




OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/21641>

To cite this version:

Dupont, Christophe . *Les granulocytes neutrophiles : morphologie, fonctions et méthodes de quantification dans l'espèce bovine*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2018, 78 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

LES GRANULOCYTES NEUTROPHILES : MORPHOLOGIE, FONCTIONS ET METHODES DE QUANTIFICATION DANS L'ESPECE BOVINE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

DUPONT Christophe

Né, le 27 décembre 1992 à RIO DE JANEIRO (Brésil)

Directeur de thèse : M. Gilles FOUCRAS

JURY

PRESIDENT :
M. Gérard CAMPISTRON

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Gilles FOUCRAS
M. Renaud MAILLARD

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directrice : **Madame Isabelle CHMITELIN**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*

Remerciements

A mon président de thèse,

Monsieur le Professeur Gérard CAMPISTRON

Professeur des universités

Praticien hospitalier

Physiologie – Hématologie

*Qui m'a fait le plus grand honneur d'accepter la présidence de mon jury
de thèse,*

Hommages respectueux.

A mon jury de thèse,

Monsieur le Professeur Gilles FOUCRAS,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des ruminants

*Qui m'a fait l'honneur de proposer ce projet et m'a soutenu tout au long
de son élaboration.*

*Veillez accepter l'expression de mon entière reconnaissance et
remerciements.*

A Monsieur le Professeur Renaud MAILLARD

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des ruminants

*Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse.
Sincères remerciements.*

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	2
Liste des figures	4
Liste des tableaux	5
Introduction	6
1 Les granulocytes neutrophiles	8
1.1 Présentation générale	8
1.1.1 Morphologie	8
1.1.1.1 A l'échelle cellulaire	8
1.1.1.2 Contenu subcellulaire : granules et vésicules	9
1.1.1.2.1 Les granules primaires.....	10
1.1.1.2.2 Granules sans peroxydase.....	11
1.1.1.2.3 Les vésicules sécrétoires	11
1.1.1.3 Hématopoïèse et différenciation	12
1.1.1.4 Contrôle de la différenciation cellulaire en neutrophile	14
1.1.1.5 Distribution des neutrophiles entre tissus	17
1.1.2 Migration lors d'inflammation aigüe	19
1.1.2.1 Recrutement	19
1.1.2.1.1 Les cytokines	20
1.1.2.1.2 Les chimiokines	20
1.1.2.1.3 Les molécules vaso-actives.....	21
1.1.2.2 Rolling et adhésion.....	22
1.1.2.3 Diapédèse	23
1.1.2.4 Production et libération de cytokines.....	24
1.2 Les neutrophiles comme effecteurs de l'immunité	25
1.2.1 Rôle dans l'immunité innée	25
1.2.1.1 Phagocytose et explosion respiratoire.....	26
1.2.1.1.1 Internalisation des agents pathogènes	26
1.2.1.1.2 L'environnement oxydatif des phagosomes	26
1.2.1.2 La bactéricidie non oxydative : le rôle des granules spécialisés	30
1.2.1.3 Nétose	30
1.2.1.4 Recrutement cellulaire.....	31
1.2.2 Immunité adaptative : présentation d'antigènes par les PNN	33
1.2.3 Apoptose et survie des PNN lors d'infection	33
1.2.4 Propriétés anti-tumorales	35
1.3 Spécificités relatives à l'espèce bovine	36
1.3.1 Les médiateurs de l'inflammation chez l'espèce bovine	37
1.3.2 Les mécanismes de défense permis par les neutrophiles chez les bovins	39
1.4 Les marqueurs de l'inflammation chez les bovins	41
1.4.1 Leucogramme	42
1.4.1.1 Valeurs usuelles	42
1.4.1.2 Variations physiologiques	42
1.4.1.3 Variations lors d'états inflammatoires.....	43
1.4.2 Les protéines de la phase aigüe.....	45
1.4.2.1 L'Haptoglobine (Hp)	45
1.4.2.2 SAA.....	46
1.4.2.3 α 1- AGP.....	47

1.4.3	Myéloperoxydase	47
1.4.3.1	Structure et localisation	47
1.4.3.2	Rôle biologique	48
1.4.3.3	Techniques de mesure et lien avec la quantité de neutrophiles	52
2	Analyse systématique des molécules spécifiques des neutrophiles	54
2.1	Introduction.....	54
2.2	Matériel et méthodes	55
2.3	Résultats	56
2.3.1	Méthodes décrites pour les espèces murine et humaine :	56
2.3.1.1	Automatisation avec coloration Giemsa	57
2.3.1.2	Les protéines membranaires de surface	57
2.3.1.3	Les molécules intracellulaires	61
2.3.2	Chez les bovins	64
2.4	Discussion et possibles applications	66
3	Conclusion	72
	Références :	73

Liste des figures

Figure 1: Morphologie d'un neutrophile en microscopie optique ² et microscopie électronique à transmission	9
Figure 2: Hématopoïèse des cellules sanguines.....	13
Figure 3: Etapes de la granulopoïèse neutrophilique.....	14
Figure 4: Mécanismes de la différenciation et de la libération des neutrophiles au sein de la moelle épinière ³	16
Figure 5 : Activation et assemblage de la NADPHoxydase ²⁴	28
Figure 6 : interaction des neutrophiles avec les macrophages (d'après Kumar ³¹).....	32
Figure 7 Dynamique de la réponse leucocytaire aux infections bactériennes chez les bovins ^{35,60}	44
Figure 8: Structure du noyau hémique de la MPO humaine ⁶⁹	48
Figure 9: Produits formés par action oxydante de HOCl et réactions d'HOCl avec d'autres espèces activées de l'oxygène et de l'azote. ⁶⁷	50
Figure 10: Schéma d'un cytomètre de flux ⁷⁵	58

Liste des tableaux

Tableau 1 : Molécules effectrices dans la granulopoïèse	17
Tableau 2 : Ligands de Mac-1 et leurs effets sur l'apoptose des neutrophiles (d'après Kebir et Filep ³⁴).....	35
Tableau 3 : Numération et formule sanguine chez le bovin adulte ⁵⁸	42
Tableau 4 : Récapitulatif des Antigènes Neutrophiliques humains et leurs caractéristiques d'après Fung et al. (2011) ⁷⁶	59.
Tableau 5 : Caractéristiques et fonctions des sous-types de neutrophiles (d'après Christofferson et Phillison ¹⁰⁵).....	67

Introduction

Du point de vue didactique, le système immunitaire est décomposé en deux systèmes complémentaires : le compartiment inné et le compartiment adaptatif. Cette subdivision est loin d'être tranchée comme nous pourrions le voir ultérieurement

Les cellules épithéliales au contact avec le milieu extérieur, les neutrophiles et les macrophages résidents dans les tissus, les cellules Natural Killer (NK) pour la partie cellulaire les anticorps ainsi que le système du complément et diverses protéines solubles pour la partie moléculaire sont classés comme acteurs de l'immunité innée. Il s'agit de l'immunité la plus rudimentaire, présente également dans les organismes les plus simples, elle devient de plus en plus élaborée au cours de l'évolution. Elle permet une réponse non-spécifique de l'agent agresseur, même si elle est particulière à chaque catégorie d'agents susceptibles de la mobiliser, rapide et spontanée, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'apprentissage nécessaire. Elle est principalement un héritage génétique, même si les travaux les plus récents montrent qu'une forme d'apprentissage et de mémoire existe aussi pour ce versant de l'immunité. La coévolution entre les micro-organismes et les organismes supérieurs a permis de sélectionner des récepteurs et des mécanismes capables de reconnaître les micro-organismes et de les différencier du soi immunologique, étape indispensable à l'initiation d'une réponse¹.

L'immunité innée est caractérisée par une réponse rapidement mobilisable et qui est présente partout dans l'organisme, y compris aux barrières, constituant ainsi une défense de première ligne dont les modes d'action sont relativement invariables pour tout organisme étranger détecté au cours de la vie de l'organisme.

L'immunité adaptative, au contraire, repose sur un principe de brassage de gènes permettant la formation aléatoire de récepteurs, lesquels sont amplifiés lorsqu'ils reconnaissent l'agent étranger. L'immunorécepteur sélectionné permet ainsi une défense adaptée et spécifique de l'intrus détecté. L'immunité adaptative présente donc des effecteurs spécifiques de cet agent étranger à l'organisme, qui s'acquièrent et permettent son élimination. Ces mécanismes acquis sont conservés sous forme de cellules à mémoire lesquelles sont conservées pendant des périodes plus ou moins longues de la vie de l'individu, créant ainsi un répertoire propre à chaque organisme et fonction des expériences antigéniques rencontrées.

Parmi les acteurs de l'immunité cellulaire, les neutrophiles jouent un rôle central car produits en très grand nombre, ils ont la capacité de tuer et dégrader des agents infectieux dans tous les tissus. Ce rôle de soldat n'est cependant pas dépourvu de risques, car leur contenu cellulaire riche en médiateurs inflammatoires et enzymes provoque des lésions cellulaires et tissulaires parfois sévères et irréversibles. C'est pourquoi leur étude et la connaissance des mécanismes de l'immunité qui les mobilisent est essentielle à la compréhension de la réponse anti-infectieuse et de l'inflammation associée.

1 Les granulocytes neutrophiles

1.1 Présentation générale

1.1.1 Morphologie

1.1.1.1 *A l'échelle cellulaire*

Les granulocytes neutrophiles appartiennent à la lignée granulocytaire qui est caractérisée par la présence de nombreux granules au sein de leur cytoplasme, d'où découle leur nom. Ils possèdent en outre un noyau plurilobé, ce qui a conduit à les désigner pendant longtemps comme des polynucléaires. Les caractéristiques de leurs granules cytoplasmiques permettent de les diviser en trois groupes : les granulocytes neutrophiles, les granulocytes basophiles et les granulocytes éosinophiles, car les granules ont des aspects différents en fonction de leur affinité pour les colorants utilisés en cytologie. On emploie souvent le nom de neutrophiles par simplification, et c'est cette dénomination que nous utiliserons dans la suite du texte.

Les neutrophiles sont des cellules arrondies de 10 à 15 μm de diamètre, dont le noyau mature présente deux à cinq lobes avec une chromatine dense. Les granulocytes neutrophiles constituent 50 à 70% des lymphocytes du sang chez la plupart des espèces monogastriques ; les ruminants ont une proportion de neutrophiles circulants plus faibles avec seulement 30-40% de ces cellules parmi les leucocytes sanguins. La moitié d'entre eux sont marginaux, c'est-à-dire qu'ils sont attachés à la paroi des vaisseaux, particulièrement dans les organes comme la rate, le foie et les poumons. Leur durée de vie dans les vaisseaux sanguins est généralement brève, d'environ 24 heures dans des conditions physiologiques. Ils survivent en moyenne 3 jours après diapédèse dans les tissus. Ceci explique le fort taux de renouvellement de ces cellules avec une production quotidienne estimée à 10^{11} neutrophiles.

Les neutrophiles jouent un rôle central dans la défense de l'hôte vis-à-vis des agents pathogènes, notamment bactérien et en conséquence dans la réaction inflammatoire.

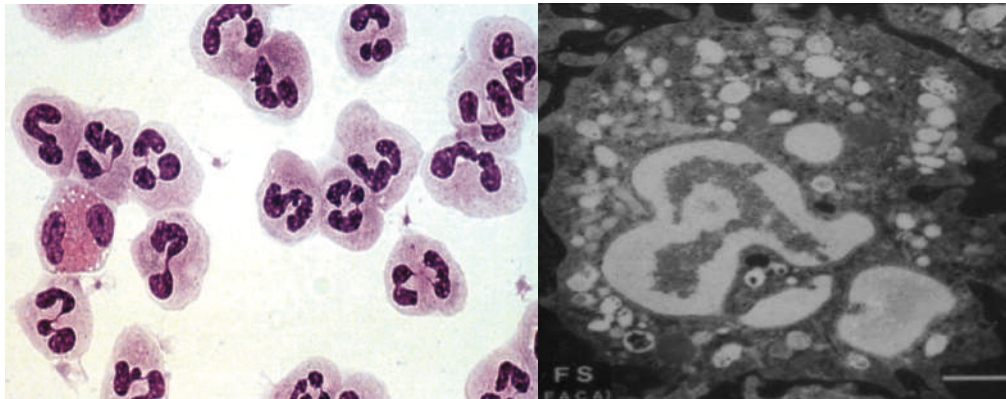


Figure 1: Morphologie d'un neutrophile en microscopie optique² et microscopie électronique à transmission .

1.1.1.2 Contenu subcellulaire : granules et vésicules

Les neutrophiles possèdent des granulations distinctes morphologiquement et biochimiquement de celles des autres granulocytes. Leurs granules contiennent une large panoplie de protéines antimicrobiennes, ainsi que des protéases, des molécules participant à l'explosion respiratoire et un grand réservoir de protéines membranaires de liaison à l'endothélium, à la matrice extracellulaire, aux bactéries, et des médiateurs solubles de l'inflammation. L'acquisition des granules est séquentielle au cours de la différenciation des neutrophiles, avec trois types de granules :

- Les **granules primaires ou azurophiles** (à cause de l'affinité pour l'azur de méthylène) sont présents dès le stade promyélocyte par fusion à partir du Golgi contenant de la myéloperoxydase en grande quantité dont la production s'arrête à la transition du promyélocyte vers le myélocyte.
- Les **granules secondaires** apparaissent au stade de myélocyte et de métamyélocyte ; elles contiennent de grandes quantités de lactoferrine et de faibles quantités de gélatinase. Ils sont également appelés granules spécifiques.

- Les **granules tertiaires** diffèrent peu des précédents mais contiennent des concentrations plus élevées de gélatinase mais plus faibles de lactoferrine, formés au stade de neutrophile immature (band cells), ainsi que dans les cellules polylobées.

A ces granules, s'ajoutent des vésicules sécrétoires formées dans les neutrophiles segmentés ; ils contiennent des protéines plasmatiques, ce qui indiquerait une formation par le mécanisme d'endocytose de ces vésicules.

Toutes ces composants cytoplasmiques ont une structure commune avec une bicouche phospholipidique et une matrice granulaire contenant des protéines destinées à l'exocytose ou bien à la fusion au phagosome.

1.1.1.2.1 Les granules primaires

Les granules primaires contiennent des hydrolases acides ainsi que des protéines antimicrobiennes, ce qui les a faits considérer pendant plusieurs années comme des lysosomes primaires. Cependant, ils n'expriment pas les protéines LAMP-1 et LAMP-2 caractéristiques des lysosomes, ce qui leur confère plutôt un rôle de granules à sécrétion contrôlée.

Les granules azurophiles peuvent être subdivisés en deux groupes en fonction de leur apparition au stade promyélocyte : les premiers produits sont pauvres en défenses tandis que ceux formés à la fin du stade promyélocyte sont plus riches. Les granules azurophiles sont peu sensibles aux stimuli ; ils sont donc peu sécrétés et jouent majoritairement un rôle dans la destruction des micro-organismes au sein du phagolysosome. La myéloperoxydase (MPO) peut quant à elle être déversée au sein du phagosome, mais aussi dans le milieu extracellulaire provoquant ainsi une suite de réactions pouvant à terme altérer la membrane des microorganismes et conduire à leur destruction. Les alpha-défensines constituent en moyenne 5% des protéines contenues au sein des neutrophiles humains et possèdent une activité antimicrobienne envers un large panel de bactéries, champignons, virus enveloppés ainsi qu'envers les protozoaires. Elles provoquent également un rôle de chimioattractants envers les monocytes ainsi que pour les lymphocytes T CD4+ ou CD8+ après exocytose. On retrouve également dans les granules primaires des BPI (*bactericidal /permeability increasing*

proteins) qui ont une activité bactéricide en plus de pouvoir se lier aux neutrophiles et aux macrophages afin de déclencher la phagocytose des bactéries Gram-négatives reconnues via leur LPS.

Enfin, sont également présentes : i) des serprocidines capables de lyser des composants de la Matrice extracellulaire (MEC) et de réagir avec les cellules de l'endothélium, de l'épithélium, les plaquettes, ainsi qu'avec des effecteurs de la réponse inflammatoire ; et ii) l'azurocidine qui peut exercer une action chimioattractive sur les monocytes, les lymphocytes T et les fibroblastes, ainsi que stimuler la vasodilatation lors de l'extravasation des neutrophiles.

1.1.1.2.2 Granules sans peroxydase

Comme dit plus haut, la production de MPO s'arrête lors de la différenciation en myélocyte, ce qui permet donc de regrouper les granules secondaires et tertiaires, car leur synthèse se fait de manière continue entre les stades myélocyte, métamyélocyte, neutrophile immature puis segmenté. Cependant, les protéines contenues dans les granules spécifiques et tertiaires font qu'ils exercent des fonctions différentes. D'une part, les granules à gélatinase semblent opérer essentiellement lors de l'extravasation des neutrophiles et de la diapédèse, avec des protéines de dégradation de la MEC ainsi que des récepteurs essentiels à ces étapes de la réponse inflammatoire. D'autre part, les granules spécifiques ont un arsenal protéique antimicrobien utile lors de l'élimination des micro-organismes aussi bien dans le phagosome que dans le milieu extracellulaire. On retrouve des molécules à fort pouvoir antimicrobien dans ces granules telles que la lactoferrine, le CAP-18 humain (hCAP18) appartenant au groupe des cathélicidines, la lipocaline associée à la gélatinase neutrophilique (NGAL), le lysozyme et la protéine *Natural resistant-associated* macrophage 1 (Nramp-1), ainsi que des métalloprotéases.

1.1.1.2.3 Les vésicules sécrétoires

Ces vésicules de localisation cytoplasmique contiennent essentiellement des récepteurs membranaires nécessaires lors des premières phases de la réaction inflammatoire régie par les neutrophiles. La fusion de ces vésicules à la membrane plasmique répond à différents stimuli et permet notamment l'expression des β 2- intégrines CD11b-CD18, et de divers autres

récepteurs. L'exocytose des vésicules sécrétoires est accompagnée de l'apparition des L-sélectines sur la membrane des neutrophiles. Ces différents changements vont permettre la liaison ferme des neutrophiles aux cellules endothéliales activées par divers signaux de la réponse inflammatoire au sein du tissu.

Ces différents granules cytoplasmiques vont jouer un rôle important en fonction des stimuli de la réponse inflammatoire aiguë qui est régie par les neutrophiles en déversant leur contenu dans le milieu extérieur ou bien dans le phagosome.

1.1.1.3 *Hématopoïèse et différenciation*

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes qui concourent à la production des éléments figurés du sang. Till et McCulloch ont mis en évidence en 1960, les cellules souches hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse à partir d'expériences réalisées chez des souris. Par la suite, la culture de ces cellules a permis de différencier différentes unités formant colonies (CFU) à l'origine de grands types leucocytaires :

- CFU-G à l'origine des granulocytes neutrophiles
- CFU-M pour les monocytes
- CFU-Eo qui génèrent les éosinophiles
- CFU-GEMM capables de produire les principales cellules myéloïdes

Ces cultures ont également permis de mettre en évidence une dépendance vis-à-vis des facteurs de croissance, nommés Facteurs stimulant des colonies ou CSF, qui conduisent à la production de précurseurs ou CFU variés à partir d'une même cellule souche hématopoïétique (HSC).

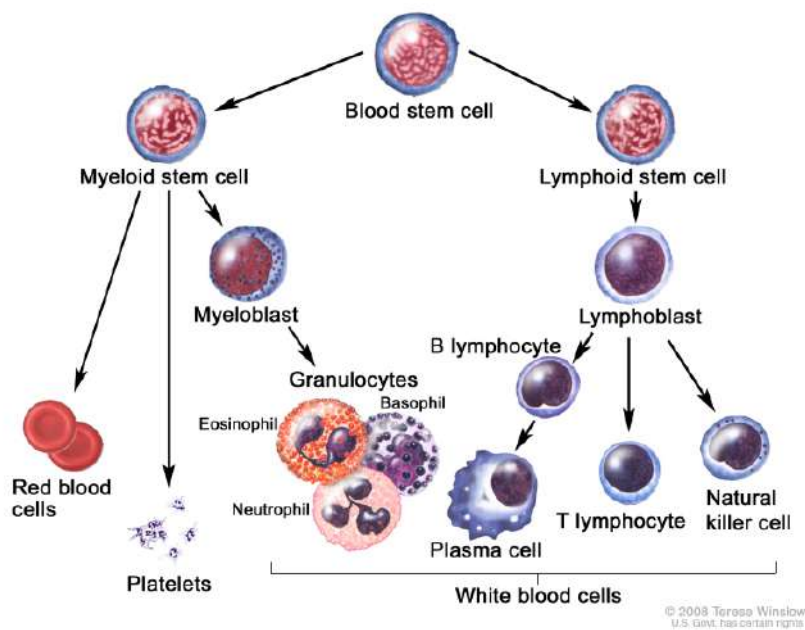


Figure 2: Hématopoïèse des cellules sanguines

L'hématopoïèse se déroule au sein de la moelle osseuse chez le nouveau-né et l'adulte, dans les os longs, certains os plats et les vertèbres, alors que chez le fœtus, cette production est assurée d'abord par le sac vitellin puis par le foie. Il s'agit d'une différenciation à partir d'une HSC très peu différenciée et capable d'auto renouvellement. La différenciation suit un programme morphogénétique précis et donne lieu à une organisation pyramidale avec au sommet la cellule souche hématopoïétique et à sa base les différents types cellulaires différenciés formant les lignées myéloïde et lymphoïde.

Lors de la granulopoïèse, un progéniteur multipotent se différenciera en progéniteur myéloïde commun, lequel a la capacité de donner un progéniteur mégacaryocyte-érythrocytaire ou un progéniteur granulocyte-macrophage. Ce dernier va poursuivre la différenciation via des stades successifs allant du myéloblaste jusqu'au neutrophile mature. La production totale des neutrophiles peut atteindre jusqu'à $2 \cdot 10^{11}$ cellules par jour. Seul le neutrophile mature présente un noyau caractéristique plurilobé ; à ce stade, ce sont alors des cellules totalement différenciées, incapables de se diviser, et de subir des changements majeurs de leur phénotype une fois qu'elles ont quitté la moelle osseuse.

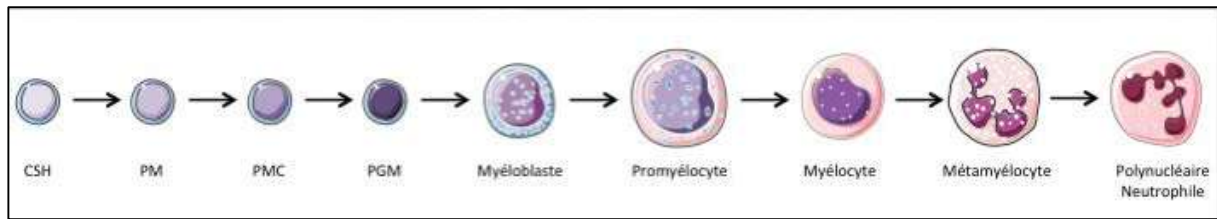


Figure 3: Etapes de la granulopoïèse neutrophilique

1.1.1.4 Contrôle de la différenciation cellulaire en neutrophile

Au sein de la moelle osseuse, s'établit un microenvironnement optimal appelé niche, où sont présents les différents signaux qui vont guider la différenciation des cellules souches vers le phénotype neutrophile. En effet les cellules stromales présentent des caractéristiques d'adhérence, permettant le contact et le lien avec les cellules en maturation. Elles vont produire des chimiokines de guidage et de localisation, ainsi que des facteurs de croissance et des cytokines qui promeuvent la différenciation et la multiplication. Il existe donc différentes niches responsables de la différenciation de différentes lignées, avec des signaux spécifiques, provenant de différentes cellules (fibroblastes spécialisés, cellules endothéliales, ostéoblastes et adipocytes). Les cellules les moins différenciées dont la HSC sont situées près de la paroi avec un flux sanguin bas ainsi qu'une pression partielle en O₂ faible, tandis que les cellules les plus différenciées se trouvent plus près du sinus central et donc de la circulation sanguine qu'elles rejoindront à la fin du processus de différenciation. Ainsi dans chaque microenvironnement est mis en place une signalisation par contact entre cellules hématopoïétiques et cellules stromales. Outre cette régulation intrinsèque, la différenciation de ces cellules est également sous la dépendance de facteurs diffusibles sécrétés par les cellules stromales ou bien provenant du sang. Cela introduit donc un contrôle à distance à l'échelle de l'organisme. De manière générale, la production d'IL-1, IL-6 et de GM-CSF lors d'une réponse inflammatoire stimule l'hématopoïèse.

La production des neutrophiles correspond à la majeure part de la production de la moelle osseuse (environ 30%). Il s'agit essentiellement d'un équilibre entre des signaux constants au sein de la niche à l'équilibre, et des signaux de différenciation et de libération dans la circulation systémique lors d'inflammation. Le récepteur CXCR4 joue un rôle majeur dans la

rémanence des cellules souches mais aussi des cellules plus différenciées au sein de la moelle., La chimiokine CXCL12, exprimé à la membrane des cellules stromales, se lie à ce récepteur. Le signal induit, provoque la rétention des cellules dans la moelle via l'interaction VLA4/VCAM1. L'expression de CXCR4, ainsi que celle de VLA4 à la membrane des neutrophiles, diminue au cours de leur maturation, permettant in fine la libération des cellules matures dans les vaisseaux sinusoides. Par ailleurs, le relargage des neutrophiles est régulé par les ligands de CXCR2, parmi lesquels on trouve CXCL1, CXCL2, CXCL5 et CXCL6. Les deux premiers sont synthétisés par les cellules endothéliales de la moelle osseuse, tandis que les CXCL12 présent dans les niches hématopoïétiques, provient essentiellement des ostéoblastes³.

Le facteur G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) est un stimulant essentiel de la production des granulocytes. Il n'est cependant pas nécessaire, lors d'inflammation⁴. Le signal est responsable de la libération des neutrophiles matures à partir de la moelle, en plus de stimuler la prolifération des cellules souches de la lignée et d'accélérer la maturation nécessaire avant le relargage. G-CSF aurait un effet inhibiteur sur la production de CXCR4/CXCL12, en réduisant respectivement l'expression sur les cellules myéloïdes, ainsi que la sécrétion par les cellules stromales.

La moelle osseuse étant également un lieu d'épuration des neutrophiles âgés, un changement du niveau d'expression des récepteurs membranaires se produit, à l'origine d'une plus grande sensibilité aux signaux, et favorisant ainsi un retour à la moelle, ou « homing ».

Par ailleurs, la production de neutrophiles est largement régulée par le taux d'apoptose des neutrophiles matures, ceux-ci étant phagocytés par des macrophages et des cellules dendritiques dans les tissus. Ce phénomène est connu sous le nom d'efferocytose. Ceci est à l'origine d'une réduction de la production par les cellules phagocytaires d'IL-23, interleukine qui stimule la production d'IL-17A, elle-même à l'origine d'une stimulation de la production de G-CSF. Ainsi, une augmentation de la quantité de neutrophiles dans les tissus engendre une diminution de la production de G-CSF. Ainsi CXCR-4 joue un rôle primordial dans la rétention des neutrophiles au sein de la moelle, créant ainsi une réserve disponible lorsqu'un signal pour la libération dans la circulation sanguine est détecté. CXCL-12 présent à la surface des cellules stromales de la moelle osseuse (ancien SDF-1) est inhibé par G-CSF, alors que ce facteur de croissance stimule l'expression de KC/CXCL8 et Groβ/CXCL2, qui sont des ligands de

CXCR-2, inversant ainsi la balance de signalisation et favorisant ainsi la libération des neutrophiles dans la circulation systémique.

Plusieurs molécules participent à la régulation de l'hématopoïèse, avec encore de nombreux paramètres inconnus. Différentes études ont ainsi pu démontrer le rôle de certaines cytokines dans le maintien des HCS au sein de la moelle ou bien la libération dans la circulation périphérique.

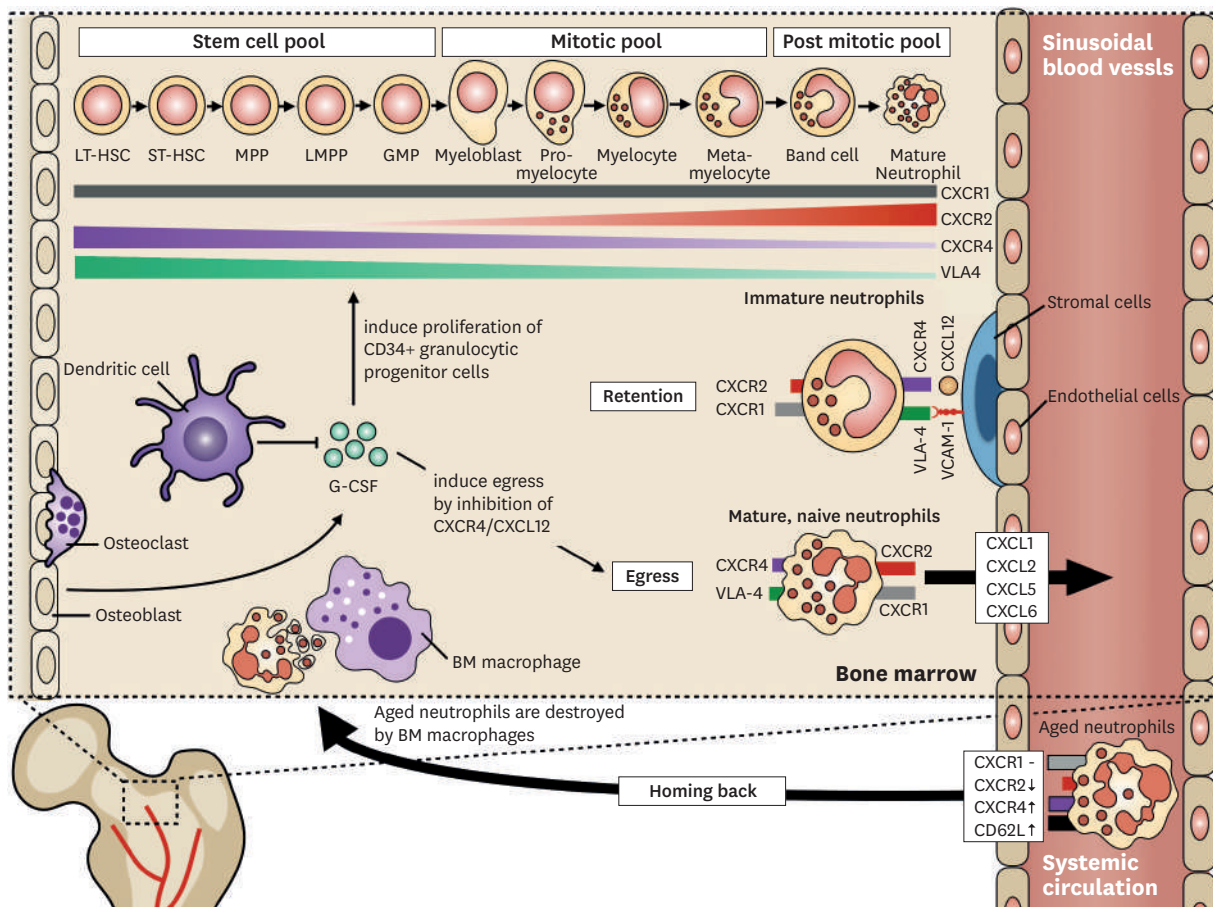


Figure 4: Mécanismes de la différenciation et de la libération des neutrophiles au sein de la moelle épinière³

Tableau 1 : Molécules effectrices dans la granulopoïèse

Molécule	Fonction
Angiopoïétine 1, Tie 2 et N-cadhérine	Maintien HSC quiescente dans la niche, lien avec contrôle cycle cellulaire
G-CSF	Régulation de SDF-1 (CXCL-12)
SDF-1 (CXCL-12)	Exprimée dans les cellules stromales, attire HSC
CXCR-4	Exprimé dans HSC, récepteur de SDF-1
VLA-4, LFA-1, Opm, Intégrines, autres cellules d'adhésion de surface	Leur activation est nécessaire pour la mobilisation de HSC
MMP-9, MMP-2 et sKitL	Induites par G-CSF et SDF-1 pour la mobilisation de HSC
FGF-4	Forme un gradient entre les cellules stromales et le réseau vasculaire pour recruter HSC
VEGF4, PLGF, , autres facteurs de croissance	Mobilisation et recrutement de HSC

⁵D'après Z.Li (2006)

D'après Frenette et al ⁶ le système nerveux sympathique participe à la mobilisation des HSC dans la niche. Ces mécanismes restent cependant mal connus⁶. De même, il a été montré chez des souris axéniques, qui ne possèdent pas de flore microbienne commensale, qu'une neutropénie marquée était présente. Cela signifie que les cellules progénitrices répondent à des stimuli spécifiques provenant directement de la flore ou du tube digestif lorsqu'il est normalement colonisé par la flore microbienne⁷.

L'équilibre entre renouvellement et différenciation des HSC est donc finement régulé par différents mécanismes intrinsèques et extrinsèques au microenvironnement, avec une participation centrale des cellules stromales de la moelle osseuse.

1.1.1.5 Distribution des neutrophiles entre tissus

A l'état physiologique, les neutrophiles matures sont présents dans la circulation sanguine ou bien dans les tissus. Ils sont normalement transportés par le flux sanguin. Ils constituent entre

60 et 70% des leucocytes circulants chez les carnivores et environ 20-30% chez les bovins. Cependant, seuls 1 à 2 % du pool total se trouvent effectivement dans la circulation et les vaisseaux sanguins, la vaste majorité étant au contact de l'endothélium des capillaires au sein de la rate, du foie, des poumons et dans la moelle osseuse. Des études ont montré que les neutrophiles résident plus longtemps au sein du parenchyme pulmonaire sans que les mécanismes qui y président soient exactement déterminés : il semblerait que le temps accru ne soit pas uniquement imputable au fait que les poumons reçoivent l'intégralité du sang éjecté par le cœur. Des données suggèrent que les neutrophiles passent plus de temps en tant que « sentinelles » dans les vaisseaux pulmonaires par rapport aux autres organes, sans que cela soit vraiment explicité⁸.

La réserve de neutrophiles permet, dans le cas d'une infection par un ou plusieurs microorganismes, de mobiliser une grande quantité de neutrophiles, avec un nombre de neutrophiles circulants qui peut être multiplié par 10.

Malgré l'idée communément admise que les neutrophiles constituent une population homogène dans la circulation sanguine, plusieurs études ont montré qu'il existe des différences non négligeables au sein de cette population. Ceci est retrouvé dans les conditions physiologiques avec des changements dus à l'âge, ainsi que dans diverses conditions pathologiques, avec une libération accrue de neutrophiles immatures. On retrouve ces différences au niveau fonctionnel ainsi qu'au plan phénotypique⁹. Ces changements seront détaillés par la suite. La quantité de neutrophiles circulants est un équilibre entre les neutrophiles libérés par la moelle épinière et la séquestration des neutrophiles âgés dans les tissus périphériques, où ils vont être éliminés. Dans l'espèce humaine, les neutrophiles ont une espérance de vie moyenne de 6 à 8 heures¹⁰. Ce sont des cellules capables de fortes pressions, en adaptant leur morphologie et en modulant leur interaction avec l'endothélium, afin de couvrir une large distribution au sein de l'organisme. Les neutrophiles sont susceptibles de migrer lors d'inflammation, à la suite d'une infection ou d'un trauma tissulaire, afin d'y exercer leur rôle. Le cas échéant, ils vont subir des changements morphologiques traduisant le vieillissement cellulaire, ainsi qu'une perte de leurs fonctions cellulaires.

1.1.2 Migration lors d'inflammation aigüe

Dans sa forme classique, l'inflammation aigüe peut être décrite par cinq signes locaux majeurs : chaleur, rougeur, douleur, tuméfaction et altération des fonctions. Ces signes cliniques sont la conséquence de la vasodilatation des petits vaisseaux périphériques causant une baisse du débit qui les traverse. Outre comme conséquence d'une infection (bactérienne notamment), celle-ci peut être également apparaître à la face endothéliale à la suite de la mort de cellules ou de lésions tissulaires stériles. Il est difficile de savoir si les neutrophiles sont capables de différencier une inflammation stérile d'un contexte infectieux. Cependant, dans les conditions décrites, les neutrophiles sont ralentis et ils peuvent s'arrêter à l'emplacement où la reconnaissance de signaux inflammatoires a lieu, et migrer ensuite dans les tissus affectés ou au siège de l'infection^{1,11}.

1.1.2.1 *Recrutement*

Les macrophages et les mastocytes sont majoritairement présents au sein des tissus et ont un rôle de sentinelles. Ces cellules initient le recrutement des neutrophiles, ainsi que divers processus tels que l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la production de chimiokines. Ceci est provoqué par la reconnaissance de motifs moléculaires associés soit à aux micro-organismes (MAMPs pour Microbial Associated Molecular Patterns) soit à des molécules intracellulaires (DAMPs pour Damage Associated Molecular Patterns, appelés aussi alarmines). Ces motifs moléculaires particuliers sont reconnus par des récepteurs membranaires ou intracellulaires dits PRR (pour Pathogen-Related Receptors) qui sont exprimés dans ou sur les cellules sentinelles (macrophages, cellules dendritiques et mastocytes) au sein des tissus. Cette interaction provoque la libération de cytokines et de chimiokines, qui vont déclencher des modifications de l'expression de molécules à la surface des endothelia qui sont alors activés. En quelques minutes il va y avoir exposition des P- et E-sélectines, qui étaient auparavant présentes dans des vésicules cytoplasmiques ; leur synthèse est également stimulée au sein des cellules de l'endothélium. Trois cytokines majeures sont également synthétisées : le facteur de nécrose TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) , les interleukine IL-1 et IL-6. Récemment, un rôle aussi été attribué aux plaquettes qui interviendraient dans l'extravasation des neutrophiles^{8,12}.

1.1.2.1.1 Les cytokines

TNF- α est produite non seulement par les cellules sentinelles activées par les récepteurs TLR (pour Toll-like receptors), mais également par l'endothélium lésé. Sa sécrétion dans le milieu extracellulaire va provoquer la libération de cytokines et chimiokines par les cellules voisines et par la suite l'adhérence, la migration, l'attraction et l'activation des leucocytes, comme les neutrophiles. Sa sécrétion peut également être stimulée par des neurotransmetteurs (neurokin-1). Au niveau systémique, TNF- α peut diminuer le débit cardiaque, augmenter la perméabilité capillaire ainsi que provoquer la formation des thrombi. Son action sur les neutrophiles va permettre de les attirer au lieu de l'infection, d'augmenter leur adhérence à la paroi de l'endothélium, et promouvoir la phagocytose par ces cellules. TNF- α agit également sur d'autres leucocytes, notamment en stimulant sa propre libération en plus de celle de l'IL-1 par les macrophages, tout comme d'autres médiateurs de l'inflammation.

En association avec l'IL-1, cette cytokine va agir au niveau de l'endothélium des capillaires sanguins, qui sont essentiels pour l'arrêt puis l'adhérence des neutrophiles. Cette association au niveau systémique déclenche la fièvre, la léthargie et la perte plus ou moins marquée de l'appétit tandis qu'elle induit la synthèse des protéines de la phase aigüe par le foie.

Enfin, l'IL-6 est produite par des lymphocytes T, des macrophages ainsi que des mastocytes, notamment en présence d'endotoxines bactériennes. Cette cytokine joue un rôle primordial dans la résistance aux infections bactériennes et semble être responsable de la transition d'une inflammation précoce dominée par l'action des neutrophiles vers les phases plus tardives de l'inflammation où les macrophages prédominent. Elle joue un rôle anti-inflammatoire par inhibition du TNF- α et la stimulation de la synthèse d'IL-10, qui est une interleukine dont l'action est principalement anti-inflammatoire.

1.1.2.1.2 Les chimiokines

Il s'agit d'une famille de petites cytokines aux propriétés chimioattractives. Elles sont libérées par les cellules sentinelles activées. Elles vont guider la migration des leucocytes et ainsi l'initiation de la réponse immunitaire innée. Différentes infections vont provoquer des profils de chimiokines sécrétées différents, conduisant au recrutement de populations variables de leucocytes. Ainsi, CXCL-8 qui est produite par des macrophages et des mastocytes, va stimuler la dégranulation des neutrophiles ainsi que l'explosion respiratoire.

1.1.2.1.3 Les molécules vaso-actives

Les molécules vaso-actives agissent au niveau des vaisseaux sanguins en provoquant leur dilatation, avec pour conséquence une diminution du flux sanguin et l'extravasation, en facilitant le ralentissement du flux cellulaire, l'adhésion des cellules inflammatoires à la paroi de petits capillaires, puis la diapédèse. Ceci provoque l'apparition des signes classiques de l'inflammation tels que la rougeur et le gonflement. Des changements cellulaires à la surface de l'endothélium ont lieu en parallèle. En cas de rupture de ce dernier, l'agrégat plaquettaire qui se forme libère également des molécules vaso-actives et pro-coagulantes. Les molécules vaso-actives ont différentes origines, telles que les tissus lésés, des précurseurs sanguins, des molécules libérées par des cellules circulantes, ainsi que des neurotransmetteurs.

Parmi les amines vaso-actives, l'histamine, qui est libérée par les mastocytes, est l'une des plus importantes. Elle est à l'origine de la libération de l'oxyde nitrique, un puissant vasodilatateur agissant sur les cellules endothéliales. La transduction du signal passe par les récepteurs H1. L'histamine provoque d'autre part une fuite de liquide à travers l'endothélium qui se distend.

La protéolyse de précurseurs sanguins inactifs génère des peptides vaso-actifs. Des protéases agissant sur les facteurs C3 et C5 du complément conduisent à l'apparition des facteurs C3a et C3b. Ces molécules sont des anaphylatoxines, c'est-à-dire qu'elles sont capables d'agir sur les mastocytes, pour provoquer la libération d'histamine et de C5a qui est un puissant attractant des neutrophiles. On retrouve également les kinines, des molécules vaso-actives responsables de la douleur, avec un rôle semblable à celui de certains neurotransmetteurs tels que la substance P.

Enfin les leucotriènes qui font partie des lipides vaso-actifs sont formés à partir d'acide arachidonique libéré à partir de la membrane de diverses cellules dont les cellules sentinelles, après action de l'enzyme 15-lipoxygénase, tandis que la cyclooxygénase produit à partir de cette même molécule, des prostaglandines vaso-actives. Les leucotriènes agissent sur les neutrophiles permettant leur recrutement ainsi que leur activation et leur survie. On retrouve parmi les leucotriènes, le LTD4 dont la libération est stimulée par l'IL-13 tandis que la production d'IL-13 est elle-même stimulée par la présence de LTD4. Il s'agit donc d'une boucle d'amplification dont le rôle est central lors d'inflammation sévère.

Parmi le grand nombre de prostaglandines que toutes les cellules nucléées peuvent produire, quatre groupes des prostaglandines pro-inflammatoires ont été décrits : les PGE2, PGF2, les

thromboxanes et les prostacyclines. Leur effet au sein de différents sites inflammatoires est complexe et variable. Cependant, au fur à mesure qu'ils infiltrent les tissus infectés, les neutrophiles produisent de la lipoxine. En retour, la lipoxine inhibe la migration des neutrophiles. Il y a ainsi une augmentation progressive de la concentration de ces molécules anti-inflammatoires, au dépend du LTB4 à l'action pro-inflammatoire.

On retrouve également un phospholipide nommé PAF (pour *Platelet-activated Factor*). Il est produit par les neutrophiles et agit lui aussi sur l'endothélium, lequel devient plus épais et favorise ainsi l'adhésion des neutrophiles, leur chimiotactisme, la dégranulation avec la libération d'oxydants. Il permet également l'agrégation des plaquettes et la libération de molécules vaso-actives, de même que la synthèse de thromboxane.

Les produits libérés par les cellules sentinelles activées vont donc augmenter la perméabilité vasculaire et attirer les leucocytes, au premier lieu desquels, les neutrophiles. Ces derniers vont donc jouer un rôle essentiel dans la lutte contre les agents infectieux, afin de les éliminer le plus rapidement et efficacement possible. Pour cela ils doivent parvenir à être en contact de ces microorganismes au site même de l'infection.

1.1.2.2 *Rolling et adhésion*

Lorsque des protéines bactériennes tel que le lipopolysaccharide (LPS) ou bien des DAMPS agissent sur les cellules endothéliales des capillaires, celles-ci surexpriment en quelques minutes des glycoprotéines à leur membrane : la P-sélectine (exprimées également par les plaquettes) et la E-sélectine¹³. Ces protéines exposées à la surface cellulaire sont capables de se lier à une L-sélectine exprimée à la surface des neutrophiles circulants. Cette liaison est transitoire, mais permet progressivement de ralentir les neutrophiles jusqu'à les arrêter complètement à la surface de l'endothélium des capillaires.

L'interaction avec l'endothélium va provoquer, via le PAF d'origine endothéliale et une protéine G transmembranaire, l'expression de protéines d'adhésion telles que CD11a/CD18 à leur membrane à partir de l'exocytose des vésicules sécrétoires. Ces protéines permettent quant à elles de reconnaître des intégrines ICAM-1 sur les cellules endothéliales et d'établir une liaison forte entre les deux cellules, conduisant ainsi à un arrêt complet des neutrophiles collés à l'endothélium en regard du tissu d'où proviennent les premiers signaux. La sécrétion d'élastase neutrophilique augmente encore la force d'adhésion.

Sous l'influence de cytokines telles que l'IL-1, IL-17 ou bien le TNF- α , les cellules endothéliales

vont exprimer des E-sélectines à fort pouvoir d'adhésion ; en outre, la sécrétion de CXCL-8 par les neutrophiles recrutés provoque l'attraction de nouveaux neutrophiles, amplifiant ainsi le phénomène, et la libération d'IL-1 va intensifier le pouvoir d'adhésion ainsi que la vasodilatation et l'attraction des cellules de l'immunité¹⁴.

Il semble cependant que d'autres mécanismes provoquent aussi l'adhésion des neutrophiles. Dans les capillaires pulmonaires dont le diamètre est inférieur à celui des neutrophiles, ceux-ci sont capables de s'attacher et de s'infiltrer sans qu'il y ait expression des intégrines et des sélectines, mais uniquement par une action mécanique. Le contact avec l'endothélium vasculaire va permettre l'activation des neutrophiles comme développé plus loin.

1.1.2.3 *Diapédèse*

L'adhésion forte aux cellules endothéliales et l'influence des cytokines va permettre aux neutrophiles de traverser la paroi vasculaire. Ce phénomène nommé diapédèse (« saut à travers » du grec ancien) est finement guidé par des agents chimiotactiques. Le cytosquelette des neutrophiles permet une polarisation de la cellule, avec la formation d'un lamellipode concentrant les récepteurs de chimiokines et inducteurs de phagocytose. Ceci est engendré par des voies de transduction incluant des protéines G sensibles au phosphoinositol 3 Phosphate (PiP3) et à la RhoGTPase (Rac), qui provoquent une modification de l'actine-F intracellulaire¹³.

A la suite de ce signal, le neutrophile s'immisce entre deux cellules endothéliales à travers une jonction serrée grâce à une interaction entre les molécules de CD 31, exprimée d'une part sur les cellules endothéliales, et d'autre part à la membrane des neutrophiles. Les filaments d'actine et de myosine vont donc profiter de l'appui permis par ces liaisons fortes pour propulser les neutrophiles dans le tissu infecté ou lésé. Sont également nécessaires des intégrines et des protéines d'adhésion cellulaire (CAM), dont ICAM-1 et ICAM-2, ainsi que des molécules d'adhésion jonctionnelles (JCAM)⁸. Des études ont permis de montrer le rôle des protéines de liaison entre deux cellules épithéliales. En effet, les VE-cadhérines membranaires joueraient un vrai rôle de contrôle du passage des neutrophiles, en se dissociant suite à leur phosphorylation et en permettant le passage des neutrophiles en restaurant l'étanchéité après leur passage¹⁵.

Le passage à travers la membrane basale est facilité par le déversement dans le milieu extracellulaire de métalloprotéases collagéno-lytiques (collagénases, protéases...) contenues

dans les granules à gélatinase. La majorité des neutrophiles va traverser l'endothélium de cette manière. Cependant, environ 20% utilisent la voie transcellulaire^{12,13}.

Les neutrophiles nouvellement arrivés au sein du tissu doivent suivre un gradient, avant d'entrer en contact avec les micro-organismes, lequel doit dépasser le gradient précédent. Ainsi, de nouvelles molécules d'attraction vont créer ce gradient aux alentours des tissus lésés. Le peptide N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine dérivé des bactéries et le C5a du complément sont responsables du chimiotactisme au sein du tissu. Les neutrophiles vont alors migrer vers les bactéries en projetant leurs lamellipodes⁸.

1.1.2.4 *Production et libération de cytokines*

Le passage à travers la matrice basale permet l'activation des neutrophiles avec un changement du phénotype et de leur activité optimisée dans les tissus. Afin de promouvoir l'attraction d'autres cellules inflammatoires, les neutrophiles sécrètent également des CC-chimiokines, responsables du recrutement des monocytes capables d'éliminer les cellules mortes ou apoptotiques dans le tissu après différenciation en macrophages. La production d'IL-8 (CXCL-8), IFN- γ et G-CSF va stimuler et orienter la réponse inflammatoire. La libération d'IL-17 induit la libération de facteurs pro-inflammatoires par les cellules myéloïdes et mésenchymateuses permettant le recrutement ainsi que l'activation de nouveaux neutrophiles. De plus, la production de Leucotriène B4 (LTB4) attire de nouveaux neutrophiles. Les chimiokines sont des molécules chargées positivement qui vont se lier à des héparanes sulfates chargés négativement qui servent d'ancres et permettent la création d'un gradient le long de l'endothélium¹⁶.

Lorsqu'ils sont activés, les neutrophiles vont également libérer des cytokines (MIP-1 α , MIP-1 β , INF- γ) agissant sur le recrutement de macrophages. Réciproquement, les macrophages activés vont agir sur les neutrophiles en sécrétant du TNF- α , G-CSF et GM-CSF, produisant une augmentation des synthèses, du recrutement neutrophilique, ainsi que l'inhibition de l'apoptose, accroissant du même coup la survie des cellules dans le site inflammatoire.

Cependant, il a été montré que les neutrophiles murins produisent préférentiellement une cytokine anti-inflammatoire, L'IL-10 plutôt que des cytokines pro-inflammatoires¹⁷ lorsqu'ils sont stimulés par la présence de bactéries, via la co-activation de TLR-2 et d'un CLR/Syk. A

l'inverse des monocytes, les neutrophiles ne sont pas sensibles à l'IL-10, ce qui en fait une cellule régulatrice de l'inflammation après le contact avec une bactérie.

Les neutrophiles ont été associés à l'induction de l'inflammation et sont capables d'influer directement sur les cellules dendritiques. Cependant les neutrophiles activés suppriment les fonctions des lymphocytes T, ainsi que la production de cytokines via la production de peroxyde d'hydrogène¹⁸. Zhang et al¹⁷ ont montré le rôle central des neutrophiles activés dans la régulation de l'inflammation lors d'infection bactérienne, en contrebalançant la forte activité pro-inflammatoire des autres cellules effectrices de l'immunité (monocytes, macrophages et cellules dendritiques). Lors d'inflammation aiguë, l'activité des neutrophiles correspond à un équilibre entre l'élimination directe des bactéries et l'induction d'un profil anti-inflammatoire, sans exercer d'influence majeure sur la croissance bactérienne.

1.2 Les neutrophiles comme effecteurs de l'immunité

1.2.1 Rôle dans l'immunité innée

L'activation des neutrophiles va permettre à l'organisme de combattre les micro-organismes qui l'infecte. Cela a lieu à la suite du double signal produit par la liaison aux intégrines des cellules endothéliales, et à la stimulation par les facteurs TNF- α , CXCL-8 ou bien C5a. Les vésicules sécrétoires sont les plus propices à la dégranulation, suivis des granules à gélatinase, des granules spécifiques et enfin des granules azurophiles. Les voies de signalisation, menant à la libération des granules et des vésicules, sont complexes et encore assez mal comprises.

Lorsqu'ils sont au contact de bactéries, les neutrophiles activent divers systèmes anti-microbiens (dépendant ou non de l'oxygène), en libérant le contenu des granules azurophiles et des granules spécifiques dans le milieu extérieur ou dans les phagosomes. Les substances contenues dans ces granules permettent une variété d'activités envers les bactéries. Elles agissent surtout en déstabilisant la membrane bactérienne, d'autres telles que le NGAL, les lactoferrines, et Nramp1 perturbent le métabolisme bactérien qui dépend du fer. Il produit également des radicaux oxygénés ou ROS grâce au cytochrome *b*₅₅₈ et à la MPO¹⁹.

1.2.1.1 *Phagocytose et explosion respiratoire*

1.2.1.1.1 Internalisation des agents pathogènes

L'activation des récepteurs TLR par la présence de bactéries déclenche différents signaux. Les neutrophiles possèdent l'intégralité des récepteurs TLR connus, ce qui permet d'affiner la réponse selon qu'il s'agit d'une bactérie à Gram positif ou bien à Gram négatif. Les neutrophiles émettent des lamellipodes en direction des zones contenant une concentration supérieure de chimio-attractants. Ce sont différentes molécules qui forment ce gradient à l'endroit où se trouvent des agents pathogènes, parmi lesquelles on retrouve le C5a, le fibrinopeptide provenant du fibrinogène, et du peroxyde d'hydrogène, ainsi que des chimiokines, des leucotriènes et d'autres molécules libérées par les bactéries.

Les neutrophiles vont de cette façon parvenir à proximité des bactéries. La phagocytose la plus efficace a lieu lorsque les bactéries sont préalablement opsonisées par des anticorps permettant ainsi la liaison à des récepteurs membranaires présents à la surface des neutrophiles. D'autres récepteurs membranaires peuvent par ailleurs reconnaître la fraction C3b du complément, liée aux bactéries. Il peut aussi y avoir une reconnaissance directe grâce aux PRRs²⁰.

S'ensuit alors un recouvrement du corps étranger représenté par la bactérie par deux pseudopodes composés d'actine et de myosine par stimulation de leur polymérisation. Il s'agit de la phagocytose de type I lors de la liaison à des anticorps liés aux bactéries. Lors d'une interaction directe au travers d'un ou de plusieurs PRR, ou bien via le complément, la bactérie aurait tendance à s'infiltrer progressivement au sein du neutrophile. Il s'agit alors de la phagocytose de type II. Enfin une troisième sorte d'internalisation semble exister par émission d'un unique pseudopode qui englobe l'agent pathogène. Ceci est fonction des propriétés de surface de la bactérie rencontrée. Dans tous les cas de figure, il y a formation d'un phagosome à la suite du processus conduisant à l'internalisation.

1.2.1.1.2 L'environnement oxydatif des phagosomes

Un phagosome néoformé ne possède pas un contenu propice à la destruction des micro-organismes initialement. Il doit donc auparavant subir un processus appelé maturation pendant lequel il y a fusion avec d'autres organites cellulaires. Ceci permet la concentration d'une machinerie enzymatique, au niveau de la membrane ainsi que de la lumière du phagosome, qui est propice à l'élimination de l'agent pathogène. Ce processus de maturation

est moins bien connu pour les neutrophiles que pour les macrophages, car ces cellules sont plus facilement manipulables au laboratoire et donc mieux étudiées. Il est cependant connu que la maturation du phagosome permet l'acquisition du complexe Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène (NADPH) oxydase et d'ATPases. Le phagosome acquiert notamment ses capacités bactéricides par fusion avec les différents granules spécifiques des neutrophiles, qui contiennent différentes protéines et enzymes comme détaillées plus haut. Cette fusion a lieu à la suite du signal déclenchant l'internalisation des éléments extracellulaires. On retrouve alors une augmentation du calcium intracellulaire, libéré par le réticulum endoplasmique ou provenant du milieu extérieur. L'augmentation du calcium libre dans le cytosol permet une fusion vésiculaire séquentielle, étant donné que le seuil varie pour chacun des quatre types de granules. Ainsi, les vésicules sécrétoires possédant le seuil déclencheur le plus bas sont les premiers à être libérés dans le phagosome, tandis que selon le même principe, les granules azurophiles sont les derniers. Il semblerait qu'un isoforme de la synaptotagmine soit impliqué dans cette réponse différentielle selon les vésicules²¹. Les variations de la concentration calcique dans le cytosol influent également sur les trames d'actine. Les protéines kinases jouent vraisemblablement le rôle d'une ancre mal connu dans la fusion des différentes vacuoles, en plus de probables autres mécanismes encore inconnus.

Les granules secondaires sont considérés comme ceux amenant l'essentiel des complexes NADPH-oxydase présents dans le phagosome suite à l'activation du neutrophile. Ce complexe enzymatique est formé en partie par des structures initialement présentes sur la membrane cellulaire et qui sont assimilés à des structures contenues dans des compartiments intracellulaires. Ce complexe hétéromérique permet le transfert d'un électron provenant de la NADPH vers une molécule d'O₂ donnant naissance à un anion superoxyde, qui est par la suite utilisé dans la formation des différents radicaux libres oxygénés.

Lorsqu'ils sont stimulés, les neutrophiles sont donc capables de produire des ions superoxydes (O₂⁻) par consommation d'oxygène au sein des phagosomes. Il s'agit du processus appelé explosion respiratoire ou « burst oxydatif », médié par le complexe NADPH-oxydase catalyseur de la réaction : $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{O}_2^- + \text{H}^+$. Cette réaction joue un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire assurée par les neutrophiles, comme le montre la sensibilité accrue des individus atteints de la maladie granulomateuse chronique. Ces personnes sont porteuses d'une mutation génétique à l'origine d'une inactivation de la NADPH oxydase²².

Il s'agit là du complexe enzymatique à l'origine de toutes les réactions d'oxydo-réduction qui ont lieu à l'intérieur du phagosome. L'essentiel de la production d'ions superoxyde et H_2O_2 dans les neutrophiles a lieu à l'intérieur des phagosomes. La production à l'extérieur de ces organites pourrait être impliquée dans la transmission de messages cellulaires, comme ceux qui sont observés dans d'autres cellules avec des molécules de la famille des NOX à laquelle appartient aussi la NADPH oxydase²³. Celle-ci est polarisée dans la membrane du phagosome et permet la libération de superoxyde à l'intérieur de l'organite, tandis que la consommation de NADPH se fait dans le cytosol du neutrophile. La voie des hexoses monophosphates permet de court-circuiter la voie glucidique et ainsi de former à nouveau du NADPH essentiel pour le maintien de la production de superoxyde.

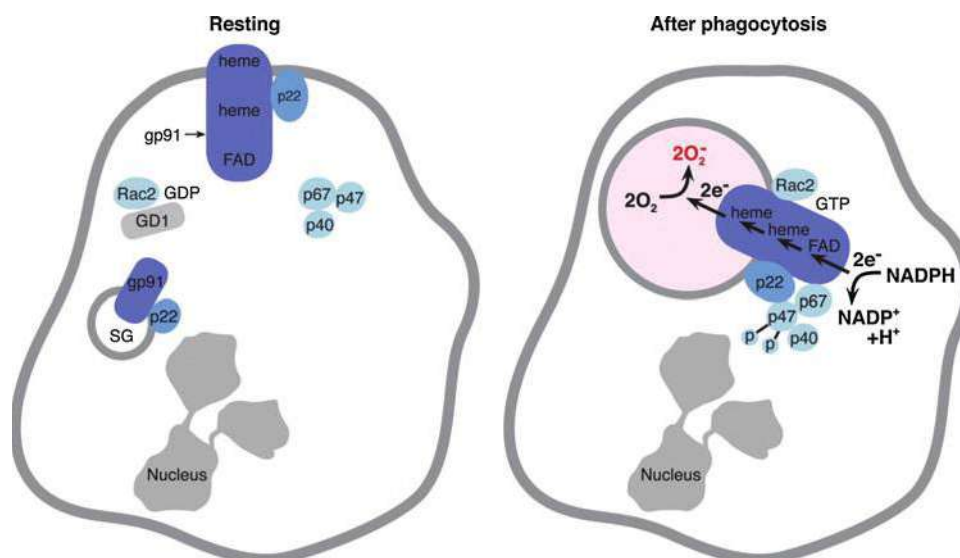


Figure 5 : Activation et assemblage de la NADPHoxydase²⁴

Le différentiel de charges créé par la formation d'ions superoxyde est compensé par le transport de protons à l'intérieur du phagosome via des canaux voltage-dépendants. Les protons réagissent alors avec les ions superoxyde lors de la réaction de dismutation : $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + 2H_2O_2$.

D'autres théories proposent une entrée de potassium dans le phagosome pour le maintien de l'électroneutralité, ce qui faciliterait par ailleurs la solubilisation d'autres granules²⁵.

Dans les conditions à l'intérieur du phagosome, il est reconnu que les ions superoxyde donnent naissance à du peroxyde d'hydrogène lequel donne essentiellement du HOCl et des chloramines grâce à l'activité de la MPO et malgré une grande variété de réactions chimiques

possibles en théorie. Alors que l'essentiel de l'activité est couramment associé aux ions superoxyde, cela n'est pas réellement observé dans les conditions aqueuses de la cellule, dans laquelle il n'est pas un fort oxydant ni un fort nucléophile. Ainsi son activité consiste-elle en un réducteur faible, une base forte de Bronsted et un ligand pour les complexes métalliques. C'est cela qui lui confère une réactivité élevée pour la MPO à l'origine de la dismutation du superoxyde, libérant du peroxyde d'hydrogène. La réaction de dismutation peut également avoir lieu spontanément. H_2O_2 est une molécule bactéricide efficace. Cependant, la concentration dans le phagosome réduit cette activité, compte tenu d'une énergie d'activation élevée pour pouvoir oxyder d'autres molécules²⁶. Ainsi le peroxyde d'hydrogène élimine les bactéries surtout en agissant rapidement au niveau des déshydratases bactériennes. Dans le phagosome H_2O_2 réagit plus largement avec la MPO par affinité aux protéines héminiques. Les caractéristiques et réactions catalysées par la MPO seront développées dans une partie ultérieure, mais il semblerait que dans le phagosome, la MPO réagit avec le peroxyde d'hydrogène formant un cation radicalaire (appelé Composé I) capable d'oxyder différents éléments à hauteur de 1 ou 2 électrons. Compte tenu des concentrations des différents composés dans le phagosome pendant l'explosion respiratoire, les ions chlorure semblent être le principal substrat de la MPO avec H_2O_2 . La forte concentration de MPO dans le phagosome permet de réagir rapidement avec H_2O_2 , ce qui évite sa concentration et sa diffusion à l'extérieur du phagosome qui pourrait être délétère pour le neutrophile.

L'influx de protons et d'ions chlorure permet donc la formation de HOCl. Celui-ci serait dirigé vers l'agent pathogène phagocyté afin de l'éliminer. Des études ont montré que les protéines du phagosome seraient également oxydées (sur les résidus méthionine et cystéine). Aujourd'hui, malgré la preuve que les phagosomes des neutrophiles produisent du HOCl, il n'est pas complètement déterminé si ces derniers sont entièrement responsables de la destruction des bactéries ou bien s'il y a formation de chloramines à partir des protéines du phagosome, qui ont elles-mêmes une activité bactéricide.

Il reste tout de même établi que l'acide hypochloreux est produit au sein des phagosomes et qu'il permet l'élimination des bactéries, de façon directe ou indirecte. L'examen des personnes atteintes d'un déficit de NOX2 ou bien de la MPO montre que l'activité oxydasique au sein des phagosomes représente une première défense rapide et importante, couplée à d'autres mécanismes agissant à plus longs termes. En effet, alors que les sujets souffrant d'un défaut de la MPO semblent plus résistants que ceux souffrant de CGD, les premiers restent

tout de même largement sensibles à de fortes expositions à des bactéries pathogènes, notamment lorsque plusieurs bactéries sont impliquées²⁷. L'activité oxydasique durerait en moyenne plusieurs minutes après la formation du phagosome, tandis que le mécanisme à l'origine de son interruption reste encore mal compris²⁴.

1.2.1.2 *La bactéricidie non oxydative : le rôle des granules spécialisés*

Comme décrit précédemment, les neutrophiles se caractérisent notamment par un éventail de granules dont le contenu est riche en molécules propices à l'élimination des agents pathogènes. Il est soutenu que les neutrophiles expulsent rarement leur contenu intracytoplasmique, et que l'équipement enzymatique est plutôt déversé au sein du phagosome. Dans les différentes vésicules, on retrouve des cathepsines, des défensines, de la lactoferrine et du lysozyme parmi d'autres molécules à pouvoir antimicrobien¹³. Ceci vient compléter la production de radicaux oxydatifs présentée dans le paragraphe précédent. Ceci explique que des individus ayant de déficiences des enzymes oxydatives ne sont pas entièrement immunodéprimés par la présence de ces molécules également bactéricides. Ils restent cependant plus aux agents infectieux.

1.2.1.3 *Nétose*

Au-delà de leur capacité à éliminer les agents pathogènes en les phagocytant ou bien en libérant le contenu enzymatique de certaines vésicules dans le milieu extérieur à leur contact, les neutrophiles possèdent également une autre propriété pour l'élimination extracellulaire des agents pathogènes : la nétose, la bactéricidie extracellulaire doit être contrôlée afin de minimiser au maximum l'atteinte des tissus environnants. Suite à l'activation des neutrophiles par la présence de bactéries ou de chimiokines, il est possible d'observer l'émission d'un réseau de fibres capables de lier des bactéries quel que soit leur type. Il s'agit d'un processus rapide qui apparaît en une dizaine de minutes. Ce réseau est composé d'ADN, d'histones ainsi que d'enzymes contenues dans certaines vacuoles des neutrophiles parmi lesquelles des enzymes contenues dans les granules primaires (élastases, cathepsines G et MPO) ainsi que des protéines des granules secondaires et tertiaires (lactoferrine et gélatinase)²⁸. Suite à l'inefficacité des NET en présence d'ADNase, il a été déduit qu'il s'agit d'une structure faite principalement de chromatine et d'histones. Sa sécrétion par les neutrophiles activés reste encore incomprise. En effet il s'agit d'un processus plus rapide que l'apparition de l'apoptose

suite à l'émission de signaux adaptés. Il se pourrait cependant que cela soit un évènement précoce dans l'évolution apoptique de la cellule. Il semblerait que des neutrophiles ayant émis des NETs puissent continuer à migrer en réponse à un gradient chimiotactique. Il est tout de même admis que ces structures extracellulaires permettent une concentration des agents pathogènes et leur destruction, ainsi que l'inactivation de leurs facteurs de virulence grâce notamment à l'élastase et aux histones. Des études ont pu mettre en évidence avec clarté les propriétés antimicrobiennes des histones même à des concentrations faibles²⁹. Ceci est efficace face à une grande variété de pathogènes. En effet le maillage dense de chromatine permet la concentration des agents pathogènes au contact des molécules de défense et des agents chimiotactiques. Cela permet non seulement une réelle efficacité de la lutte antimicrobienne mais aussi un moindre effet sur les tissus situés autour.

Malgré la capacité de protection vis-à-vis des pathogènes conférée par la formation des NETs, il reste cependant plusieurs questions concernant leur mise en place. Il est difficile de concilier la migration des neutrophiles activés avec la formation d'un réseau de capture des bactéries, ainsi que le relais amplificateur pour l'attraction d'autres cellules effectrices de l'immunité. Il reste aussi à comprendre comment ce réseau dense de chromatine est défait une fois que l'infection est contrôlée³⁰.

1.2.1.4 *Recrutement cellulaire*

Les neutrophiles jouent un rôle important au sein du site inflammatoire pour le recrutement et l'activation d'autres cellules comme les macrophages. Les neutrophiles activés sont capables de libérer une grande quantité de chimiokines, qui sont elles-mêmes capables d'attirer des macrophages, aussi bien que des monocytes et des cellules dendritiques. En effet des neutrophiles activés vont libérer dans le milieu extracellulaire MIP-1 β (Macrophage Inflammatory Protein) et MIP-1 α . Ces molécules pluripotentes sont capables d'activer des macrophages et des monocytes, aussi bien que des cellules dendritiques immatures et des cellules NK (Natural Killer). TNF- α , IL-8 et IL-17 seraient aussi libérés par les neutrophiles et influeraient sur l'activation des macrophages et des cellules dendritiques, aussi bien que sur la maturation des macrophages vers un profil anti ou pro-inflammatoire. Enfin les macrophages libèrent des MMRs (Macrophage Mannose Receptors) capables d'interagir avec la MPO produite par les neutrophiles, ce qui stimule également la libération de cytokines pro-inflammatoires³¹.

Par ailleurs, les neutrophiles vont libérer des molécules qui vont promouvoir leur propre recrutement dans le site inflammatoire. Ceci est permis par la libération d'IL-17 déjà citée précédemment qui agit indirectement en stimulant la production du G-CSF qui stimule la production de neutrophiles. D'autre part, la libération d'IL-8 et de GRO α (*Growth-related gene product- α*) crée un gradient chimioattractant pour d'autres neutrophiles³². Il convient enfin de rappeler qu'en agissant sur les macrophages, il y a libération par ces derniers de molécules qui vont également stimuler la migration des neutrophiles vers le site inflammatoire ainsi que prolonger la survie des neutrophiles présents³¹.

Le lien entre cellules dendritiques et neutrophiles a déjà été largement étudié afin de montrer que la réponse immunitaire Th1 est dépendante de l'activation des neutrophiles au site inflammatoire³³. En effet lors d'activation des neutrophiles, plusieurs molécules sécrétées dans le milieu ont le pouvoir de déclencher la maturation des cellules dendritiques immatures et ainsi conduire à l'apparition des versants aussi bien inné qu'adaptatif de la réponse³¹.

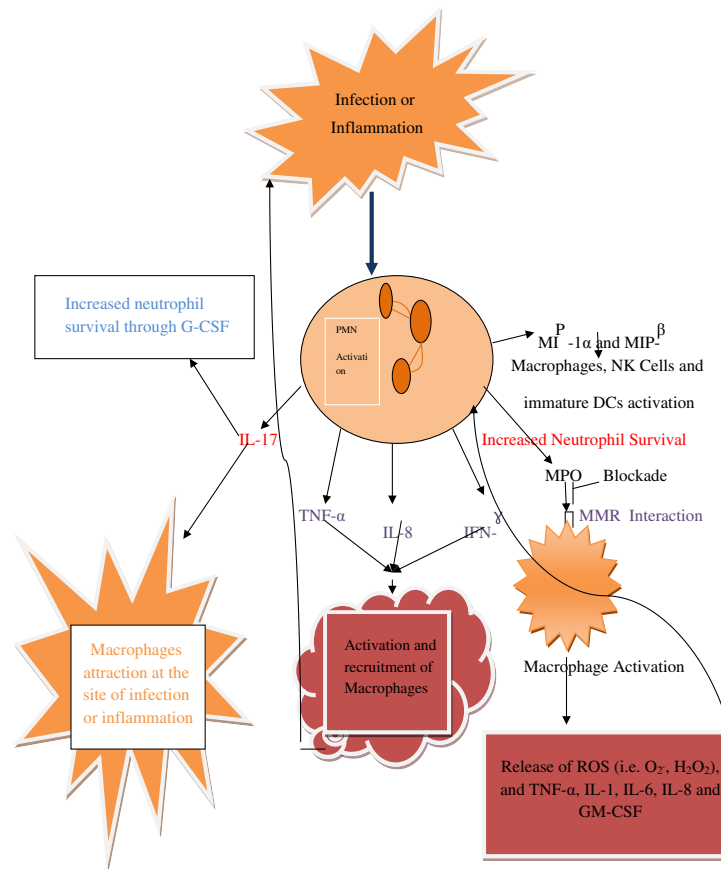


Figure 6 : interaction des neutrophiles avec les macrophages (d'après Kumar³¹)

1.2.2 Immunité adaptative : présentation d'antigènes par les PNN

Les neutrophiles joueraient également un rôle direct dans la réponse immunitaire adaptative par la libération directe de molécules agissant sur la population de lymphocytes ainsi que par un rôle de cellule présentatrice d'antigènes au sein de la moelle osseuse. En effet, après injection de virus modifié Ankara, il a été montré que des neutrophiles ont la capacité de migrer à partir du site cutané d'injection vers la moelle osseuse où ils interagissent avec des cellules myéloïdes résidentes. Ce rôle est de plus renforcée par la localisation de neutrophiles au sein des nœuds lymphatiques ⁸.

1.2.3 Apoptose et survie des PNN lors d'infection

Dans des conditions normales, la durée de vie des granulocytes circulant est courte, entre 24 et 48 heures, ce qui fait que le pool sanguin est renouvelé entièrement en moyenne 2 fois par jour chez l'homme. L'apoptose des neutrophiles les rend insensibles aux stimuli extérieurs, avec pour conséquence, l'expression de signaux « eat-me » à l'origine de la reconnaissance de ces cellules par les macrophages circulants et leur élimination dans la rate, la moelle, ainsi que par les cellules de Küppfer dans le foie. Cependant lors d'inflammation et de migration transendothéliale des neutrophiles au sein des tissus, il est essentiel que ceux-ci restent actifs jusqu'à l'élimination des agents pathogènes. Ce n'est qu'après cette étape que les cellules immunitaires peuvent subir l'apoptose, la nécrose ou bien la NETose (libération des NETs). L'apoptose neutrophilique joue un rôle majeur dans le processus de régulation et de fin de l'inflammation grâce à la capacité de ces cellules de séquestrer des cytokines inflammatoires en plus de devenir progressivement insensibles aux stimuli avec arrêt de la production et de la libération de molécules pro-inflammatoires. L'activité des macrophages phagocytaires est également influencée avec une polarisation vers le phénotype M2 dont la principale caractéristique est de promouvoir la résolution des processus inflammatoires. Ces derniers libèrent des cytokines telles que l'IL-10 et le TGF- β , qui interviennent également dans le processus de réparation des tissus lésés.

Lors d'un retard dans le déclenchement de l'apoptose des cellules inflammatoires, ou d'un défaut de phagocytose des macrophages, les neutrophiles peuvent persister au sein du milieu

inflammatoire et être à l'origine d'une réponse exacerbée avec production prolongée de cytokines pro-inflammatoires et à terme une atteinte des tissus de l'hôte.

La lutte efficace contre les agents pathogènes résulte donc d'un équilibre entre une apoptose trop précoce pouvant conduire à un défaut d'immunité de l'hôte à l'origine d'une infection chronique et sévère pour l'organisme, ou à l'inverse, d'une apoptose trop tardive qui peut être directement nuisible pour l'organisme. C'est le cas dans des maladies humaines telles que le syndrome de détresse respiratoire aigüe, l'arthrite rhumatoïde, le sepsis parmi d'autres.

On retrouve cette même analogie de l'équilibre au niveau cellulaire. Il existe un équilibre constant entre les signaux apoptiques et les signaux de survie des neutrophiles. Lors de l'absence de signaux extérieurs, les neutrophiles subissent une apoptose dite constitutive, par défaut. Cependant, dans la majorité des cas, ces cellules reçoivent un ensemble de signaux antagonistes qui les maintient vivants et actifs³⁴.

On retrouve parmi les signaux de survie le GM-CSF, le leucotriène B₄, le C5a, la protéine C-Réactive de la phase aigüe, le LPS bactérien ainsi que l'ADN bactérien. Ce sont des signaux agissant sur différentes cascades de phosphorylation à l'origine de la survie des PNN.

On retrouve également les β 2 intégrines dans la régulation du temps de survie des neutrophiles en plus du rôle fondamental d'adhésion et de migration bien établi, qui sont essentiels pour l'immunité de l'hôte. On retrouve la molécule Mac-1 appartenant à la famille des β 2-intégrines avec un rôle dans la liaison au fibrinogène, les complexes immuns, et les plaquettes. Il s'agit, au même titre que CD11c/CD18, de récepteurs spécifiques aux parties C3ib du complément capables de réguler la phagocytose des bactéries opsonisées tout en étant capables de reconnaître directement des fragments de ces agents pathogènes. Différents ligands du récepteur Mac-1 auront des effets sur la survie des neutrophiles.

Tableau 2 : Ligands de Mac-1 et leurs effets sur l'apoptose des neutrophiles (d'après Kebir et Filep³⁴).

Ligand	Action	Rôle sur l'apoptose
ICAM-1	Adhésion et migration PNN	Supprime apoptose
Fibrinogène	Précurseur de fibrine, initie coagulation	Supprime apoptose
Plasminogène	Précurseur de plasmine, initie fibrinolyse	Supprime apoptose
Angiostatine	Inhibe angiogénèse	Pas d'effet
MPO	Lyse bactérienne, stimule expression Mac-1 et libération MPO	Supprime apoptose
Héparine	Anticoagulant	
Immobile	Int. adhésion des leucocytes	Provoque apoptose
Soluble	Inhibe liaison fibrinogène	Inconnu
Soluble, BPM		Pas d'effet
Bactérie opsonisée	Phagocytose des bactéries	Provoque apoptose

1.2.4 Propriétés anti-tumorales

Des expériences chez l'animal ont permis d'étudier le profil de neutrophiles et leur influence sur le milieu favorisant d'apparition d'une tumeur. En effet, des études indiquent que la présence de neutrophiles en grande quantité signerait un moins bon pronostic avec un profil pro-tumorigène. Il est également admis l'existence de neutrophiles dont le profil est anti-tumorigène.

En effet, de nombreuses tumeurs libèrent des molécules qui vont attirer les neutrophiles dans le milieu tumoral, telles que CXCL6, CXCL8 et CCL3. Une fois sur place, ces neutrophiles dit

associés aux tumeurs (TAN, *Tumor Associated Neutrophils*) seront activés à leur contact, augmentant ainsi le signal de recrutement. Les neutrophiles activés produisent alors des molécules qui vont faciliter le développement tumoral dont les metalloprotéases MMP8 et MMP9, ainsi que des molécules stimulant l'angiogenèse telles que VEGF. De plus, en désorganisant la lame basale de la matrice extracellulaire, les neutrophiles favorisent le passage des cellules tumorales dans la circulation sanguine et ainsi l'apparition de métastases. Les TAN vont également avoir un effet immunosuppresseur sur les cellules T CD8+ qui possèdent une action cytolytique sur les cellules tumorales.

Par ailleurs, les TAN peuvent également exercer une action anti-tumorale localement dans certains cancers. En effet la production locale de ROS permet une action lytique directe sur les cellules tumorales, tandis que la libération d'un ligand FAS induirait l'apoptose de cellules tumorales. De plus, la libération de cytokines pro-inflammatoires engendre une stimulation de cellules T CD8+ anti-tumorales. Enfin, plusieurs techniques thérapeutiques se basent sur la production d'anticorps reconnaissant les cellules tumorales, afin de stimuler l'activité phagocytaire des neutrophiles pour les cellules tumorales.

Ainsi, par rapprochement avec ce qui a déjà été décrit pour les macrophages, certains auteurs tendent à différencier ces deux profils de TANs en N1 pour les cellules à profil anti-tumoral et N2 pour celles favorisant le développement tumoral⁷.

1.3 Spécificités relatives à l'espèce bovine

La production des neutrophiles dans l'espèce bovine est semblable à celle décrite auparavant pour l'homme, avec une durée moyenne de 6 jours. Cependant, dans cette espèce, ils sont retenus un jour supplémentaire dans la moelle avant de rejoindre la circulation sanguine. Ceci est valable même lors d'inflammation aiguë et comparativement, la réserve de neutrophiles dans la moelle osseuse est inférieure à celles des autres espèces. Cela explique en partie la raison pour laquelle une neutropénie est souvent observée lors des phases précoces de l'inflammation à réponse granulopoïétique³⁵. Ceci est par la suite compensé par la stimulation de la granulopoïèse et le décalage à gauche de la courbe d'Arneth, qui traduit la production de jeunes neutrophiles. D'autre part les bovins possèdent un troisième type de granules

neutrophiliques, plus amples que les granules primaires et secondaires. Ce type occupe la moitié du cytoplasme des neutrophiles de cette espèce. Des études cytochimiques et immunocytochimiques ont permis de montrer l'absence de lysozyme à l'intérieur des neutrophiles bovins alors qu'il s'agit d'une molécule très présente dans d'autres espèces³⁵.

L'absence de neutrophilie au cours des 3 à 5 premiers jours d'une inflammation rend la distinction entre une inflammation chronique et une réponse récente, difficile en se basant sur le seul leucogramme. Ainsi, est-il plus aisé de rechercher une production en excès d'une protéine de phase aiguë comme le fibrinogène ou l'haptoglobine, afin de distinguer les deux situations. Lors d'inflammation aiguë marquée, on observe une neutrophilie modérée suite à la stimulation de la granulopoïèse. Cependant, lors d'inflammation chronique, on observe une concentration normale ou bien une légère neutropénie lorsqu'il y a une forte mobilisation de neutrophiles.

Plusieurs causes peuvent être à l'origine d'une neutrophilie avec en premier lieu les infections d'origines bactériennes, virales et fongiques. Cette augmentation est également observée lors d'affections digestives comme un déplacement de la caillette, un processus néoplasique, une anémie immuno-médiée, une toxicose, un syndrome de détresse respiratoire aiguë due à une hypersensibilité ainsi que suite à l'administration de somatotropine.

1.3.1 Les médiateurs de l'inflammation chez l'espèce bovine

Ainsi que dans d'autres espèces, les neutrophiles sont attirés par des chimioattractants libérés lors d'une infection, parmi lesquels on retrouve essentiellement des chimiokines comme CXCL8, les leucotriènes LTB4 et les PAFs. CXCL 8 et LTB4 sont non seulement responsables de l'attraction des neutrophiles, mais aussi de l'amplification de la réponse inflammatoire vu que ces derniers sont eux-mêmes capables d'en synthétiser après activation. CXCL 8 a notamment été étudié avec précision, ce qui a permis de déterminer qu'il s'agit d'une molécule largement exprimée par les neutrophiles ainsi que par des macrophages dans les tissus enflammés. *In vitro* les neutrophiles activés vont libérer cette molécule après avoir subi la diapédèse et le chimiotactisme. CXCL 8 est donc libérée par des neutrophiles permettant une amplification de la réponse inflammatoire et également l'activation de la réponse oxydative des neutrophiles^{36,37}.

Les PAF sont des molécules dérivées de phospholipides produites par différents types

cellulaires. Elles sont capables d'attirer les polynucléaires neutrophiles et de les activer, provoquant la libération de ROS ainsi que la dégranulation. Ce sont également des molécules capables d'agir sur les neutrophiles qui peuvent eux même en libérer dans les tissus, provoquant ainsi une amplification de la réponse initiale^{38,39}.

C5a est un des fragments du complément rapidement libéré lors d'inflammation. Il agit également sur les neutrophiles bovins via un récepteur membranaire (C5R) à l'origine d'un influx de calcium stimulant le chimiotactisme de ces cellules ainsi que leur activité phagocytaire et les défenses oxydatives, en plus de retarder l'apoptose. A terme, cette voie de signalisation permet en plus la synthèse et la libération de CXCL8 par les neutrophiles. C5a provoque également l'apparition de CD14 à la membrane des neutrophiles. Il s'agit d'un des corécepteur de TLR4, qui est stocké dans des vésicules intracellulaires⁴⁰. Des études ont également montré que la cytokine TNF- α possède une action similaire avec la capacité d'activer les neutrophiles et promouvoir la phagocytose et l'explosion respiratoire⁴¹.

Comme pour d'autres espèces, les neutrophiles bovins peuvent également détecter directement les agents pathogènes en reconnaissant des fractions très conservées sur leurs membranes. Lors d'exposition à un agent pathogène, les neutrophiles expriment des cytokines pro-inflammatoires telles IL-1, TNF- α , et CXCL8, parmi d'autres. La reconnaissance des MAMPS par les PRR est moins bien connue chez l'espèce bovine que chez l'homme ou la souris comme nous l'avons décrit auparavant. Ainsi *Conejeros et al*⁴² ont pu démontrer que 4 PAMPs étudiés ont produit un changement de la taille et de la forme des neutrophiles en plus de stimuler les propriétés de phagocytose. Malgré une réponse différentielle selon les LPS rencontrés, l'expression en surface de TLR2 et de TLR4 a été démontrée par cytométrie de flux ainsi que l'augmentation de l'expression de TLR4 membranaire après cette exposition, qui provoque la libération de CXCL8 dans le milieu⁴³. Il existe également des PRR cytoplasmiques NOD 1 et NOD 2 (Nucleotide binding Oligomerizing Domain) capables de reconnaître des composés bactériens et d'activer la transcription du facteur NF- κ B (chez l'homme seul NOD 2 est présent). Il s'agit d'une voie importante chez les bovins, conduisant à la migration et probablement au rôle protecteur des neutrophiles. Cependant il ne s'agit pas de l'unique voie d'activation de NF- κ B^{43,44}.

De la même façon que celle décrite auparavant, le rôle des molécules d'adhésion lors de la réponse inflammatoire est reconnue, avec notamment une expression augmentée des β 2-

intégrines sur les endothelia ⁴⁵. Le syndrome de déficience d'adhésion leucocytaire a par ailleurs été largement étudié dans cette espèce où à une mutation sur le gène codant pour CD 18 a été identifiée. Elle causait un défaut d'extravasation des neutrophiles dans les tissus infectés. Les animaux atteints étaient sujets à des neutropénies persistantes et des infections récurrentes qui entraînaient généralement la mort précoce (avant l'âge de six mois) des sujets atteints ⁴⁶.

1.3.2 Les mécanismes de défense permis par les neutrophiles chez les bovins

On retrouve chez les bovins trois types de granules contenant des molécules impliquées dans les défenses anti-bactériennes. Les granules tertiaires sont les plus tardifs dans leur apparition et sont les plus nombreux dans cette espèce ⁴⁷. On retrouve également des vésicules contenant des protéines membranaires ainsi que la phosphatase alcaline. La répartition dans différents organites permet également la séparation de composés capables de s'activer réciproquement et permettant une réponse contrôlée fidèle aux signaux reçus. Ainsi les protéases sont généralement les derniers composés libérés lors de l'activation des neutrophiles, laissant supposer qu'il s'agit d'une réponse de dernière ligne, étant donné son potentiel nocif envers les tissus de l'hôte. En comparaison avec les neutrophiles humains, on trouve chez les bovins une activité antimicrobienne accrue avec des quantités plus marquées de lactoferrine, de protéine B12, de phosphatases alcalines et acides, ainsi que de glutathion peroxydase et oxydase. En contrepartie, les neutrophiles possèdent moins de lysozyme, de MPO, de catalase de β -gluconidase et de β -galactosidase ⁴⁸.

Parmi les peptides antimicrobiens étudiés chez les bovins, il faut noter la présence de cathélicidines de plusieurs formes (différemment de ce qui est vu chez l'homme) dont la production peut être largement amplifiée lors d'inflammation. Ce sont des molécules stockées sous forme de pro-enzymes dans les granules larges et activées par l'élastase contenue dans les granules azurophiles. On retrouve également la présence d'une unique défensine β et l'absence de défensine α . Ces molécules possèdent un spectre antibactérien ainsi qu'antifongiques ^{49,50}.

En plus il existe des PGRPs (Peptidoglycan Recognition Proteins) qui sont également présentes chez les bovins et qui sont capables de reconnaître des séquences conservées chez différentes bactéries, en exerçant une activité antibactérienne et antifongique ⁵¹.

De façon analogue à ce qui a été décrit chez l'homme et la souris, la présence de NETs a suscité de nombreuses études dans les derniers quinze ans, et dans l'espèce bovine, le même mécanisme a été décrit^{52,53}.

De manière semblable à ce qui est connu chez l'homme, les neutrophiles bovins exercent également une activité de contrôle de la réponse inflammatoire, en plus de leur rôle central dans l'élimination des agents pathogènes. Ces capacités aussi bien pro- qu'anti-inflammatoires ne sont pas très bien élucidées chez les bovins. Les neutrophiles sont capables d'attirer d'autres cellules inflammatoires en libérant des PAF et du LTB₄. La libération de glycoprotéine acide α 1 en diminuant la production de ROS et en stimulant la production de CXCL 8, est également modulateur de la réponse neutrophilique^{54,55}. Les neutrophiles exercent de plus une activité sur les autres cellules immunitaires dont les macrophages et les monocytes. Ces derniers sont stimulés lors de la dégranulation des neutrophiles bovins avec la production de CD31 et CD11a par les monocytes. De plus, des expériences *in vitro* ont montré que les monocytes deviennent des macrophages avec un profil M2 et une libération accrue d'IL-10 et d'IL-12, et une plus grande capacité de phagocytose et de production de ROS au bout de 4 jours d'incubation en présence des produits de dégranulation des neutrophiles⁵⁶. Par ailleurs, il semblerait que les neutrophiles sont capables d'intégrer des protéines membranaires de cellules mortes, qui conservent leurs propriétés fonctionnelles. Ceci aurait une influence directe sur l'immunité adaptative car les neutrophiles joueraient un rôle de cellules présentatrices d'antigènes⁵⁷.

Comme dans l'espèce humaine, les neutrophiles constituent un pool de cellules hautement différenciées dont le temps de survie est court. Cependant il s'avère que lors d'inflammation, ces cellules sont capables de survivre plus longtemps dans les tissus enflammés. Ceci permet une augmentation de leur potentiel antibactérien mais produit également des altérations des tissus de l'hôte. On observe chez les bovins un retard de l'apoptose des neutrophiles, ainsi qu'un délai de la phagocytose par les macrophages ; ceci peut avoir des conséquences importantes qui seront détaillées plus loin.

1.4 Les marqueurs de l'inflammation chez les bovins

Parmi les différents paramètres hématologiques, le leucogramme est le moyen le plus approprié pour évaluer une inflammation compte tenu de l'influence de la lignée blanche lors d'inflammation. Il permet d'obtenir le nombre de leucocytes totaux, de neutrophiles segmentés et non segmentés, des éosinophiles, des basophiles (qui sont très peu nombreux dans l'espèce bovine), des monocytes, et des lymphocytes.

La teneur en d'hémoglobine est variablement affectée lors d'inflammation. Lors d'affection chronique, une anémie hypochrome macrocytaire peut être observée. Cependant, en raison de sa faible sensibilité et de sa faible spécificité, ce paramètre n'est pas utilisé comme marqueur de l'inflammation chez les bovins. Il est aujourd'hui difficile d'établir des sensibilités et des spécificités pour la détection d'un processus inflammatoire pour un paramètre donné. Les études permettent cependant de tracer des grandes lignes avec des valeurs seuils chez un animal sain.

1.4.1 Leucogramme

1.4.1.1 Valeurs usuelles

On peut retrouver les valeurs usuelles de la formule sanguine des bovins dans le tableau.

Tableau 3 : Numération et formule sanguine chez le bovin adulte⁵⁸

Numération formule sanguine				
Formule érythrocytaire				
Paramètres	Valeurs normales	Moyenne		
Numération érythrocytaire (x 10 ⁶ /mm ³)	5 - 10	7		
Taux d'hémoglobine (g /100 ml)	8 - 15	11		
Hématocrite (%)	24 - 46	35		
VGM (µm ³)	40 - 60	52		
TGMH (pg)	11 - 17	14		
CCMH (%)	30 - 36	32,7		
Numération réticulocytaire	0	0		
Diamètre érythrocytaire (µm)	4 - 8	5,8		
Formule leucocytaire				
Paramètres normaux (nombre/mm ³)	Ecart normaux	Moyenne	Pourcentage de la population leucocytaire (%)	Pourcentage moyen
Numération leucocytaire	4000 - 12000	8000		
Neutrophiles non segmentés	0 - 120	20	0 - 2	0,5
Neutrophiles segmentés	600 - 4000	2000	15 -45	28
Eosinophiles	0 - 2400	700	0 - 20	9
Basophiles	0 - 200	50	0 - 2	0,5
Monocytes	25 - 840	400	2 - 7	4
Lymphocytes	2500 - 7500	4500	45 - 75	58
Autres				
Numération Thrombocytaire	100000 - 800000	500000		

1.4.1.2 Variations physiologiques

Il est important de noter que ces valeurs sont valables chez l'adulte, alors que chez le nouveau-né et le jeune, on observe une variation au cours des premières semaines de vie. A la naissance, le rapport Neutrophiles : Lymphocytes (N:L) est supérieur à 2:1 voire 3:1 ; il

s'inverse progressivement durant les premières semaines de vie, en raison de la diminution des neutrophiles circulants et de l'augmentation simultanée du nombre de lymphocytes.

Une autre variation couramment rencontrée est celle d'un leucogramme dit de stress, comme conséquence de l'augmentation de la concentration de cortisol et d'adrénaline. On observe une augmentation du nombre de neutrophiles et de lymphocytes, qui en général ne dépasse pas le double des valeurs usuelles sous l'action de l'adrénaline. Dans le cas d'une hypercortisolémie, les variations sont plus marquées. Cependant la neutrophilie observée, qui peut durer jusqu'à 72 heures, n'est pas accompagnée d'une déviation à gauche de la courbe d'Arneth, compte tenu de l'absence de libération de cellules immatures depuis la moelle. A cause de la séquestration concomitante des lymphocytes dans les tissus lymphoïdes, on observe également une augmentation du rapport N:L. Ceci est observé notamment lors de situations de stress, d'excitation ou après l'exercice physique. Fréquemment noté au moment du vêlage, la neutrophilie est suivie d'une diminution rapide du nombre de neutrophiles dans les 48h, avant de revenir aux valeurs de base au bout de 4 à 6 jours. On l'observe également dans le cas d'atteintes avec des réactions inflammatoires légères (déplacement de la caillette, hypocalcémie puerpérale, dystocie simple...) ^{59,60}.

On retrouve bien entendu des variations semblables lors de mises bas sans complications ou bien lors d'injection de corticostéroïdes.

1.4.1.3 *Variations lors d'états inflammatoires*

Comme décrit auparavant, compte tenu de la particularité de la faible réserve de neutrophiles, on observe chez les bovins une neutropénie accompagnée d'une lymphopénie lors des premières heures de la réaction inflammatoire. La séquestration des neutrophiles au sein du site inflammatoire génère cependant des messagers hormonaux à l'origine d'abord d'une libération du pool de réserve sous l'action de NRF (Neutrophil Releasing Factor), puis d'une néo-granulopoïèse libérant des neutrophiles immatures sous l'action de G-CSF. Ainsi un décalage à gauche de la courbe d'Arneth est généralement observé 24 à 48 heures après la neutropénie primaire.

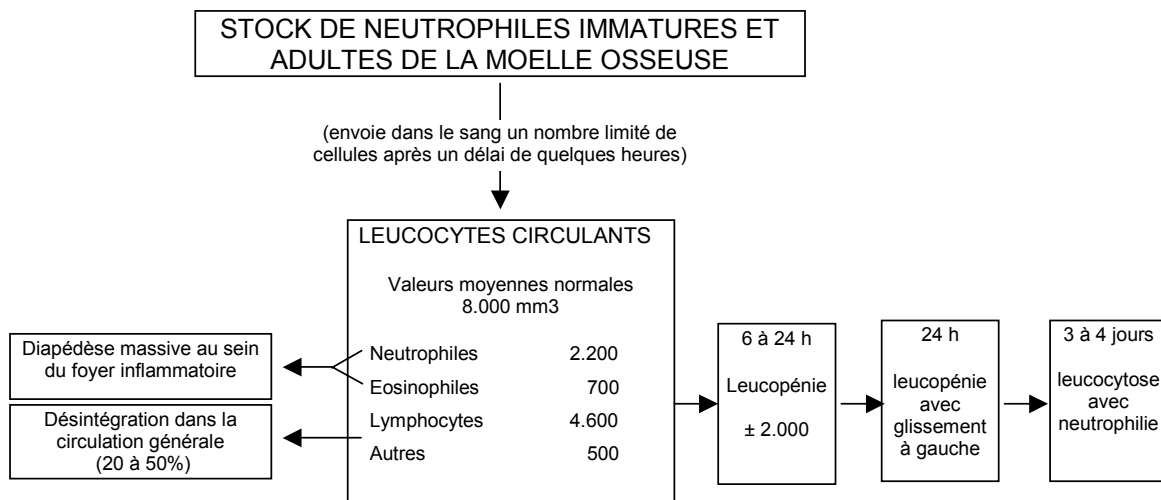


Figure 7 Dynamique de la réponse leucocytaire aux infections bactériennes chez les bovins^{35,60}

Les variations de proportions entre les différents types cellulaires permettent d’orienter le diagnostic en fonction de la répartition observée. Si on s’intéresse plus particulièrement aux neutrophiles, la diminution du nombre d ces–derniers est présente dans les premières heures de l’inflammation mais également lors de septicémie et d’endotoxémie d’origine gastro-intestinale. Lors des certaines infections virales et de cancer affectant la moelle productrice (possiblement accompagnés d’une anémie aplasique), une diminution du nombre de neutrophiles circulants est également possible.

A l’inverse, la neutrophilie est présente lors d’inflammation suppurée et elle est en général plutôt de bon pronostic indiquant l’activation de la réponse immunitaire. Il convient de noter au même moment la présence de monocytes circulants, normalement en très faible quantité (entre 25 et 840/mm³), dont le nombre peut être augmenté lors d’une infection chronique, ou bien diminués de façon transitoire en réponse à un stress corticoïde.

La présence de neutrophiles non-segmentés circulants donc immatures en parallèle d’une neutropénie, est le signe d’une inflammation sévère le plus souvent d’origine bactérienne. La régénération du pool de neutrophiles circulants par la moelle est insuffisante et permet de

répondre aux besoins de la réponse immunitaire.

1.4.2 Les protéines de la phase aigüe

La définition donnée par la Société Française de Biologie Clinique pour les protéines de la phase aigüe (PPA) est la suivante : ce sont des protéines plasmatiques dont le taux de production hépatique est supérieur au taux du catabolisme, au cours de la réaction inflammatoire, quelle que soit la cause de cette dernière ». En fonction de l'augmentation ou de la diminution de leur production pendant cette réaction, on parle respectivement de protéines positives ou négatives. Différentes études ont permis d'isoler chez les bovins des glycoprotéines hydrosolubles répondant à ces critères : l'haptoglobine, la SAA et l'alpha1-AGP plasmatiques. Des valeurs seuils ont été établies dont celles proposées par Eckersall *et al*⁶¹ :

- Haptoglobine (HP) : 50 mg/L
- Sérum Amyloïde A (SAA) : 9,6 mg/L
- α 1-glycoprotéine (AGP) : 0,5 mg/L

On peut donc affirmer que lors de différentes affections à l'origine d'un processus inflammatoire, une augmentation de ces paramètres au-dessus du seuil établi est observée. Cependant pour chaque paramètre, spécificité et sensibilité varient ce qui peut en partie être expliqué par leur nature, leurs fonctions et leur métabolisme. La Protéine C-Réactive n'est pas considérée comme une protéine de l'inflammation aigüe chez les ruminants.

1.4.2.1 L'Haptoglobine (Hp)

L'haptoglobine est une molécule composée de deux chaînes polypeptidiques reliées par un pont disulfure. L'haptoglobine a la capacité de fixer l'hémoglobine libre ainsi que ses dérivés provenant de la lyse des globules rouges par apoptose ou lors d'hémolyse. Le complexe formé (Hb-Hp) est par la suite métabolisé par les macrophages ou dans le foie. Cette molécule possède également des propriétés anti-oxydantes indirectes par inhibition de la production de radicaux libres pouvant endommager les tissus endogènes. Elle participerait également à l'angiogenèse, jouant ainsi un rôle direct dans la cicatrisation. Chez les bovins, sa concentration augmente d'un facteur x100 lors de processus inflammatoire, ce qui en fait une des protéines majeures de l'inflammation dans cette espèce. Chez des animaux sains, les concentrations en haptoglobine sont très basses voire nulles (<0,2 mg/mL) alors que dans des

conditions morbides, notamment lors d'infections bactériennes avec un processus inflammatoire aigu (métrite, abcès hépatique, ...), les concentrations augmentent très fortement ; la même observation a été faite dans les conditions d'inflammation provoquée expérimentalement^{62,63}.

Plusieurs techniques de dosage de l'haptoglobine ont été développées, dont des méthodes rapides et peu onéreuses pouvant être utilisées en pratique médicale⁶⁴. Cependant des interférences sont possibles notamment lors d'hémolyse marquée avec la formation de complexes Hp-Hb en grande quantité qui vont subir le métabolisme hépatique à l'origine d'une concentration circulante plus faible alors qu'un processus inflammatoire évolue en parallèle provoquant la hausse de sa concentration.

Les variations de la concentration de l'haptoglobine semblent très spécifiques (valeur de spécificité supérieure à 85% et de sensibilité comprise entre (60 et 90%). La hausse de la concentration est le résultat de la production d'IL-6 et de TNF- α ^{60,65}.

1.4.2.2 SAA

Le terme de Serum Amyloïde A (SAA) regroupe un ensemble d'apolipoprotéines dont la structure est conservée au sein de différentes espèces et de faible poids moléculaire. Elle est liée aux HDL (*High Density Lipoprotein*) de façon physiologique et sa production hépatique est largement amplifiée par les cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-1) lors d'inflammation. Sa concentration peut subir une hausse de 100 à 1000 fois dans de brefs délais⁶⁶.

Le rôle de ces molécules n'est pas entièrement élucidé mais il semblerait qu'elle participe à la régulation du métabolisme des HDL et du cholestérol. Elle jouerait de plus un rôle chimiotactique pour les cellules de l'inflammation en facilitant l'adhérence de ces cellules.

Son dosage se fait principalement par ELISA indirect chez les bovins⁶⁰. Lors de processus inflammatoires, il s'agit de la molécule avec la sensibilité la plus élevée, entre 80 et 100% et dont la spécificité varie entre 80 et 90%. Ceci peut être dû au fait que la seule influence de l'IL-6 suffirait à augmenter les concentrations de SAA⁶⁵, avec parfois des animaux présentant une élévation du taux de SAA alors que ceux de l'haptoglobine restent inchangés. Les valeurs sont élevées même lors d'inflammation modérée ainsi que lors de stress et autres phénomènes non inflammatoires. Pour ces raisons, il est donc important de corrélérer les variations observées avec celles de l'haptoglobine et le contexte clinique.

1.4.2.3 $\alpha 1$ - AGP

L' $\alpha 1$ - AGP est une glycoprotéine constituée d'une chaîne polypeptidique dont la composition en acides aminés est connue pour l'espèce bovine. Sa fonction est encore mal déterminée ; elle joue un rôle dans l'hémostase et la restauration des tissus conjonctifs en se déposant sur la surface des fibres élastiques néoformées, les protégeant ainsi des conditions lytiques du milieu inflammatoire. Son rôle précis n'est pas entièrement compris mais elle stimulerait la croissance des fibroblastes avec également une forte action immuno-modulatrice et anti-inflammatoire. Ce rôle est démontré *in vitro*.

Des kits de dosage par immunodiffusion radiale sont disponibles dans le marché. Le pic de concentration semble se produire tardivement lors de processus inflammatoire avec des valeurs peu modifiées en début d'inflammation, ce qui explique des valeurs de sensibilité très variables en fonction des études.

1.4.3 Myéloperoxydase

1.4.3.1 Structure et localisation

La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme hémique présente en concentrations élevées dans les granules primaires des neutrophiles, représentant 5% de la masse protéique de la cellule. Chez l'homme, la MPO est présente également mais dans des quantités bien moindres, dans des populations de macrophages résidents telles les cellules de Küppfer dans le foie ou encore la microglie.

C'est une enzyme qui agit en synergie avec les autres enzymes de l'explosion respiratoire, la NADPH-oxydase, et la NOSynthase. Cette action conjointe permet d'éliminer les microorganismes phagocytés qui sont résistants aux enzymes protéolytiques. Il existe une grande similitude du comportement enzymatique de la MPO dans les différentes espèces où elle a été identifiée, malgré une séquence d'acides aminés qui varie. Les données les plus maîtrisées concernent les enzymes humaines et équine.

La myéloperoxydase appartient à la famille des peroxydases des mammifères, présente en grande quantité dans les granules primaires des neutrophiles, et dans les monocytes en quantité plus faible. Elle est indétectable avant les dernières étapes de maturation des macrophages. La synthèse de MPO a lieu dans la moelle osseuse au sein des cellules

myéloïdes. Lors de la synthèse de MPO humaine, un passage dans le réticulum endoplasmique de la séquence immature permet une N-glycosylation de celle-ci et incorpore le groupe prosthétique hémique à Fe^{3+} donnant naissance à la proMPO de 90kDa de poids moléculaire. L'enzyme mature est obtenue suite au passage dans un compartiment pré-granulaire. L'hème est lié par son atome $Fe(III)$ à deux histidines de la protéine, l'une par liaison covalente et l'autre par un pont hydrogène. Par ailleurs l'hème présente trois liaisons covalentes avec la protéine. La protéine étant glycosylée, son poids varie entre 120 et 150 kDa, avec un pic d'absorption caractéristique à 430 nm à cause de sa structure hémique. Suite à différents signaux (liaison de TLR, GM-CSF, $TNF-\alpha$...), la MPO peut être libérée par dégranulation ou bien par apoptose ou nécrose cellulaire^{67,68}.

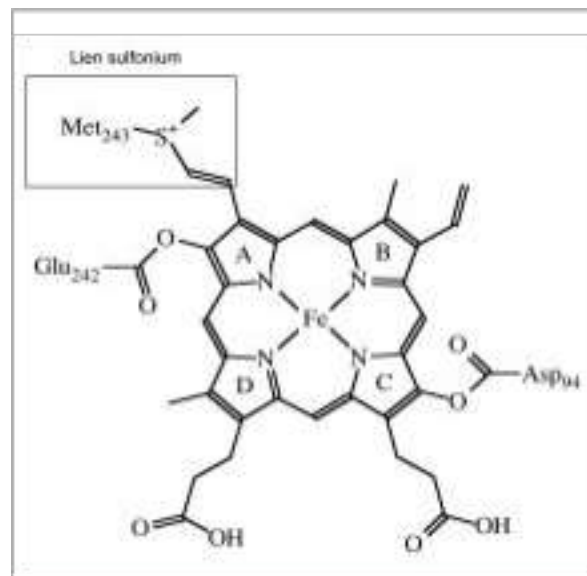
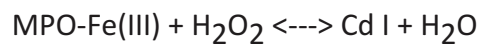


Figure 8: Structure du noyau hémique de la MPO humaine⁶⁹

1.4.3.2 Rôle biologique

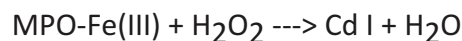
La MPO est une enzyme clé dans le rôle de défense des neutrophiles dans l'immunité. La MPO possède une activité peroxydase et de chloration libérant de l'acide hypochloreux HOCl ou bien des acides hypo-halogénés à partir d'ions bromure ou iodure. Son activité de chloration crée des agents intermédiaires hautement réactifs conduisant à la formation de dérivés chlorés. Différemment des autres peroxydases, la MPO est très réactive sous sa forme naturelle MPO – $Fe(III)$ donnant un intermédiaire lui-même hautement réactif Cdi de courte durée de vie qui réagit avec Cl^- afin de donner l'ion hypochloreux et restituer la MPO- $Fe(III)$.

- Activité de chloration



CdI peut par ailleurs réagir avec un substrat réducteur DH pour former CdII possédant une structure hémique à Fe(IV) et un produit oxydé radicalaire provenant de DH. En réagissant avec un nouveau réducteur, Cd II restitue la MPO-Fe(III) en formant un deuxième produit oxydé radicalaire. Les produits oxydés radicalaires peuvent diffuser et conduire à la formation de produits actifs de lipoperoxydation à partir de différents réducteurs tels que les nitrites (NO_2^-), l'ascorbate, l'urate, les catécholamines, les œstrogènes, la sérotonine et la tyrosine.

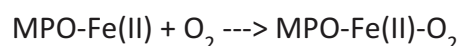
- Activité peroxydase



Des concentrations maximales en H_2O_2 et en Cl^- sont nécessaires afin d'optimiser la production d'ion hypochloreux et ainsi éviter la formation de CdII (et d'ion superoxyde) à partir de CdI qui réagit avec H_2O_2 ainsi que la formation de CdI par réaction de la MPO avec HOCl.

De plus, la MPO peut réagir avec des réducteurs (dont O_2^\bullet) afin de former CdIII inactif. Cette réaction reste toutefois réversible et peut se produire en début de phagocytose lorsque le pH à l'intérieur du phagosome est alcalin ou bien neutre, favorisant ainsi l'action de la NADPH-oxydase avec une MPO quiescente. Lorsque le pH se rapproche du pH optimal de fonctionnement de la MPO, c'est-à-dire $\text{pH}=5,5$, CdIII libère à nouveau de la MPO-Fe(II) naturelle.

- Formation du Cd III



Toutefois, une inactivation irréversible de la MP – Fe(III) par HOCl est possible, ce qui laisse supposer un mécanisme d'autorégulation.

Ainsi pH, production de $O_2^{\cdot-}$ avec formation de H_2O_2 , concentration de Cl^- dans le plasma, concentrations en réducteurs et en monoxyde d'azote vont balancer de façon complexe les différentes réactions de la MPO au sein du phagosome.

La myéloperoxydase va donc permettre de former différentes espèces oxydantes. Comme cité précédemment, l'acide hypochloreux est le principal produit de l'enzyme, il agit comme un puissant bactéricide à l'intérieur du phagosome dans lequel il est formé, et va permettre de nombreuses réactions dans le milieu extracellulaire. La MPO sera ainsi responsable directement de la production de nombreuses molécules oxydantes participant à la défense de l'hôte. Il est intéressant de noter que ce sont ces espèces qui seront responsables de la chimioluminescence observée lors de la stimulation des neutrophiles *in vitro*.

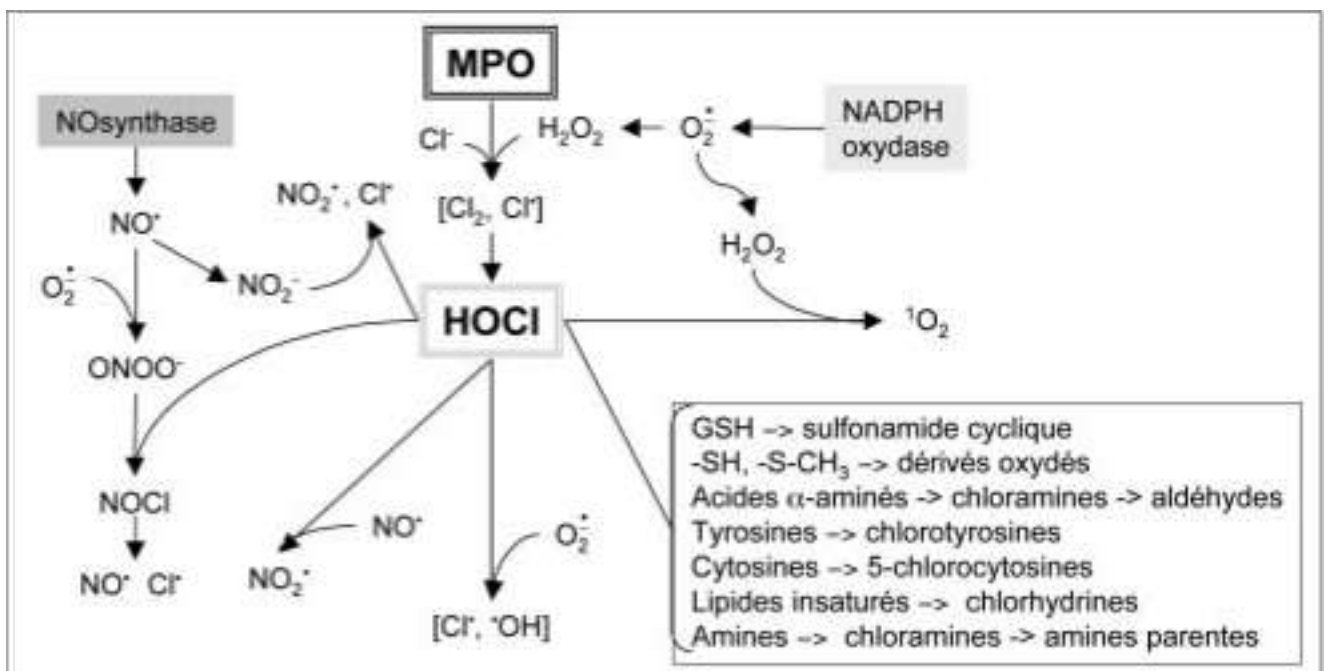


Figure 9: Produits formés par action oxydante de HOCl et réactions d'HOCl avec d'autres espèces activées de l'oxygène et de l'azote.⁶⁷

L'activité principale de la MPO décrite pour l'enzyme humaine est principalement un rôle antimicrobien au sein des phago-lysosomes des neutrophiles. Les granules spécifiques

contenant la NADPH-oxydase sont les premiers à fusionner et à relarguer leur contenu enzymatique. Le contenu des granules azurophiles (dont la MPO) est déversé après fusion membranaire dans un deuxième temps, formant alors de nouvelles espèces activées. L'activité de la MPO s'intensifie avec l'acidification du milieu. La MPO agit sur une large gamme de microorganismes par oxydation de différents produits et différents mécanismes. La fixation sur des structures polysaccharidiques de la membrane bactérienne permet à la MPO une attaque extracellulaire de microorganismes comme les parasites et les champignons trop volumineux pour être phagocytés, et qui sont souvent résistants aux enzymes protéasiques et hydrolytiques. En oxydant différentes structures enzymatiques, la MPO peut induire rapidement la mort cellulaire.

Malgré une forte concentration de la MPO au contact direct des agents infectieux au sein du compartiment intracellulaire qu'est le phagolysosome, une petite quantité de l'enzyme peut être déversée dans le milieu extracellulaire, notamment lors d'inflammation sévère. En effet lorsque les neutrophiles procèdent à une dégranulation exacerbée ou lorsqu'ils deviennent apoptotiques, une action toxique locale est prévisible. Malgré une inhibition des effets délétères de la MPO par l'albumine, la céruloplasmine ou les lipoprotéines de faible densité qui sont plus sensibles aux effets oxydants de la MPO, des lésions des tissus endogènes sont fréquentes. De plus il s'agit d'une inhibition qui est réversible. La MPO est cytotoxique pour les hématies ainsi que pour les cellules endothéliales et les fibroblastes ; ces deux derniers pouvant l'internaliser lors de la dégranulation des neutrophiles. Par ailleurs la MPO possède la capacité d'oxyder les neutrophiles de l'hôte même.

La MPO peut également agir directement ou indirectement dans la transduction des signaux de l'inflammation en interférant dans la cascade des protéines kinases et au travers du médiateur NF- κ B. Elle peut avoir un effet bénéfique ou néfaste selon l'endroit et le moment où se produit la réaction inflammatoire.

Libérée au sein du site inflammatoire, la MPO est à l'origine de la formation d'espèces oxydantes diffusibles qui vont avoir une activité sur les voisins alentour. En synergie avec Cl⁻ et H₂O₂, la MPO perturbe les fonctions de prolifération, de production d'anticorps et de cytolysse des lymphocytes T, B et NK (*Natural Killer*) en fonction du nombre de neutrophiles et du potentiel antioxydant de l'environnement. Par interaction avec des macrophages, la MPO peut également induire la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α et IL-

1. Ces cellules ont également un potentiel oxydant accru vis-à-vis des microorganismes à capsules polysaccharidiques résistantes aux protéases.

Par ailleurs, la MPO peut également avoir un effet limitant sur la réaction inflammatoire en diminuant le potentiel de phagocytose des neutrophiles par oxydation des récepteurs membranaires.

Des dérégulations de l'activité oxydante de la MPO sont liées à différentes maladies telles que la maladie d'Alzheimer ou l'athérosclérose chez l'homme⁷⁰. Des mutations génétiques dans l'espèce humaine sont connues comme étant à l'origine de déficits en MPO sans toutefois provoquer des signes cliniques, car *in vitro* les neutrophiles présentent une explosion respiratoire et une activité phagocytaire accrues. Ces altérations conduisent à une sensibilité accrue aux infections fongiques.

On peut donc émettre l'hypothèse que la quantification de MPO permettrait d'estimer l'intensité du recrutement et de l'activation des neutrophiles et donc indirectement l'importance du processus inflammatoire dans le tissu où il apparaît.

1.4.3.3 *Techniques de mesure et lien avec la quantité de neutrophiles*

Plusieurs techniques pour quantifier le recrutement et l'activation des neutrophiles ont été décrites permettant de mesurer la concentration de MPO chez l'homme ou le cheval. Cependant la concentration enzymatique n'est pas proportionnelle à l'activité, car il existe plusieurs inhibiteurs endogènes de son activité. Il serait donc plus intéressant de pouvoir exprimer l'activité afin d'estimer la sévérité de la réaction inflammatoire. Cependant il n'y a pas de consensus sur la méthode la plus fiable compte tenu des différents substrats utilisés (Tétraméthylbenzidine (TMB), dianisidine, guaiacol) qui ne sont pas spécifiques de la MPO mais de toute activité peroxydasique. Il est important de noter que l'hémoglobine ainsi que la myoglobine possèdent une activité peroxydasique, ce qui peut directement influencer les mesures⁷¹. L'activité peroxydasique de la production de H₂O₂ et par chimioluminescence⁷².

D'après Pulli *et al.*⁷³ différentes techniques sont utilisées afin de mesurer soit la présence de MPO ou son activité souvent dans l'objectif de quantifier la présence de neutrophiles. Les sondes majoritairement utilisées pour mettre en évidence la présence de MPO sont la

dianisidine, le TMB suivi de l'Adénosine Diphosphate hydrogénase (ADPH) et la taurine. A ce jour, aucune étude comparant les différentes techniques entre elles.

Afin de s'affranchir des interférences avec d'autres molécules à activité peroxydasique, Pulli et son équipe ont proposé une méthode de dosage avec des anticorps anti-MPO qui d'après leurs résultats, est fidèle et reproductible, ainsi que d'une bonne sensibilité ; elle est capable de détecter la production de MPO à partir de 500 neutrophiles. Parallèlement, la fixation de la MPO par des anticorps augmenterait la spécificité des dosages. La corrélation entre l'activité de la MPO dans les compartiments intracellulaires et la quantité de neutrophiles a été montré.

2 Analyse systématique des molécules spécifiques des neutrophiles

2.1 Introduction

L'identification et la quantification des cellules inflammatoires dans le sang périphérique ainsi que dans les tissus sont étudiées depuis plusieurs centaines d'années et sont corrélées au concept même de la théorie cellulaire. L'analyse minutieuse de ces prélèvements a permis tout d'abord d'identifier différentes familles ainsi que des patterns de présence considérés physiologiques chez des patients sains. Le développement de la cytologie clinique ainsi que de l'hématologie clinique a permis de détecter de variations anormales dans les contenus cellulaires et leur répartition. Ceci a abouti à une meilleure compréhension médicale sur les processus physiopathologiques d'infiltration cellulaire, leur évolution au cours du temps et leurs réponses à des traitements.

Historiquement différentes techniques ont servi à identifier et à classer les types cellulaires, que ce soit sur la base de leurs propriétés physico-chimiques, immunologiques ou encore fonctionnelles. Deux traits caractérisent les granulocytes neutrophiliques : leur courte durée de vie, avec une moyenne de 5 jours à partir du moment où ils quittent la moelle, ainsi que leur faible capacité de synthèse protéique une fois arrivés à maturation. Depuis la maîtrise de la fabrication d'anticorps dirigés contre des épitopes précis, l'immunomarquage a été utilisé dans l'identification des neutrophiles pour les distinguer des autres leucocytes. Différentes méthodes de séparation et d'identification des neutrophiles ont permis d'étudier leurs caractéristiques et leur participation, ainsi que la cinétique de recrutement, lors de la réponse inflammatoire. Traditionnellement, le protocole de séparation des neutrophiles repose sur la technique de sédimentation afin de les isoler du reste des cellules circulantes dans le sang. La technique décrite par Ferrang et Thong repose sur une différenciation en couche des différents types cellulaires présents dans le sang, si cette technique est utile pour purifier les cellules à partir du sang, elle est d'une utilité moindre dans la quantification des neutrophiles présents dans les autres tissus.

2.2 Matériel et méthodes

Nous avons procédé à une analyse systématique des publications portant sur les différentes méthodes publiées d'analyse des neutrophiles présents dans les tissus, en dehors de l'analyse histologique.

La base de données est représentée par la littérature accessible en ligne notamment sur des sites spécialisés tel *Pubmed*, *ScienceDirect* et *Google Scholar*. Les articles recensés sont des articles en langue anglaise publiés dans des revues spécialisées. Afin de concentrer nos recherches sur les techniques les plus récentes, nous avons sélectionné les articles publiés entre 1990 et 2018. Les termes utilisés pour la sélection des articles ont été : *neutrophil quantification*, *polynuclear neutrophil biomarker*, *inflammation quantification*, *determining neutrophils in tissue*, *neutrophils ELISA quantification*, *cytometry quantification*.

Les articles répondant à ces critères de recherche ont été triés dans un premier temps à partir de la lecture du résumé afin de s'assurer qu'il s'agissait bien de descriptions techniques portant sur les neutrophiles humains, murins ou bovins, et qu'ils traitaient directement ou indirectement des méthodes de quantification des granulocytes neutrophiliques dans les tissus au sens large, aussi bien les fluides biologiques (dans lesquels les cellules sont en suspension) que les tissus organisés, que les neutrophiles ont infiltré. Au final, les articles remplissant ces critères ont été étudiés afin d'extraire les informations relatives aux techniques d'identification des neutrophiles. Toutes les références supplémentaires identifiées au cours de la lecture des articles précédemment sélectionnés ont été incluses dans l'étude et analysées de façon analogue à ce que nous avons précédemment décrit, afin de recueillir des articles qui auraient échappé à la recherche avec des mots clés.

Parfois différents articles ont été retenus pour une même approche technique car les méthodes étaient sensiblement différentes. Ce choix permettait généralement d'apporter une précision ou des informations supplémentaires sur la technique en question.

2.3 Résultats

Nos premières recherches avec les moyens décrits nous ont fait accéder à plus de 600 articles parmi lesquels nous avons tout d'abord sélectionné ceux qui s'intéressaient à l'infiltration neutrophilique spécifiquement dans l'inflammation. Beaucoup d'articles de recherche clinique s'intéressent à la nétose et à la manière de la quantifier, mais nous avons exclus ces articles car la technique ne permet pas de quantifier les cellules, et ils ne répondaient donc pas aux objectifs de notre étude.

Initialement, 44 articles ont été séparés pour lecture dont 28 ont été retenus et comparés.

Les articles analysant des techniques décrites antérieurement et parfois adaptées afin de prouver la corrélation de maladies spécifiques dans certains organes chez l'homme, ont été supprimés de notre étude. De même, toute étude de la réponse inflammatoire qui ne s'intéressait pas aux aspects cellulaires et la réponse aux stimuli inflammatoires a été écartée. De plus, les études corroborant des résultats déjà rapportés par un autre article avec une méthode identique n'ont pas été retenus à la faveur des études originales. En effet nous n'avons pas la finalité de déterminer précisément les voies moléculaires de l'inflammation des organes lors d'affections spécifiques ; cependant lorsque tout marqueur original a été proposé dans de telles études, que nous avons jugé exploitable dans la détection des neutrophiles, la méthode a été analysée et incluse dans notre étude. Au final, 28 articles ont été retenus et analysés.

2.3.1 Méthodes décrites pour les espèces murine et humaine :

Chez les espèces étudiées, différents milieux ont servi de support à la recherche des neutrophiles. Ainsi en fonction du milieu biologique, les méthodes varient. En effet lorsque les neutrophiles sont libres dans un milieu liquide, comme le sang, les exsudats inflammatoires ou bien le liquide articulaire qui peuvent être le site d'une infiltration neutrophilique, ou encore dans des tissus organisés infiltrés.

Ainsi dans le premier cas, les cellules sont aisément accessibles. Par la reconnaissance d'un marqueur de surface des cellules il est possible de les identifier et les dénombrer. Il suffit pour cela de générer un ligand spécifique d'un tel marqueur, postérieurement distinguable.

Cependant lors de l'analyse de tissus organisés et solides, il n'est pas possible d'aller directement au contact des cellules infiltrées au sein d'un compact. Pour cela il convient de défaire la structure organisée. En cassant les trames extracellulaires qui relient les cellules entre elles ainsi que les liaisons intercellulaires, il y a atteinte des membranes cellulaires qui sont alors plus difficilement analysables. Ceci rend donc nécessaire une méthode de détection qui puisse relier les concentrations d'un biomarqueur contenu uniquement dans les neutrophiles au nombre de neutrophiles présents. Ainsi l'analyse d'un composant moléculaire d'un broyat de tissu permettrait une analyse indirecte de la composition cellulaire et de la proportion de neutrophiles.

2.3.1.1 *Automatisation avec coloration Giemsa*

Le dénombrement microscopique se fait à l'aide des différences morphologiques qui distinguent les neutrophiles des autres types de leucocytes. Ce comptage se fait à partir des frottis de sang périphérique suite à une coloration. Le traitement est particulièrement chronophage, dépendant de celui qui l'exécute, et dès est susceptible d'erreur non négligeable. De plus, les différentes techniques de coloration et la variation du temps d'exposition pour chaque type de coloration cause une variabilité marquée de l'intensité de couleur de chaque compartiment subcellulaire et la possibilité de confusion entre types cellulaires. C'est pourquoi des méthodes de détermination automatisées avec des protocoles bien définis sont recherchées, tel est le cas des recherches de Ahmghalan *et al* (2009)⁷⁴ afin de mesurer automatiquement les différents types cellulaires sur un frottis à l'aide d'un algorithme. En analysant au microscope électronique relié à une caméra digitale, des lames ayant subi une coloration au Giemsa, ils parviennent à détecter les noyaux plurilobés de par leur coloration de plus forte intensité et de les séparer des autres lymphocytes par leur proximité inférieure au diamètre d'un leucocyte. Ils parviennent ainsi à quantifier les neutrophiles observés sur les frottis sanguins avec une précision rapportée de 96 %.

2.3.1.2 *Les protéines membranaires de surface*

Pour l'identification des neutrophiles selon différentes méthodes, il convient de connaître des protéines membranaires spécifiques des cellules neutrophiles, et ce afin de produire des anticorps capables de les reconnaître.

Parmi les techniques de quantification, l'immunohisto ou cyto-chimie telle que la cytométrie de flux sont utilisées.

La cytométrie de flux mesure la fluorescence et la diffusion de la lumière à travers des cellules en suspension. Cette méthode permet d'analyser les propriétés des cellules en les exposant à un faisceau laser après séparation dans un liquide de gaine. Des capteurs permettent d'analyser les propriétés de la lumière diffractée et celle émise par les cellules afin d'en déduire les propriétés physiques (taille et complexité cellulaire interne). De plus, la reconnaissance à l'aide d'anticorps spécifiques de protéines membranaires, couplés à des marqueurs fluorescents, permet de discerner différentes populations de cellules. Ainsi, plusieurs études ont décrit la détermination des protéines spécifiques des neutrophiles⁷⁵.

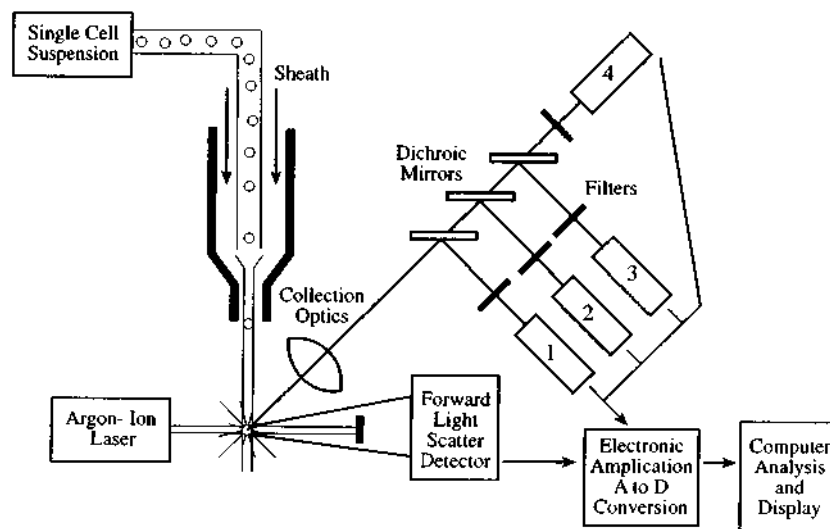


Figure 10: Schéma d'un cytomètre de flux⁷⁵

Fung et al (2011)⁷⁶ ont publié un récapitulatif des antigènes connus en fonction pour l'homme.

Tableau 4 : Récapitulatif des Antigènes Neutrophiliques humains et leurs caractéristiques d'après Fung et al. (2011)⁷⁶

Ag System	HNA-1 (15-25)			HNA-2 (26-33)	HNA-3 (34-42)		HNA-4 (43,44,46)	HNA-5 (44,45,47)
Ag	HNA-1a	HNA-1b	HNA-1c	HNA-2a	HNA-3a	HNA-3b	HNA-4a	HNA-5a
Old nomenclature	NA1	NA2	SH	NB1	5b		MART	OND
Glycoprotein (Cluster)	Fc γ RIIIb (CD16b)			gp 50-64 (CD177)	CTL-2 (undefined)		α M (CD11b)	α L (CD11a)
Anchor/link	glycosyl-phosphatidylinositol link (GPI)			GPI	transmembrane		transmembrane	transmembrane
Expression	Neutrophils			Neutrophils (monocytes of pregnant women)	Neutrophils, granulocytes, monocytes, lymphocytes, platelets, kidney, placental tissue, spleen, lymph node tissue, endothelial cells		Granulocytes, monocytes, T-lymphocytes	Granulocytes, monocytes, lymphocytes

Des marqueurs de la lignée myéloïde ont été proposés par Lagasse et al. (1996)⁷⁷ afin de séparer neutrophiles et monocytes des autres types leucocytaires. En utilisant deux anticorps Gr-1 et Mac-1 qui reconnaissent des épitopes membranaires, spécifiques des neutrophiles et des monocytes, respectivement, la cytométrie de flux permet de distinguer les deux populations dont les neutrophiles, et ainsi de les quantifier avec un marquage fluorescent préalable. Ceci a été fait dans des tissus murins notamment le sang, les ponctions de moelle osseuse et des fractions de rate broyée ; cette identification a été confirmée en microscopie électronique. Cette étude a notamment permis de relever que l'expression de Gr-1 augmentait à la surface des neutrophiles au cours de leur maturation, dans un premier temps dans la moelle osseuse et ensuite dans la circulation sanguine et dans la rate.

La cytométrie de flux est devenue une méthode ubiquiste, performante et rapide de mesure de la concentration des neutrophiles dans le sang. La maîtrise de différents marqueurs membranaires a permis aussi de différencier les neutrophiles parmi les leucocytes ainsi que de suivre leur différenciation au cours de leur développement.

Les neutrophiles murins possèdent de grandes quantités de protéines membranaires de la famille de Ly6B, Ly6C et Ly6G, comme rapporté par P. Y. Lee et al (2013)⁷⁸. Il s'agit de protéines dont le rôle n'est pas encore entièrement compris mais dont on estime qu'elles participent à la migration. Ly6B est plus particulièrement exprimée sur les cellules au sein de la moelle osseuse et sur les neutrophiles circulants, mais également à la surface des monocytes immatures. Il s'agit donc d'un marqueur utile des neutrophiles en combinaison avec F4/80 ; CCR2, et CD11b, pour différencier les neutrophiles des monocytes.

Ly6C est également présente sur les neutrophiles mais aussi sur différentes cellules de la lignée blanche ; elle est principalement utilisée comme marqueur des monocytes. Rose et al (2014) ont proposé d'utiliser le marquage avec LY6G et LY6C pour identifier de façon plus fiable les neutrophiles⁷⁹.

Ly6G ayant été démontrée comme une protéine exclusivement présente chez les neutrophiles, elle a été utilisée par J. Daley et al. (2008)⁸⁰ pour enlever la production de neutrophiles chez des souris, confirmant ainsi la spécificité vis-à-vis des neutrophiles.

La quantification de l'évolution de l'expression de CD11b a été étudiée lors de l'activation des neutrophiles et des monocytes pendant l'inflammation. Il est difficile de séparer les deux types cellulaires uniquement sur la base de l'expression de CD11b ; en outre, son expression ne permet pas de quantifier avec certitude la quantité de neutrophiles activés. Ainsi Nicholson et al (2007) ont utilisé la cytométrie de flux pour analyser les neutrophiles dans le sang périphérique afin de mesurer l'évolution de l'expression de CD11b lors d'activation par chimiokines chez des patients sains et de patients atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique⁸¹. CD11b et CD18 sont des molécules $\beta 2$ intégrines, qui participent à l'adhésion aux protéines de surface de l'endothélium vis-à-vis desquelles des anticorps spécifiques sont disponibles. De même, l'expression de la L-sélectine (CD62L) à la surface des neutrophiles permet de mesurer l'activation des neutrophiles de façon indirecte mais également la capacité d'adhésion aux cellules endothéliales, comme montré par Marshall et al (1997)⁸².

Cependant Bateman et al (1993) ont décrit que le niveau de base d'expression de CD11b et CD18 ne permettait pas de définir avec précision l'activation des neutrophiles lors de stimulation inflammatoire chez des individus malades⁸³.

Chez l'homme, plusieurs anticorps dirigés contre CD35, CD16, CD64, et CD87, ont été proposés en association pour étudier la maturation des neutrophiles, en comparant la présence séquentielle de ces molécules au cours du développement neutrophilique et permettant même d'identifier des anomalies de la maturation des neutrophiles. Il convient de noter que lors de cette étude les auteurs se sont intéressés à la corrélation entre l'expression des marqueurs en cytométrie de flux et le dénombrement manuel sur lame effectué en parallèle par des observateurs. Ils ont décrit des corrélations statistiques entre la proportion des jeunes neutrophiles « band cells » avec l'expression des marqueurs de CD16 et CD35. La différence est plus grande en ce qui concerne les neutrophiles segmentés, mais il y a également une différence marquée entre les différents observateurs⁸⁴.

2.3.1.3 Les molécules intracellulaires

Des molécules présentes dans les granules des neutrophiles ont été dosées dans le plasma afin d'établir si leurs concentrations étaient corrélées avec le nombre de neutrophiles circulants. Lors de la dégranulation des neutrophiles, des contenus intracellulaires sont déversés dans le milieu extérieur. Compte tenu du faible potentiel de synthèse des neutrophiles, il est possible de les doser soit en stimulant les cellules à la dégranulation, soit en déstructurant leur membrane cellulaire.

Sorensen et al (1997)⁸⁵ ont développé un test ELISA afin de doser la hCAP-18, une cathélicidine présente dans les granules spécifiques des neutrophiles humains. Ils ont montré une corrélation positive entre la quantité de neutrophiles circulants et la quantité de hCAP-18 plasmatique, malgré la présence d'une quantité basale de cette protéine dans le plasma, qui est d'origine inconnue mais très vraisemblablement d'origine non neutrophilique et myéloïde. Des études précédentes avaient déjà permis de montrer une relation entre l'élastase circulante et la quantité de neutrophiles dans des infiltrats cutanés. Ainsi Lammers *et al* (1986) ont relié la quantité d'élastase libérée au nombre de neutrophiles infiltrés dans des extraits de peau d'humain par immunofluorescence⁸⁶.

L'étude de la quantité de lipocaline 2 associée à la gélatinase neutrophilique a également été proposée comme protéine aigüe de l'inflammation, car elle est sécrétée par les neutrophiles humains. La quantité sérique augmente en fonction de l'état d'activation des neutrophiles. Il s'agit donc d'une molécule intéressante dans les études concernant l'inflammation rénale et articulaire chez l'homme. Elle peut être dosée grâce à un test ELISA⁸⁷.

Des lipocalines associées à la gélatinase neutrophilique (NGAL), qui sont des collagénases de type IV libérées par les neutrophiles humains, ont été étudiées chez des sujets sains. Une étude quantitative de la collagénase présente dans les granules azurophiliques a été réalisée et un test ELISA a été proposé par Kjeldsen *et al* (1996)⁸⁸. Les auteurs ont conclu à l'absence de corrélation entre le nombre de neutrophiles et le taux de gélatinase mesurée dans des échantillons de sang chez les sujets sains. Cependant, une corrélation était présente chez des patients atteints de lymphome non-Hodgkinien. La gélatinase serait liée de façon fidèle au nombre de neutrophiles circulants, sans interférence de l'activité myéloïde^{88,89}.

Parmi les molécules candidates présentes dans les vésicules des neutrophiles on trouve la myéloperoxydase, qui est également exprimée par les éosinophiles alors qu'elle est absente dans les macrophages. Brown *et al* (2001)⁹⁰ avait montré par immunohistochimie, que les cellules de Kupfer ainsi que les macrophages résidents dans le foie exprimaient également la MPO. Cependant, des études plus récentes ont investigué cette possibilité à l'aide de différentes techniques comme l'immunohistochimie, le Western Blot et la RT-PCR dans des échantillons de foie murins sains ou avec des lésions induites par une surcharge alcoolique, ainsi que dans des échantillons de foie lésés humains avec des lésions. Les auteurs n'ont pas conclu sur une origine strictement hépatique de la MPO⁹¹.

Dans des essais utilisant des modèles animaux, la MPO est un marqueur de l'inflammation très sensible et précoce car il est présent 24 heures avant que le nombre de neutrophiles soit augmenté et qu'ils puissent être détectés en histologie⁹². On retrouve dans la littérature trois techniques de dosage de l'activité peroxydasique dont la spécificité et la sensibilité ont été rapportées :

- La chimioluminescence dépendante du luminol à pH acide, spécifique de la myéloperoxydase (MPO) des neutrophiles et dont l'activité a été corrélée à la quantité de neutrophiles dans des tumeurs⁹³
- L'activité peroxydasique révélée avec de l'Adénosine Diphosphate Hydrogène (ADPH)/ADPH

- L'activité de chlorination avec de l'acide 2-[6-(4'-hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoïque (HPF) et de l'acide 2-[6-(4'-amino)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoïque (APF),) dont le différentiel de signal représenterait spécifiquement l'activité de la MPO⁹⁴

L'équipe de Pulli *et al* (2013)⁷³ ont publié un conséquent travail sur la myéloperoxydase et la détermination d'une technique spécifique et standardisée de mesure de son activité au sein des tissus et liquides biologiques. Lors de l'analyse des méthodes précédemment citées ils ont conclu à la présence d'une interférence avec d'autres protéines lors de la mesure de l'activité de la MPO. En utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques de la MPO, ils ont démontré la spécificité et la répétabilité des mesures de l'activité peroxydasique dans des échantillons de différents tissus murins broyés. Ils ont ainsi pu établir une relation fidèle et robuste entre la quantité de MPO et l'infiltration neutrophilique des tissus.

Une équipe canadienne a étudié une méthode semi-quantitative par immunochromatographie (*lateral flow test*) de détermination de l'activité peroxydasique de la MPO à partir de prélèvement d'expectoration chez des patients humains. Ils en concluent une corrélation entre l'activité de la MPO et la quantité de neutrophiles dans les prélèvements, dénombrés par un comptage dans les conditions classiques⁹⁵.

RuJuan DAi *et al* (2017) ont utilisé des techniques de RT-PCR (Real Time Polymérase Chain Reaction ou PCR quantitative) pour quantifier l'expression de l'élastase neutrophilique et de la myéloperoxydase circulante lors l'administration d'œstrogène chez la souris. Ils ont conclu à l'augmentation de ces molécules parallèlement à l'augmentation des neutrophiles quantifiés par cytométrie de flux au travers des marqueurs Gr-1 et CD11b. Ils n'ont cependant pas proposé de corrélation entre les deux facteurs⁹⁶. Une méthode a été décrite afin de mesurer les neutrophiles de façon quantitative sur des échantillons de prélèvements nasopharyngés humains congelés en utilisant la RT-q sur les gènes codant CD16, CD18 et CD26L, des molécules considérées comme spécifiques des neutrophiles. Ils concluent que cette méthode pourrait être étendue à d'autres prélèvements que les expectorations nasopharyngées⁹⁷.

2.3.2 Chez les bovins

Différentes études ont été menées chez les bovins afin de dénombrer les neutrophiles présents dans le lait notamment, lors d'augmentation de la concentration cellulaire signant la présence d'une mammite. Différentes techniques ont été décrites afin de quantifier les populations de cellules présentes dans le lait.

Des méthodes de cytologie en microscopie optique permettent l'identification directe des cellules présentes et leur classification sur la base des caractéristiques morphologiques⁹⁸.

De multiples techniques de cytométrie de flux ont été décrites dans le but de déterminer précisément les quantités de cellules dans des échantillons de lait. Le marquage avec de l'iodure de propidium et l'analyse par cytométrie en flux est possible pour détecter des états inflammatoires avec des concentrations cellulaires basses, lors de mammites⁹⁹. L'augmentation de la concentration de cellules dans ce cas précis étant principalement due à un recrutement de neutrophiles.

Des anticorps spécifiques des neutrophiles bovins présents dans le lait ont été développés et ont permis l'essor de techniques indirectes de détection de ces cellules dans le lait avec des test ELISA notamment. Ainsi, à l'aide d'anticorps polyclonaux murins, la densité optique mesurée à l'aide d'un test ELISA permettait une mesure fiable et bien corrélée aux résultats du comptage cellulaire dans les échantillons de lait. La sensibilité était de l'ordre de 95% et la spécificité d'environ 97%. La fiabilité du test permettrait notamment la détection systématique de l'afflux neutrophilique pour des concentrations inférieurs à 100 000 cellules par millilitre¹⁰⁰ qui est considérée comme le seuil au-dessus duquel la glande mammaire est considérée comme enflammée à la suite d'une infection.

Par la suite, une technique reliant un marquage spécifique des neutrophiles à l'aide d'anticorps polyclonaux marqués avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (possédant un pic d'excitation à 470nm, fluorescence verte) couplé à un marquage de l'ADN avec de l'iodure de propidium (excitation à 530 nm, fluorescence rouge), et une analyse en microscopie a été proposée. Ainsi lors de l'analyse microscopique, la détection des neutrophiles s'est avérée spécifique et sensible, avec un marquage vert sur les membranes entourant une fluorescence rouge. Cette technique est utile et fiable notamment lors de forte augmentation de la

cellularité du lait puisque les neutrophiles représentent dans ce cas, plus de 80% de la population des leucocytes recrutés ¹⁰¹.

Cooray *et al* (1994) ont montré une corrélation entre la concentration de MPO dans le lait et la concentration cellulaire. Des anticorps murins monoclonaux spécifiques de la MPO bovine ont été produits et utilisés afin de mesurer la MPO dans les échantillons de lait avec un test ELISA. Par ailleurs, l'absence d'interférence des autres protéines du lait ou de l'inflammation elle-même a été démontrée, ainsi que l'absence de réaction croisée avec la lactoferrine, la lactoperoxydase, l'albumine sérique, les produits de dégradation des lymphocytes ainsi que les protéines du lait normal ¹⁰².

Zerbe *et al* (2002) se sont intéressé aux écoulements utérins de vaches atteintes d'endométrite causée par *Escherichia coli* ou *Trueperella pyogenes* et la population de neutrophiles présentes. Malgré l'absence de quantification, ils ont montré un phénotype altéré et une production de réactifs oxygénés réduite par les neutrophiles présents dans les sécrétions prélevées, rendant certaines techniques de détection inappropriées dans ce cadre ¹⁰³.

2.4 Discussion et possibles applications

Il existe de multiples techniques de quantification des neutrophiles, du comptage direct à des méthodes de détection indirectes. Le comptage direct se base essentiellement sur des lectures de frottis sanguins, ou étalement sur lame de prélèvements liquides. Ce sont des techniques historiques mais qui demandent du temps dans la préparation et ne sont pas libres d'erreurs. En effet en fonction du technicien qui se charge de la préparation et de la lecture, des variations non seulement de l'intensité de la coloration ainsi que du recensement des types cellulaires sont fréquentes. De plus ces lectures sont largement dépendantes de l'équipement de laboratoire disponible.

D'autres techniques de quantification des polynucléaires neutrophiles connues et maîtrisées sont possibles à l'aide d'équipements coûteux, de haute technicité et dont les temps d'analyse ne sont pas négligeables. La détention et l'utilisation de ces équipements demande une expertise et un certain débit afin d'optimiser leur utilisation. La cytométrie de flux est de plus en plus répandue et représente aujourd'hui une des technologies les plus puissantes utilisées en routine en hématologie et en immunologie. En moins de 60 ans, les appareils de mesure sont passés d'un traitement de quatre couleurs de fluorescence à plus de 10 couleurs mesurées actuellement. Afin d'identifier les neutrophiles circulants dans le sang périphérique, deux paramètres physiques analysés par réfraction de la lumière émise sont cependant suffisants. Progressivement l'ajout de marqueurs fluorescents dont le signal peut être lu a permis d'affiner les techniques ainsi que d'identifier de nouveaux types cellulaires. Ces marqueurs fluorescents sont conjugués à des anticorps spécifiques des types cellulaires à déterminer¹⁰⁴. Ainsi l'étude des marqueurs des neutrophiles représente une part significative des travaux utilisant la cytométrie de flux.

Il convient de relever que la grande diversité des études représente une difficulté dans l'identification d'un marqueur universel qui surpasserait tous les autres. En effet en fonction de l'espèce cible, de la nature de l'échantillon biologique plusieurs techniques ont été décrites. Ainsi Rose *et al* (2014)⁷⁹ affirment qu'un marquage dirigé contre Ly6C/Ly6G permet une détection plus spécifique des neutrophiles spléniques par rapport à l'utilisation des anticorps anti-Gr1. Cependant le marquage le plus communément utilisé cible la protéine CD11b. Cependant, l'expression de ces marqueurs qui diffèrent en fonction de l'activité des

neutrophiles et dont l'interaction peut même induire des changements de l'expression. On retrouve cette même problématique lors de l'analyse des contenus des granules des neutrophiles, où des différences peuvent apparaître différence parmi les neutrophiles ciblés. Par ailleurs CD11b est également présent à la surface des éosinophiles et doit être considéré avec précaution chez des individus avec une éosinophilie⁸². Ainsi, par accumulation des données, des variations existent au sein même de la population de neutrophiles sans pour autant en connaître la cause, comme le passage par différentes étapes de maturation. Alors que les neutrophiles sont considérés comme des cellules à faible pouvoir d'expression protéique, ces différences sont difficiles à expliquer sauf à conclure à des différences d'expression membranaire en fonction de certains états. Ainsi Christoffersson et Phillipson (2018)¹⁰⁵ ont récemment recensé les sous-types répertoriés :

Tableau 5 : Caractéristiques et fonctions des sous-types de neutrophiles (d'après Christoffersson et Phillipson¹⁰⁵)

Neutrophil subtype	Defining features	Function	Model system
N1 (antitumor)	Hypersegmented nuclei, high TNF α , ICAM-1, FAS	Cytotoxic (through ROS)	Mouse, subcutaneous and orthotopic tumors
N2 (protumor)	Circular nuclei, high arginase, CCL2, CCL5	T cell inactivation, angiogenic factors, matrix degradation	
N1 (pro-inflammatory)	Ly6G ⁺ , CD206 ⁻	Promotes adverse ventricle wall remodeling	Mouse, myocardial infarction
N2 (anti-inflammatory)	Ly6G ⁺ , CD206 ⁺	Attenuates adverse ventricle wall remodeling	
SiglecF ^{hi} (protumor)	SiglecF ^{hi} ,	Cancer promotion; myeloid cell recruitment, angiogenesis, T cell suppression	Mouse, KP lung tumor, Human, non-small cell lung cancer patients
Pro-tumorigenic	VEGF, MMP-9, CXCR4, IFN γ -responsive	Proangiogenic, matrix degradation	Mouse, subcutaneous tumors and metastases, Matrigel assay
Pro-angiogenic	CD49d, CXCR4, VEGFR1, MMP-9	Accumulate at hypoxic sites and stimulate angiogenesis	Mouse, transplanted hypoxic tissue, hindlimb ischemia, recruitment models
Reverse-migrated	Activated morphology	Can re-mount responses to microbes and injuries	Zebrafish wounding and infection
PMN-N	"Normal" neutrophils, round nuclei, CD49d ⁻ , CD11b ⁻ , TLR-2,-4,-9	No effect on macrophages	Mouse, MRSA infection
PMN-I	Multilobular nuclei, CD49d ⁺ , CD11b ⁻ , IL-12, CCL3, TLR-2,-4,-5,-8	Activates M1 macrophages	
PMN-II	Ring-shaped nuclei, CD49d ⁺ , CD11b ⁺ , IL-10, CCL2, TLR-2,-4,-7,-9	Activates M2 macrophages	
IL-17A-producing neutrophils	ROR γ t, IL-17	Clear infections	Human blood, cystic fibrosis – pseudomonas aeruginosa-infected, mouse, fungal infection
High density neutrophils	Hypersegmented nuclei	Anti-tumor	Mouse, tumor models, Human cancer
Low density neutrophils	Banded/ring-shaped to hypersegmented nuclei	Tumor-permissive	
CD62L ^{bright} /CD16 ^{bright}	Multilobular nuclei,		Human; LPS administration to volunteers
CD62L ^{dim} /CD16 ^{bright}	Hypersegmented nuclei, CD11c ^{hi} , CD11b ^{hi} , CD54 ^{hi}	ROS release to control T cell proliferation	
CD62L ^{bright} /CD16 ^{dim}	Banded nuclei, CD11c ^{lo} , CD11b ^{lo} , CD54 ^{lo}		

On voit donc que non seulement la cytométrie de flux reste une technique couteuse et requérant une certaine technicité, mais les progrès techniques et des connaissances sur cette population cellulaire conduisent à s'interroger sur la pertinence de tel ou tel marqueur pour l'identification de ces cellules et les différences au sein de la population ciblée. Est-ce

raisonnable de cibler toute la population avec un unique marqueur membranaire ou serait-ce plus précis de l'analyser au cas par cas en fonction de la question posée ou d'utiliser une combinaison de marqueurs ?

Une autre approche très étudiée consiste à relier l'activité de la MPO contenue dans les granules des neutrophiles à la quantité de cellules neutrophiliques. Une étude majeure a été conduite par Pulli *et al* (2013⁷³), montrant une relativement bonne corrélation avec la quantité de neutrophiles dans différents tissus avec un protocole standardisé dont les résultats sont répétables. En quantifiant l'activité de la MPO à partir de broyats tissulaires à l'aide d'un test ELISA, Pulli et son équipe ont pu quantifier les neutrophiles infiltrés de façon indirecte. Ce test est à la fois simple et robuste, une fois les anticorps anti-MPO correctement identifiés et l'ELISA mis au point. Les champs d'application potentiels sont nombreux. Compte tenu de l'absence d'études avec une méthode aussi détaillée pour la quantification des neutrophiles par ELISA, son développement pour une future en médecine vétérinaire incluant l'espèce bovine, est envisageable dans le suivi de certaines affections très répandues.

Le diagnostic de nombreuses affections pourrait bénéficier de cet apport technique. En effet, les infections de la sphère respiratoire, mammaire et génitale sont particulièrement fréquentes chez les bovins. Les neutrophiles ont un rôle particulier dans les infections comme les pneumonies ou les mammites d'origine bactérienne. Même s'ils participent à l'élimination des infections, les neutrophiles produisent aussi des dommages tissulaires à la suite de la libération de leur contenu intracellulaire, qui est un facteur important des atteintes des parenchymes. Des études ont montré que la régulation du nombre et de la diapédèse des neutrophiles permettait d'atténuer les signes cliniques des animaux atteints¹⁰⁶. Plusieurs études se sont intéressées à la cinétique de l'infiltration des neutrophiles suite à des épisodes de stress ou chez des animaux soumis à des infections virales tels le BVD ou l'herpès virus Bovin de type 1¹⁰⁷. Alors que le premier induit une neutropénie favorable à des infections pulmonaires d'origine bactérienne, le second induit une infiltration leucocytaire dont des neutrophiles activés délétères au tissu pulmonaire. Comme relaté dans des études en médecine humaine, il existe une corrélation entre l'activité de la MPO des sécrétions nasales et la présence de neutrophiles⁹⁵. Il faut cependant déterminer des seuils d'interprétation

permettant l'interprétation des résultats de ces mesures. La détermination de seuils chez des veaux atteints permettrait un criblage rapide des animaux atteints, permettant du même coup un traitement précoce.

Par ailleurs en élevage laitier, les mammites et endométrites sont très fréquentes pendant le peripartum.

La sélection génétique des animaux ainsi que les avancées dans la nutrition et dans la gestion de l'élevage ont permis une augmentation de la production laitière par animal. Cependant, parallèlement à cette hausse une prédisposition aux maladies métaboliques et infectieuses est observée. Elles ont la cause d'importantes pertes pour l'industrie laitière. La période de sensibilité maximale s'étend de la 3^{ème} semaine précédant la parturition jusqu'à la 3^{ème} semaine post-partum, désignée période de transition pendant laquelle les vaches laitières haute productrices subissent de nombreux changements : qu'ils soient hormonaux à la suite de la parturition et le début de la lactation, métaboliques avec les changements nutritionnels et l'exportation forte de grandes quantités d'énergie et de protéines, en plus de l'évolution concurrente de maladies infectieuses. Ces changements sont fortement liés entre eux et évoluent concomitamment. Environ 75% des pathologies rencontrées chez la vache laitière s'expriment pendant cette période de transition. Différentes études se sont penchées sur l'activité des neutrophiles pendant cette étape de transition, et malgré les différentes méthodes utilisées des résultats contradictoires ont été obtenus. Il en ressort néanmoins que l'activité pro-inflammatoire des neutrophiles est augmentée.¹⁰⁸ McDougall *at al* (2017)¹⁰⁹ ont démontré que chez des vaches saines une neutrophilie passagère relative à la hausse de la cortisolémie due à la mise bas et une réduction des capacité de diapédèse étaient présentes en peripartum. La diminution du nombre de neutrophiles circulants peut être imputable à une migration des neutrophiles suite au développement d'infections au sein des tissus utérin ou mammaire.

Les endométrites sont définies comme une inflammation endométriale présente au-delà de 21 jours après la parturition en l'absence de signes cliniques systémiques. Histologiquement, on retrouve une interruption de la continuité de l'épithélium et la présence de cellules inflammatoires avec pour l'essentiel des neutrophiles. Le diagnostic cytologique repose sur l'identification d'une augmentation de la proportion des neutrophiles dans les échantillons à

la suite du prélèvement utérin par cytobrosse ou sur des prélèvements de faible quantité de lavage utérin. Ces tests de référence sont capables de diagnostiquer des endométrites cliniques et subcliniques sur la base du pourcentage de neutrophiles dénombrés. Un pourcentage supérieur à 5% de neutrophiles serait le signe d'une inflammation et d'une endométrite possiblement subclinique. Ces endométrites ne sont pas toujours détectées et sont la cause de nombreux échecs de reproduction, synonymes d'importantes pertes économiques dans les élevages bovins¹¹⁰.

Par ailleurs les mammites figurent parmi les causes majeures de pertes économiques en élevage laitier. Ces pertes sont la conséquence du retrait du lait dont la concentration cellulaire est trop élevée et le coût des traitements réalisés pour enrayer les infections. La technique diagnostique des mammites la plus commune repose sur le dénombrement des cellules somatique dans le lait, qui sont essentiellement des neutrophiles pour des valeurs augmentées lors d'infection¹¹¹.

Ainsi, pour les trois affections majeures de l'élevage bovin, il existe une augmentation du nombre de neutrophiles localement recrutés. La détection précoce de ces signes inflammatoires est essentielle pour la prise en charge la mise en œuvre du traitement, et ainsi minimiser les pertes de production. Pour cela, il convient d'utiliser des moyens diagnostiques fiables, rapides et peu onéreux. Tout test diagnostique applicable au plus près de l'animal est essentiel, notamment en médecine vétérinaire. Tout retard de diagnostic réduit significativement la probabilité de guérison.

Un biomarqueur est une caractéristique mesurable et évaluée comme un indicateur d'un processus normal, pathologique ou d'une réponse pharmacologique d'un essai thérapeutique. Un biomarqueur informatif doit réunir un certain nombre de qualités, comme la spécificité, la sensibilité, le caractère répétable. En outre, pour que ce biomarqueur soit utilisable en routine il doit être facile à mettre en œuvre et peu onéreux.

il existe donc une possibilité de développer un test non invasif de détection des neutrophiles de façon indirecte, comme l'indique l'étude de Pulli, au travers de la mesure de l'activité enzymatique de la MPO. Il est possible qu'un test basé sur des anticorps monoclonaux contre la MPO bovine soit utilisable dans les trois situations décrites. Les anticorps monoclonaux peuvent aisément être produits par les techniques usuelles, par génie génétique ou par des

protocoles conventionnels par immunisation de la souris Dans les expériences de Pulli, le contenu intracellulaire est extrait afin d'isoler la myéloperoxydase contenue dans les granules neutrophiliques à l'aide d'acétone. Dans chaque cas, des études ont montré que la mesure de l'activité de la MPO est potentiellement exploitable. En effet, le développement de ce type de test a déjà été envisagé afin de détecter la présence d'une mammites chez la vache laitière ; il conviendrait d'établir le lien avec la concentration neutrophilique et le diagnostic de mammites subcliniques¹⁰². De même, en médecine humaine, l'analyse de l'activité de la MPO dans les sécrétions nasales est utilisée en tant que marqueur de l'inflammation des voies respiratoires lors de bronchites chroniques (et dans le suivi des traitements de ces affections)⁹⁵. Il serait intéressant d'examiner des situations propres aux bovins. Pour cela, outre le développement de tests performants, à la condition que les réactifs nécessaires soient disponibles, il sera ensuite nécessaire d'établir la relation entre la quantité de neutrophiles et l'activité peroxydasique, afin de fixer des seuils d'interprétation. Il conviendra également de déterminer les concentrations idéales de mesure afin d'établir un intervalle dans lequel on observe une relation linéaire entre l'activité MPO et la concentration neutrophilique.

3 Conclusion

L'objectif de notre travail était d'analyser les données publiées disponibles afin de comparer les dernières techniques de mesure des neutrophiles et d'identifier une technique performante, rapide, peu coûteuse, et moins dépendante de ressources techniques spécialisés, et éventuellement transposable à la pratique quotidienne des vétérinaires praticiens en élevage bovin. L'utilisation d'un biomarqueur direct des neutrophiles semble l'approche la plus adaptée.

De nombreuses études ont analysé l'activité de la MPO contenue dans les neutrophiles afin de déterminer leur nombre de façon indirecte lors d'inflammation neutrophilique. Les techniques ont évolué et des protocoles sensibles et répétables ont été proposés. Grâce à un test ELISA il est possible de relier l'activité peroxydasique à l'infiltration neutrophilique, même lorsque celui-ci est en faible quantité.

Il serait donc intéressant de mettre en œuvre des expériences afin d'étendre le protocole proposé à la mesure de l'activité de la MPO bovine dans le but de proposer un test diagnostique précoce et non invasif utilisable pour trois maladies caractérisées par une infiltration neutrophilique des tissus.

Références :

1. Espinosa, E. & Chillet, P. *Immunologie*. (2010).
2. Shah, B., Burg, N. & Pillinger, M. H. *Neutrophils. Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology* (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-323-31696-5.00011-5
3. Hong, C.-W. Current Understanding in Neutrophil Differentiation and Heterogeneity. *Immune Netw.* **17**, 298–306 (2017).
4. Richards, M. K. *et al.* Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway. **102**, 3562–3568 (2012).
5. Li, Z. & Li, L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 589–595 (2006).
6. Katayama, Y. *et al.* Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* **124**, 407–421 (2006).
7. Mayadas, T. N., Cullere, X. & Lowell, C. A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **9**, 181–218 (2014).
8. Kolaczkowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175 (2013).
9. Beyrau, M., Bodkin, J. V. & Nourshargh, S. Neutrophil heterogeneity in health and disease: A revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open Biology* **2**, (2012).
10. Summers, C. *et al.* Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology* **31**, 318–324 (2010).
11. Phillipson, M. & Kubes, P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat. Med.* **17**, 1381–1390 (2011).
12. Williams, M. R., Azcutia, V., Newton, G., Alcaide, P. & Luscinskas, F. W. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends Immunol.* **32**, 461–469 (2011).
13. Borregaard, N. Review Neutrophils , from Marrow to Microbes. *Immunity* **33**, 657–670 (2010).
14. Cheng, Q. *et al.* Macrophage Migration Inhibitory Factor Increases Leukocyte-Endothelial Interactions in Human Endothelial Cells via Promotion of Expression of Adhesion Molecules. *J. Immunol.* **185**, 1238–1247 (2010).
15. Hu, G., Place, A. T. & Minshall, R. D. Regulation of endothelial permeability by Src kinase signaling: Vascular leakage versus transcellular transport of drugs and macromolecules. *Chem. Biol. Interact.* **171**, 177–189 (2008).
16. Sadik, C. D., Kim, N. D. & Luster, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* **32**, 452–460 (2011).
17. Zhang, X. *et al.* Coactivation of Syk Kinase and MyD88 Adaptor Protein Pathways by Bacteria Promotes Regulatory Properties of Neutrophils. *Immunity* **31**, 761–771 (2009).
18. Schmielau, J. & Finn, O. J. Activated Granulocytes and Granulocyte-derived Hydrogen Peroxide Are the Underlying Mechanism of Suppression of T-Cell Function in Advanced Cancer Patients Activated Granulocytes and Granulocyte-derived Hydrogen Peroxide Are the Underlying Mechanism of Su. 4756–4760 (2001).
19. Faurschou, M. & Borregaard, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* **5**, 1317–1327 (2003).

20. Tizard, I. *Veterinary Immunology*. (Elsevier Ltd, 2013).
21. Lee, W. L., Harrison, R. E. & Grinstein, S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* **5**, 1299–1306 (2003).
22. Heyworth, P. G., Cross, A. R. & Curnutte, J. T. Chronic granulomatous disease. *Current Opinion in Immunology* **15**, 578–584 (2003).
23. Bylund, J., Brown, K. L., Movitz, C., Dahlgren, C. & Karlsson, A. Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: How, where, and what for? *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1834–1845 (2010).
24. Winterbourn, C. C. & Kettle, A. J. Redox Reactions and Microbial Killing in the Neutrophil Phagosome. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 642–660 (2013).
25. Reeves, E. P. *et al.* Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* **416**, 291–297 (2002).
26. Imlay, J. A. Pathways of Oxidative Damage. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 395–418 (2003).
27. Aratani, Y. *et al.* Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* **40**, 557–563 (2002).
28. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria Brinkmann Science 2004.pdf. *Science* **303**, 1532–5 (2004).
29. Kim, H. S. *et al.* Pepsin-Mediated Processing of the Cytoplasmic Histone H2A to Strong Antimicrobial Peptide Boforin I. *J. Immunol.* **165**, 3268–3274 (2000).
30. Lee, W. L. The tangles webs Neutrophils weave. **303**, 314–340 (2010).
31. Kumar, V. & Sharma, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology* **10**, 1325–1334 (2010).
32. Gaffen, S. L. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine* **43**, 402–407 (2008).
33. Scapini, P. *et al.* The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol. Rev.* **177**, 195–203 (2000).
34. Kebir, D. El & Filep, J. G. Modulation of neutrophil apoptosis and the resolution of inflammation through β 2 integrins. *Front. Immunol.* **4**, 1–15 (2013).
35. *Schalm's Veterinary Hematology*. (Wiley-Blackwell, 2010).
36. Verbeke, J. *et al.* Reactive oxygen species generation by bovine blood neutrophils with different CXCR1 (IL8RA) genotype following Interleukin-8 incubation. *BMC Vet. Res.* **11**, 1–7 (2015).
37. Caswell, J. L., Middleton, D. M. & Gordon, J. R. The importance of interleukin-8 as a neutrophil chemoattractant in the lungs of cattle with pneumonic pasteurellosis. *Can. J. Vet. Res.* **65**, 229–232 (2001).
38. Carretta, M. D. *et al.* Butyric acid stimulates bovine neutrophil functions and potentiates the effect of platelet activating factor. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **176**, 18–27 (2016).
39. Swain, S. D. *et al.* Platelet-activating factor induces a concentration-dependent spectrum of functional responses in bovine neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **64**, 817–827 (1998).
40. Stevens, M. G. H. *et al.* Anaphylatoxin C5a-induced toll-like receptor 4 signaling in bovine neutrophils. *J. Dairy Sci.* **94**, 152–164 (2011).
41. Rainard, P., Riollet, C., Poutrel, B. & Paape, M. J. Phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by bovine neutrophils after priming by tumor necrosis factor- α and the des-arginine derivative of C5a. *Am. J. Vet. Res.* **61**, 951–959 (2000).
42. Conejeros, I. *et al.* Effect of the synthetic Toll-like receptor ligands LPS,

- Pam³CSK⁴, HKLM and FSL-1 in the function of bovine polymorphonuclear neutrophils. *Dev. Comp. Immunol.* **52**, 215–225 (2015).
43. Worku, M. & Morris, A. Binding of different forms of lipopolysaccharide and gene expression in bovine blood neutrophils. *J. Dairy Sci.* **92**, 3185–3193 (2009).
 44. Tan, X., Wei, L. J., Fan, G. J., Jiang, Y. N. & Yu, X. P. Effector responses of bovine blood neutrophils against *Escherichia coli*: Role of NOD1/NF- κ B signalling pathway. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **168**, 68–76 (2015).
 45. Diez-Fraille, A., Mehrzad, J., Meyer, E., Duchateau, L. & Burvenich, C. Comparison of L-selectin and Mac-1 expression on blood and milk neutrophils during experimental *Escherichia coli*-induced mastitis in cows. *Am. J. Vet. Res.* **65**, 1164–1171 (2004).
 46. Nagahata, H. Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD): a review. *J. Vet. Med. Sci.* **66**, 1475–1482 (2004).
 47. Paape, M. J., Bannerman, D. D., Zhao, X. & Lee, J.-W. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet. Res.* **34**, 597–627 (2003).
 48. Gennaro, R., Dewald, B., Horisberger, U., Gubler, H. U. & Baggiolini, M. A novel type of cytoplasmic granule in bovine neutrophils. *J. Cell Biol.* **96**, 1651–1661 (1983).
 49. Tomasinsig, L. *et al.* Broad-spectrum activity against bacterial mastitis pathogens and activation of mammary epithelial cells support a protective role of neutrophil cathelicidins in bovine mastitis. *Infect. Immun.* **78**, 1781–1788 (2010).
 50. Fjell, C. D. *et al.* Identification of novel host defense peptides and the absence of alpha-defensins in the bovine genome. *Proteins* **73**, 420–30 (2008).
 51. Tydell, C. C., Yuan, J., Tran, P. & Selsted, M. E. Bovine Peptidoglycan Recognition Protein-S: Antimicrobial Activity, Localization, Secretion, and Binding Properties. *J. Immunol.* **176**, 1154–1162 (2006).
 52. Villagra-Blanco, R. *et al.* Bovine polymorphonuclear neutrophils cast neutrophil extracellular traps against the abortive parasite *Neospora caninum*. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
 53. Yildiz, K. *et al.* Role of NETs in the difference in host susceptibility to *Toxoplasma gondii* between sheep and cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **189**, 1–10 (2017).
 54. Rinaldi, M., Cecilian, F., Lecchi, C., Moroni, P. & Bannerman, D. D. Differential effects of α 1-acid glycoprotein on bovine neutrophil respiratory burst activity and IL-8 production. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **126**, 199–210 (2008).
 55. Bordignon, M., Da Dalt, L., Marinelli, L. & Gabai, G. Advanced oxidation protein products are generated by bovine neutrophils and inhibit free radical production in vitro. *Vet. J.* **199**, 162–8 (2014).
 56. Hussen, J., Koy, M., Petzl, W. & Schuberth, H. J. Neutrophil degranulation differentially modulates phenotype and function of bovine monocyte subsets. *Innate Immun.* **22**, 124–137 (2016).
 57. Whale, T. A. Passively acquired membrane proteins alter the functional capacity of bovine polymorphonuclear cells. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 481–491 (2006).
 58. Veterinaire, D., Faculte, L. A. & Creteil, D. E. M. D. E. HEMATOLOGIE EN MEDECINE BOVINE ET APPLICATION A LA REALISATION D'UNE TRANSFUSION Pour le. (2009).
 59. Wood, R. D. *Veterinary Laboratory Medicine, Interpretation and Diagnosis, 3rd edition. Veterinary Clinical Pathology* **33**, (2004).
 60. Corbière, F. Les marqueurs de l'inflammation chez les bovins: Nature, physiopathologie et intérêt diagnostique. 185 (2002).
 61. Eckersall, P. D. *et al.* Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with

- clinical mastitis. *Vet. Rec.* **148**, 35–41 (2001).
62. Chan, J. P.-W. *et al.* Serum haptoglobin concentration in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* **66**, 43–46 (2004).
 63. Eckersall, P. D. & Conner, J. G. Bovine and canine acute phase proteins. *Vet. Res. Commun.* **12**, 169–178 (1988).
 64. Young, C. R., Eckersall, P. D., Saini, P. K. & Stanker, L. H. Validation of immunoassays for bovine haptoglobin. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **49**, 1–13 (1995).
 65. Alsemgeest, S. P. M., Van 't Klooster, G. A. E., Van Miert, A. S. J. P. A. M., Hulskamp-Koch, C. K. & Gruys, E. Primary bovine hepatocytes in the study of cytokine induced acute-phase protein secretion in vitro. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **53**, 179–184 (1996).
 66. Karreman, H. J., Wentink, G. H. & Wensing, T. Using serum amyloid a to screen dairy cows for sub-clinical inflammation. *Vet. Q.* **22**, 175–178 (2000).
 67. Serteyn, D., Grulke, S., Franck, T., Mouithys-Mickalad, A. & Deby-Dupont, G. La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann. Med. Vet.* **147**, 79–93 (2003).
 68. Odobasic, D., Kitching, A. R. & Holdsworth, S. R. Neutrophil-Mediated Regulation of Innate and Adaptive Immunity : The Role of Myeloperoxidase Immunity : The Role of MPO. **2016**, (2016).
 69. Fenna, R., Zeng, J. & Davey, C. Structure of the Green Heme in Myeloperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **316**, 653–656 (1995).
 70. Schindhelm, R. K., Van Der Zwan, L. P., Teerlink, T. & Scheffer, P. G. Myeloperoxidase: A useful biomarker for cardiovascular disease risk stratification? *Clin. Chem.* **55**, 1462–1470 (2009).
 71. Xia, Y. & Zweier, J. L. Measurement of myeloperoxidase in leukocyte-containing tissues. *Anal. Biochem.* **245**, 93–96 (1997).
 72. Cooray, R., Petersson, C. G. B. & Holmberg, O. Isolation and purification of bovine myeloperoxidase from neutrophil granules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **38**, 261–272 (1993).
 73. Pulli, B. *et al.* Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples. *PLoS One* **8**, 1–10 (2013).
 74. Hamghalam, M. & Ayatollahi, A. Automatic counting of leukocytes in giemsa-stained images of peripheral blood smear. *Proc. - 2009 Int. Conf. Digit. Image Process. ICDIP 2009* 13–16 (2009). doi:10.1109/ICDIP.2009.9
 75. Brown, M. & Wittwer, C. Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clin. Chem.* **46**, 1221–1229 (2000).
 76. Fung, Y. L. & Minchinton, R. M. The fundamentals of neutrophil antigen and antibody investigations. 381–386 (2011).
 77. Lagasse, E. & Weissman, I. L. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J. Immunol. Methods* **197**, 139–150 (1996).
 78. Lee, P. Y., Wang, J.-X., Parisini, E., Dascher, C. C. & Nigrovic, P. A. Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 585–594 (2013).
 79. Rose, S., Misharin, A. & Perlman, H. A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. **81**, 343–350 (2014).
 80. Daley, J. M., Thomay, A. A., Connolly, M. D., Reichner, J. S. & Albina, J. E. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 64–70 (2007).

81. Nicholson, G. C. *et al.* A novel flow cytometric assay of human whole blood neutrophil and monocyte CD11b levels: Upregulation by chemokines is related to receptor expression, comparison with neutrophil shape change, and effects of a chemokine receptor (CXCR2) antagonist. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **20**, 52–59 (2007).
82. Van Eeden, S. F., Klut, M. E., Walker, B. A. M. & Hogg, J. C. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J. Immunol. Methods* **232**, 23–43 (1999).
83. Bateman, J., Parida, S. K. & Nash, G. B. Neutrophil integrin assay for clinical studies TL - 11. *Cell Biochem. Funct.* **11 VN-r**, 87–91 (1993).
84. Elghetany, M. T., Ge, Y., Patel, J., Martinez, J. & Uhrova, H. Flow Cytometric Study of Neutrophilic Granulopoiesis in Normal Bone Marrow Using an Expanded Panel of Antibodies: Correlation with Morphologic Assessments. *J. Clin. Lab. Anal.* **18**, 36–41 (2004).
85. Sørensen, O., Cowland, J. B., Askaa, J. & Borregaard, N. An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. *J. Immunol. Methods* **206**, 53–59 (1997).
86. LAMMERS, A. M., VAN DE KERKHOF, P. C. M., SCHALWIJK, J. & MIER, P. D. Elastase, a marker for neutrophils in skin infiltrates. *Br. J. Dermatol.* **115**, 181–186 (1986).
87. Abella, V. *et al.* The potential of lipocalin-2/NGAL as biomarker for inflammatory and metabolic diseases. *Biomarkers* **20**, 565–571 (2015).
88. Kjeldsen, L., Koch, C., Arnljots, K. & Borregaard, N. Characterization of two ELISAs for NGAL, a newly described lipocalin in human neutrophils. *J. Immunol. Methods* **198**, 155–164 (1996).
89. Kjeldsen, L. *et al.* Human neutrophil gelatinase: a marker for circulating blood neutrophils. *Eur. J. Haematol.* **49**, 180–191 (1992).
90. Brown, K. E., Brunt, E. M. & Heinecke, J. W. Immunohistochemical detection of myeloperoxidase and its oxidation products in Kupffer cells of human liver. *Am. J. Pathol.* **159**, 2081–8 (2001).
91. Amanzada, A. *et al.* Myeloperoxidase and elastase are only expressed by neutrophils in normal and in inflamed liver. *Histochem. Cell Biol.* **135**, 305–315 (2011).
92. Faith, M., Sukumaran, A., Pulimood, A. B. & Jacob, M. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity? *Clin. Chim. Acta* **396**, 23–25 (2008).
93. Haqqani, A. S., Sandhu, J. K. & Birnboim, H. C. A myeloperoxidase-specific assay based upon bromide-dependent chemiluminescence of luminol. *Anal. Biochem.* **273**, 126–132 (1999).
94. Setsukinai, K. ichi, Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H. J. & Nagano, T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J. Biol. Chem.* **278**, 3170–3175 (2003).
95. Wolfe, M. G. *et al.* Development of a functional point-of-need diagnostic for myeloperoxidase detection to identify neutrophilic bronchitis. *Analyst* **141**, 6438–6443 (2016).
96. Dai, R. *et al.* Neutrophils & neutrophil serine proteases are increased in the spleens of estrogen-treated C57BL/6 mice & several strains of spontaneous lupus-prone mice. *PLoS One* **12**, 1–19 (2017).
97. Morris, M. C., Nadeem Khan, M. & Pichichero, M. E. A PCR-based method for quantifying neutrophils in human nasal secretions. *J. Immunol. Methods* **447**, 65–70 (2017).
98. Baumert, A., Bruckmaier, R. M. & Wellnitz, O. Cell population, viability, and some key

- immunomodulatory molecules in different milk somatic cell samples in dairy cows. *J. Dairy Res.* **76**, 356–364 (2009).
99. Koess, C. & Hamann, J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *J. Dairy Res.* **75**, 225–232 (2008).
 100. Shattock, A. G., Joyce, P. J. & Sloan, T. Capture immunoassay for the diagnosis of bovine mastitis using a monoclonal antibody to polymorphonuclear granulocytes. *J. Dairy Res.* **59**, 123–133 (1992).
 101. Becheva, Z., Gabrovska, K. & Godjevargova, T. Immunofluorescence microscope assay of neutrophils and somatic cells in bovine milk. *Food Agric. Immunol.* **28**, 1196–1210 (2017).
 102. Cooray, R. Use of bovine myeloperoxidase as an indicator of mastitis in dairy cattle. *Vet. Microbiol.* **42**, 317–326 (1994).
 103. Zerbe, H., Ošadnik, C., Leibold, W. & Schuberth, H. J. Lochial secretions of *Escherichia coli*- or *Arcanobacterium pyogenes*-infected bovine uteri modulate the phenotype and the functional capacity of neutrophilic granulocytes. *Theriogenology* **57**, 1161–1177 (2002).
 104. Perfetto, S. P., Chattopadhyay, P. K. & Roederer, M. Seventeen-colour flow cytometry: Unravelling the immune system. *Nature Reviews Immunology* **4**, 648–655 (2004).
 105. Christoffersson, G. & Phillipson, M. The neutrophil: one cell on many missions or many cells with different agendas? *Cell Tissue Res.* **371**, 415–423 (2018).
 106. Breider, M. A., Walker, R. D., Hopkins, F. M., Schultz, T. W. & Bowersock, T. L. Pulmonary lesions induced by *Pasteurella haemolytica* in neutrophil sufficient and neutrophil deficient calves. *Can. J. Vet. Res.* **52**, 205–209 (1988).
 107. Wolfger, B., Timsit, E., White, B. J. & Orsel, K. A Systematic Review of Bovine Respiratory Disease Diagnosis Focused on Diagnostic Confirmation, Early Detection, and Prediction of Unfavorable Outcomes in Feedlot Cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **31**, 351–365 (2015).
 108. Bassel, L. L. & Caswell, J. L. Bovine neutrophils in health and disease. *Cell Tissue Res.* **371**, 617–637 (2018).
 109. McDougall, S., LeBlanc, S. J. & Heiser, A. Effect of prepartum energy balance on neutrophil function following pegbovigrastim treatment in periparturient cows. *J. Dairy Sci.* **100**, 7478–7492 (2017).
 110. Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S. & LeBlanc, S. J. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **93**, 5225–5233 (2010).
 111. Duarte, C. M., Freitas, P. P. & Bexiga, R. Technological advances in bovine mastitis diagnosis. *J. Vet. Diagnostic Investig.* **27**, 665–672 (2015).

{Formatting Citation}

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, Gilles FOUCRAS, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **DUPONT Christophe** intitulée « **Les granulocytes neutrophiles : morphologie, fonctions et méthodes de quantification dans l'espèce bovine** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 11 octobre 2018
Professeur Gilles FOUCRAS
Enseignant Chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Gérard CAMPISTRON

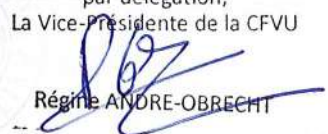


Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier

Monsieur Jean-Pierre VINEL
Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU



Régine ANDRE-OBRECHT



M. DUPONT Christophe
a été admis(e) sur concours en : 2013
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 04/07/2017
a validé son année d'approfondissement le : 06/09/2018
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

DUPONT Christophe

TITRE : Les granulocytes neutrophiles : morphologie, fonctions et méthodes de quantification dans l'espèce bovine.

Résumé :

Les neutrophiles sont les plus grands effecteurs de l'immunité innée. Ils illustrent la première ligne de défense contre les infections bactériennes, virales ou fongiques. La réponse inflammatoire médiée par les neutrophiles est complexe et se déroule en plusieurs étapes. La myéloperoxydase (MPO) est une protéine hémique présente uniquement dans les neutrophiles, notamment chez les bovins. Parmi les différentes méthodes de quantification des neutrophiles analysés une méthode proposée récemment amène des opportunités de développement d'un test rapide de quantification des neutrophiles au travers d'un dosage de l'activité de la MPO dans des tissus grâce à un marquage par ELISA. Chez les bovins un biomarqueur serait utile dans trois pathologies spécifiques rencontrées en élevage bovin et à fort impact économique. En effet le développement d'un test rapide de l'inflammation respiratoire, mammaire ainsi qu'utérine serait largement bénéfique à la pratique vétérinaire rurale.

Mots clés : neutrophiles, inflammation, myéloperoxydase, ELISA, bovin, quantification

Abstract:

Neutrophils are the main effectors of innate immunity. They illustrate the first line of defense against infection of bacteria, viruses or fungi. The inflammatory response mediated by neutrophils is complex and happens in several steps. The myeloperoxidase is a heme protein found only in neutrophils, included in the bovine specie. Among different quantification methods of neutrophils in tissues a new method has been proposed. It is an opportunity of development of a quick test for neutrophils quantification based on MPO activity in tissue samples with an ELISA test. In cows an useful biomarker of respiratory, mammal or uterine disease could be helpful considering the economic impact for farmers of those diseases. Such test could be very advantageous in veterinarian practice.

Keywords: neutrophils, inflammation, myeloperoxidase, ELISA, bovine, quantification