

Liste des abréviations

- AIF : *Apoptosis inducing factor*
Apaf-1 : *Apoptotic protease-activating factor-1*
ASMase : Sphingomyélinase acide
Bcl-2 : *B-cell lymphoma-2*
BH : *Bcl-2 homology domain*
BIR : *Baculowial IAP repeat*
BPCO : Bronchopneumopathie chronique obstructive
BPI : *Bactericidal/permability increasing protein*
CAPP : *Ceramide activated protein phosphatase*
CARD : *Caspase recuitement domain*
Caspase : Protéinases cystéine-aspartate dépendantes (*Cysteinyl aspartate specific protease*)
DD : *Death domain*
DED : *Death effector domain*
Diablo : *Direct IAP binding protein and low pI*
DISC : *Death-inducing signaling domains DED complex*
 $\Delta\psi_m$: Potentiel trans-membranaire mitochondrial
FADD : *Fas protein with DD*
FLIP : *FLICE (caspase-8) inhibitory protein*
fMLP : formyl-Met-Leu-Pro
FRO : Formes réactives de l'oxygène
GCer : Glucosylcéramide
GM-CSF : *Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*
GSL : Glycosphingolipide
H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène
HOCl : Acide hypochloreux
Htra2 : *High temperature requirement protein A2*
IAP : Protéines inhibitrices de l'apoptose (*Inhibitor of apoptosis protein*)
ICAM-1 : *Intra cellular adhesion molecule-1*
IFN- γ : Interféron- γ
Ig : Immunoglobuline
IgA-Ic : Complexes immuns d'IgA
Il : Interleukine
Jaks : *c-jun activated kinases*
JAM : *Junctionnal adhesion molecule*
LT : Leucotriène
LCer : Lactosylcéramide
LPS : Lipopolysaccharide
LT_{h2} : Lymphocyte T auxiliaire de type 2

MAPK : *Mitogen activated protein kinase*

MBP : *Major basic protein*

MMP : Métalloprotéase de matrice

MTP : Transition de la perméabilité membranaire

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF-κB : Facteur nucléaire-κB

NSD : *Neutral sphingomyelinase activation domain*

NSMase : Sphingomyélinase neutre

PAF : Facteur d'activation plaquettaire

PECAM-1 : *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*

PI3K : Protéine kinase phosphatidyl-inositol-3

PK : Protéine kinase

PS : Phospholipide phosphatidylsérine

RAIDD : *RIP-Associated ICH-1/CED-3-homologous protein with DD*

RING : Domaine protéique "doigt à zinc"

RIP : *Receptor interacting protein*

SHPTP-2 : Protéine tyrosine phosphatase SH2

SM : Sphingomyéline

Smac : *Second mitochondria-derived activator of caspase*

S1P : Sphingosine-1-phosphate

STAT : *Signal transducer and activator of transduction*

TM : Domaine peptidique trans-membranaire

TNF : Facteur de nécrose tumoral

TRADD : *TNF-R associated protein with DD*

TRAFF2 : *TNF receptor-associated factor 2*

TRAIL : Ligands similaires au TNF-α induisant l'apoptose

XAF-1: *X-IAP associated factor-1*

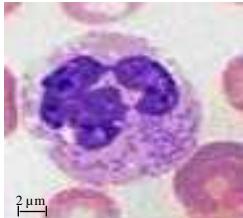
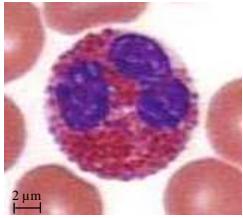
	NEUTROPHILE	EOSINOPHILE
Morphologie		
Taille	12 - 14 μm	13 - 16 μm
Nombre par litre de sang	$2,0 - 7,5 \times 10^9$	$1,3 - 3,5 \times 10^9$
Formule leucocytaire	40 - 75 %	1 - 6 %
Temps de maturation dans la moelle osseuse	6 - 9 jours	6 - 9 jours
Durée de vie dans le sang	6 - 18 h	18 - 26 h
Durée de vie dans les tissus	6 h - quelques jours	8 - 12 jours
Noyau	3 - 7 lobes	2 - 3 lobes

Tableau I. Caractéristiques cytologiques des neutrophiles et des éosinophiles (d'après Walker et Willemze, 1980 ; Giembycz et Lindsay, 1999) (Photos : Frottis sanguin, coloration hématoxylène-éosine, x 1600).

Chapitre I - Les granulocytes neutrophiles et éosinophiles

Tous les organismes vivants sont soumis à de constantes menaces d'invasion par des agents pathogènes, tels les bactéries, les virus, les champignons et les parasites multicellulaires, qui peuvent pénétrer par des brèches de la peau, ou les revêtements des tractus digestif, respiratoire et génito-urinaire. Les lésions tissulaires inhérentes à ces invasions induisent dans un premier temps une réaction immune non spécifique appelée inflammation (qui peut être aiguë ou chronique) destinée à débarrasser l'organisme des tissus morts et des corps étrangers, à remplacer la perte tissulaire par une cicatrice et, dans certains cas, à régénérer un tissu normal. Les granulocytes sont les premières cellules de l'immunité à être recrutées au site de l'inflammation où ils s'accumulent en grand nombre et exercent une variété de réponses cellulaires contre les agents pathogènes. L'abondance des granulocytes dans le sang ainsi que l'efficacité de leur recrutement et de leur action contre le pathogène en font une ligne de défense essentielle du système immunitaire inné. Il est à noter que les granulocytes sont également impliqués dans des maladies inflammatoires aberrantes telles que l'allergie, maladies où l'agent causal est inoffensif (Durham et Church, 2001).

Le rôle des granulocytes a longtemps été sous-estimé, les reléguant le plus souvent à de simples marqueurs du degré de sévérité d'un processus inflammatoire. Cependant, au cours des dernières dizaines d'années, le regard scientifique porté à ces cellules s'est profondément modifié grâce notamment aux énormes progrès réalisés en matière d'investigation expérimentale tant dans les domaines de la biochimie, de la biologie moléculaire et cellulaire que dans celui des sciences cliniques. Des nombreux travaux réalisés, il ressort désormais que les granulocytes et en particulier les deux types majoritaires, neutrophiles et éosinophiles, sont des cellules immunes à fonctions multiples regroupant les caractéristiques de cellules cytotoxiques (capables de libérer des protéines cytolytiques, de produire des formes réactives de l'oxygène (FRO) de cellules inflammatoires (capables de libérer des médiateurs de l'inflammation, des facteurs de croissance, facteurs angiogéniques et de remodelage tissulaire, *etc*) et de cellules immunorégulatrices (capables d'orienter la réponse immune).

Les granulocytes ont été découverts par l'anatomiste anglais Thomas Wharton Jones en 1846 qui, en étudiant le comportement des cellules sanguines en milieu hypotonique, a observé que certaines cellules blanches, remplies de granules, résistaient au choc osmotique (Jones, 1846). C'est en 1879, après avoir mis au point une technique de coloration de frottis sanguins que Paul Erhlich identifia les 3 types de granulocytes : les neutrophiles, les éosinophiles, et les basophiles (Erhlich, 1879). Le tableau I reprend les caractéristiques cytologiques des deux types granulocytaires neutrophiles et éosinophiles. Les granulocytes, également appelés leucocytes polymorphonucléaires en rapport à la forme particulière multilobée de leur noyau, ont un cytoplasme rempli de différents types de granules. En fonction de leur rôle et de leur apparition dans les cellules au cours de leur différenciation, quatre classes de granules ont été identifiées. Les tableaux II et IV (voir chapitre I.2, p. 6 et 9, relatif la fonction des granulocytes) répertorient, de façon non exhaustive, la composition des granules des neutrophiles et des éosinophiles.

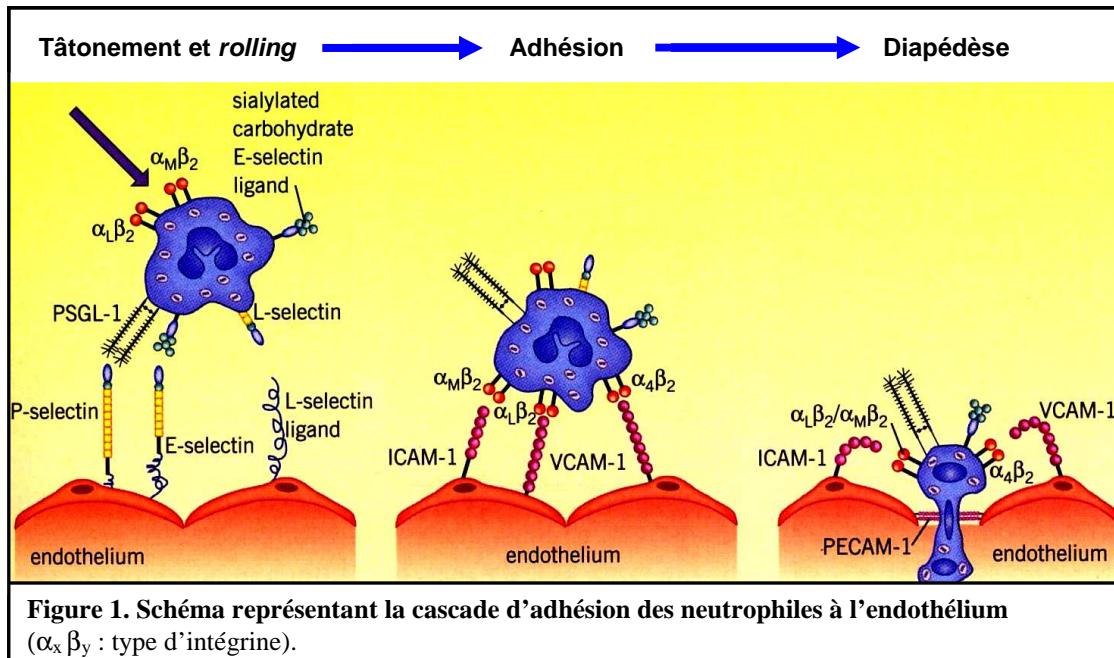
Les granulocytes sont formés à partir d'un processus de l'hématopoïèse appelé la myélopoïèse. Chez l'homme adulte, la myélopoïèse se déroule au niveau de la moelle de certains os ; les os plats du squelette comme les côtes et le sternum, la colonne vertébrale, le pelvis et l'extrémité proximale des fémurs. Une fois complètement différenciés, les granulocytes sont soit libérés dans la circulation, soit sont stockés dans la moelle osseuse. Ce stock représente 15 à 20

fois la masse des granulocytes sanguins. La moelle osseuse ne sert donc pas uniquement d'organe de production de granulocytes mûrs pour une utilisation journalière mais sert également de réservoir de cellules fonctionnelles utilisables quotidiennement pendant environ une semaine (Dancey *et al.*, 1976 ; Walker et Willemze, 1980). Les granulocytes exercent leurs fonctions au niveau des tissus, alors que le sang ne fait qu'assurer leur transport entre les lieux de formation, de réserve et d'activité. Dans la circulation, tous les granulocytes ne se trouvent pas en suspension dans le plasma. Une partie d'entre-eux restent "sédentaires" et sont temporairement exclus de la circulation par vasoconstriction des capillaires sanguins ou, comme dans le poumon par exemple, à la périphérie des vaisseaux, adhérant à l'endothélium. On distingue donc deux compartiments, l'un dit circulant, l'autre dit de margination. Il y a un échange permanent entre les cellules des 2 compartiments et il y a plus ou moins le même nombre de granulocytes dans chacun des compartiments. Le nombre de granulocytes circulant dépend des demandes tissulaires. En cas d'inflammation, l'accumulation des granulocytes n'implique pas nécessairement une augmentation de la production par la moelle osseuse mais peut être le résultat de libération des granulocytes fonctionnels depuis le compartiment de margination vers le compartiment circulant (Athens *et al.*, 1961).

I.1. Recrutement tissulaire des granulocytes

Comme il a été décrit précédemment, les granulocytes dans le sang sont répartis en un pool circulant et un pool de margination. En l'absence d'inflammation, ce pool de margination comprend les granulocytes momentanément arrêtés dans les capillaires étroits des muqueuses principalement pulmonaires et digestives. Cette rétention physiologique dans les capillaires semble être un processus mécanique dû à la faible déformabilité des granulocytes et n'implique pas d'adhésion cellulaire à proprement parler (Yoder *et al.*, 1990 ; Mizgerd *et al.*, 1996 ; Doyle *et al.*, 1997 ; Yamaguchi *et al.*, 1997). Cependant la présence dans le sang des granulocytes est temporaire. En effet, notre corps étant continuellement la cible d'infections et d'agressions extérieures, la plupart de ces cellules vont se retrouver dans les tissus. Ainsi, par exemple, on estime la concentration tissulaire en éosinophiles 100 fois supérieure à celle du sang (Kato *et al.*, 1998 ; 2001 ; Rothenberg *et al.*, 2001). Lorsqu'un tissu est infecté par un micro-organisme ou qu'un épithélium est placé en contact d'une substance allergénique/pathogénique, l'événement initial du recrutement des granulocytes est l'apparition au niveau de l'endothélium des capillaires avoisinant les muqueuses affectées de molécules d'adhésion induites par des médiateurs inflammatoires, tels que le facteur de nécrose tumoral (TNF)- α et l'interleukine (IL)-1 β relâchés par les tissus endommagés. Il en résulte une extravasation locale de leucocytes.

Dans les veinules post-capillaires et les capillaires de certaines muqueuses (comme les muqueuses pulmonaires et digestives) la lenteur du flux sanguin, encore réduite par la dilatation des vaisseaux adjacents au site inflammatoire, permet un tâtonnement cellulaire des granulocytes, appelé *rolling*, le long de l'endothélium. Les neutrophiles et éosinophiles expriment à leur surface différents types de molécules d'adhésion, ce qui les rend différemment sensibles aux types de molécules d'adhésion exprimées par les cellules de l'endothélium. L'expression des molécules d'adhésion par les granulocytes est inductible par différentes cytokines et autres médiateurs de l'inflammation (tels le TNF- α , le GM-CSF [*Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*], le facteur d'activation plaquettaire [PAF], la substance P, les lipopolysaccharides [LPS], l'interféron [IFN]- γ , etc). Cette importante étape de sensibilisation des granulocytes est appelée *priming* (Guthrie *et al.*, 1984 ; Williams et Solomkin, 1999 ; Seely *et al.*, 2003 ; Stie et Jesaitis, 2007). L'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales est également variable en fonction du type



de tissus enflammés et du type de réaction inflammatoire (allergique, bactérienne, virale ou parasitaire). Le schéma proposé en figure 1 montre, en exemple, la cascade d'adhésion des neutrophiles à l'endothélium. L'étape de *rolling* est réalisée grâce à des sélectines-L exprimées constitutivement à la surface des granulocytes et des sélectines-P et -E nouvellement exprimées à la surface des cellules endothéliales adjacentes au site inflammatoire. Les sélectines-P et -E interagissent avec des ligands carbohydrate situés au sommet des microvillosités des granulocytes (Moore *et al.*, 1995 ; Teixeira *et al.*, 1995 ; Wardlaw *et al.*, 1995 ; Knol et Roos, 1996 ; Steegmaier *et al.*, 1997). Ces interactions sont de faible affinité et sont rapidement détruites suite aux forces produites par la circulation sanguine. Les granulocytes sont donc simplement ralentis et "roulent" à la surface de l'endothélium. Les ligands carbohydrate situés au sommet des microvillosités des granulocytes peuvent en plus d'interagir avec les ligands endothéliaux être liés par les sélectines-L d'autres granulocytes leur permettant ainsi de rouler sur des granules adhérents à l'endothélium (Bargatze *et al.*, 1994 ; Alon *et al.*, 1996). Ce second tâtonnement pourrait agir en synergie avec le premier pour augmenter l'accumulation granulocytaire au niveau des endothéliums du site inflammatoire.

Au niveau du site inflammatoire, l'endothélium des capillaires produit des substances chimio-attractantes communes ou spécifiques aux neutrophiles ou/et aux éosinophiles. Le tableau V (voir chapitre I.2.2, p. 10, relatif à l'immunocompétence des granulocytes), relatif à l'immunocompétence des granulocytes) répertorie de manière non exhaustive les chimiokines communes et spécifiques aux deux types granulocytaires.

Ralentis par le *rolling*, les granulocytes se fixent et adhèrent aux cellules endothéliales par établissement d'interactions de plus forte affinité entre des intégrines- $\beta 1$ et - $\beta 2$ exprimées par les granulocytes et des endothélines, telles que ICAM-1 (*Intracellular adhesion molecule-1*), exprimées à la surface des cellules endothéliales (Kimani *et al.*, 1988 ; Smith, 2000). Une fois les interactions intégrines-endothélines fixées, les granulocytes cessent de rouler et adhèrent à la surface de l'endothélium. A ce moment, leur cytosquelette se réorganise et les cellules s'étendent à la surface de l'endothélium qu'elles s'apprêtent à traverser. Ce mécanisme de transmigration plus communément appelé diapédèse s'effectue principalement au bord des cellules endothéliales là où des discontinuités des jonctions serrées, liées à l'inflammation, sont observées. Cependant, l'extravasation requiert des modifications des jonctions adhérentes intercellulaires de l'endothélium. Le passage de la partie baso-latérale à la partie apicale de la couche épithéliale, qui représente souvent plus de deux fois la taille d'un granulocyte, implique une série complexe d'événements d'adhésion et de dé-adhésion induits par des forces mécaniques et chimio-attractantes. Deux molécules d'adhésion cellulaire sont impliquées dans la transmigration des granulocytes : PECAM-1 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) et JAM (*Junctional adhesion molecule*). PECAM-1 est exprimé tant par les granulocytes qu'au niveau des jonctions entre les cellules endothéliales et favorise l'extravasation des granulocytes par des interactions homophiliques PECAM-1/PECAM-1. JAM est quant à lui uniquement présent au niveau des jonctions serrées de l'endothélium (Chiba *et al.*, 1999 ; Smith, 2000).

Les granulocytes se déplacent par haptotaxie, c'est-à-dire en suivant un gradient de substances chimio-attractantes immobilisées sur les fibres de la matrice extracellulaire plutôt que solubles. Les granulocytes migrent dans le tissu selon un processus en plusieurs étapes répondant à une source d'agonistes puis à une autre, *etc*. La migration granulocytaire à travers la matrice extracellulaire est assurée par des intégrines de type- $\beta 1$, - $\beta 2$, - $\beta 3$ et les récepteurs à la laminine, à la fibronectine et à la vitronectine. Ces récepteurs initialement séquestrés dans les granules sont rapidement exprimés à la surface des cellules dès qu'un stimulus chimio-attractant est perçu par la cellule (Bohnsack *et al.*, 1995 ;

Hendey *et al.*, 1996 ; Roussel *et al.*, 1997 ; Loike *et al.*, 1999). La locomotion granulocytaire implique la formation continue de nouveaux contacts adhésifs à l'avant de la cellule alors qu'à l'arrière la cellule doit se détacher de son substrat (Lauffenburger et Horwitz, 1996). Dans de nombreuses maladies inflammatoires, les granulocytes finissent par migrer à travers un épithélium polarisé pour s'accumuler à la surface lumineuse de cet épithélium (Seminario et Gleich, 1994 ; Lukacs *et al.*, 1995 ; Parkos, 1997 ; Erjefalt *et al.*, 2004).

I.2. Fonction des granulocytes

D'un point de vue patho-physiologique, les granulocytes sont, avec les macrophages, les cellules sentinelles de l'immunité non spécifique. Leur recrutement au site de l'inflammation et leur activation subséquente ne nécessite pas de reconnaissance préalable du pathogène par des cellules présentatrices d'antigène. Bien que la distinction entre les rôles spécifiques de chacun des deux sous-types granulocytaires ne soit pas clairement définie, les neutrophiles sont généralement impliqués dans la défense de l'organisme contre des pathogènes unicellulaires de taille micrométrique (bactéries, amibes, leishmanies, *etc*), alors que les éosinophiles, leur rôle serait surtout de lutter contre les organismes parasites pluricellulaires (helminthes). En effet, il a été constaté qu'une hyper-éosinophilie systémique ainsi qu'une concentration sérique en immunoglobuline (Ig) E importante étaient associées aux infestations parasitaires de type helminthoïde. De plus, il a été démontré *in vitro*, par des expériences de cytotoxicité dépendante d'anticorps vis-à-vis de larves de parasites, que les éosinophiles étaient nécessaires à leur élimination, en particulier au stade larvaire, c'est-à-dire lorsque les parasites sont les plus infectieux (Gaulfield *et al.*, 1980 ; Sher *et al.*, 1990 ; Gounni *et al.*, 1994 ; Taverne et Bradley, 1998 ; Meeusen et Balic, 2000 ; Dombrowicz et Capron, 2001). Les maladies parasitaires constituent toujours un grave problème de santé publique essentiellement dans les pays en voie de développement. Les granulocytes et en particulier les éosinophiles sont également impliqués dans le développement d'inflammations à composante allergique telles qu'observées dans l'asthme ou la rhinite allergique (Busse et Lemanske, 2001 ; Nathan, 2007).

I.2.1. Fonction cytotoxique des granulocytes

Pour assurer leur rôle de cellules effectrices de l'immunité, les granulocytes ont développé différents mécanismes pour détruire les pathogènes. En fonction de la taille et de l'abondance du pathogène, les granulocytes ont plusieurs modes d'action. Si le pathogène est de taille micrométrique, les granulocytes auront la capacité de l'internaliser et de le détruire "proprement" par phagocytose. Ce processus permet d'éviter la libération dans le milieu extérieur de molécules pouvant occasionner des dégâts à l'hôte et encourager le processus inflammatoire. Par contre, si le pathogène est de trop grande taille ou trop abondant, les granulocytes libéreront, par un mécanisme dit de "dégranulation", le contenu de leurs granules dans le milieu extracellulaire. Les mécanismes cytotoxiques peuvent être dépendants de l'oxygène ou non. Chacun des deux sous-types de granulocytes en fonction de leurs particularités intrinsèques réagiront différemment. Les neutrophiles ont une activité phagocytaire beaucoup plus importante que les éosinophiles. Ceux-ci exercent préférentiellement leur rôle cytotoxique par différentes formes de dégranulation.

I.2.1.1. Fonction cytotoxique du neutrophile

I.2.1.1.1. La phagocytose

Le terme "phagocytose" est réservé au mécanisme d'ingestion de particules de tailles supérieures au micromètre. Le processus d'internalisation est fonction de la taille des particules, et le processus de phagocytose diffère clairement de celui de l'endocytose, lequel permet l'internalisation de matériel soluble de taille inférieure au micromètre. Le phénomène de phagocytose a été observé, pour la première fois par Ilya Mechnikov dans les années 1880, sur les larves d'étoiles de mer, dont certaines cellules étaient capables d'ingérer une substance étrangère délibérément introduite dans ces organismes. Il étendit ensuite ses études aux organismes supérieurs et fut le premier à décrire la capacité des cellules blanches du sang des vertébrés à migrer vers des sites infectieux et à ingérer et détruire des bactéries vivantes. Il conclut alors que la phagocytose était sans doute une caractéristique essentielle pour la défense de l'hôte (Weissmann, 1988).

La première étape de la phagocytose est la reconnaissance par le neutrophile de sa cible. Il peut la reconnaître directement en interagissant avec des motifs moléculaires exprimés à la surface de la cible qu'il considère comme étrangers. Par exemple, les peptidoglycans produits par les bactéries Gram positives ou les LPS générés par les bactéries Gram négatives sont reconnus par le neutrophile comme étant des molécules étrangères. Cependant, la reconnaissance et l'ingestion des cibles par les neutrophiles sont fortement augmentées si celles-ci sont opsonisées par des protéines du sérum de l'hôte, tels que les anticorps spécifiques ou des fragments du complément. L'interaction entre les ligands et les récepteurs de surface des neutrophiles tels que le CD14 (Worthen *et al.*, 1992) ou les récepteurs Toll-like (TLR ; *Toll-like receptors*) (Kurt-Jones *et al.*, 2002) induit des réponses cellulaires spécifiques. Ces interactions provoquent les modifications de la membrane et du cytosquelette menant à l'encerclement de la cible. Mais elles contribuent également au processus de dégranulation, à la libération d'enzymes cytolytiques, à l'activation de la flambée oxydative et à l'activation des voies métaboliques menant à la génération des médiateurs de l'inflammation (Stuart et Ezekowitz, 2005). Suite à la reconnaissance des particules, l'internalisation se réalise par une invagination de la membrane cytoplasmique couplée à une extension latérale de celle-ci en pseudopodes grâce à une réorganisation du cytosquelette et à la polymérisation orientée de filaments d'actine. Par un mécanisme proche de celui d'une fermeture éclair, les pseudopodes progressent le long de la particule par fixation en chaîne de récepteurs membranaires du neutrophile aux structures antigéniques exprimées à la surface de la particule cible. Les pseudopodes finissent par se rencontrer et fusionnent pour former une vésicule : le phagosome (Silverstein *et al.*, 1997 ; Gagnon *et al.*, 2002 ; Swanson et Hoppe, 2004 ; Stuart et Ezekowitz, 2005). Une fois formé, le phagosome fusionne avec des granules, les lysosomes, pour former le phagolysosome.

I.2.1.1.2. Mécanismes cytotoxiques indépendants de l'oxygène

Le neutrophile possède plusieurs mécanismes oxydatifs et non oxydatifs pour détruire et éliminer les particules pathogéniques ingérées. Les mécanismes non oxydatifs sont exécutés principalement par des polypeptides antimicrobiens qui résident pour la plupart dans les nombreux granules cytoplasmiques de la cellule et en particulier dans les granules azurophiles. Ces molécules bloquent la machinerie enzymatique des pathogènes. Agissant conjointement avec