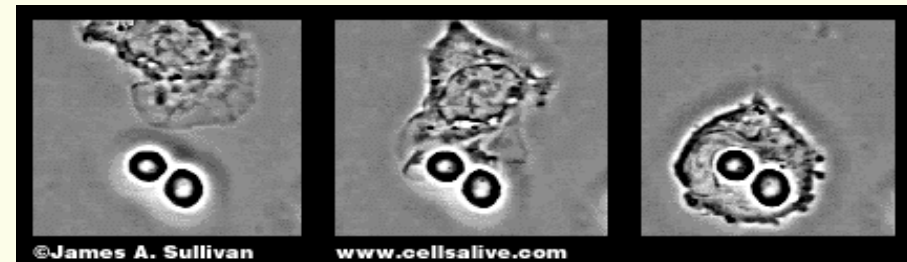
- **Lysozyme (primary and secondary granules):**
Hydrolyze peptidoglycan of bacteria cell wall.
- **Phospholipase A2 (primary granule):**
Hydrolyze phospholipids in bacteria membrane.
- **BPI (bactericidal permeability-increasing protein, primary granule):**
Disrupt bacterial membrane.
- **Defensins (primary granule):**
Disrupt bacterial membrane.
- **Serprocidins (primary granule, a family of serine proteases):**
Disrupt membrane and proteolysis.
- **Lactoferrin (Secondary granule):** Chelate iron
- **cathelicidin (Secondary granule):** antibiotic protein

**PRODUCTION DES FORMES RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE
(FRO OU ROS) PAR LES NEUTROPHILES**

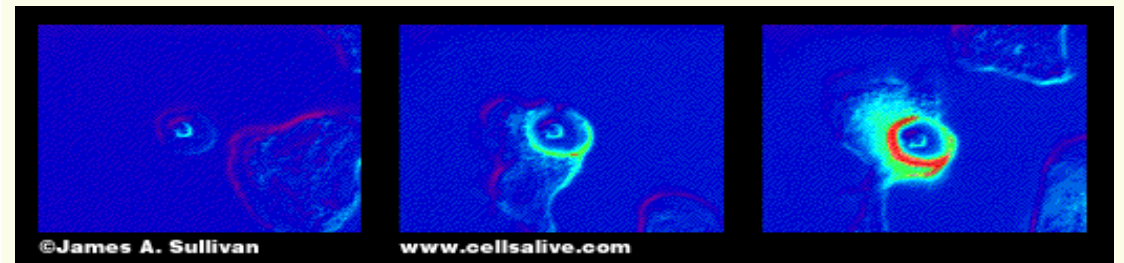
La phagocytose déclenche l'activation de la NADPH-oxydase



Après assemblage, la NADPH-oxydase est accessible aux substrats des deux versants de la membrane : au NADPH par son versant cytosolique et à l'oxygène moléculaire par son versant externe.



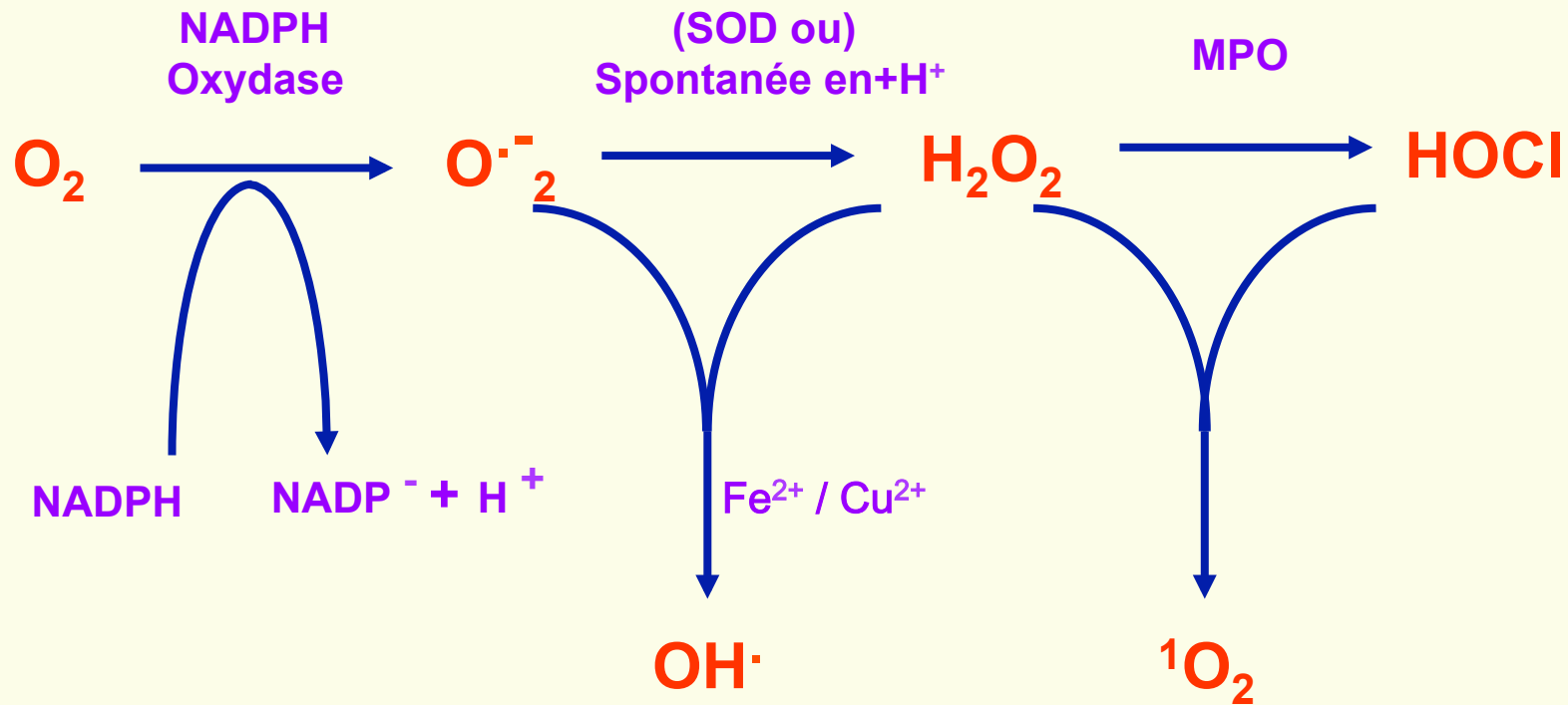
phagocytosis



Oxidative burst

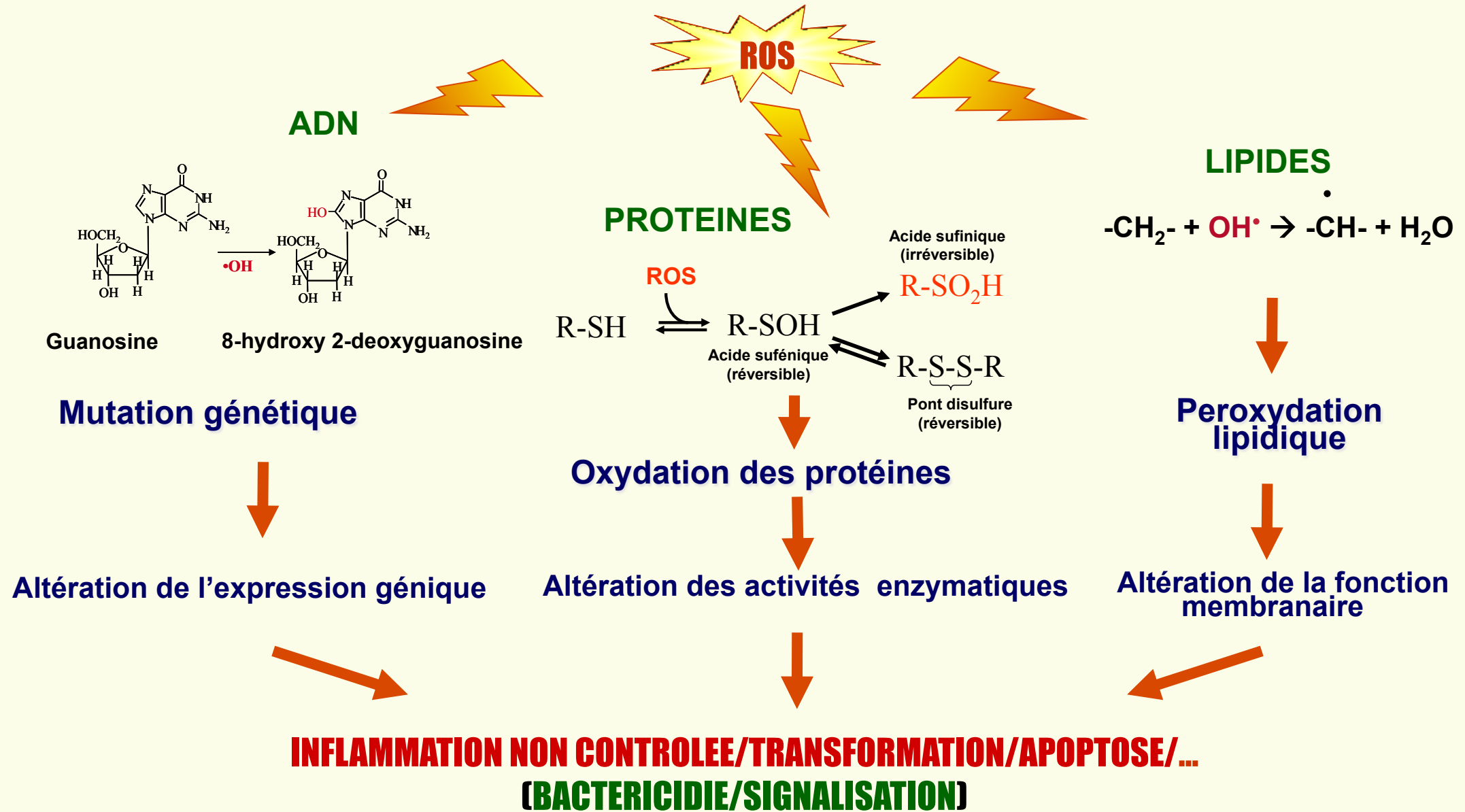
LES FORMES REACTIVES DE L' OXYGENE (FRO)

Les radicaux libres: atomes ou molécules ayant un électron non apparié ou célibataire

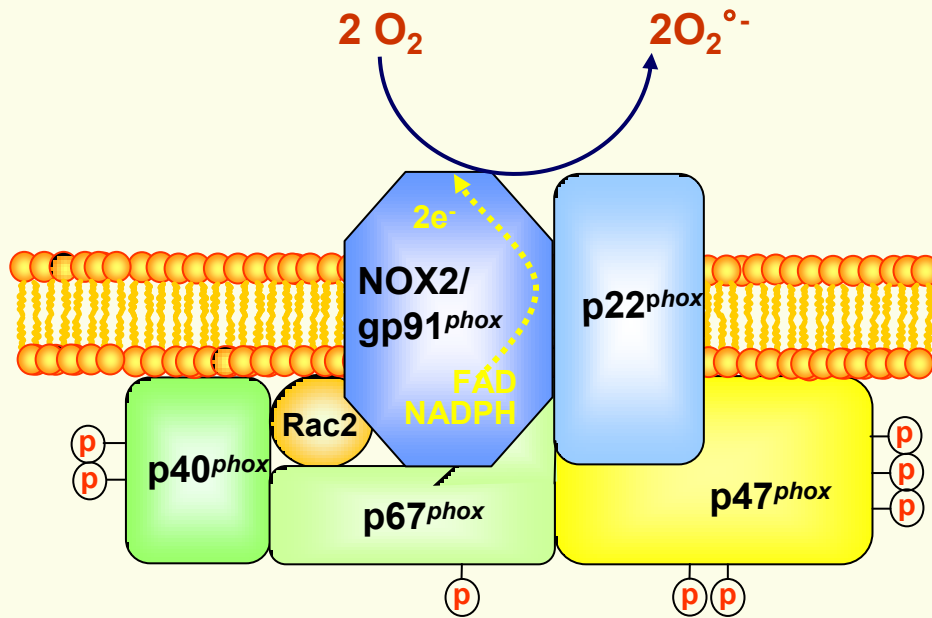


$O_2^{\cdot-}$ anion superoxyde; H_2O_2 peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée; OH^{\cdot} radical hydroxyl; HOCl acide hypochloreux; 1O_2 oxygène singulet, SOD superoxyde dismutase, MPO myélopéroxydase

Une production excessive où inappropriée de ROS peut entraîner des dommages tissulaires

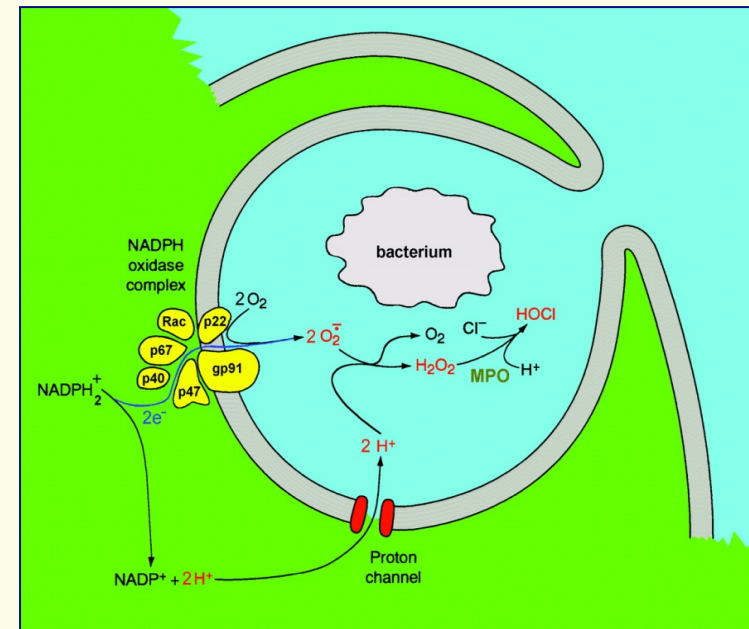


LA NADPH OXYDASE DES PHAGOCYTES / NOX2



NOX2 phagocytaire:

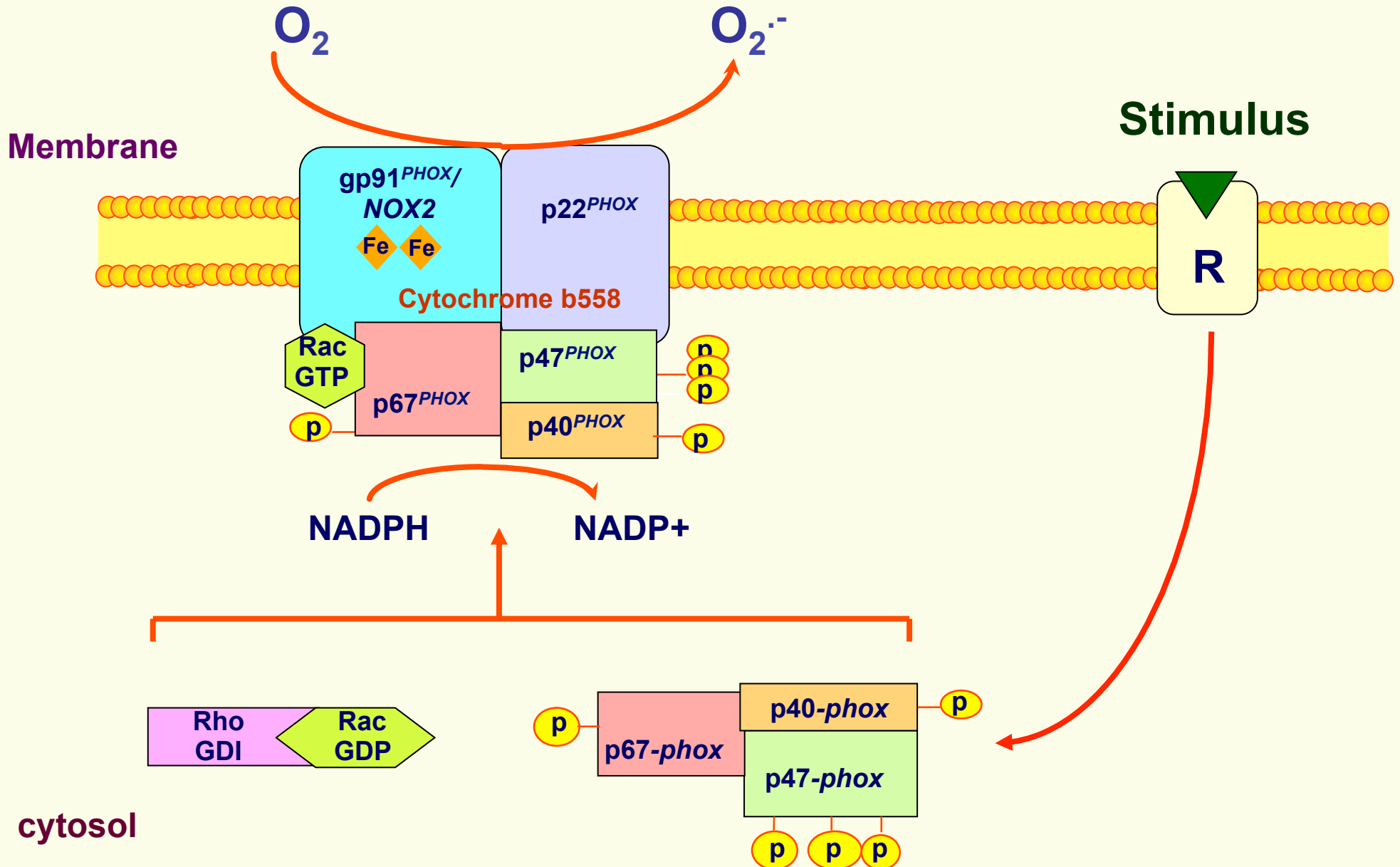
L'explosion oxydative



EXPRESSION DE NOX2:

P. Eosinophiles > Neutrophiles > Monocytes > Macrophages > C.Dendritiques

NADPH OXIDASE ACTIVATION



GRANULOMATOSE SEPTIQUE CHRONIQUE

Déficit immunitaire d'origine génétique
des différents composants de la NADPH oxydase:
infections graves et/ou répétées à bactéries et champignons

Composant affecté	Transmission génétique	Fréquence
<i>gp91 phox</i>	X	65%
<i>p22 phox</i>	AR	<5%
<i>p47 phox</i>	AR	25%
<i>p67 phox</i>	AR	5%

SIGNES CLINIQUES DE LA CGD

Déficit immunitaire avec infections graves et/ou répétées à bactéries et champignons

(S Aureus, P. aeruginosa , Salmonelle Serratia, Nocardia, Aspergillus..)

- . Abscess cutanés, hépatiques, pulmonaires, ostéomyélites
- . Lymphadénopathie, hépatomégalie, splénomégalie
- . Atteintes granulomateuses intestinales

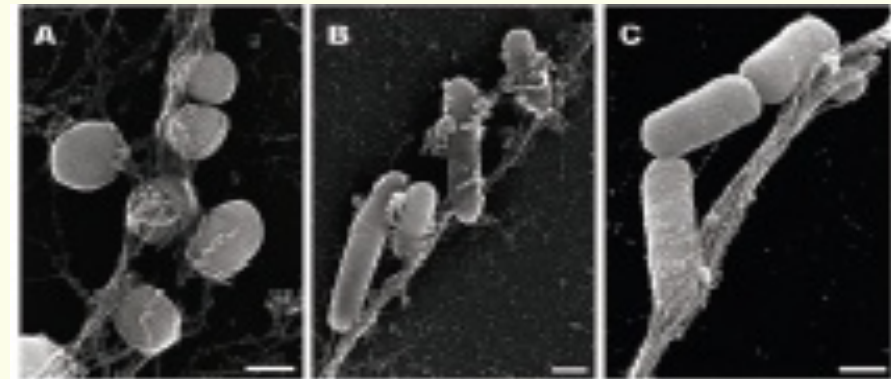
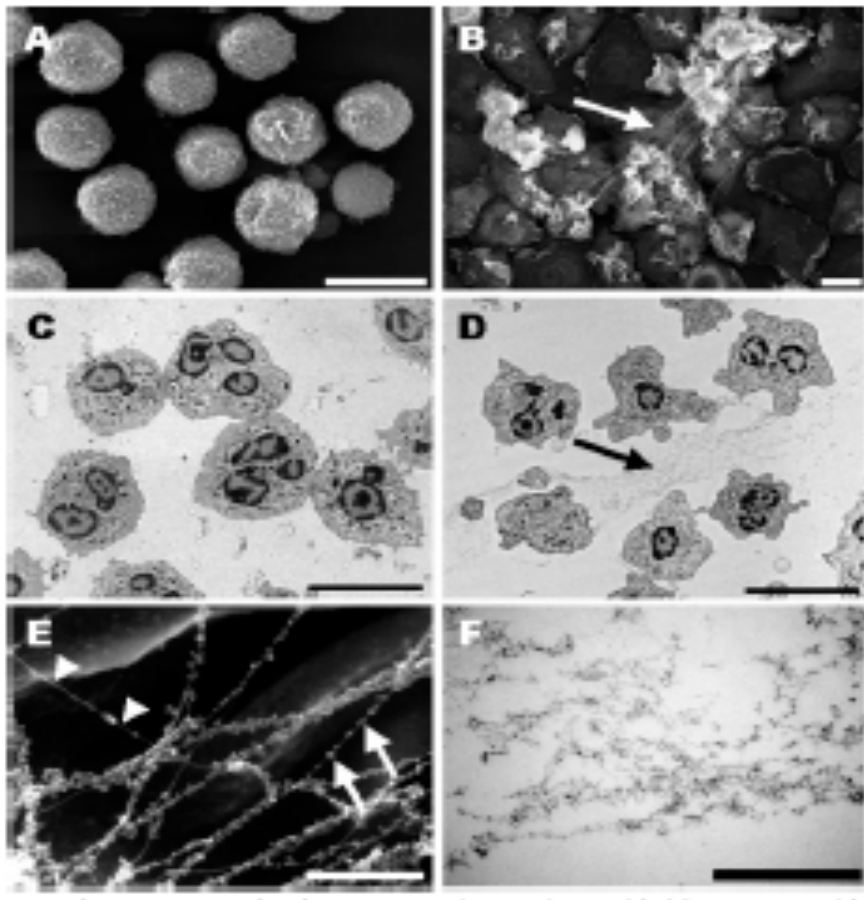
ΔG : Déficit de production de l' O₂[°] + Western Blot. Diagnostic génétique

- . Développement de lignées B-EBV déficitaires dans les composants de l' oxydase

**Service d'immunologie biologique du CHU Bichat-Cl. Bernard
Centre de référence de Diagnostic des dysfonctionnements
phagocytaires**

Formation de NETs par les PN: les PN activés se désintègrent et émettent des filets extracellulaires qui piègent les bactéries et les tuent: **Moyen de défense post-mortem**

Neutrophil extracellular traps (NETs) kill bacteria.
Brinkmann et al, Science 2004,303:1532.



Staph.

Salm.

Shig.

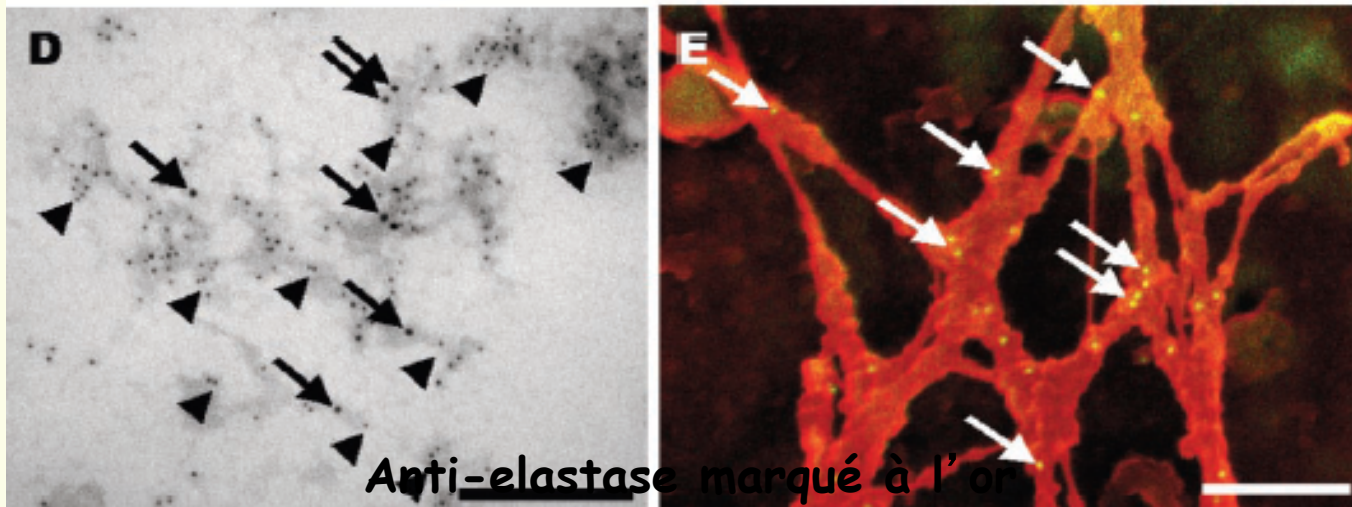
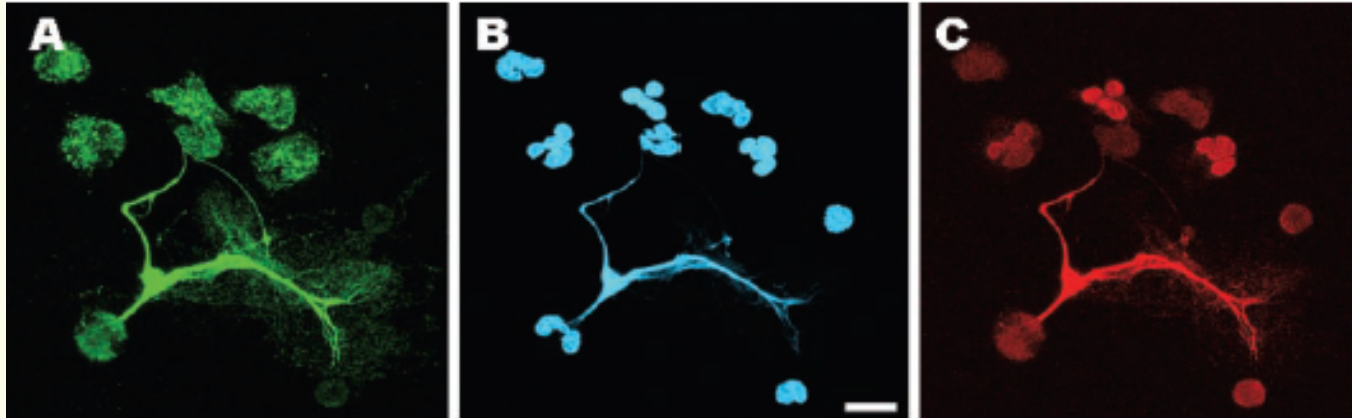
Les filets capturent les bactéries et maintiennent une concentration élevée de protéines bactéricides libérées des granulations.

Anti-Elastase

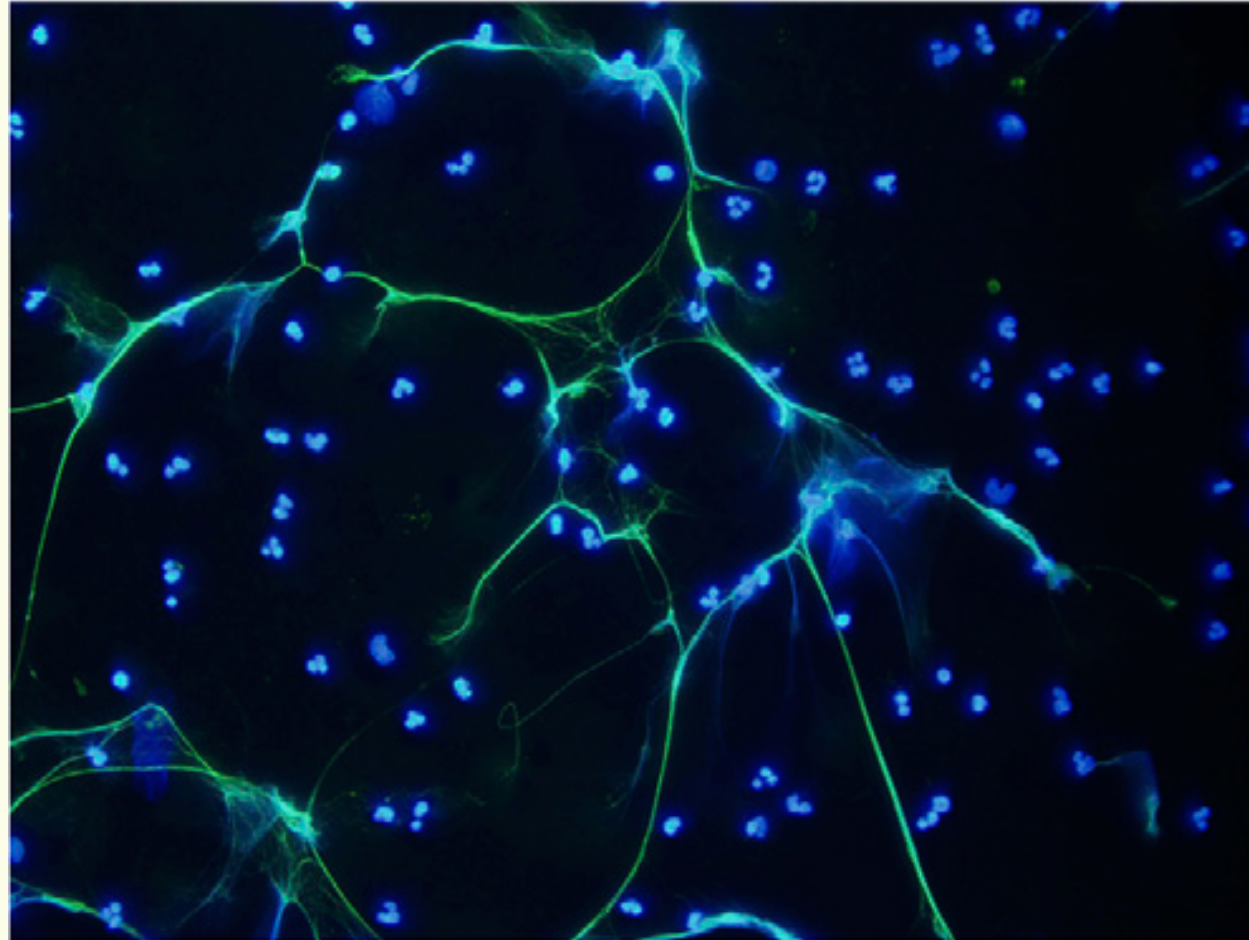
Anti-ADN

Anti-Histone-ADN

M. confocal

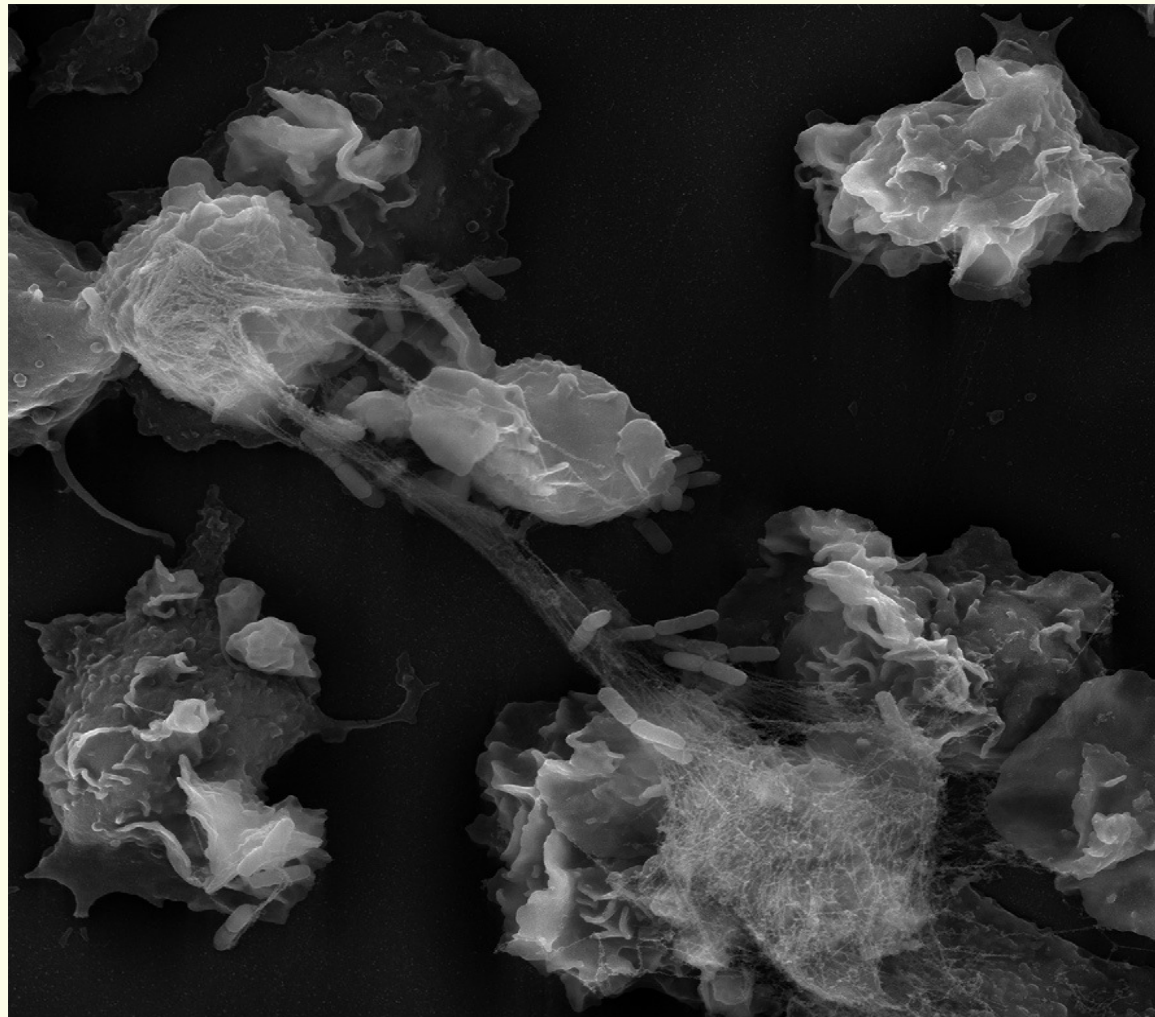


INDUCTION DES NETS PAR LE LPS (marquage Elastase et ADN)

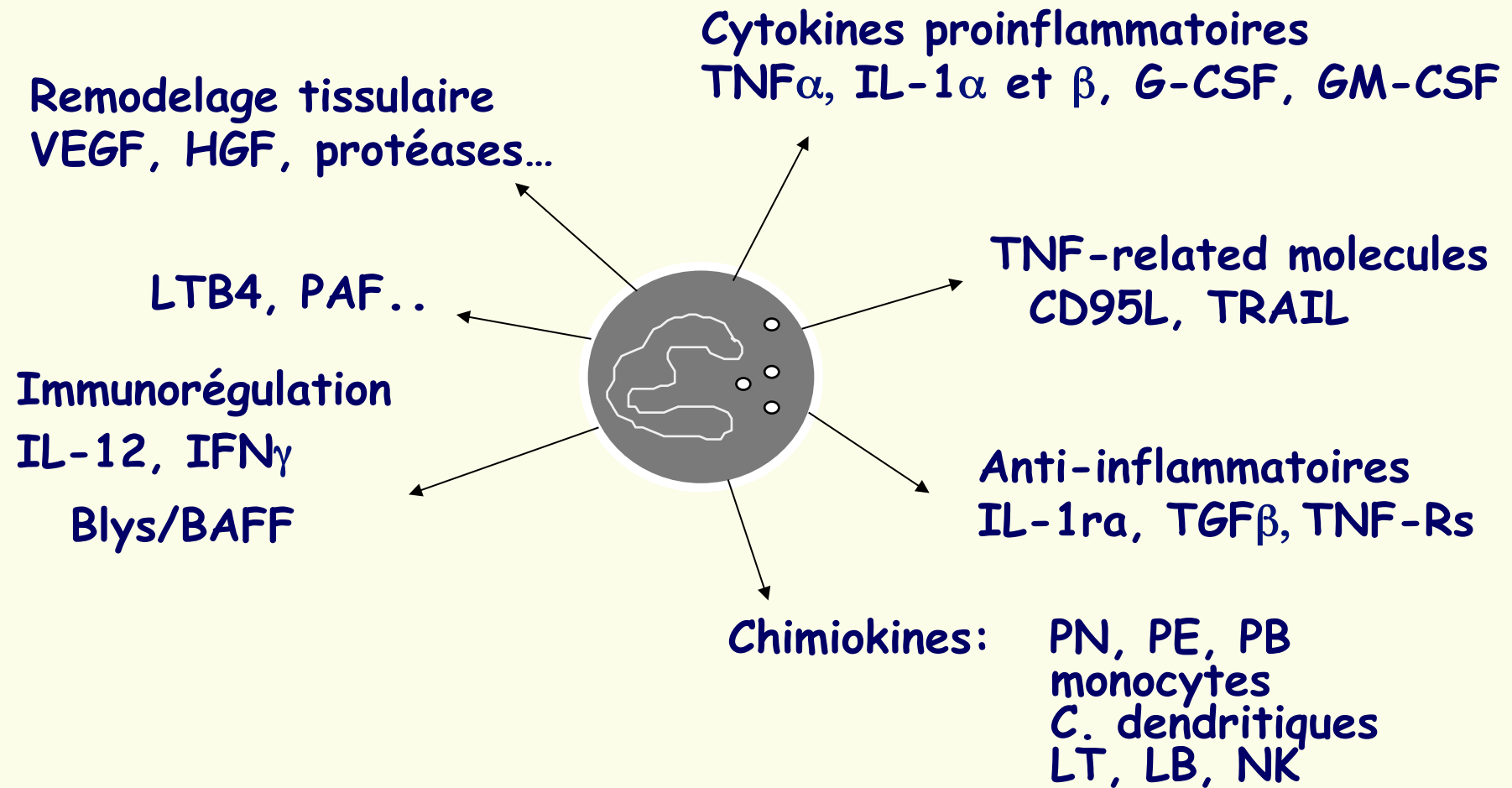


Kaplan et Radic, J.Immunol.2012

Scanning electron micrograph of *Shigella flexneri* trapped in a NET



Les monocytes/macroph (PN) régulent les réponses immunitaires innées et adaptatives: **Production de cytokines et chimiokines**



BIBLIOGRAPHIE

- Nauseef et al, Nat Immunol 2014, 15,602-611.**
- Winterbourn CC. Nat. Chem. Biol, 2008,4, 278-286.**
- El-Benna J et al. Semin Immunopathol. 2008;30,279-289.**
- Nauseef WM. Immunol Rev. 2007;219:88-102.**
- Borregaard et al, Trends in Immunol. 2007, 28, 340.**
- Nathan, Nat.Rev.Immunol. 2006, 6, 173**
- Dang et al, J.Clin.Invest. 2006,116, 2033.**
- Groemping et al, Biochem.J. 2005, 386, 401.**
- Lee et al, Microbes and Infection, 2003, 1299.**
- Babior BM. Am J Med. 2000 Jul;109(1):33-44.**
- Witko-Sarsat et al, Lab. Invest. 2000, 80, 617.**
- Saran et al, Free.Rad.Biol.Med. 1999, 26, 482.**
- Hampton et al, Blood, 1998, 92, 3007.**