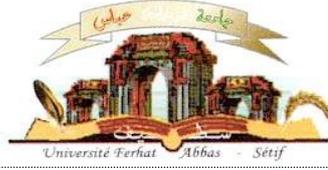


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2017

**THÈSE**

Présentée par

**BOUSSIF Abdelali**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT EN SCIENCES**

**Filière: BIOLOGIE**

**Spécialité: BIOCHIMIE**

**THÈME**

**Activités de défense antibactériennes et signalisation intracellulaire  
des neutrophiles humains normaux et de patients cirrhotiques.**

Soutenue publiquement le 16/02/2017

DEVANT LE JURY

Président	Senator Abderrahmane	Pr. UFA Sétif 1
Directeur	Bouriche Hamama	Pr. UFA Sétif 1
Co-directeur	Périanin Axel	DR. CNRS - Paris
Examineurs	Djerdjouri Bahia	Pr. USTHB Alger
	Yahia Mouloud	Pr. U Batna-2

*Laboratoire de Biochimie Appliquée*

Les travaux décrits dans ce rapport ont été effectués dans le Centre de Recherche sur l'Inflammation (CRI) de la Faculté de Médecine Xavier Bichat (INSERM U1149), dans le cadre du Programme National Exceptionnel (PNE) du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique. Les travaux ont été codirigés par:

Dr. Axel Périani, Directeur de recherche à l'INSERM U1149 de Paris, France.

Pr. Hamama Bouriche, Professeur à l'université de Sétif-1, Algérie.

# REMERCIEMENTS

*Je tiens à remercier infiniment La Pr. Hamama Bouriche pour m'avoir fait confiance en acceptant de m'encadrer depuis mon Magister, pour m'avoir soutenu, encouragé et conseillé. Merci pour votre patience.*

*Nul mot ne pourra exprimer ma reconnaissance et ma profonde gratitude envers le Docteur Axel Périanin qui m'a accueilli dans son équipe de recherche à l'INSERM U1149-Centre de Recherche Biomédicale Bichat-Beaujon - Paris. Dr. Axel Périanin n'a jamais épargné d'effort pour m'aider, me diriger, me conseiller puis me guider vers la réussite. Ce fut un honneur pour moi de travailler avec vous, et j'espère avoir été à la hauteur.*

*Je remercie infiniment Le Pr. Abderrahmane Senator, La Pr. Bahia Djerdjouri et Le Pr. Mouloud Yahia qui m'ont honoré en acceptant d'examiner et de juger mon travail.*

*Mes sincères remerciements vont également à Dr. Jamel El Benna qui m'a ouvert les portes de ses labos et qui m'a accueilli dans son équipe de recherche à l'INSERM U1149*

*Je remercie également le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique qui m'a accordé la bourse d'étude PNE dans le cadre de laquelle j'ai pu réaliser ce travail au sein de l'équipe du Dr Axel Périanin.*

*Je tiens à remercier particulièrement ma collègue et mon amie Dr. Sahra Amel Belambri qui m'a mis en contact avec Dr. Périanin, qui m'a encouragé à rejoindre l'équipe El-Benna de l'unité U1149 et qui m'a soutenu tout au long de ce travail.*

*Je remercie vivement mon ami le Dr. Loïc Rolas pour son aide précieuse et sa collaboration active à la réalisation de ce travail.*

*Je remercie également Dr. Richard Moreau, le Dr. Emmanuel Weiss et le Département d'Anesthésie Réanimation de l'Hôpital Beaujon, qui nous ont fourni les précieux échantillons sanguins de patients atteints de cirrhose hépatique, ainsi que le personnel de l'EFS France qui nous a fourni les poches de sang des témoins.*

*Je tiens également à remercier tous les autres chercheurs et membres de l'équipe del'U1148, particulièrement la Professeur Marie-Anne Gougerot-Pocidallo, Dr.PhamMy-Chan Dang, Dr. Jean-Claude Marie, Dr. Eric Chastre, Dr. Larissa Kotelevets Michèle Fay, Viviana Marzaioli, Riad Arabi-Derkawi, Margarita Hurtado-Nedelec, Anaïs Gardette, Hasna Maksouri, Yamina Khichane et Tarek Boussetta, merci pour toute votre aide, vos conseils et surtout pour les beaux moments que j'ai passés avec vous.*

*Merci à mes amis qui ont contribué de près comme de loin à la réalisation de ce travail, qui m'ont encouragé et qui m'ont soutenu jusqu'au bout :Yacine Derradji, Sahra Amel Belambri, Dalila Mesaoudi, Kaouthar Boudiaf, ChaharaBoudoukha, et plus particulièrement mon meilleur ami de toujours Réda Serhane.*

*Mille mercis à tous les membres de ma famille pour leur soutien et leur patience.*

# **DEDICACE**

*Je dédie ce travail  
à  
Mes chers parents*

## ملخص

تلعب الخلايا المتعادلة دورا رئيسيا في دفاع الجسم ضد الجراثيم. ترتبط هذه الوظيفة ارتباطا وثيقا باستجابتين رئيسيتين؛ إنتاج كمية ضخمة من Superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) (انفجار الأوكسدة) من طرف NADPHoxidase، الذي هو مصدر تشكيل بيروكسيد الهيدروجين ( $H_2O_2$ )، وإفراز الإنزيمات من الحبيبات (تحب)، بما في ذلك Myeloperoxidase (MPO) التي تستخدم  $H_2O_2$  في تدمير مسببات الأمراض. في بعض الأمراض مثل تليف الكبد الكحولي، يظهر المرضى ارتفاعا فيالتعرض للعدوى الميكروبية التي تؤدي في اغلب الأحيان إلى الموت، مما يشير إلى فشل الإستجابات الدفاعية للخلايا المتعادلة.

تم في هذا العمل دراسة قدرة إفراز إنزيم Myeloperoxidase من طرف الخلايا المتعادلة لمرضى التليف الكبدي المحفزة بـ ثلاثي البيتيد fMLP، وكذلك حالة تنشيط بعض المسارات الهامة لنقل الإشارة التي يمكن أن تلعب دورا في تنظيم هذه الاستجابة. من جهة أخرى، تمت دراسة تدخل هذه المسارات في تنظيم إفراز الحبيبات في الخلايا السليمة. بينت النتائج قسورا حادا في إفراز Myeloperoxidase من طرف خلايا مرضى التليف الكبدي المنشطه بـ fMLP، في حين أن المخزون الحبيبي لم يتغير، لوحظ أيضا تنشيط شديد لفسفرة ERK1/2 و p38MAPK، AKT، في حين لم يلاحظ أي تغير في تعبير هذه البروتينات ولا في تعبير المستقبل الغشائي للفPR (fPR). أظهر استعمال المثبطات النوعية لهذه المسارات أن AKT و p38MAPK فقط يتدخلان في تنظيم إفراز إنزيم Myeloperoxidase في الخلايا المتعادلة المنشطة بـ fMLP. أظهرت الخلايا المتعادلة لمرضى التليف الكبدي حالة تثبيط حاد في قتل البكتيريا، ولكن اظهر البحث أنه يمكن تصحيح الوضع ex vivo عن طريق تحفيز مستقبلات TLR7/8 باستعمال CL097، ويتم ذلك عبر تنشيط المحور p38MAPK/AKT، وتنشيط إفراز Myeloperoxidase بـ fMLP.

بيننا في هذا العمل للمرة الأولى أن الخلايا المتعادلة لمرضى التليف الكبدي تعاني تثبيطا في نقل الإشارة عبر ERK1/2 و p38MAPK، AKT، وقسورا حادا في إفراز Myeloperoxidase وكذا ضعف النشاطية ضد البكتيريا. في حين يمكن تصحيح هذه الاختلالات عن طريق تحفيز مستقبلات TLR7/8. تساهم هذه الاختلالات في تضاعف قابلية مرضى التليف الكبدي للإصابة بالالتهابات البكتيرية.

**الكلمات المفاتيح:** الخلية المتعادلة، إفراز الحبيبات، Myeloperoxidase، التليف الكبدي البالغ، نقل الإشارة،

الأنواع الأوكسيجينية النشطة.

## Résumé

Le polynucléaire neutrophile (PN) joue un rôle clé dans la défense antimicrobienne de l'organisme. Cette fonction innée dépend étroitement de deux réponses majeures du PN; la production massive d'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ) par le système NADPH oxydase, (explosion oxydative) qui est à l'origine de la formation de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), et la libération des enzymes granulaires (dégranulation), parmi lesquelles la myéloperoxydase (MPO) qui utilise  $H_2O_2$  pour détruire les pathogènes. Dans certaines pathologies telles que la cirrhose hépatique alcoolique décompensée, les patients ont une susceptibilité accrue aux infections microbiennes parfois mortelles, suggérant une défaillance des réponses défensives des PN.

Dans ce travail, nous avons comparé la dégranulation de la MPO des neutrophiles de ces patients cirrhotiques et témoins, induite par le peptide d'origine bactérienne fMet-Leu-Phe(fMLP), ainsi que l'état d'activation de plusieurs effecteurs majeurs de signalisation intracellulaire potentiellement impliqués (AKT, p44/42-MAP kinases (ERK1/2) et p38-MAP-kinases). Par ailleurs, la contribution respective de ces effecteurs dans la dégranulation de la MPO a été explorée dans des neutrophiles sains à l'aide d'antagonistes pharmacologiques des effecteurs. Nos résultats montrent que la dégranulation de myéloperoxydase induite par le fMLP est fortement altérée dans les neutrophiles des patients alors que le taux d'expression de la myéloperoxydase intracellulaire n'a pas été modifié. En revanche, l'activation des trois effecteurs de signalisation induite par le fMLP et, mesurée par leur niveau de phosphorylation, était aussi fortement déficiente en dépit d'une expression normale de ces effecteurs et du récepteur de fMLP (fPR). Cependant, le blocage pharmacologique de ces effecteurs dans les neutrophiles sains, montre que AKT et p38-MAPK, mais pas ERK1/2, régulent positivement l'exocytose de la myéloperoxydase induite par le fMLP. De façon intéressante, les neutrophiles de patients cirrhotiques présentent également un déficit de bactéricidie que nous avons pu corriger *ex vivo* à l'aide d'un agoniste des récepteurs de type Toll(TLR7/8). Le CL097 potentialise à la fois le niveau et la durée d'activation de la voie AKT/p38-MAPK induite par le fMLP, favorisant ainsi la libération de la myéloperoxydase.

En conclusion, cette étude apporte les premières indications que les neutrophiles de patients atteints de cirrhose hépatique décompensée présentent une forte défaillance de signalisation via l'axe AKT/p38-MAPK, de la libération de la myéloperoxydase et de l'activité bactéricide. Ces défaillances qui contribuent à la susceptibilité accrue des patients cirrhotiques aux infections peuvent être corrigées via l'activation des TLR7/8, ce qui ouvre des perspectives thérapeutiques pour les patients immunodéprimés.

**Mots clés :** Neutrophile, Exocytose, Myéloperoxydase, Hépatite, Phagocytes, Signalisation, Espèces réactives de l'oxygène

## Abstract

Polymorphonuclear neutrophils (PN) play a key role in host defense mechanisms against microbial infections. This innate function is dependent on two major PN responses ; a massive production of superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) by the NADPH oxidase system (a phenomenon termed respiratory burst) leading to the formation of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and the release of granular enzymes (degranulation) among which Myeloperoxidase (MPO) which uses  $H_2O_2$  to kill bacteria. In some pathologies such as decompensated alcoholic cirrhosis, patients exhibit an increased susceptibility for mostly lethal infections suggesting deficiencies of defensive responses of PN.

In this study, we compared the MPO release from PN of these cirrhotic patients and healthy volunteers in response to stimulation by the bacterial peptide fMet-Leu-Phe(fMLP), and the activation state of major signaling effectors potentially involved(AKT, p44/42-MAP kinases (ERK1/2) et p38-MAP-kinases). In addition, the, respective contribution of the three signaling effectors in MPO degranulation was explored using healthy PN and pharmacological antagonists. Our results show that fMLP-induced myeloperoxidase release was strongly impaired in patients' neutrophils whereas the intracellular myeloperoxidase stock was unaltered. The fMLP-induced activation of signaling effectors measured by their phosphorylated forms was also strongly deficient despite a normal expression of the three effectors and the fMLP receptor, fPR. However, based on the pharmacological inhibition of the signaling effectors in healthy neutrophils, AKT and p38-MAPK, but not ERK1/2, up-regulated fMLP-induced myeloperoxidase exocytosis. Interestingly, patients' neutrophils also exhibited a defective bactericidal capacity that was reversed ex-vivo by the Toll-like receptor 7/8agonist CL097. This agent potentiated both the degree and duration of the AKT/p38-MAPK signaling axis induced by fMLP, thus enhancing myeloperoxidase release.

In conclusion, this study provides first evidences that neutrophils from patients with decompensated alcoholic cirrhosis exhibit a deficient AKT/p38-MAPK signaling, myeloperoxidase release and bactericidal activity. These deficiencies which may increase patients' susceptibility to bacterial infections, can be reversed via TLR7/8 activation, and thus raises therapeutical perspectives to boost host-defense mechanisms of immuno-depressed patients.

**Key words:** Neutrophil, Exocytosis, Myeloperoxidase, Hepatitis, Phagocytes, Signaling, Reactive oxygen species

# PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS EN RELATION AVEC LES TRAVAUX DE THESE

## PUBLICATIONS

- 1- **Boussif A**, Rolas L, Weiss E, Bouriche H, Moreau R, Périanin A. J Hepatol. Impaired intracellular signaling, myeloperoxidase release and bactericidal activity of neutrophils from patients with alcoholic cirrhosis. 2016 May; 64(5):1041-8
- 2- **Louvet A**. Restoration of bactericidal activity of neutrophils by myeloperoxidase release: A new perspective for preventing infection in alcoholic cirrhosis. 2016 May; 64(5):1006-7. (Editorial de *Journal of Hepatology* dédié à notre article)
- 3- Loïc Rolas, **Abdelali Boussif**, Emmanuel Weiss, Phillippe Letteron, Oualid Haddad, Jamel El-Benna, Pierre-Emmanuel Rautou, Richard Moreau and Axel Périanin. NADPH Oxidase depletion in neutrophils from patients with cirrhosis: Restoration via Toll-like receptor 7/8 activation. *Soumis à la revue Gut*.

## COMMUNICATIONS

- 1- **BOUSSIF Abdelali**, ROLAS Loïc, WEISS Manuel, MOREAU Richard, PERIANIN Axel. Neutrophils from patients with severe alcoholic cirrhosis exhibited a deficient p38-MAP kinases-dependent myeloperoxidase degranulation. *1st Meeting Of The Neutrophil Club; Paris* April 10th, 2015. (Communication Poster)
- 2- **BOUSSIF Abdelali**, ROLAS Loïc, WEISS Emmanuel, EL-BENNA Jamel, MOREAU Richard, PERIANIN Axel. Down regulation of AKT/MAP-Kinases signaling-mediated NADPH oxidase activity and myeloperoxidase release in neutrophils from decompensated alcoholic cirrhosis. 9<sup>ème</sup> Club Oxydase; Genève 21-22 Mai 2015. (Communication Poster)
- 3- Loïc Rolas, Nesrine Makhezer, Soumeiya Hadjoudj, **Abdelali Boussif**, Emmanuel Weiss, Jamel El-Benna, Bahia Djerdjouri, Laure Elkrief, Richard Moreau and Axel Périanin. Regulation of neutrophil NADPH oxidase activity : Identification of a novel signaling effector, mTOR, and NOX2 down-regulation processes induced during alcohol cirrhosis. 1st Meeting Of The Neutrophil Club; Paris April 10th, 2015. (Communication Orale)
- 4- Loïc ROLAS, **Abdelali BOUSSIF**, Emmanuel WEISS, Jamel EL-BENNA, Richard MOREAU and Axel PERIANIN. Extensive down-regulation of NOX2 expression mediated by alcohol cirrhosis and bacterial peptides in human neutrophils. 9<sup>ème</sup> Club Oxydase; Genève 21-22 Mai 2015. (Communication Orale)

# LISTE DES SCHEMAS ET FIGURES

<b>Schéma</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Schéma 1.</b>	Origine et devenir du neutrophile.	06
<b>Schéma 2.</b>	Fonction bactéricide du neutrophile au cours de la réponse immunitaire innée.	07
<b>Schéma 3.</b>	Phagocytose des agents pathogènes par les neutrophiles et activation des fonctions bactéricides.	08
<b>Schéma 4.</b>	Schéma de la granulogénèse au cours de la maturation des PN.	09
<b>Schéma 5.</b>	Implication des SNAREs dans l'exocytose des granules intracellulaires.	15
<b>Schéma 6.</b>	Organisation structurale de la NADPH oxydase.	24
<b>Schéma 7.</b>	Les différentes espèces réactives antimicrobiennes produites par le système MPO-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	26
<b>Schéma 8.</b>	Neutrophil Extracellular Traps (NETs).	27
<b>Schéma 9.</b>	Structure primaire et 3D prédictive du formyl-peptide-receptor fPR1	31
<b>Schéma 10.</b>	Diagramme des voies de signalisation enclenchées par le récepteur fPR dans les neutrophiles humains	32
<b>Schéma 11.</b>	Structure des récepteurs Toll-Like (TLR) et similitude avec l'IL-R1.	33
<b>Schéma 12.</b>	Rôle des Phospholipases et de leurs dérivés lipidiques dans la transduction du signal au cours de l'activation du neutrophile.	38
<b>Schéma 13.</b>	Architecture d'une sinusoïde hépatique.	49
<b>Schéma 14.</b>	Représentation schématique des altérations vasculaires et architecturales du foie (sinusoïde hépatique) au cours de la cirrhose.	50
<b>Schéma 15.</b>	Progression de la cirrhose hépatique alcoolique.	53
<b>Schéma 16.</b>	Rôle de l'alcool et de ses métabolites dans la cirrhose hépatique.	54
<b>Schéma 17.</b>	Séparation des différentes populations cellulaires au cours de l'isolement des neutrophiles à partir du sang humain.	62

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Figure 1.</b>	Détermination des paramètres de dégranulation des neutrophiles humains.	70
<b>Figure 2.</b>	Défaillance sévère de dégranulation de la MPO des neutrophiles de patients ayant une cirrhose alcoolique décompensée.	72
<b>Figure 3.</b>	Défaillance de l'activation des effecteurs de signalisation induite par le fMLP dans les neutrophiles des patients cirrhotiques.	74
<b>Figure 4.</b>	L'expression des effecteurs majeurs de signalisation n'est pas altérée dans les PN des patients cirrhotiques.	75
<b>Figure 5.</b>	AKT est un effecteur majeur dans la dégranulation de la MPO dans les PN.	76
<b>Figure 6.</b>	La p38-MAPKinase est un effecteur majeur dans la dégranulation de la MPO dans les PN.	77
<b>Figure 7.</b>	La p38-MAPKinase est activée en aval d'AKT dans la cascade de signalisation induite par le fMLP dans le neutrophile.	78
<b>Figure 8.</b>	L'antagoniste de ERK1/2, U0126, interfère avec l'activité MPO dans le surnageant de dégranulation.	79
<b>Figure 9.</b>	ERK1/2 ne serait pas impliquée dans la dégranulation des neutrophiles stimulés par le fMLP.	80
<b>Figure 10.</b>	L'antagoniste des TLR7/8 restaure la dégranulation induite par le fMLP des neutrophiles de patients cirrhotiques.	81
<b>Figure 11.</b>	Le CL097 potentialise la phosphorylation d'AKT et de p38-MAPK et reverse leur activation défailante dans les PN des patients.	83
<b>Figure 12.</b>	Expression des TLR7/8 dans les neutrophiles de donneurs sains et de patients.	84
<b>Figure 13.</b>	Défaillance de l'activité bactéricide des neutrophiles de patients cirrhotiques et restauration par le	85

CL097.

**Figure 14.** Le plasma des patients cirrhotique inhibe la dégranulation des neutrophiles normaux stimulés avec du fMLP. 87

**Figure 15.** Modèle proposé pour la dégranulation de la MPO induite par le fMLP via AKT/MAPK dans les neutrophiles sains et de patients cirrhotiques. 94

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 1.</b>	Principaux chimioattractants du neutrophile.	08
<b>Tableau 2.</b>	Constituants essentiels des différentes granules du neutrophile humain.	14
<b>Tableau 3.</b>	Substrats et produits de la MPO	20
<b>Tableau 4.</b>	Cytokines secrétées par le neutrophile humain.	28
<b>Tableau 5.</b>	Evolution de la cirrhose hépatique.	52
<b>Tableau 6.</b>	Caractéristiques et scores des patients	60
<b>Tableau 7.</b>	Valeurs d'IC <sub>50</sub> des différents inhibiteurs sur la dégranulation et l'activation des effecteurs majeurs de la signalisation.	78

## LISTE DES ABREVIATIONS

AIR	auto-inhibitory region
AKT/PKB	Protéine kinase B
AMPK	AMP-activated protein kinase
AP	Acide phosphatidique ARN Acide ribonucléique
ASK	Apoptosis signal-regulation kinase
ATP	Adénosine triphosphate
BPI	Bactericidal permeability increasing protein
CGD	Chronic granulomatous disease
CR	Récepteur du complément
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand
CXCR	Récepteur de chimiokine au motif CXC
Cyto B	Cytochalasine B
DAG	1,2-diacylglycérol
DEPTOR	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DUOX	dual oxidase
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FAD	Flavin adenine dinucleotide
FKBP	FK506 binding protein
fMLP	formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
fPR (FPR)	formyl peptide receptor, récepteur du fMLP
FRO	Formes réactives de l'oxygène
G-CSF	Granulocyte - Colony stimulating factor
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	GTP exchange factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor
GTP	Guanosine triphosphate
HL60	Human promyelocytic leukemia cells
IC <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice médiane
ICAM	intercellular adhesion molecule
IKK	I $\kappa$ B kinase
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucin-Rich-Repeats
LTB4	leukotriene B4
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MEK	Mitogen extracellular kinase
MIP	Macrophage inflammatory protein
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8
MPO	Myéloperoxidase
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC	mammalian target of rapamycin complex

NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NOX	NADPH oxidase
PAF	Platelet-activating factor
PAMP	Motif moléculaire associé aux pathogènes
PH	Pleckstrin homology
Phox	Phagocyte oxidase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP3	Phosphatidylinositol 3 phosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate
PN	Polynucléaire neutrophile
PRAS40	Proline-richAkt-substrate 40
PRR	Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
Rac	ras-related C3 botulinum toxin substrate
RAPTOR	Regulatory Associated Protein of mTOR
GPCR	G protein coupled receptor
Rho-GDI	Rho GDP-dissociation inhibitor
RICTOR	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
S6K1	S6 kinase polypeptide 1
SH3	Src Homology domain
SOD	Superoxyde dismutase
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TIR	Toll/IL-1R/R
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TOR	Target of Rapamycin
TSC	Tuberous sclerosis

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

## *Revue Bibliographique*

<b>I. Le neutrophile, cellule clé de l'immunité innée</b> .....	4
I.1. Génération et homéostasie des neutrophiles .....	5
I.2. Principales activités de défense du neutrophile .....	6
I.2.3. Dégranulation du neutrophile .....	9
I.2.3.1. Granulogénèse .....	9
I.2.3.2. Différentes granulations du neutrophile .....	10
I.2.3.3. Mécanisme de dégranulation du neutrophile .....	14
I.2.3.4. Rôle des granules dans l'activité microbicide du neutrophile .....	17
I.2.3.5. La Myéloperoxydase .....	19
I.2.4. Explosion oxydative du neutrophile .....	21
I.2.4.1. La NADPH oxydase du neutrophile .....	22
I.2.4.2. Génération des FRO et coopération NOX2-MPO .....	24
I.2.5. Neutrophil Extracellular Traps (NET) .....	26
I.2.6. Production de cytokines .....	27
I.2.7. Apoptose des neutrophiles et résolution de l'inflammation .....	28
I.3. Transduction du signal au cours de la stimulation du neutrophile .....	29
I.3.1. Les récepteurs membranaires liés aux fonctions bactéricides du neutrophile .....	30
I.3.1.1. Les récepteurs couplés aux protéines G .....	30
a. Les récepteurs des peptides formylés (fPR) .....	31
I.3.1.2. Les "Toll-like Receptors" (TLR) .....	33
I.3.1.3. Autres récepteurs du neutrophile .....	35
I.3.2. Principaux effecteurs et voies de la signalisation du neutrophile humain .....	35
I.3.2.1. La protéine G .....	35
I.3.2.2. Les Phospholipases .....	36
I.3.2.3. La Protéine Kinase C .....	39
I.3.2.4. L'axe PI3K-AKT-mTOR .....	39
I.3.2.5. MAP Kinases (MAPK) .....	43
I.3.2.6. Tyrosine Kinases .....	44
I.3.2.7. Les petites GTPases .....	45
I.4. Dysfonctionnements du neutrophile et pathologies .....	46
I.4.1. Les désordres d'homéostasie .....	46
I.4.2. Les désordres d'activités fonctionnelles .....	47
I.4.3. Les désordres de régulation .....	47
<b>II. Le neutrophile et la cirrhose hépatique décompensée</b> .....	49
II.1. Le Foie .....	49
II.2. La cirrhose hépatique .....	50
II.3. Rôle des neutrophiles dans la physiopathologie de la cirrhose .....	54
II.4. Dysfonctionnements du neutrophile au cours de la cirrhose hépatique .....	56
II.5. Traitement de la cirrhose .....	57

## *Etude expérimentale*

<b>III. Matériels et Méthodes</b> .....	60
<b>III.1. Matériels</b> .....	60
III.1.1. Patients.....	60
III.1.2. Réactifs .....	61
<b>III.2. Méthodes</b> .....	61
III.2.1. Isolement des neutrophiles .....	61
III.2.2. Dégranulation des neutrophiles .....	62
III.2.3. Implication des effecteurs de signalisation.....	63
III.2.4. Activité bactéricide des neutrophiles.....	64
III.2.5. Explosion oxydative des neutrophiles .....	64
III.2.6. Analyse des protéines phosphorylées par immuno-empreinte (western-blot).....	65
III.2.7. Restauration des réponses des PN de patients par l'agoniste des TLR7/8 .....	66
III.2.8. Quantification de l'ARNm deTLR7/8 .....	66
III.2.9. Effet du plasma des patients cirrhotiques sur la dégraulation .....	67
III.2.10. Analyse statistique .....	67
<b>IV. Résultats</b> .....	69
IV.1. Caractérisation de la dégranulation de la MPO des neutrophiles humains stimulés par le fMLP .....	69
IV.2. Défaillance sévère de dégranulation de la MPO des neutrophiles de patients ayant une cirrhose alcoolique décompensée.....	71
IV.3. La défaillance de dégranulation des PN des patients cirrhotiques est associée à un défaut de signalisation intracellulaire initié par le fPR, le récepteur du fMLP.....	73
IV.4. Implication majeure d'AKT et p38-MAPK mais pas deERK1/2 dans la dégranulation de la MPO des PN stimulés par le fMLP .....	73
IV.5. L'agoniste des récepteurs Toll 7/8 (TLR7/8), le CL097, potentialise la dégranulation des PN normaux et corrige la défaillance de dégranulation dans les PN des patients cirrhotiques.....	80
IV.6. Le CL097 potentialise la phosphorylation d'AKT et de p38-MAPK et réverse leur activation défaillante dans les PN des patients.....	82
IV.7. La restauration de la dégranulation de la MPO et de l'activation d'AKT et de p38-MAPK par le CL097 est médiée principalement via TLR8.....	84
IV.8. Défaillance de l'activité bactéricide dans les PN des patients cirrhotiques, et sa restauration par le CL097 .....	85
IV.9. Le plasma des patients cirrhotiques réduit la dégranulation de la MPO des PN normaux stimulés avec du fMLP.....	86
<b>V. Discussion</b> .....	89
<b>VI. Conclusions et Perspectives</b> .....	96
VI.1. Conclusions .....	96
VI.2. Perspectives .....	97
<b>Références Bibliographiques</b> .....	100

## Introduction

Les *polynucléaires* neutrophiles (PN) représentent la plus grande famille de leucocytes sanguins et jouent un rôle majeur dans l'élimination d'agents pathogènes. Cette fonction de défense innée met en jeu de nombreuses activités tueuses du PN notamment la libération des contenus des granules (exocytose ou dégranulation) et une production massive et brutale d'anion superoxyde ( $O_2^{\circ}$ ), par le complexe NADPH oxydase (NOX2), phénomène appelé également explosion oxydative. Parmi les enzymes granulaires relarguées, la myéloperoxydase (MPO) initialement stockée dans les granules azurophiles, et qui utilise alors le peroxyde d'hydrogène formée par la dismutation de l'anion superoxyde, pour former des hypochlorites et chloramines qui sont des agents bactéricides. L'importance biologique de la MPO est d'illustrée notamment dans des modèles de souris génétiquement déficientes pour la MPO qui montrent une augmentation de la mortalité des animaux infectés, et une prolongation de l'inflammation.

La dégranulation de la MPO et l'explosion oxydative des PN peuvent être déclenchées simultanément par de nombreux médiateurs pro-inflammatoires parmi lesquels les peptides bactériens n-formylés qui sont également de puissants chimioattractants, alertant ainsi les PN en cas d'infection. Ces peptides interagissent via un récepteur spécifique à la surface des phagocytes, le fPR, qui déclenche alors l'activation en cascade de nombreux effecteurs de signalisation intracellulaires parmi lesquels les phospholipases qui génèrent des seconds messagers qui vont à leur tour activer de nombreuses protéines kinases parmi lesquelles AKT, PKC, MAP-Kinases (ERK1/2, p38-MAPK) ainsi que mTOR. Ces effecteurs de signalisation jouent un rôle important dans l'explosion oxydative des PN. Cependant leur contribution dans la dégranulation de la MPO des PN reste largement inexplorée.

Dans certaines situations pathologiques, les fonctions de défense des PN sont altérées de manière plus moins marquée selon l'état de sévérité de la maladie et deviennent ainsi nuisibles pour l'hôte. C'est le cas par exemple des patients ayant une cirrhose et dont la mortalité mondiale peut atteindre 4% de la population. Les patients cirrhotiques présentent une grande sensibilité aux infections microbiennes et meurent souvent d'infection (sepsis, péritonite) indiquant une défaillance des systèmes de défense anti-infectieuse. Bien que les traitements médicaux existent, ciblant uniquement les pathogènes (antibiotiques, antifongiques), et améliorent la survie des patients, environ 35% de ceux qui sont hospitalisés pour une cirrhose alcoolique sévère (décompensée) meurent dans les six mois. Ces traitements restent néanmoins insuffisants et peu satisfaisants d'autant que les antibiotiques peuvent également altérer les activités de défense des PN. Les travaux menés dans notre laboratoire sur les PN des patients ayant une cirrhose alcoolique décompensée ont montré que leur explosion oxydative est fortement réduite et liée à

un défaut d'activation de plusieurs effecteurs internes formant une voie de signalisation originale, mTOR/p38-MAPK/p47<sup>phox</sup>.

Dans ce contexte, notre objectif de thèse a été d'étudier les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la dégranulation de la MPO dans les PN de patients ayant une cirrhose alcoolique décompensée, comparativement aux PN humains normaux. La finalité du projet vise à identifier de nouveaux paramètres biochimiques permettant d'expliquer la grande susceptibilité des patients aux infections et éventuellement de les exploiter en vue de proposer des stratégies permettant d'améliorer leurs systèmes de défense, Pratiquement, le projet s'articule autour de 3 objectifs complémentaires suivants :

- Quantifier la dégranulation de la MPO ainsi que l'activité bactéricide des PN de patients cirrhotiques dans des conditions optimales, comparativement aux PN normaux, en réponse à la stimulation des PN à l'aide du tripeptide d'origine bactérienne, le fMet-Leu-Phe (fMLP).

- Etudier l'état d'activation de trois effecteurs majeurs induite par le fMLP et déterminer leur contribution respective dans la dégranulation de la MPO, dans les PN normaux et des patients cirrhotiques.

- Enfin, déterminer si les défaillances fonctionnelles et transductionnelles des PN des patients cirrhotiques, peuvent être traitées ou corrigées par une approche pharmacologique en utilisant un agoniste des récepteurs « Toll » intracellulaires (TLR7/8).

# *Revue Bibliographique*

## I. Le neutrophile, cellule clé de l'immunité innée

Les polynucléaires neutrophiles (PN), ou polymorphonucléaires neutrophiles constituent les cellules clés de l'immunité innée, et sont les cellules les plus importantes et les plus étudiées de la réponse inflammatoire. Ils sont les premières cellules recrutées au foyer inflammatoire où ils accomplissent leur fonction de première ligne de défense innée. Les PN jouent un rôle important dans la lutte contre les microorganismes envahisseurs grâce à leur capacité de développer rapidement de puissantes activités antimicrobiennes. Cette fonction du PN est assurée par une variété de réponses finement régulées et hautement efficaces. Après son recrutement, le PN quitte la circulation périphérique pour rejoindre le site de l'agression par chimiotactisme en réponse aux différents agents activateurs (chimioattractants). Les PN recrutés reconnaissent les pathogènes et les éliminent notamment par le biais de la phagocytose, et la production de quantités énormes de substances très réactives hautement toxiques qui dérivent de l'oxygène (Formes réactives de l'oxygène, FRO) dont le précurseur est l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) produit par le complexe NADPH Oxydase (NOX2) au cours de l'explosion oxydative (EO) (Boregaard, 2010 ; Kumar *et* Sharma, 2010 ; Summers *et coll.*, 2010). Simultanément, les PN libèrent (dégranulation ou exocytose) tout un arsenal de molécules et d'enzymes bactéricides emmagasinées dans différentes granules intracellulaires. Les PN sont également capables de libérer des réseaux structurés à base de chromatine appelés les pièges extracellulaires des PN (*Neutrophil Extracellular Traps, NET*) qui sont des structures d'ADN porteuses de différentes protéines provenant de l'intérieur des granules. Ces filets favorisent l'immobilisation et la destruction des micro-organismes dans un processus baptisé NETose (NETosis) (Mantovani *et coll.*, 2011). En plus de la dégradation et l'élimination des micro-organismes, les PN activés synthétisent des chimiokines et des cytokines, qui régulent la réponse inflammatoire et recrutent d'autres cellules effectrices, y compris les PN eux-mêmes (Theilgaard-Mönch *et coll.*, 2006).

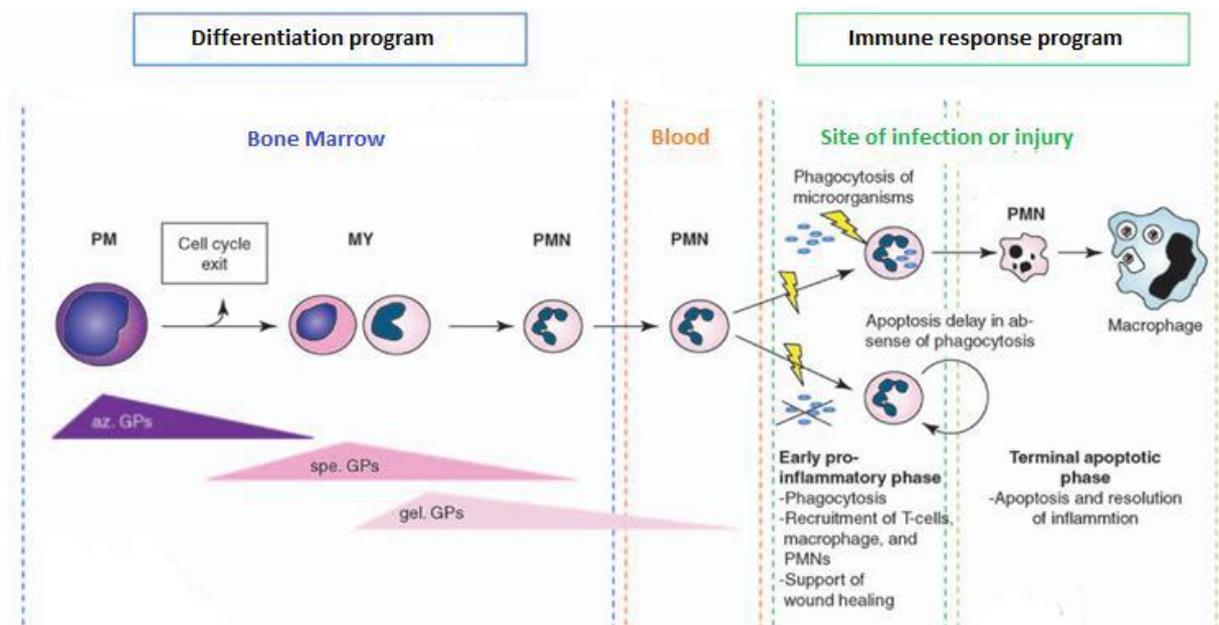
L'importance des PN comme éléments clés dans la réponse immunitaire innée est bien illustrée dans de nombreuses maladies caractérisées par des troubles neutropéniques, la granulomatose septique chronique (*Chronique Granulomatous Diseases, CGD*) ou encore le syndrome d'insuffisance d'adhérence de leucocyte. Ces pathologies sont en particulier caractérisées par une prédisposition et une susceptibilité accrue aux infections bactériennes et fongiques. Cependant, la forte capacité destructive des PN soulève également leur potentiel à endommager les tissus sains environnants, ce qui se produit dans de nombreuses maladies inflammatoires telles que l'emphysème pulmonaire, certaines maladies inflammatoires intestinales, la polyarthrite rhumatoïde (Summers *et coll.*, 2010) ou encore dans les stades précoces de la cirrhose alcoolique (Ramaiah *et coll.*, 2007).

Ainsi, les activités de défense des PN constituent des outils très efficaces dans la lutte anti infectieuse mais peuvent avoir des effets délétères dans certaines situations. Ces effets paradoxaux des neutrophiles soulignent par ailleurs les difficultés de mettre en place des stratégies de contrôle pharmacologique de leurs activités inappropriées, d'autant qu'elles diffèrent fortement selon la localisation des PN, dans le sang ou dans les tissus.

## **I.1. Génération et homéostasie des neutrophiles**

Comme tous les autres leucocytes, le PN dérive d'une cellule souche hématopoïétique (*Hematopoietic Stem Cell*) CD34<sup>+</sup> dans les cordons hématopoïétiques des sinus veineux de la moelle osseuse (Pruchniak *et coll.*, 2013; Summers *et coll.*, 2010). La cellule souche hématopoïétique se différencie en un précurseur hématopoïétique pluripotent nommé HPP-CFC (*High proliferative Potential-Colony Forming Cell*) qui représente moins de 0,1% des cellules. Cette cellule souche donne naissance à une cellule souche myéloïde puis aux progéniteurs des granulocytes et des monocytes-macrophages (GM-CFC), étape suivie de la formation du progéniteur direct des polynucléaires (G-CFC). Chacune de ces étapes est régulée et orientée par différentes cytokines (IL-3, GM-CSF, G-CSF, IL1 et IL6) (Manz *et Broettcher*, 2014). Au cours de leur différenciation, les cellules deviennent plus volumineuses et perdent leur capacité de division rapide et donnent à la fin de leur maturation une cellule renfermant un noyau polylobé et de différents types de granules cytoplasmiques, qui est le PN (**Schéma 1**) (Lakshman *et Finn*, 2001). Cette production des PN est largement régulée par le taux des PN apoptotiques dans les tissus (Borregaard, 2010). Lorsque les macrophages et les cellules dendritiques phagocytent les PN apoptotiques, leur production en IL-23 diminue (Von Vietinghoff *et Ley*, 2009). L'IL-23 stimule la production de l'IL-17A par les cellules T spécialisées désignées collectivement sous le nom de cellules T régulatrices du PN, principalement localisées dans les ganglions lymphatiques mésentériques (Ley *et coll.*, 2006). L'IL-17A est également un important stimulateur de la production du G-CSF (Schwarzenberger *et coll.*, 2000). Ainsi la production du G-CSF est réduite lorsque le nombre de PN dans les tissus augmente, et une augmentation de G-CSF stimule la granulopoïèse (Borregaard, 2010).

Chez l'homme, les PN représentent 50 à 70% des leucocytes circulants. Ils sont générés à un taux de 10<sup>11</sup> par jour, et pouvant augmenter jusqu'à 10<sup>12</sup> par jour durant une infection bactérienne, ce qui explique le fait que 55% à 60% de la moelle osseuse est dédiée à leur production (Mayadas *et coll.*, 2014).



**Schéma 1. Origine et devenir du neutrophile.** PM: Promyélocyte; MY: Myélocyte; PMN: Polymorphonucéaire neutrophile mature; az.GPs: protéines des granules azurophiles; spe.GPs: protéines des granules spécifiques ; gel.GPs : protéines des granules à gélatinase (Theilgaard-Mönch *et coll.*, 2006).

Dans les conditions homéostatiques, les PN matures restent dans la moelle osseuse pendant 5 jours avant d'être libérés dans la circulation. Après avoir circulé 6 à 8 heures, où ils peuvent être activés par de différents stimuli, les PN migrent vers les tissus périphériques où ils peuvent survivre 5 à 6 jours, notamment dans les ganglions (Janeway *et coll.*, 2001; Chtanova *et coll.*, 2008). Les PN entrent ensuite en apoptose et sont phagocytés et détruits par les macrophages.

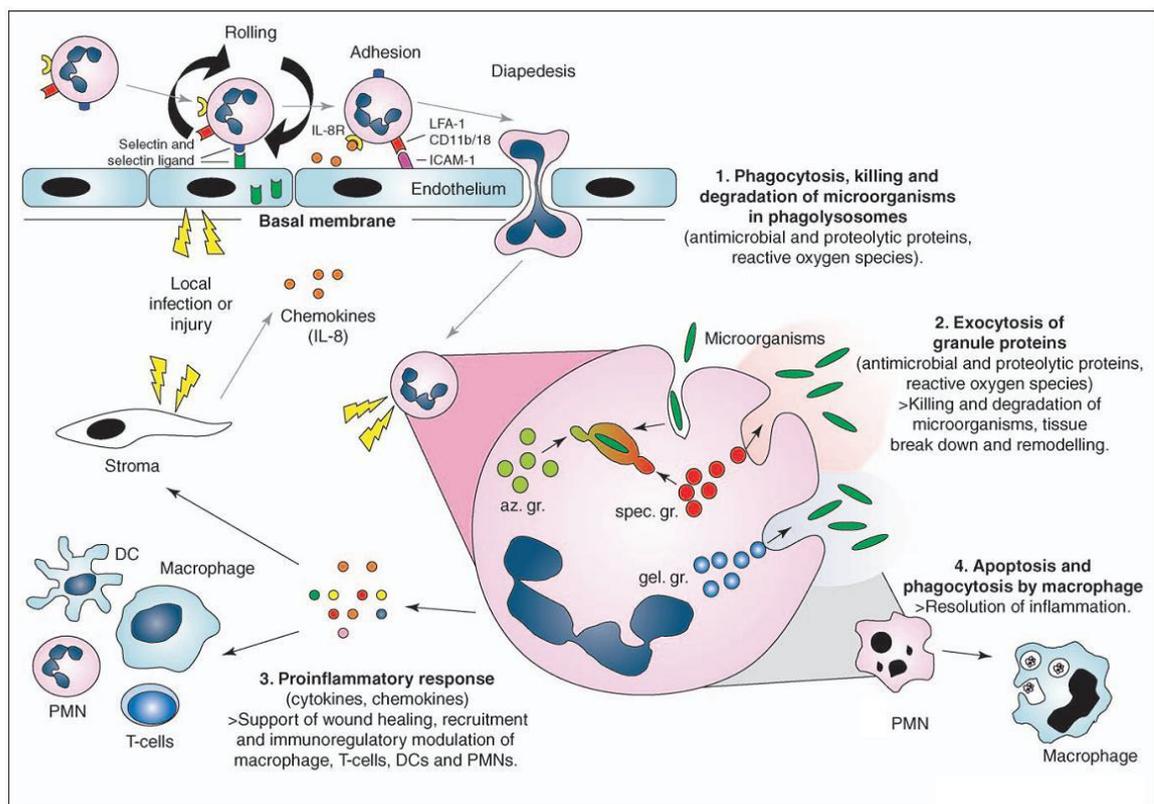
## I.2. Principales activités de défense du neutrophile

Le PN joue un rôle important dans la première ligne cellulaire de défense de l'organisme contre les microorganismes agresseurs. La fonction microbicide des PN au cours de la réaction inflammatoire est un processus complexe qui implique la concertation et la coordination de nombreuses réponses hautement efficaces et finement régulées.

### I.2.1. Chimiotactisme et migration

Au cours de la phase précoce de l'inflammation, les PN circulants répondent aux différents médiateurs pro-inflammatoires (C5a, PAF, LTB<sub>4</sub>, Il-8, TNF<sub>α</sub>...etc.) ce qui aboutit à leur activation et leur marginalisation vers les parois des vaisseaux sanguins périphériques (Liu *et coll.*, 2003). Au niveau de la paroi interne des vaisseaux, les PN établissent des interactions avec les cellules endothéliales activées, ce qui entraîne leur roulement, leur adhésion ferme aux parois, le changement de leur morphologie puis leur diapédèse vers l'espace extravasculaire (**Schéma 2**)

(Seely *et coll.*, 2003). Ces interactions sont facilitées par de nombreuses molécules d'adhésion exprimées à la surface du PN (L-selectines, PECAM et les intégrines) ainsi qu'à la membrane des cellules endothéliales (E-selectines et ICAM) (Wagner *et Roth*, 2000). Une fois dans l'espace extravasculaire, les PN sont soumis aux propriétés chimiotactiques de faibles concentrations d'attractants (**Tableau 1**), ce qui favorise leur mouvement vers les foyers inflammatoires. Les travaux *in vitro* montrent que les PN migrent suivant un gradient créé par des concentrations croissantes du chimioattractant (Liu *et coll.*, 2003). Cependant, lorsque les concentrations de chimioattractants tels que le fMLP augmentent fortement, elles paralysent la migration des PN (Périanin *et coll.*, 1982) tout en stimulant fortement la production d'oxydants (Snyderman *et Pike*, 1984). Ces données suggèrent que les fortes concentrations d'attractants retiendraient les PN dans les foyers inflammatoires et faciliteraient la destruction des bactéries. Les substances chimiotactiques sont reconnues à la membrane plasmique des PN par des récepteurs spécifiques couplés à une protéine G, qui sont distribués à la surface des PN activés de façon à polariser les cellules dans le sens du gradient (Witko-Sarsat *et coll.*, 2000).



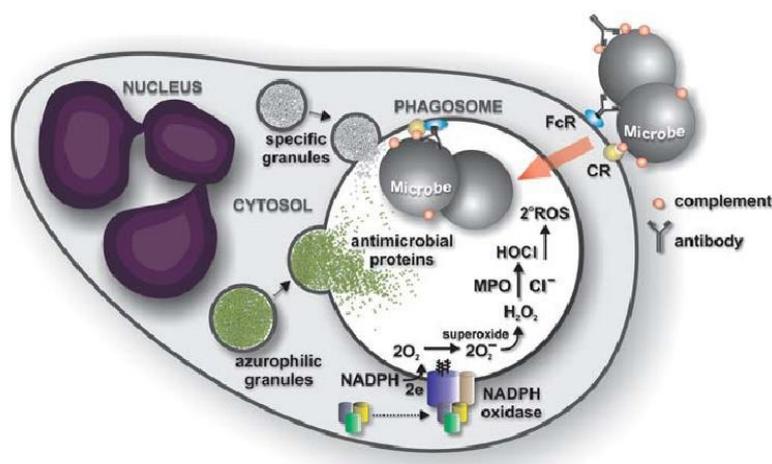
**Schéma 2. Fonction bactéricide du neutrophile au cours de la réponse immunitaire innée.** *az. Gr* : granules azurophiles. *DC* : Cellules dendritiques; *gel. gr.*, granules à gélatinase. *ICAM-1* : molécule d'adhésion intercellulaire 1; *LFA-1* : Leukocyte function associated molecule 1; *spec. gr.* : granules spécifiques (Theilgaard-Mönch *et coll.*, 2006).

**Tableau 1. Principaux chimioattractants du neutrophile humain** (Seely *et coll.*, 2003)

<i>Spécifiques</i>	<i>Non spécifiques</i>
Interleukine-8	Complement fragment C5a
Granulocyte Chemotactic Protein (GCP)-2	f-Met-Leu-Phe (fMLP)
Endothelial cell-derived neutrophil attractant (ENA)-78	Tumor Necrosis Factor (TNF)
Neutrophil-Activated Peptide (NAP)-2	Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-1,-2,-3,-4
Growth-Related Oncogene (GRO)- $\alpha$ ,- $\beta$ ,- $\gamma$	Macrophage Chemotactic and Activating Factor (MCAF)
Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1,-2	Platelet Activating Factor (PAF)
Platelet Factor (PF)-4	RANTES
Mast cell-derived chemotactic factor	Casein
5-Hydroxy Eicosatetraenoic acid (5-HETE)	Leukotriene-B <sub>4</sub> (LTB <sub>4</sub> )

### I.2.2. Phagocytose

Arrivés au site d'infection, les PN reconnaissent les bactéries et procèdent à leur destruction principalement via leur phagocytose, un moyen d'optimiser leur élimination. La membrane du PN développe des projections qui entourent les microorganismes et les internalisent dans des vacuoles, processus facilités par l'opsonisation des microorganismes essentiellement par le fragment C3b du complément et les immunoglobulines de la classe G et M (Seely *et coll.*, 2003). Les particules opsonisées s'attachent passivement aux PN via des interactions entre les opsonines et leurs récepteurs leucocytaires (CR3 et FC $\gamma$ R) qui contrôlent les processus d'invagination initié au niveau de la zone de contact établi avec le pathogène qui finit par être complètement internalisé dans un phagosome pour y être détruit via différents mécanismes (Schéma 3) (Roos *et Van Bruggen*, 2000).



**Schéma 3. Phagocytose d'agents pathogènes par les PN et activation des fonctions bactéricides**

(Kobayashi *et coll.*, 2005).

### I.2.3. Dégranulation du neutrophile

La destruction de microorganismes phagocytés par les PN est accélérée par la libération de nombreuses enzymes lytiques au cours de la dégranulation (Lakchmann *et* Finn, 2001). Le PN est équipé de quatre types de granules intracellulaires (détaillées ci-après) qui renferment des substances hautement microbicides, protéines et enzymes lytiques telles que les protéases, les matrice-métalloprotéinases et la myéloperoxydase (MPO) (Borregaard *et* Cowland, 1997). La fusion des granules intracellulaires avec le phagosome permet de l'enrichir avec de nombreuses substances protéolytiques nécessaires pour la destruction des pathogènes (Seely *et coll.*, 2003). Ces enzymes lytiques peuvent également être libérées dans l'espace extracellulaire où elles peuvent causer de graves lésions tissulaires, conduisant dans certains cas à des pathologies inflammatoires chroniques (Schéma 2).

#### I.2.3.1. Granulogénèse

La granulogénèse (appelée également granulopoïèse) est un processus important dans la génération des PN. La formation des différentes granules apparaît pendant la différenciation du PN, elle prend place quand les vésicules immatures de transport qui dérivent de l'appareil de Golgi fusionnent entre elles. Les différentes granulations sont formées séquentiellement au cours de la différenciation myéloïde (Schéma 4) (Borregaard *et* Cowland, 1997; Faurischou *et* Borregaard, 2003).

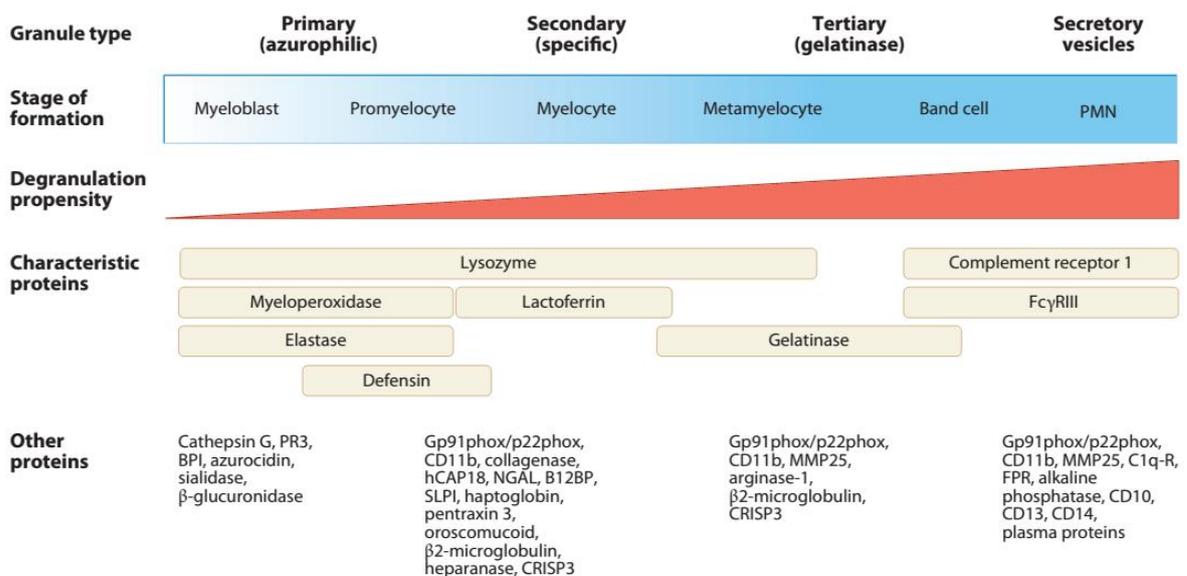


Schéma 4. Schéma de la granulogénèse au cours de la maturation des PN (Amulic *et coll.*, 2012). (Une liste plus complète des constituants granulaires est proposée dans le Tableau 2).

Toutes les granules partagent entre elles certaines caractéristiques structurales communes. Cependant, des différences importantes existent entre elles à propos de leur taille, leur contenu et les types de protéines stockées. Il paraît en fait qu'il n'y a pas d'adressage individuel des protéines vers chaque type de granules mais elles s'accumulent au moment de leur synthèse dans le type de granules en cours de formation ; c'est le mécanisme de ciblage dans le temps (targeting-by-timing). L'extraordinaire hétérogénéité des granules de PN est ainsi expliquée par une expression affinée et hautement réglementée individuellement des gènes des protéines des granules, médiée par des combinaisons de facteurs de transcription myéloïdes qui, comme les protéines granulaires, sont exprimés à des stades spécifiques du développement des PN (Faurischou *et* Borregaard, 2003). Ainsi, les granules formées précocement dans le PN ont été initialement définies par leur teneur élevée en myéloperoxydase (MPO) et par conséquent nommées "granules peroxydase-positives", mais elles sont également appelées "granules azurophiles" en raison de leur affinité pour le colorant basique azure A, ou tout simplement désignées "granules primaires". La production de la MPO cesse à la transition promyélocyte/ myélocyte. En conséquence, les granules formées à des étapes ultérieures sont peroxydase-négatives. Les granules de peroxydase-négatives peuvent être subdivisés en "Spécifiques" (secondaire) et "gélatinases" (tertiaires), en fonction de leur temps d'apparition et le contenu en protéines de la matrice. Les granules spécifiques sont formées dans le myélocyte et le métamyélocyte et ont une teneur élevée en lactoferrine mais une faible teneur en gélatinase, tandis que les granules à gélatinase sont formées dans les cellules bandées et les PN segmentés et sont pauvres en lactoferrine, mais riches en gélatinase. Les vésicules sécrétoires, comme les granules, sont des vésicules d'exocytose régulée qui apparaissent dans le neutrophile segmenté, mais le fait que ces vésicules contiennent des protéines plasmatiques suggère qu'elles sont formées par endocytose dans le PN mature.

Au cours de l'activation des PN, ces différentes granules sont mobilisées pour déverser leur contenu soit dans les phagosomes, soit dans le milieu extracellulaire. L'exocytose des granules conduit à la libération des protéines matricielles stockées, et la translocation de protéines des membranes granulaires vers la membrane plasmique. Ces deux processus ont une grande importance dans la régulation de la fonction défensive du PN (Ligeti *et* Mócsai, 1999).

### **I.2.3.2. Différentes granulations du neutrophile**

Quatre types de granules/vésicules sont présents dans le cytoplasme du PN quiescent : granules azurophiles, granules spécifiques, granules à gélatinases et vésicules sécrétoires. Ces granules diffèrent les unes des autres non seulement par leur contenu intragranulaire mais aussi par les marqueurs exprimés sur leur membrane ainsi que par leur taille.

### **a. Granules azurophiles (primaires)**

Les granules azurophiles ou primaires sont les premières granules formées au cours de la différenciation du PN. Elles apparaissent très tôt dans le stade promyélocyte mais leur nombre décroît avec la maturation des PN (Gullberg *et coll.*, 1997 ; Witko-Sarsat *et coll.*, 2000) mais pouvant atteindre environ 1500 granules /PN, soit environ le 1/3 des granules du PN. Elles ont une forte affinité pour les colorants azures d'où elles tiennent leur nom. Elles sont reconnaissables en raison de leur couleur rouge-violet dans les préparations au colorant Wright-Giemsa (Mollinedo, 2003). Les granules azurophiles ont une petite taille avec une certaine hétérogénéité (0,5-0,8  $\mu\text{m}$ ), de forme allongée et qui sont très denses en microscopie électronique. Cette hétérogénéité peut être due au « packaging » avec un contenu qui varie avec le temps au cours de leur formation et les changements au sein des granules remplies après formation (Faurischou *et Borregaard*, 2003). Ainsi, les granules azurophiles peuvent être subdivisées en deux sous-populations : Les granules azurophiles précoces (pauvres en défensine) qui apparaissent au début du stade de promyélocytaire et les tardives (riches en défensine) qui se forment durant la transition promyélocyte/myélocyte (Arnljots *et coll.*, 1998).

Les azurophiles expriment à leur membrane la granulophysine (CD63) comme le lysosome, mais contrairement à celui-ci elles n'expriment pas le LAMP-1 et LAMP-2 (*Lysosome associated membrane proteins 1 and 2*). En plus de CD63, les seules protéines membranaires identifiées dans les granules azurophiles jusqu'à présent sont CD68, préséniline 1, stomatine et un type vacuolaire  $\text{H}^+$ -ATPase (Faurischou *et Borregaard*, 2003). Les granules azurophiles sont des peroxydase-positives caractérisées principalement par leur haute teneur en myéloperoxydase (MPO), une peroxydase hémoprotéique qui utilise le  $\text{H}_2\text{O}_2$  comme substrat pour générer d'autres dérivés microbicides et pro-oxydants encore plus toxiques. En plus de la MPO, les granules azurophiles renferment également de nombreuses hydrolases acides, des substances bactéricides et d'enzymes lytiques (Borregaard *et Cowland*, 1997 ; Faurischou *et coll.*, 2002). Les sérines protéases constituent une partie importante des protéases contenues dans les granules azurophiles. Trois sérines protéases neutres appelées Serprocidines (la protéinase-3, la cathepsine G et l'élastase) et qui présentent une forte activité microbicide, ont été identifiées (Sinha *et coll.*, 1987 ; Campanelli *et coll.*, 1990). Les granules azurophiles contiennent également des protéines non membranaires qui ont une action anti-microbienne directe. Il s'agit notamment de la famille des défensines ( $\alpha$ -Défensines), la protéine BPI (*bactericidal/permeability-increasing protein*) et l'azurocidine (Nauseef, 2007).

Les azurophiles sont les granulations les plus difficiles à mobiliser dans les PN, comme nous le montrons dans notre étude expérimentale. Leur disponibilité à la dégranulation est faible, et elles subissent une exocytose limitée en réponse à la stimulation du PN par des agents pro-

inflammatoires qui par ailleurs stimulent relativement fortement l'explosion oxydative (Sengelov *et coll.*, 1993). Il semblerait que ces granules contribuent principalement à la destruction et à la dégradation des microorganismes qui a lieu au niveau du phagolysosome (Faurischou *et Borregaard*, 2003 ; Nauseef, 2007).

#### **b. Granules spécifiques (secondaires)**

Elles sont formées au stade myélocyte, métamyélocyte et les PN segmentés (Ligeti *et Mócsai*, 1999; Faurischou *et Borregaard*, 2003). Elles sont sphériques et de petite taille (0,2  $\mu\text{m}$ ) comparativement aux granules primaires (0,5-0,8  $\mu\text{m}$ ) et de couleur brun foncé. Elles constituent avec les granules tertiaires (à gélatinase) le groupe de granules peroxydase-négatives. Cependant, les granules spécifiques et à gélatinase diffèrent considérablement les unes des autres par rapport à leur teneur en protéines et aux propriétés sécrétoires. Ainsi, alors que les granules spécifiques plus grandes sont riches en substances antibiotiques, les granules à gélatinase les plus petites ne le sont pas, mais plutôt riches en métalloprotéinases (Faurischou *et Borregaard*, 2003).

Un des marqueurs les plus importants des membranes des granules spécifiques est le *Cytochrome b<sub>558</sub>*, qui représente le cœur catalytique du complexe générateur du superoxyde, la NADPH oxydase. Les membranes des granules spécifiques renferment aussi des molécules d'adhésion comme les  $\beta$ 2-intégrines (CD11b/CD18), des récepteurs pour les éléments de la matrice extracellulaire (Fibronectin-R, Laminin-R, vitronectin-R), et pour certains chimioattractants comme le fPR, le récepteur des peptides bactériens formyl-Methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP). Les granules spécifiques constituent également un réservoir de molécules et substances antibiotiques et microbicides dont la lactoferrine est la plus abondante de ces granules (Faurischou *et Borregaard*, 2003). Les granules spécifiques renferment également trois autres molécules potentiellement microbicides : la lipocaline (*Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*, *NGAL*), *hCAP-18* (*Human Cathelicidin Antimicrobial Protein*) et le lysozyme (Borregaard, 2007).

Les granules spécifiques contiennent également une famille importante d'enzymes lytiques, les métalloprotéinases nommées MMP (*Matrix Metalloproteinase*). Ces métalloprotéinases sont séquestrées dans les granules spécifiques sous forme inactive et subissent une activation protéolytique après exocytose. Les plus importantes des MMP des granules spécifiques sont la collagénase (MMP-8) et les leukolysines (MMP-25). Ces protéases sont capables de dégrader la majorité des constituants de la matrice extracellulaire comme les collagènes, les fibronectines et les laminines. Elles joueraient donc un rôle essentiel dans la dégradation de la membrane basale de la paroi vasculaire ainsi que des structures interstitielles lors de l'extravasation et la migration du PN (Borregaard, 2007), comme elles seraient impliquées

dans certaines pathologies (Chistiakov, 2015). Les granulations spécifiques sont mobilisées plus rapidement que les granules azurophiles au cours de l'exocytose (Faurischou *et* Borregaard, 2003).

### ***c. Granules à gélatinase (tertiaires)***

Ces granules sont moins bien caractérisées que les deux précédentes. Elles apparaissent parallèlement aux granules spécifiques à partir du stade métamyélocyte, et par conséquent elles sont peroxydase-négatives, mais contrairement à ces dernières elles sont de petite taille et peu visibles au microscope optique. Ces granules sont très riches en gélatinase ou matrice métalloprotéinase-9 (MMP-9) d'où leur appellation, comme elles comprennent d'autres métalloprotéinases (collagénases *et* leukolysines). Comme les granules spécifiques, les granules à gélatinase renferment également dans leur membrane des molécules d'adhésion comme les  $\beta$ 2-intégrines (CD11b/CD18), le récepteur fPR ainsi que le cytochrome b558 (Faurischou *et* Borregaard, 2003). Les granules à gélatinase jouent un rôle essentiel dans la diapédèse des PN puisqu'elles sont riches en protéines dégradant la matrice interstitielle. En effet, le collagène de type IV, constituant majeur de la membrane basale de la paroi vasculaire, ainsi que le collagène de type V du tissu interstitiel sont des substrats de la gélatinase (Borregaard *et* Cowland, 1997 ; Chistiakov, 2015). Ces métalloprotéinases interviennent ainsi aux étapes de migration tissulaire au cours du recrutement des PN. En terme de dégranulation, les granules à gélatinase sont les plus aisément mobilisables par rapport aux azurophiles et aux spécifiques (Faurischou *et* Borregaard, 2003 ; Borregaard, 2010).

### ***d. Vésicules sécrétoires***

Les vésicules sécrétoires sont les dernières granules formées dans les PN, et apparaissent au cours de la maturation finale du PN. Elles pourraient être d'origine endocytaire parce qu'elles contiennent des protéines de plasma telles que l'albumine qui sert de marqueur pour ces vésicules (Borregaard *et* Cowland, 1997). Ces vésicules constituent un réservoir des récepteurs associés à la membrane et qui sont nécessaires à la phase précoce de la réponse inflammatoire gouvernée par les PN (Faurischou *et* Borregaard, 2003). Les vésicules sécrétoires sont les granules les plus mobilisées dans le PN, mais elles ne font pas une partie des vésicules constitutives d'endocytose/exocytose. Une fois mobilisées, les vésicules sécrétoires ne sont plus reformées que soit *in vitro* ou *in vivo* (Ligeti *et* Mócsai, 1999).

Lorsque les PN sont stimulés par des agents pro-inflammatoires, ils déversent le contenu des granules dans le milieu extracellulaire et/ou dans les phagolysosomes, tout en enrichissant la membrane plasmique des PN en récepteurs divers. Certains composants des granules (myéloperoxydase, élastase) se fixent à la surface des cellules et agents pathogènes où ils exercent leurs activités. Cette dégranulation permet ainsi une décompartmentalisation rapide des

contenus granulaires qui vont réguler les fonctions physiopathologiques du PN. Le **Tableau 2** résume les principaux constituants intragranulaires et membranaires de chaque type de granule.

**Tableau 2. Constituants essentiels des différentes granules du neutrophile humain.**

(adapté à partir Faurischou *et* Borregaard, 2003 et Borregaard *et coll.*, 2007).

<i>Granules</i>	<i>Matrice granulaire</i>	<i>Membrane</i>
<i>Azurophiles</i>	Acide $\beta$ -glycerophosphatase, Acide mucopolysaccharide, $\alpha_1$ -Antitrypsine, $\alpha$ -Mannosidase, Azurocidine, BP1, $\beta$ -Glycerophosphatase, Cathepsines, Defensines, Elastase, Lysozyme, MPO, N-acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase, Protéinase-3, Sialidase, Ubiquitin-protein	CD63, CD68, Presenilin 1, Stomatin
<i>spécifiques</i>	$\beta_2$ -Microglobuline, Collagénase, CRISP-3(SGP28), Gélatinase, hCAP-18, Histaminase, Heparanase, Lactoferrine Lysozyme, NGAL, uPA, Sialidase, Transcobalamine-1	CD11b/CD18, CD15, CD66, CD67 Cytochrome $b_{558}$ , fPR, Récepteur de fibronectine, Sous-unité $\alpha$ de la protéine G, Récepteur de laminine, Leukolysine, L'antigène NB1, Protéine 19 KDa, Protéine 155KDa, RAP1, RAP 2, SCAMP, SNAP-23/-25, VAMP-2, Récepteur de thrombospondine, de TNF et Vitronectine
<i>A gélatinase</i>	Acétyltransférase, $\beta_2$ -Microglobuline, CRISP-3, Gélatinase, Collagénase, Lysozyme,	CD11b/CD18, Cytochrome $b_{558}$ , Arginase, fPR, Leukolysine, NRAMP-1, SNAP-23/-25, Récepteur de l'uPA, $H^+$ -ATPase-V
<i>V. sécrétoires</i>	Protéines plasmatiques	Phosphatase alcaline, CD11b/CD18 CD13, fPR, CD14, CD16, CR1, Récepteur C1a, Cytochrome $b_{558}$ , DAF (Decay-Accelerating factor), Leukolysine, VAMP-2

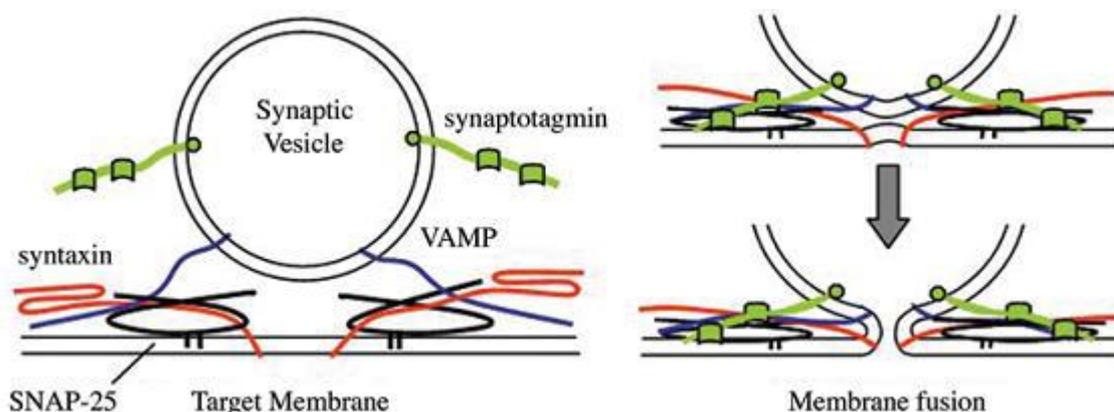
### I.2.3.3. Mécanisme de dégranulation du neutrophile

La mobilisation des différentes granules dans les PN stimulés montre des différences quantitatives et temporelles suggérant qu'elle est régulée différemment au point de vue biochimique. La cinétique de libération des granules leucocytaires reflète une hiérarchie stricte de mobilisation aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Ainsi, les vésicules sécrétoires sont les plus rapidement libérées, suivi des granules à gélatinase tandis que la libération des granules spécifiques se fait plus lentement (Ligeti *et* Mócsai, 1999 ; Faurischou *et* Borregaard, 2003 ; Lacy, 2006). De plus, ces différentes granules sont mobilisées à des moments différents de l'activation du PN et selon des stimulations hiérarchisées qui semblent être ajustées aux rôles que ces différents organites peuvent jouer lors des réponses des PN (Borregaard *et* Cowland, 1997).

La stimulation *in vitro* des PN par des concentrations de l'ordre du nanomolaire des médiateurs inflammatoires tels que le fMLP induit une exocytose rapide et presque complète des vésicules sécrétoires, sans effet significatif sur les autres granules. La stimulation des PN avec

des agonistes plus puissants comme le PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) induit une libération exhaustive des granules à gélatinase, une libération modérée des granules spécifiques, et une faible exocytose des granules azurophiles (Faurischou *et* Boregard, 2003). Cependant, la dégranulation du PN peut être fortement potentialisée par de faibles concentrations d'agents comme la cytochalasine B et D suggérant que le cytosquelette exerce un effet inhibiteur, alors que par ailleurs, elle aide au mouvement des granules vers la membrane dans les cellules stimulées (Lacy, 2006).

L'élévation de la concentration du calcium cytosolique ( $Ca^{2+}$ ) joue un rôle important dans l'induction de l'exocytose des granules dans une variété de cellules (Sengelov *et coll.*, 1993). La dégranulation en réponse au calcium semble, par ailleurs, être biphasique: la première phase de haute affinité au calcium (faible concentration du  $Ca^{2+}$ ) correspond à l'exocytose des granules spécifiques et celles à gélatinase. La seconde phase de faible affinité (forte concentration du  $Ca^{2+}$ ) correspond la sécrétion des granules azurophiles (Sengelov *et coll.*, 1993). Cette différence de sensibilité des diverses populations de granules au  $Ca^{2+}$  peut être liée aux variations de régulation des annexines (I, II, ... XI), un groupe de protéines régulées par le  $Ca^{2+}$  et qui interviennent dans l'agrégation et la fusion des vésicules avec la membrane plasmique (Borregaard *et* Cowland, 1997; Ligeti *et* Mócsai, 1999). En outre, le calcium pourrait favoriser la dégranulation du PN en modulant les interactions des protéines du système moteur de l'exocytose notamment entre les SNAP (*Soluble NSF attachment protein*) et les SNARE (*SNAP receptor proteins*). Les SNARE sont des protéines ubiquitaires et hautement conservées composant la machinerie d'accostage et de fusion de vésicules (Lacy, 2006 ; Snyder *et coll.*, 2006). Chaque vésicule de transport exprime sur sa membrane un v-SNARE (*vesicle Soluble NSF Acceptor Receptor*) qui reconnaît et interagit spécifiquement avec un seul type de t-SNARE (*target SNARE*) présent sur la membrane plasmique (**Schéma5**).



**Schéma 5. Implication des SNARE dans l'exocytose des granules intracellulaire** (Snyder *et Coll.*, 2006)

Le calcium renforce l'interaction v-SNARE-t-SNARE et facilite la fusion des deux membranes. Après la fusion, le recrutement de SNAP et d'une ATPase cytosolique, le NSF (*N-ethylmaleimide Sensitive Factor*), permet l'hydrolyse de l'ATP et entraîne la dissociation du complexe et l'incorporation de la membrane de granule dans la membrane de la cellule (Chen *et Scheller*, 2001). Dans le PN, les protéines t-SNARE, syntaxine-4 et 6 sont détectées exclusivement dans la membrane plasmique; alors que les v-SNARE, VAMP-2 (*Vesicle Associated Membrane Protein*) et SCAMP (*Secretory Carrier Membrane Protein*) sont présentes au niveau de la membrane des vésicules sécrétoires, les granules à gélatinase et les granules spécifiques. Les SNAP-23 et -25 (*Synaptosome Associated Protein 23 et 25*) sont trouvés principalement au niveau des membranes des granules peroxydase-négatives (Martin-Martin *et coll.*, 2000; Faurschou *et Borregaard*, 2003).

En plus des protéines SNARE, d'autres protéines accessoires et régulatrices sont nécessaires pour un contrôle efficace de l'exocytose des granules du PN. Ainsi, la synaptotagmine II a été proposé pour jouer un rôle comme un possible détecteur de calcium dans l'exocytose des PN. La régulation de la dégranulation pourrait également inclure des membres de la famille Sec1/Munc18 (SM) qui sont essentiels dans la régulation des différentes étapes de trafic intracellulaire. Plus précisément, il a été montré que les isoformes Munc18-1, Munc18-2 et Munc18-3 jouent un rôle majeur dans la régulation de l'exocytose dans divers tissus et types de cellules. Les mécanismes d'action précis de ces protéines sont encore méconnus. Cependant, des travaux récents ont montré qu'elles peuvent interagir de plusieurs façons avec leurs partenaires SNARE et que chacun de ces modes de liaison peut correspondre à une tâche spécifique dans la régulation de l'assemblage et de la fusion des complexes SNARE. Leur propriété essentielle est d'activer sélectivement un complexe SNARE par l'interaction avec des complexes SNARE préassemblés comme démontré pour Munc18-1 dans de nombreuses cellules. La fonction appropriée des protéines Munc18 peut également impliquer des mécanismes de régulation supplémentaires et des protéines telles que Munc13 et Rab (Logan *et Odemuyiwa*, 2003 ; Brochetta *et coll.*, 2008). L'exocytose nécessite également la liaison de GTP à des molécules effectrices intracellulaires impliquées dans la machinerie de dégranulation. Ceci suggère que les protéines de liaison au GTP, y compris guanosine triphosphatases (GTPases), peuvent être impliquées dans la dégranulation. Les données actuelles sont en faveur de l'implication du Rac2, un membre de superfamille de Ras-GTPases, dans la dégranulation des PN notamment celle des azurophiles. Cependant, son homologue le Rac1 participent plutôt à l'activation de la NADPH oxydase et la production du superoxyde (Lacy, 2006). Un autre membre de la famille des Ras-GTPase, qui est proposé pour jouer un rôle important dans la dégranulation, est la protéine Rab27 (Johnson *et coll.*, 2010). Ceci est démontré dans des souris déficientes (*knock-out*) pour le Rab27

qui montrent une sévère défaillance de l'exocytose des granulations azurophiles. Dans le PN, l'implication de Rab27 est coordonnée par deux effecteurs, une protéine Synaptotagmine-Like et le Munc13 (Catz, 2014). Cependant, le rôle exact de Rab27 dans la mobilisation des granules intracellulaires est encore à élucider (Johnson *et coll.* 2010 ; Catz, 2014).

La phosphorylation des différents partenaires d'exocytose constitue un autre mécanisme majeur de régulation de la dégranulation. Cette phosphorylation concerne aussi bien les protéines SNAP-SNARE, pièces charnières de la machinerie de dégranulation, que leur protéine accessoires. La protéine Kinase C (PKC) est la première kinase identifiée pour phosphoryler les différents partenaires de la machinerie d'exocytose. La PKC phosphoryle les deux constituants majeurs des SNARE, les Syntaxines et les SNAP (23 et 25) (Lacy, 2006 ; Snyder *et coll.*, 2006). Elle pourrait également phosphoryler les autres protéines régulatrices telles que le Munc-18, la synaptotagmine, et le NSF. Outre la PKC qui comporte une douzaine d'isoformes dont le rôle respectif reste non explorée, la protéine kinase A (PKA) et la calmodulin-dependent Kinase (CdK) ont également été rapportées pour phosphoryler certains partenaires de la machinerie d'exocytose (Snyder *et coll.*, 2006). D'autres effecteurs de la signalisation tels que les tyrosine Kinases et les MAP-Kinases sont également soupçonnées pour avoir un rôle dans la phosphorylation des protéines régulant l'exocytose. Cependant, leur contribution respective reste peu étudiée de même que la sensibilité de l'exocytose aux atteintes pathologiques (Lacy, 2006).

#### **I.2.3.4. Rôle des granules dans l'activité microbicide du neutrophile**

Les granules des PN constituent de véritables réservoirs de molécules toxiques, microbicides et antibiotiques. La majeure partie de ces molécules est stockée dans les granules azurophiles et spécifiques et représentent l'arsenal microbicide par excellence des PN. De plus, la membrane des granules des PN renferment de nombreuses molécules d'interaction cellulaire ou d'interaction avec les pathogène, qui interviennent effectivement dans la réponse microbicide des PN (Nauseef, 2007 ; Cole *et Nizet*, 2016). Une fois exprimées à la membrane plasmique au cours de la dégranulation et pendant le recrutement des PN au foyer inflammatoire, ces molécules membranaires renforcent ce recrutement et participent à la stimulation ultérieure des PN (Cowland *et Borregaard*, 2010).

Dans le PN stimulés par des agents particulaires, les granules déversent leur contenu principalement dans le phagosome alors qu'une stimulation par des agents solubles entraîne une dégranulation dans le milieu extracellulaire, avec incorporation des membranes granulaires dans la membrane plasmique. La libération des différentes populations de granules est d'une grande importance pour l'activité défensive du PN (Ligeti *et Mócsai*, 1999). Dès les premiers stades de roulements du PN circulant sur l'endothélium, les vésicules sécrétoires sont mobilisées grâce à la

présence du CD11b sur leurs membranes qui permet aux PN activés d'établir des interactions fermes avec l'endothélium. Ces interactions déclenchent également la mobilisation des vésicules sécrétoires des PN qui enrichit la surface du PN avec la  $\beta 2$ -intégrine (CD11b/CD18) ; ceci est accompagné de l'expression de la L-sélectine. Cependant, l'exocytose des vésicules sécrétoires n'est pas associée à une sortie systémique des protéines des granules potentiellement toxiques. La translocation des  $\beta 2$ -intégrines engage des molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM) endothéliales, notamment aux ICAM-1 qui médie l'adhésion ferme et initie la transmigraton des PN. L'exocytose des granules à gélatinase libère les métalloprotéases collagénolytiques, qui jouent probablement un rôle important dans la dégradation de la membrane basale vasculaire pendant l'extravasation (diapédèse) du PN. Au cours de la migration ultérieure des PN à travers les tissus interstitiels, les granules spécifiques et les granules azurophiles subissent une exocytose partielle. Ceci mobilise des récepteurs membranaires pour les composants de la matrice extracellulaire et libère d'autres enzymes lytiques, y compris la collagénase et les sérine protéases, ce qui dégrade encore la matrice extracellulaire qui facilite davantage la migration (Gullberg *et coll.*, 1997 ; Borregaard, 2007 et 2010 ; Cowland *et Borregaard*, 2010). Une fois en contact avec les pathogènes, le PN met en œuvre ses divers mécanismes antimicrobiens oxygène-dépendants et oxygène-indépendants en déversant les granules azurophiles et spécifiques dans le phagosome ou à l'extérieur de la cellule. La diversité fonctionnelle des substances granulaires permet aux PN de cibler les bactéries de différentes manières. Ainsi, certains constituants granulaires (les défensines, BPI, hCAP-18, lactoferrine, lysozyme) exercent une activité antimicrobienne en perturbant les membranes bactériennes, alors que d'autres (NGAL, lactoferrine, Nramp1) interfèrent avec les voies métaboliques dépendant du fer chez les bactéries (Naussef, 2007 ; Borregaard, 2010 ; Cole *et Nizet*, 2016). Cependant, le mécanisme le plus efficace dans la lutte antimicrobienne de PN est sans doute le mécanisme oxygène-dépendant. Ce mécanisme nécessite la coopération de deux enzymes importantes des granules du PN, la NOX2 (granules spécifiques), et la MPO (granules azurophiles) dont les caractéristiques seront détaillées ci-après car elle est l'objet de notre étude expérimentale. La NOX2 est le système générateur du superoxyde  $O_2^{\circ}$ , le précurseur de toute une famille de substances oxygénées hautement oxydantes et très toxiques (FRO), alors que la MPO utilise le  $H_2O_2$  dérivé de la dismutation de l' $O_2^{\circ}$  pour produire le HOCl très toxique dans le système halogène- $H_2O_2$ -MPO-HOCl (Klebanoff, 2005). La membrane des granules spécifiques et tertiaires constitue le réservoir de NOX2 (gp91<sup>phox</sup>) et de fPR qui, une fois dégranulés, vont contribuer à favoriser l'explosion oxydative des PN.

En plus de leur action bactéricide, une caractéristique intéressante de certains constituants granulaires tels que les défensines, azurocidin et hCAP-18 est leur capacité à induire le

chimiotactisme des cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Cette capacité amplifie la réponse inflammatoire et fournit ainsi une connexion intéressante entre les mécanismes immunitaires innés et adaptatifs (Borregaard, 2010).

### **I.2.3.5. La Myéloperoxydase**

#### ***a. Structure et localisation***

La Myéloperoxydase(MPO) est une enzyme hémoglycoprotéique fortement exprimée dans le neutrophile, et qui représente environ 5% du poids sec de la cellule (Klebanoff, 2005 ; Nauseef, 2014). La MPO a une masse moléculaire de 144 kDa et est constituée de deux sous-unités (hétérodimères) identiques liées par un pont disulfure. Chaque sous-unité est composée d'une chaîne polypeptidique lourde (55–64 kDa, 466 acides aminés) et une légère (10–15 kDa, 108 acides aminés) (Lau *et* Baldus, 2006), ainsi qu'un groupe protoporphyrine IX avec un fer central. L'environnement de l'hème est constitué par les deux polypeptides. Les deux groupements héminiques de la MPO sont structurellement et fonctionnellement identiques (Arnhold *et* Flemmig, 2010). La structure secondaire de la MPO est principalement  $\alpha$ -hélicoïdale, chaque sous-unité étant constituée d'un noyau central de 5 hélices et d'un hème. Quatre hélices proviennent de la chaîne lourde et la cinquième de la chaîne légère (Lau *et* Baldus, 2006).

La MPO a été identifiée pour la première fois dans les neutrophiles et fût baptisée Verdoperoxydase à cause de la couleur verte de ses extraits (Klebanoff, 2005). Elle a été, par la suite, localisée également dans les monocytes (~1% des protéines totales) et dans une population de macrophages tissulaires (Nauseef, 2010). Dans les PN, la MPO est synthétisée sous forme d'un précurseur lors de la différenciation myéloïde dans la moelle osseuse, et est stockée dans les granules azurophiles avant que les PN ne rejoignent la circulation (Lau *et* Baldus, 2006). Lors de l'activation et de la dégranulation des PN, la MPO est libérée dans les vacuoles phagocytaires ainsi que dans l'espace extracellulaire.

#### ***b. Activité MPO***

La MPO est une oxydoréductase (EC 1.11.1.7) dotée de deux activités principales ; une activité peroxydase et une activité d'halogénéation (notamment la chloration) qui aboutissent à la formation d'oxydants et des produits radicalaires. La MPO utilise le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et catalyse l'oxydation bi-électronique des ions Cl<sup>-</sup> pour former l'acide hypochloreux (HOCl) dans un système appelé « *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-MPO-HOCl-halide system* »; elle peut aussi utiliser les ions bromures ou iodures pour former les acides hypohalogénés correspondants (Arnhold *et* Flemmig, 2010). Depuis peu, on admet que son activité de chloration produit des espèces intermédiaires hautement réactives comme le Cl<sub>2</sub> ou le chlore à l'état natif (<sup>•</sup>Cl), conduisant à la

formation de dérivés chlorés comme la chlorotyrosine (Sertayn *et coll.*, 2003). De plus, un grand nombre de substrats différents peuvent être oxydés par la MPO en formant des produits radicalaires. Ces substrats comprennent la tyrosine, le tryptophane, sulfhydryles, le phénol et les dérivés d'indole, l'oxyde nitrique et le nitrite (**Tableau 3**) (Arnhold *et Flemmig*, 2010).

**Tableau 3. Substrats et produits de la MPO** (Adapté à partir de Arnhold *et Flemmig*, 2010)

<i>Substrat</i>	<i>Produit</i>
<i>Oxydation a deux électrons</i>	
<b>Chlorure</b>	HOCl
<b>Bromure</b>	HOBr
<b>Thiocyanate</b>	<sup>-</sup> OCSN, <sup>-</sup> OCN
<i>Oxydation à un électron</i>	
<b>Oxyde Nitrique</b>	NO, NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
<b>Nitrite</b>	NO <sub>2</sub>
<b>Tyrosine</b>	Radical Tyrosyl, Dityrosine
<b>Phénols</b>	Radicaux, Dimères, Oligomères

### **c. Rôle de la MPO et de ses produits**

Le rôle et l'importance de la MPO dans la réponse immunitaires du PN sont très souvent discutés. L'absence de complications infectieuses potentiellement mortelles chez certaines personnes présentant un déficit de la MPO est souvent avancée comme preuve que le système de la MPO est accessoire plutôt qu'essentielle pour l'activité antimicrobienne des PN. Cependant, cet argument ne tient pas compte des observations chez l'homme et des souris KO qui démontrent que la réponse antimicrobienne des cellules déficientes en MPO est beaucoup moins efficace que celle des PN normaux (Klebanoff, 2005 ; Nauseef, 2010). Ainsi, l'importance biologique de la MPO est bien illustrée chez des souris « *knock-out* » qui montrent une augmentation des infections par *klebsiella* et *candida*, et une mortalité accrue suite aux infections (Aratani *et coll.*, 2004). Effectivement, la MPO est responsable de la production d'oxydants les plus puissants et les plus toxiques, à savoir le HOCl et les dérivés chlorés, qui participent efficacement à la lutte antimicrobienne au cours des infections (Lau *et Baldus*, 2006 ; Arnhold *et Flemmig*, 2010 ; Nauseef, 2010). La MPO est active sur une grande variété de microorganismes qu'elle attaque par oxydation en différents points et de différentes manières (virus, bactéries, fungi, protozoaires). Son activité bactéricide comprend une étape de fixation sur la membrane bactérienne en de nombreux points où existent des structures polysaccharidiques résistantes aux protéases et hydrolases. Cette liaison permet à la MPO une attaque extracellulaire des microorganismes trop volumineux pour être phagocytés (parasites et fungi). En contact avec les microorganismes, elle produit le HOCl et d'autres espèces capables de chloration et de nitration et qui attaquent une large gamme de molécules: les hèmes, les groupes aminés, les centres Fe-S, les groupes SH, les lipides insaturés et les bases nucléiques. Avec les lipides membranaires, le HOCl forme des amines chlorées et des chlorhydrines et perturbe la perméabilité. En oxydant les

structures héminiques, il altère de nombreuses fonctions enzymatiques, notamment celles de la chaîne respiratoire entraînant la mort bactérienne (Sertayn *et coll.*, 2003).

De nombreuses études ont montré un rôle de la MPO et de ses intermédiaires dans les événements inflammatoires indépendamment de son rôle dans la défense antimicrobienne (Nussbaum *et coll.*, 2013). Les données confirment ainsi l'implication de la MPO dans la modulation des réponses des PN. Ainsi, la MPO peut moduler l'activité des protéines co-libérées dans le phagosomes ou dans le milieu extracellulaire, soit en les activant ou en les réprimant. Par exemple, une plus grande activité de l'élastase, qui est également stockée dans les granules azurophiles, est détectée dans le surnageant des PN provenant de souris « *knock-out* » pour la MPO. Le HOCl produit par la MPO inactivent l'élastase et d'autres enzymes telles que la cathepsine G, la protéinase-3 ou MMP-9 (Arnhold *et Flemmig*, 2010). D'autres données suggèrent que le système H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-MPO-HOCl peut également contribuer à la modulation de l'activité de la NADPH oxydase dans les PMN stimulés. Ainsi, le système H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-MPO-HOCl modifie de manière irréversible des sites sur le flavocytochrome *b558*, changeant ainsi les sites de conformation et/ou de liaison critiques pour l'assemblage de la NOX2 ; ou la modification de p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> ou Rac2 pour les libérer du complexe oxydase (Nauseef, 2001). De plus, il a été montré que le système H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-MPO-halogènes induit l'apoptose via différentes voies. Le NH<sub>2</sub>Cl, comme effecteur en aval de la chloration par le HOCl, exercent des effets pro-apoptotiques dans les PN et les cellules Jurkat par l'activation de c-Jun kinase N-terminale (JNK) et l'inhibition du facteur de transcription NFκB. Le HOCl pourrait aussi induire l'activation des caspases, alors que le HOClN pourrait induire l'apoptose *in vitro* et s'est révélée plus efficace que le HOCl ou l'acide hypobromeux (HOBr) (Nussbaum *et coll.*, 2013). Malgré que les mécanismes ne soient pas encore bien élucidés, il paraît que la MPO intervient dans la modulation des activités des PN et participe ainsi à la résolution de l'inflammation et à la protection des tissus environnant le foyer inflammatoire (Arnhold *et Flemmig*, 2010). Cependant, la MPO via ses produits hautement toxiques pourrait intervenir et contribuer à certaines pathologies, notamment vasculaires et cardiovasculaires (Nussbaum *et coll.*, 2013).

#### **I.2.4. Explosion oxydative du neutrophile**

L'explosion oxydative est l'un des plus importants événements au cours de l'activation du PN. Elle se caractérise par une augmentation rapide de la consommation de l'oxygène du milieu environnant par le PN et une production concomitante de quantités énormes d'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), qui représente le premier précurseur d'autres dérivés de l'O<sub>2</sub> regroupés sous le terme de formes réactives de l'oxygène (FRO) (*Reactive Oxygen Species, ROS*) (Roos, 1991; Babior, 2004). L'importance biologique de l'explosion oxydative dans l'élimination dans la défense anti-

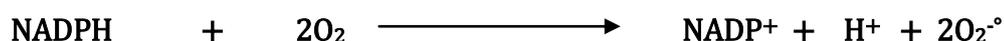
infectieuse, est malheureusement illustrée par une pathologie génétique grave parfois mortelle, la Granulomatose septique chronique (*Chronic Granulomatous Disease*, CGD) caractérisée par une susceptibilité accrue des patients aux infections, et qui résulte de mutations affectant les composants de la NADPH oxydase et entraînant une production de FRO insuffisante voire nulle (Nauseef *et coll.*, 1990; Hampton *et coll.*, 1998; Quinn *et Gauss*, 2004).

Les NADPH oxydases constituent une famille d'oxydases qui comporte à ce jour 7 membres répartis en 2 groupes, les NOX (NOX1 à NOX5) et les DUOX (DUOX1 et DUOX2). Toutes ces NOX sont des protéines transmembranaires qui utilisent des électrons de la NADPH cytosolique via le FAD (*Flavine Adenine Dinucleotide*) et les transportent via ses hèmes pour réduire l'oxygène soit de manière monovalente formant ainsi l'anion superoxyde (NOX1-5) ou bivalente pour former le peroxyde d'hydrogène (DUOX1/2). Cependant, le PN humain exprime un seul type de NOX, c'est la NOX2 qui a été le plus étudié à ce jour (Bedard et Krause, 2007).

#### **I.2.4 1. La NADPH oxydase du neutrophile**

La NADPH oxydase 2 (NOX2) est exprimée dans différents phagocytes (PN, éosinophiles et monocytes/macrophages) et même que dans des cellules non phagocytaires, telles que les cellules endothéliales (Roos, 1991) ou le foie. Dans les PN sanguins, l'activité NOX2 n'est pas détectable dans les conditions de mesures habituelles, indiquant que la NOX2 est « inactive ». Son activité nécessite une stimulation des PN qui provoque une modification de ses partenaires notamment cytosoliques et leur assemblage à la membrane plasmique.

La NOX2 catalyse alors la production d' $O_2^{\circ}$  par réduction monoélectronique de l' $O_2$ , en utilisant comme donneur d'électron le NADPH suivant la réaction :



L'anion superoxyde étant très instable va générer d'autres formes réactives de l'oxygène (FRO) qui seront détaillés, ainsi que leurs effets bactéricides, dans le § **I.2.4.2** Génération des FRO et coopération NOX2-MPO.

##### **a. Organisation de la NOX2**

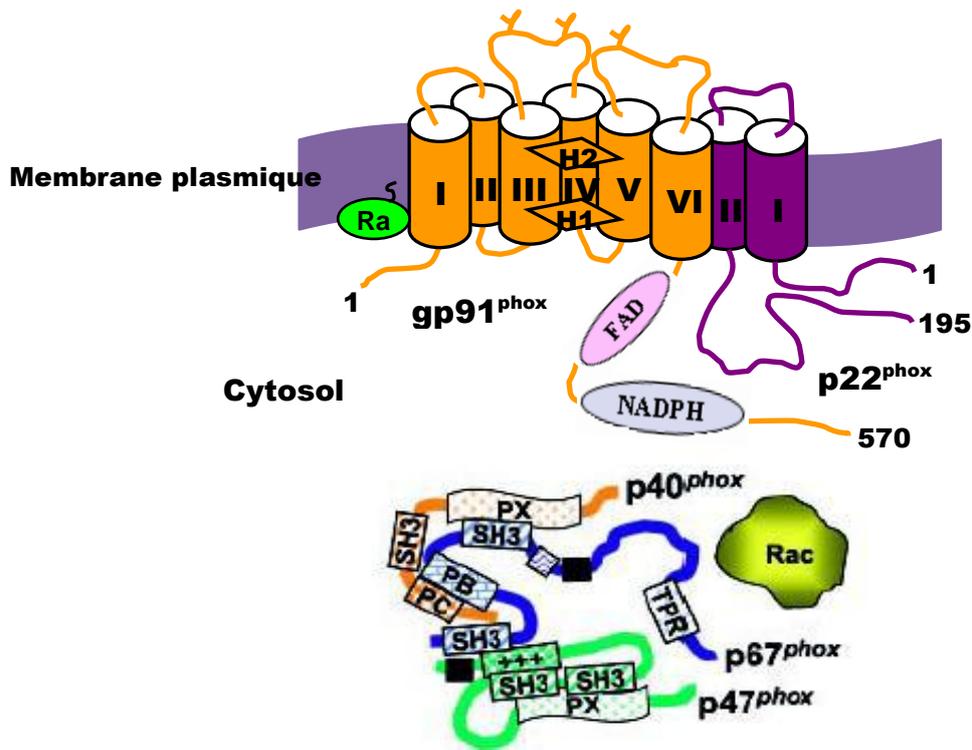
De point de vue structurale, la NOX2 est un complexe constitué d'au moins six composants majeurs dont certains de localisation cytosolique s'associent aux partenaires de la membrane plasmique pour former un complexe actif. La NOX2 des PN est constituée d'une flavohémoprotéine (Cytochrome *b*<sub>558</sub>) présente dans la membrane plasmique et celle des granules spécifiques et tertiaires, et qui joue le rôle du centre redox (El Benna *et coll.*, 1997; Babior,

1999). Le cytochrome  $b_{558}$  est une protéine hétérodimérique constituée de 2 sous-unités, une sous-unité glycosylée de 91 kDa appelée la  $gp91^{phox}$  et une autre plus petite non glycosylée de 22 kDa, la  $p22^{phox}$ , qui s'associe à la  $gp91^{phox}$  de façon non covalente et assure sa stabilité au niveau de la membrane (Sumimoto *et coll.*, 1996; Regier *et coll.*, 2000). Le cytochrome  $b_{558}$  comporte deux hèmes et deux sites pour le FAD et pour le NADPH, possédant ainsi toute la machinerie requise pour le transfert d'électrons du NADPH à l' $O_2$  (Regier *et coll.*, 2000; Quinn *et Gauss*, 2004). La membrane plasmique lie également, une petite GTPase de la famille des Ras, la Rap-1A qui s'associe au cytochrome  $b_{558}$  (**Schéma 6**) (Quinn *et Gauss*, 2004 ; Sheppard *et coll.*, 2005).

Les composants cytosoliques de la NADPH oxydase sont des protéines solubles d'un poids moléculaire de 40, 47 et 67 kDa appelées  $p40^{phox}$ ,  $p47^{phox}$  et  $p67^{phox}$ , respectivement (Clark, 1999). Dans le PN quiescent, ces trois protéines forment un complexe multimérique de taux équimolaires (1:1:1) de  $p40^{phox}$ ,  $p47^{phox}$  et  $p67^{phox}$  (Babior, 1999). Ce complexe est stabilisé, en partie, par des interactions au niveau des domaines SH3 qui sont renforcées par des interactions additionnelles entre le domaine C-terminal riche en proline de la  $p47^{phox}$  et le domaine C-terminal SH3 de la  $p67^{phox}$  (Babior, 2004 ; Quinn *et Gauss*, 2004). En plus des trois protéines cytosoliques, un quatrième facteur s'ajoute, la protéine Rac qui est une petite GTPase de la sous-famille des Rho liée au GDP à l'état inactif (Bokoch *et Diebold*, 2002; Li *et coll.*, 2002 ; Babior, 2004).

### ***b. Assemblage et Activation de la NOX2***

L'activation de la NOX2 nécessite une modification structurale des composants cytosoliques, leur translocation et assemblage au niveau de la membrane plasmique (Dang *et coll.*, 1999). Ainsi dans les PN stimulés, les composants cytosoliques ( $p40^{phox}$ ,  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  et Rac) migrent vers la membrane plasmique, où ils s'associent au flavocytochrome  $b_{558}$  (Sheppard *et coll.*, 2005). La translocation et l'assemblage de la NADPH oxydase nécessite la phosphorylation des différents composants, aussi bien cytosoliques que membranaires, du complexe multimérique (Sumimoto *et coll.*, 1996). Au cours de la stimulation du PN par des agents pro-inflammatoires, une cascade de signalisation prend place au niveau de la membrane plasmique et dans le cytosol, et aboutit à la phosphorylation de nombreux sites disponibles sur les effecteurs cytosoliques de la NADPH oxydase (Sumimoto *et coll.*, 1996; Clark, 1999, Belambri *et coll.*, 2012). Ainsi, La phosphorylation de la  $p47^{phox}$  et de la  $p67^{phox}$  induit un changement conformationnel de ces sous-unités et entraîne leur translocation vers la membrane plasmique où elles s'associent avec les composants du cytochrome  $b_{558}$  ( $gp91^{phox}$  et  $p22^{phox}$ ) phosphorylés à leur tour aussi (Quinn *et Gauss*, 2004 ; Sheppard *et coll.*, 2005).



**Schéman6. Organisation structurale de la NADPH oxydase.** La NADPH oxydase est un complexe enzymatique multiprotéique dont les composants sont répartis entre la membrane plasmique (**gp91<sup>phox</sup>**, **p22<sup>phox</sup>**) et le cytosol (**p47<sup>phox</sup>**, **p67<sup>phox</sup>**, **p40<sup>phox</sup>** et la petite GTPase **Rac**). **H** : centre hème (Adapté à partir de Quinn *et* Gauss, 2004).

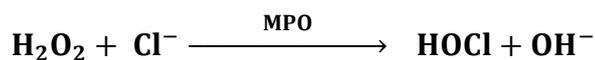
La translocation de p47<sup>phox</sup> est indispensable pour la translocation de la p67<sup>phox</sup> vers la membrane. Ces deux protéines subissent des phosphorylations au niveau des résidus séril, thréonil et tyrosil (El Benna *et coll.*, 1997, Belambri *et coll.*, 2012), alors que la p40<sup>phox</sup> paraît réguler négativement l'activation du complexe oxydase (Quinn *et* Gauss, 2004). La phosphorylation des sous unités cytoplasmiques p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> et la présence du cytochrome b<sub>558</sub> (site d'ancrage pour les composants cytosoliques) à la membrane plasmique sont des évènements indispensables dans le processus de translocation et d'activation de la NADPH oxydase (Babior, 1999). Cependant, les petites GTPases Rac (1/2) et Rap 1A paraissent jouer le rôle de protéines adaptatrices qui facilitent l'association des composants cytosoliques et ceux membranaires de la NADPH oxydase (Quinn *et* Gauss, 2004).

La NADPH oxydase ainsi activée catalyse le transfert d'un seul électron, dans une première étape du NADPH vers le FAD, puis dans une deuxième étape du FAD vers les noyaux hèmes et finalement vers l'oxygène moléculaire pour générer l'anion superoxyde précurseur des autres espèces réactives de l'oxygène (Clark, 1999 ; Quinn *et* Gauss, 2004).

#### I.2.4.2. Génération des FRO et coopération NOX2-MPO

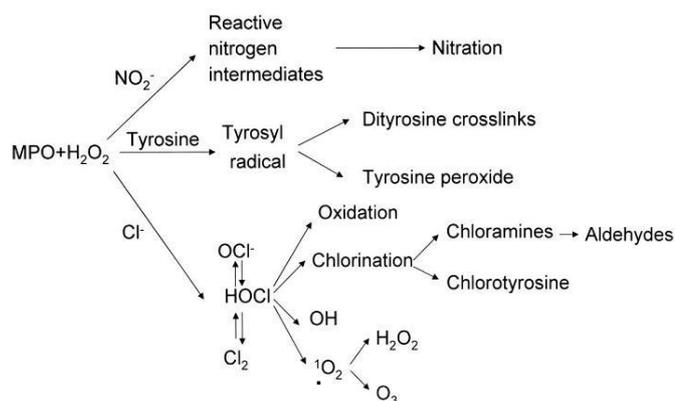
L'anion superoxyde généré par la NOX2 subit une réaction spontanée de dismutation en milieu protoné, ce qui entraîne la génération du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Hampton *et coll.*, 1998). Ce dernier peut réagir avec l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pour former le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) et le singulet d'oxygène (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). La réaction de dismutation est relativement lente, sauf quand elle est catalysée par le fer (Martinez-Cayuela, 1995). *In vitro*, les chélateurs de fer de faible poids moléculaire tel que l'ADP-Fe<sup>3+</sup> permettent d'accélérer cette réaction (Grisham *et Ganger*, 1988), alors que la lactoferrine inhibe cette réaction par captation du fer (Hampton *et coll.*, 1998). Le radical hydroxyle peut être également formé par interaction de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> avec l'acide hypochlorique (HOCl) ou l'oxyde nitrique (NO). Les deux réactions précédentes ne nécessitent pas de métal de transition. L'acide hypochlorique et l'oxyde nitrique sont produits par l'action de la MPO et de la nitrique oxyde synthase, respectivement.

La MPO utilise le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formé durant l'explosion oxydative pour produire de grandes quantités d'acide hypochlorique (HOCl) dans le système *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-MPO-Halogène* (Schéma7) (Klebanoff, 2005).



L'acide hypochloreux ainsi généré réagit rapidement avec les groupements amines pour donner les dérivés chloramines (R-NHCl) qui sont des oxydants très puissants. D'autre part, l'HOCl en réagissant avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, produit l'oxygène singlet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (Hampton *et coll.*, 1998; Droge, 2003). La présence de l'oxyde nitrique dans le milieu peut conduire à la génération des espèces réactives d'azote qui sont très dangereuses et délétères pour les tissus (Hampton *et coll.*, 1998).

Les effets toxiques des FRO peuvent être limités à l'élimination des agents étrangers lorsque que ceux sont confinés dans les phagosomes. Cependant, lorsque la production de FRO est excessive et inappropriée, les FRO peuvent entraîner des dommages tissulaires importants. En effet, la haute réactivité des FRO leur permet d'interagir avec toute sorte de molécules organiques : lipides, protéines, glucides et même avec les acides nucléiques. Ceci entraîne des lésions biochimiques, cellulaires et tissulaires aggravantes dans plusieurs pathologies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde et l'emphysème pulmonaire (Martinez-Cayuela, 1995).

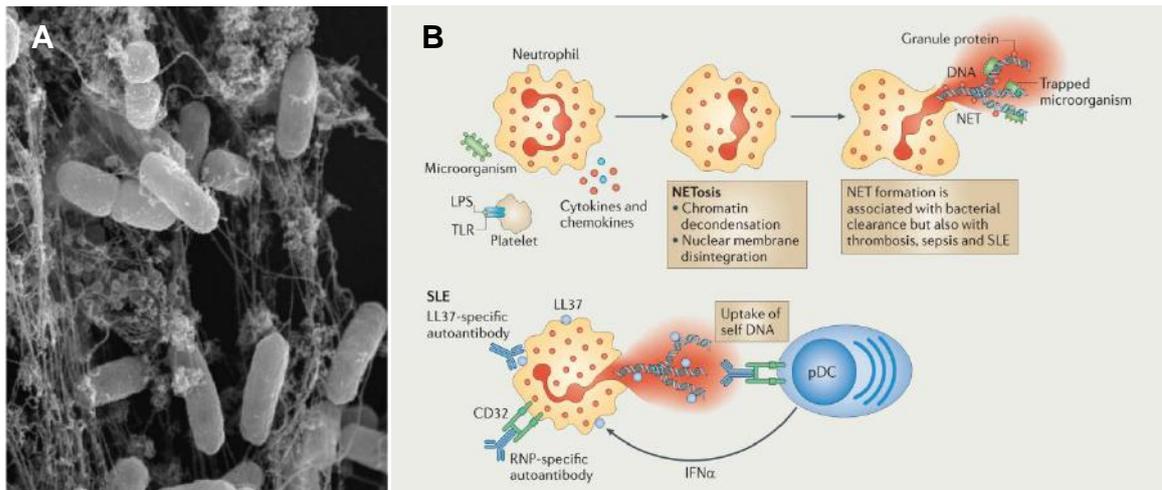


**Schéma 7. Les différentes espèces réactives antimicrobiennes produites par le système MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. NO<sub>2</sub><sup>-</sup> : Dioxyde d'azote; OCl<sup>-</sup> : Hypochlorite; OH<sup>•</sup> : Radical hydroxyle (Klebanoff, 2005)**

### I.2.5. Neutrophil Extracellular Traps (NET)

Un autre processus de lutte antimicrobienne mis en œuvre par le PN a récemment été décrit, l'émission des NET (Neutrophil Extracellulaire Traps). Cette nouvelle fonction du PN (dite aussi NETosis ou NETose) a été décrite pour la première fois par Brinkmann *et coll.* (2004), il s'agit de la libération de structures fibreuses sous forme de réseaux dont les constituants principaux sont l'ADN et certaines protéines des granules intracellulaires du PN, notamment l'élastase et la MPO (Köckritz-Blickwede *et Nizet*, 2009). Les NET ont été initialement décrits comme étant une forme unique de mort cellulaire alternative à l'apoptose et à la nécrose, et qui est caractérisée par la perte des membranes intracellulaires avant que l'intégrité de la membrane plasmique ne soit compromise (Brinkmann *et Zychlinsky*, 2012). Cependant, des travaux plus récents indiquent que les NET ont été également observés avec des cellules vivantes. Les NET jouent le rôle de pièges pour les microorganismes envahisseurs (**Schéma 8**). Ils permettent à la fois la localisation, le piégeage et l'immobilisation des agents pathogènes au sein d'un maillage collant de chromatine et l'exposition de ces agents à des concentrations très élevées de peptides antimicrobiens et des enzymes piégés également dans la chromatine (Mayadas *et coll.*, 2014).

Différents stimuli peuvent conduire à la NETose du PN et à la libération des NET, tels que les microorganismes, les LPS et l'acide lipotéicoïque, les plaquettes activées, les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-8), les peptides bactériens comme le fMLP ainsi que le PMA, un activateur pharmacologique direct des PKC (Cui *et coll.*, 2012, Kaplan et Radic, 2012). La production des NET semble nécessiter la présence des ROS tel qu'il a été montré avec les PN des patients CGD qui étaient incapables de former des NET en réponse à des stimuli appropriés, alors que cette capacité est rétablie en exposant ces PN au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Brinkmann *et Zychlinsky*, 2012).



**Schéma 8. Neutrophil Extracellular Traps (NET).** (A) Photographie au microscope électronique de Salmonelles piégées dans les NET de PN humains (Binkmann *et Zychlinsky*, 2012). (B) Modèle proposé pour le mécanisme de formation des NET après activation du PN par contact avec le pathogène ou avec différents stimuli (Mantovani *et coll.*, 2011)

### I.2.6. Production de cytokines

En plus de leurs activités de défense, il a été montré que les PN sont capables d'exprimer et/ou de produire, spontanément ou après stimulation appropriée, de nombreuses cytokines, chimiokines et des facteurs pro-inflammatoires (Mantovani *et coll.*, 2011). De nombreuses études récentes ont montré que la phagocytose des bactéries déclenche l'expression des gènes de PN codant pour de nombreux agents immunomodulateurs, y compris l'IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\epsilon$ , l'IL-1RN, l'IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 $\beta$ , IL-15, IL-18, CCL2 (MIP1 $\alpha$ ), CCL3 (MIP1 $\beta$ ), CXCL1 (GRO $\alpha$ ), CXCL2 (MIP2 $\alpha$ ), CXCL3 (MIP2 $\beta$ ), CXCL12 (SDF1), CCL20 (MIP3 $\alpha$ ), le facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ), le facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires et l'oncostatine M (**Tableau 4**). Outre leurs effets dans le recrutement d'un grand nombre de PN et de la modulation de leurs fonctions, ces molécules potentiellement coordonneraient les réponses précoces des monocytes, des macrophages, des cellules dendritiques et des lymphocytes au cours des réponses inflammatoires. Fait important, la production de cytokines et de chimiokines par les PN sert de premier lien entre les réponses immunitaires innées et acquises (Kobayashi *et coll.*, 2005 ; Amulic *et coll.*, 2012).

**Tableau 4. Cytokines secrétées par le neutrophile humain** (adapté de Tecchio *et coll.*, 2014)

<i>Classe de cytokines</i>	<i>Types de cytokines</i>
Cytokines anti-inflammatoires	IL-1ra, IL-4, TGFβ1, TGFβ2
Cytokines pro-inflammatoires	IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-7, IL-9, IL-16, IL-17, IL-18, MIF
Cytokines immunorégulateurs	IFNα, IFN-β, IFNγ, IL-12, IL-21, IL-23, IL-27, TSLP
CC Chimiokines	CCL2, CCL3, CCL4, CC17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22
CXC Chimiokines	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13
Super-famille des TNF	TNFα, Fas-L, CD30-L, TRAIL, LIGHT, Lymphotoxine β, APRIL, BAFF, CD40-L, RANKL
Facteurs angiogéniques et fibrogéniques	VEGF, BV8, HBEGF, FGF2, TGFα, HGF, Angiopoietine 1
Colony-Stimulating Factors	G-CSF, GM-CSF, IL-3, SCF
Autres cytokines	NGF, BDNF, NT4, PBEF, Amphireguline, Midkine, Oncostatine, activine A, Endothéline

### I.2.7. Apoptose des neutrophiles et résolution de l'inflammation

La résolution de l'inflammation est une phase importante pour limiter les dégâts et réparer les endommagements tissulaires causés par les PN au cours des réponses inflammatoires. La plupart de ces réponses s'autolimitent et se résolvent spontanément grâce à un programme interne hautement intégré qui arrête l'inflammation et limite les destructions des tissus de l'hôte. Ceci implique l'élimination de l'agent agresseur, le passage des médiateurs pro-inflammatoires aux médiateurs anti-inflammatoires, la régression du recrutement des leucocytes vers le site inflammatoire, leur apoptose et leur élimination par les macrophages ainsi que la réparation tissulaire (Kantari *et coll.*, 2008). L'arrêt du recrutement des PN au sein du tissu enflammé ainsi que l'élimination des PN émigrants au niveau du site inflammatoire constituent un des événements déterminants dans la résolution de l'inflammation. Une fois l'agent causal de l'inflammation éliminé, les PN sont éliminés par voie de nécrose, apoptose, NETose (Brinkmann *et Zychlinsky*, 2012) ou encore autophagie (Remijnsen *et coll.*, 2011).

Outre leur insensibilité aux agonistes et leur arrêt de production des médiateurs inflammatoires, les PN apoptotiques peuvent également séquestrer les cytokines pro-inflammatoires (Ren *et coll.*, 2008). La phagocytose des PN par les macrophages induit aussi la polarisation de ces derniers de la forme pro-inflammatoire (M1) à la forme pro-résolutive (M2) (El Kebir *et Filep*, 2013). Les macrophages M2 sécrètent des médiateurs comme l'IL-10, l'IL-13 et le TGF-β (Transforming Growth Factor- β) qui induisent l'arrêt de l'inflammation et la réparation tissulaire (Kantari *et coll.*, 2008 ; El Kebir *et Filep*, 2013). De plus, un changement du métabolisme lipidique permet de passer de la production de médiateurs pro-inflammatoires comme les prostaglandines E2 (PGE2) et les leucotriènes à celui des lipoxines, médiateurs

lipidiques anti-inflammatoires retardant le recrutement des PN au niveau du site inflammatoire par inhibition de leur adhésion et leur transmigration à travers l'endothélium vasculaire, tout comme les protéines et les résolvines, médiateurs lipidiques dérivant des acides gras polyinsaturés  $\omega$ -3 qui induisent en plus l'apoptose des PN. En effet, l'apoptose du PN est un point critique pour la réussite de la résolution de l'inflammation. Elle est hautement régulée par un processus qui fait intervenir des facteurs de mort cellulaire comme le ligand de Fas (Fas-L), le TNF- $\alpha$ , les caspases, la famille des Bcl-2 (*B-cell leukemia protein-2*), les FRO, les calpains ainsi que le pathogène. Lorsque les PN entrent en apoptose, leurs fonctions sont négativement régulées. Ils perdent notamment leur capacité à synthétiser les chimiokines, à répondre aux peptides chimioattractants, à phagocyter ainsi qu'à développer l'explosion oxydative et la dégranulation. La membrane des PN apoptotiques est aussi altérée avec la désensibilisation des différents récepteurs tout comme l'intégrité du cytosquelette (Kantari *et coll.*, 2008). La balance entre la mort et la survie des PN doit être donc finement régulée vu qu'une prolongation de la durée de vie des PN ou une accélération de leur mort est impliquée dans plusieurs pathologies inflammatoires et immunitaires (Ottonello *et coll.*, 2002).

### **I.3. Transduction du signal au cours de la stimulation du neutrophile**

Afin de pouvoir répondre efficacement aux agressions de type microbien et inflammatoire, les PN développent de puissants réseaux d'information intracellulaire qui leur permettent rapidement d'activer le système moteur de leurs différentes activités de défense. Les PN perçoivent la présence d'agents pathogènes ou leurs molécules dérivées ou d'autres types de signaux via de nombreux récepteurs présents à la surface ou à l'intérieur des PN (Ben-Baruch *et coll.*, 1995; Ali *et coll.*, 1999). L'interaction du récepteur membranaire avec leurs ligands spécifiques (premiers messagers) constitue l'étape de reconnaissance du signal qui sera transduit par le récepteur pour induire en cascade d'autres signaux amplificateurs (seconds messagers) au niveau membranaire et intracellulaire aboutissant aux systèmes moteurs fonctionnels. De nombreuses seconds messagers et enzymes ubiquitaires sont impliqués dans les fonctions des PN, notamment les protéines G trimériques, le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), la PKC, la PI3-kinase, les tyrosine kinases, des petites protéines G et les MAP kinases (Bokoch, 1995 ; Kogut *et coll.*, 2001).

Les enjeux majeurs de la signalisation dans les PN visent à identifier les signaux biochimiques impliqués dans les différentes activités de défense, leur contribution fonctionnelle respective, leur sensibilité aux atteintes pathologiques et pharmacologiques, et la possibilité de les manipuler en vue de corriger les réponses inappropriées des PN pathologiques dans une perspective thérapeutique.

### **I.3.1. Les récepteurs membranaires liés aux fonctions bactéricides du neutrophile**

Les PN expriment un grand nombre de récepteurs de surface impliqués dans la reconnaissance d'agents pathogènes et inflammatoires, et qui initient les mécanismes d'activation fonctionnelle des PN. Ceux-ci incluent les récepteurs de chimiokines et d'autres chimioattractants couplés à la protéine G, des récepteurs du fragment Fc, des récepteurs d'adhésion telles que les sélectines/L-sélectines et les intégrines, divers récepteurs de cytokines ; ainsi que des récepteurs de l'immunité innée tels que les récepteurs de type Toll (*Toll-Like Receptors, TLR*) (Futosi *et coll.*, 2013). Ces différents récepteurs déclenchent diverses voies de signalisation qui diffèrent par leur intensité, leur durée, la nature des effecteurs internes impliqués même si la plupart d'entre elles sont communes à toutes les cellules comme des protéines G hétérotrimériques et monomériques, les signaux calciques ( $Ca^{2+}$ ), des protéine et des lipide kinases, des protéines adaptatrices et cytosquelettiques. Un grand nombre de ces récepteurs sont à 7 segments transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG), aux tyrosine Kinases ou encore aux adényl et guanilyl cyclases (Bokoch, 1995, Naccache, 2013) sont particulièrement intéressantes car ils sont capables d'induire à la fois des activités de défense biochimiquement très différente comme la migration, la dégranulation, l'explosion oxydative et la production de cytokines. Le fPR est le chef de file des récepteurs des PN (Boulay, 1990). Il reste le plus étudié à ce jour et l'un des plus puissants au point de vue fonctionnel. Il fera l'objet d'une étude bibliographique plus au moins approfondie d'autant que c'est notre modèle d'étude choisi pour le projet expérimental.

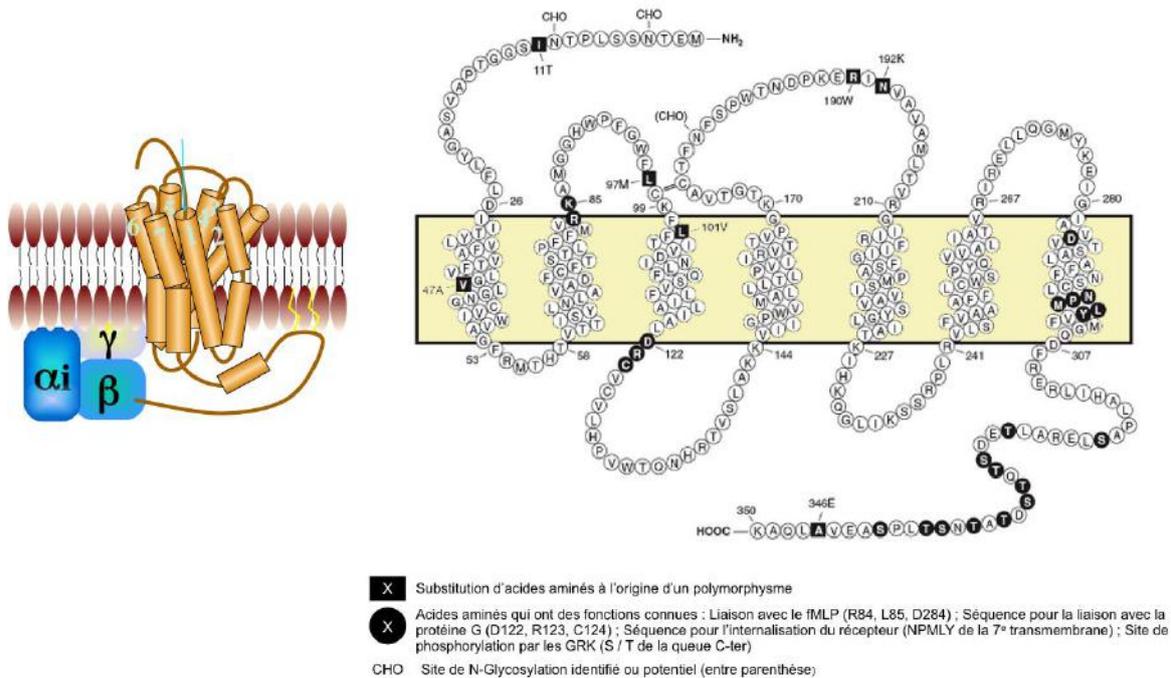
#### **I.3.1.1. Les récepteurs couplés aux protéines G**

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent la plus vaste famille génique du génome des vertébrés (>1%) dont plus de 600 membres ont été répertoriés chez l'homme. La caractéristique commune de ces récepteurs est qu'ils traversent sept fois la membrane plasmique et forment ainsi trois boucles extracellulaires, trois boucles intracellulaires et une queue C-terminale cytoplasmique. Les PN expriment un grand nombre de RCPG parmi lesquels des récepteurs des peptides N-formylés (*formyl-peptide receptor, fPR*) qui détectent les produits issus de bactéries et mitochondriaux suite aux lésions tissulaires. Ces récepteurs régulent non seulement des paramètres de déplacement cellulaire, mais aussi d'autres activités de défense rapide des phagocytes comme la dégranulation, la production de FRO et la synthèse de protéines. Le plus étudié de ces RCPG dans le PN est le fPR identifié en 1990 (Boulay *et coll.*, 1990) mais dont le ligand, les peptides bactériens étaient déjà utilisés une dizaine d'année auparavant, et depuis de nombreux ligands de ce récepteur ont été identifiés. Les mécanismes qui sous-tendent spécifiquement ces différentes activités du PN restent plus au moins non élucidés. Cependant,

quelques paramètres ont été proposés concernant à la fois la concentration des stimulants et les étapes de la cascade de signalisation conduisant à la stimulation des différents systèmes moteurs. Compte tenu de l'importance du fPR dans l'acquisition des connaissances que nous avons des différentes activités fonctionnelles et transductionnelles du PN d'une part, et comme l'un des plus puissants RCPG du PN, la signalisation de ce récepteur sera traitée de manière détaillée ci-après.

### a. Les récepteurs des peptides formylés (fPR)

Les récepteurs des peptides formylés (fPR) sont une famille exceptionnelle des RCPG qui fonctionnent comme des récepteurs chimiotactiques et dans d'autres réponses immunitaires innées, avec un spectre d'agonistes exceptionnellement large (Bufe *et coll.*, 2015). Le fPR est composé d'une seule chaîne de 350 acides aminés organisée en une structure à 7 domaines transmembranaires, avec trois boucles extracellulaires et intracellulaires, une queue N-terminale extracellulaire et une queue C-terminale intracellulaire (**Schéma 9**). Le fPR est couplé à une protéine G de type Gi et regroupe une famille de 3 récepteurs homologues qui jouent tous un rôle dans la défense contre les pathogènes: fPR1 (FPR), fPR2 (FPRL1) qui est une protéine de 351 acide aminés et présente 69% d'homologie avec le fPR1 et fPR3 (FPRL2) qui ne partage que 56% d'homologie avec fPR1. Seuls le fPR1 et fPR2 sont exprimés dans le PN humain. fPR1 et fPR2 sont stockés non seulement sur la membrane plasmique, mais également sur celles des granules mobilisables et des vésicules sécrétoires (Dahlgren *et coll.*, 2016).



**Schéma 9. Structure primaire et 3D prédictive du formyl-peptide-receptor fPR1**  
 (Adapté à partir de <http://atlasgeneticsoncology.org> par Rolas, 2015).

Au niveau fonctionnel, la queue N-terminal et les boucles extracellulaires du fPR sont impliquées dans la reconnaissance et la fixation du tripeptide bactérien formyl-méthéonyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) qui s'intercale dans l'espace formé par les 7 transmembranes, alors que la partie intracellulaire du fPR est fortement impliquée dans la transduction du signal consécutive à la liaison du récepteur avec son agoniste (Radel *et coll.*, 1994). La queue C-terminale et la 2e boucle intracellulaire sont fortement impliquées dans la liaison du récepteur avec la protéine G trimérique (Schreiber *et coll.*, 1994 ; Miettinen *et coll.*, 1999).

Le tripeptide bactérien fMLP est l'agoniste-type de la famille des ligands du fPR. Le fMLP est un agent chimiotactique et activateur puissant pour les phagocytes, et il est également généralement adoptée comme modèle de référence pour évaluer l'activité des analogues nouvellement synthétisés. En plus des peptides N-formylés, plusieurs différents agonistes du fPR ont été identifiés, y compris des peptides non formylés dérivant de l'hôte, des agonistes peptidiques et des agonistes non peptidiques (Dahlgren *et coll.*, 2016).

De nombreuses voies de signalisation intracellulaire sont déclenchées par l'engagement du fPR (Schéma 10). Suite à l'interaction du fPR avec le fMLP, une cascade d'évènements de signalisation se déclenche dans le PN. Les voies induites par le fMLP impliquent l'activation de la protéine Gi, des phospholipase, des phospholipide kinase (PI3K) ainsi que de nombreuses protéine kinase (AKT, mTOR, MAPK ...etc).

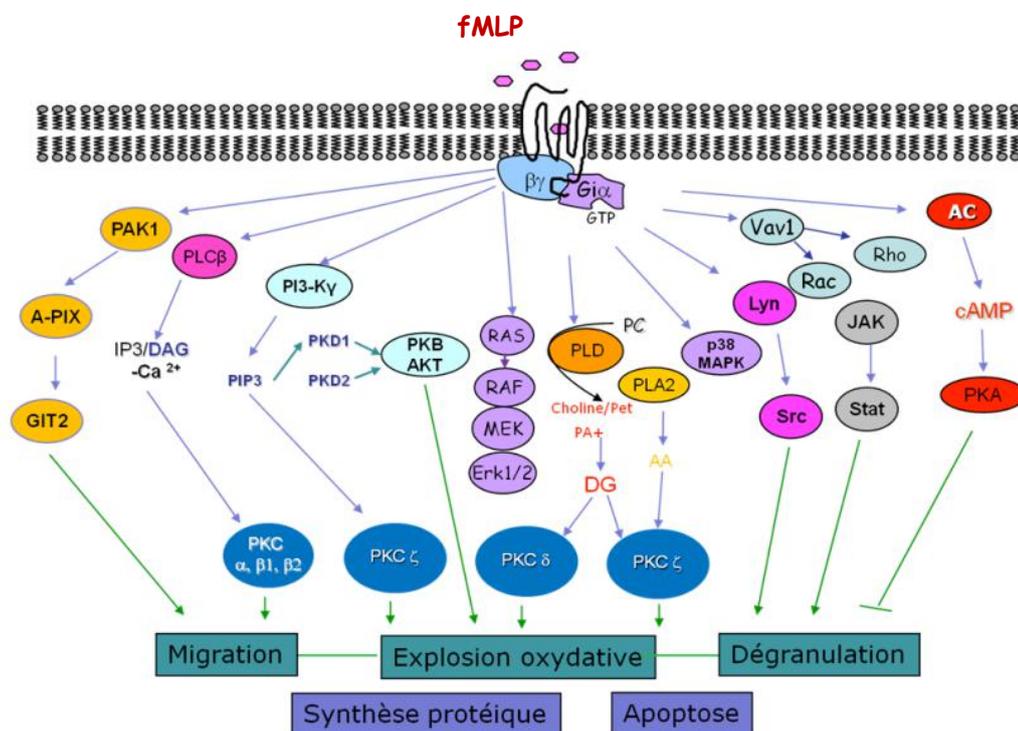
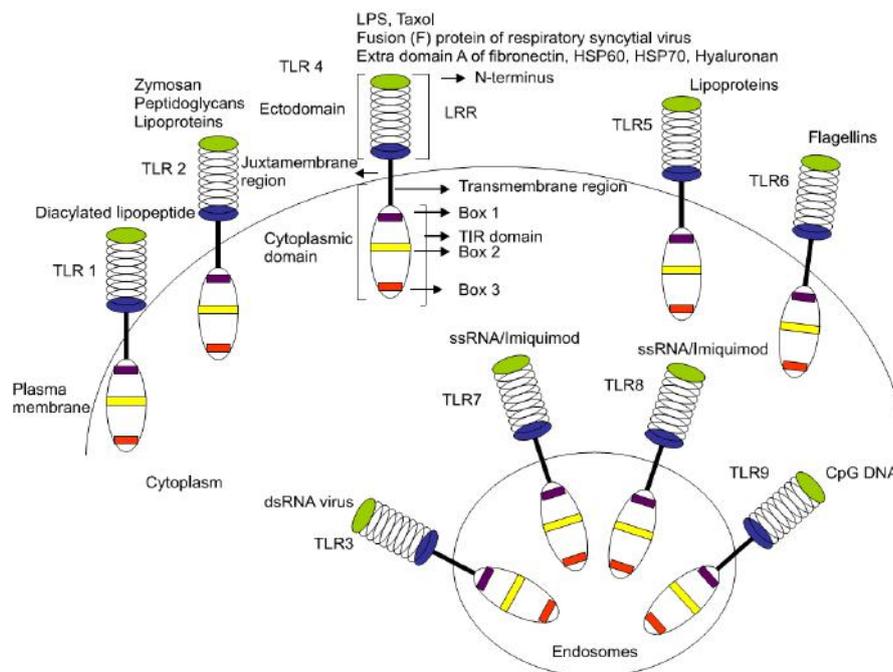


Schéma 10. Principales voies de signalisation déclenchées par le récepteur fPR dans les neutrophiles humains (Rolas, 2015).

### I.3.1.2. Les “Toll-like Receptors” (TLR)

Les récepteurs de type Toll (*Toll-like receptor*, TLR) sont les récepteurs les plus connus de l’immunité innée, et sont exprimés pour certains sur la surface cellulaire et pour d’autres dans des compartiments endosomaux intracellulaires (Prince *et coll.*, 2011). A l’heure actuelle 11 TLR ont été identifiés chez l’homme, largement exprimés dans les macrophages, les PN, les DC, les cellules NK, les lymphocytes ainsi que dans les cellules épithéliales et endothéliales. Le PN humain exprime tous les TLR connus à l’exception de TLR3, et probablement le TLR7 qui est encore un sujet de débat (Janke *et coll.*, 2009 ; Futosi *et coll.*, 2013).

Les TLR sont des glycoprotéines transmembranaires de type I, organisés en trois domaines : un domaine N-terminal extracellulaire qui permet la reconnaissance du ligand, un domaine transmembranaire, et un domaine C-terminal intracellulaire chargé de la transduction du signal à l’intérieur de la cellule (Medvedev, 2013). L’expression des TLR dans deux compartiments, la membrane plasmique et celle des endosomes intracellulaires, est fonction des ligands qu’ils reconnaissent et la cellule dans laquelle ils sont exprimés. Ainsi, les TLR exprimés à la surface de cellules (TLR1, 2, 4, 5 et 6) détectent les lipides, les protéines et les polysaccharides des pathogènes, alors que les TLR endosomaux (TLR3, 7, 8 et 9) détectent des acides nucléiques microbiens (**Schéma 11**) (Medvedev, 2013). Cependant, il faut noter que le TLR4 fait l’exception de cette famille de récepteur, car son expression est à la fois membranaire et endosomale (Bell, 2008 ; Kagan *et coll.*, 2008).



**Schéma 11. Les récepteurs Toll-like (TLR) et leurs ligands.** LRR : leucine rich repeats ; TIR : Toll IL-1R-resistance (Krichnan *et coll.*, 2007)

Les TLR reconnaissent et interagissent avec une variété de ligands exogènes (PAMP) et endogènes (DAMP). Les PAMP sont sous forme de protéines, de lipides, de sucres ou encore des acides nucléiques (**Schéma 11**) (Akira *et coll.*, 2006). Les ligands endogènes (DAMP) correspondent à des fragments de molécules de la matrice extracellulaire, à des protéines de choc thermique ou des peptides antimicrobiens pouvant stimuler les TLR de surface (Prince *et coll.*, 2011). L'interaction d'un agoniste avec son TLR initie une homo- (TLR4-TLR4) ou une hétérodimérisation (TLR1-TLR2 ou TLR6-TLR2) qui met les domaines TIR intracellulaires à proximité, ce qui permet ainsi le recrutement de protéine kinases et les adaptateurs nécessaires pour la transduction du signal (Medvedev, 2013). La principale voie de transduction du signal des TLR est médiée par le recrutement de l'adaptateur MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response protein 88*). Le MyD88 recrute à son tour les kinases de la famille IRAK (*IL-1 Receptor Associated kinases*), principalement IRAK4, conduisant ainsi à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par l'intermédiaire IKK, ainsi que les voies JNK et p38-MAPK via les protéines MKK (Futosi *et coll.*, 2013). Une deuxième voie de signalisation, indépendante de MyD88, fait intervenir le TRIF (*TIR domain-containing adapter-inducing IFN- $\beta$* ) (Medvedev, 2013) qui mène à l'activation des voies aboutissant finalement à la translocation nucléaire d'un ou plusieurs facteurs de transcription (principalement du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B, les MAP kinases, et les facteurs de régulation de l'interféron (Prince *et coll.*, 2013).

Il est bien démontré que l'activation des TLR dans le PN conduit à l'induction des fonctions de défense de celui-ci. Les TLR sont capables d'induire l'activation des voies MAPK dans les PN, la production de cytokines, de formes réactives de l'oxygène (FRO), le « priming », le clivage de L-Selectine, l'expression du CD11b, l'expression des récepteurs et la phagocytose (Sabroe *et coll.*, 2003 ; Prince *et coll.*, 2011). Les TLR ont fait l'objet de nombreux travaux y compris dans notre laboratoire, notamment sur les TLR7 et les TLR8 (Makni-Maalej *et coll.*, 2012 et 2015 ; Boussif *et coll.*, 2016). Ces travaux ont montré qu'un agoniste des TLR7 et/ou TLR8, le CL097, potentialise l'explosion oxydative des PN humains stimulés par le fMLP. Le mode d'action du CL097 incluait l'augmentation de l'expression du cytochrome b558 (gp91<sup>phox</sup> et p22<sup>phox</sup>) à la membrane plasmique, induisait la phosphorylation de p38-MAPK, ERK1/2, PKC $\beta$  et de la p47<sup>phox</sup>. L'activation de ces TLR7/8 dans les PN humains normaux est donc en mesure d'induire une hyperactivation de la NOX2 via l'activation de p38-MAPK, ERK1/2 et PKC. Nous avons examiné si cette approche pourrait être utilisée dans les PN de patients cirrhotiques, en vue de potentialiser la production de FRO, la dégranulation de la MPO des PN et leur pouvoir bactéricide, qui étaient déficitaires. Ainsi, l'activation de TLR7/8 par le CL097 ou le R848 est capable de stimuler faiblement l'explosion oxydative des PN (Rolas *et coll.*, Manuscrit soumis à la publication), en accord avec des travaux d'autres auteurs (Janke *et coll.*, 2009) et favorise

l'explosion oxydative induite secondairement par le fMLP. Des résultats similaires ont été obtenus pour la dégranulation de la MPO et un mécanisme d'action du CL097 est proposé au niveau des voies de signalisation impliquant notamment AKT et p38-MAP (détaillé dans la partie expérimentale) (Boussif *et coll.*, 2016).

### **I.3.1.3. Autres récepteurs du neutrophile**

Les PN expriment également de nombreux autres récepteurs et familles de récepteurs qui jouent un rôle important dans les mécanismes de défense anti-infectieuse. C'est le cas des récepteurs Fc (*Fc-R*) qui jouent un rôle primordial dans la reconnaissance des pathogènes opsonisés par les immunoglobulines, et dont les plus importants sont les récepteurs  $Fc\gamma$  ( $Fc\gamma-R$ ). De plus, les PN expriment les récepteurs indispensables à leur adhésion et leur transmigration tels que les Sélectines/Sélectine-Ligands (Selectin/Selectin-L) et les intégrines (CD11/CD18). Ils expriment également les récepteurs classiques de cytokines (classe I et II), des membres de la famille « *IL-1-Receptor/Toll-like Receptor* », et les membres de la famille des récepteurs de TNF. Ces récepteurs sont impliqués dans la régulation de la communication intercellulaire et diverses fonctions de défense du PN. Enfin, les PN expriment également des récepteurs supplémentaires qui ne peuvent pas être regroupés dans les catégories ci-dessus. Ceux-ci incluent les récepteurs associés au DAP12 et au  $FcR\gamma$  tels que TREM-1 et OSCAR; le récepteur CEACAM3 de reconnaissance de *Neisseria* ; ainsi que les récepteurs scavengers, les récepteurs du complément et différents récepteurs senseurs des lipidiqes intracellulaires (Futosi *et coll.*, 2013).

## **I.3.2. Principaux effecteurs intracellulaires et voies de la signalisation du neutrophile humain**

### **I.3.2.1. La protéine G**

Les protéines G hétérotrimériques représentent une large famille de protéines ( $G_i$ ,  $G_s$ ,  $G_o$ ,  $G_q$ ,  $G_{16}$ ,  $G_{12/13}$ ). Elles sont toutes constituées de 3 sous-unités différentes,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  qui sont étroitement associées à la face intracellulaire des RCPG et servent à activer des effecteurs internes. A l'état inactif, la sous-unité  $G\alpha$  se trouve liée à une molécule du GDP (Vines *et Prossnitz*, 2004). La majorité des réponses des PN sont régulées via des récepteurs chimiotactiques sont couplés à une protéine G sensibles à la toxine pertussique indiquant que la protéine G est de type  $G_i$  (Ben-Baruch *et coll.*, 1995).

Lors de l'activation du fPR par son ligand, le récepteur change de conformation, ce qui déclenche l'échange du GDP contre le GTP au niveau de la sous-unité  $\alpha$ , et provoque la

dissociation des sous-unités  $\beta\gamma$  (Selvatici *et coll.*, 2006). Le complexe  $\beta\gamma$  active directement plusieurs effecteurs intracellulaires parmi lesquels la phospholipase C $\beta$ 2 (PLC $\beta$ 2) (Camps *et coll.*, 1992), la phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) (Stoyanov *et coll.*, 1995) et la petite protéine G Ras. De son côté, la sous-unité G $\alpha$  induit l'activation de nombreux autres effecteurs, notamment ceux dépendant des tyrosine kinases.

### I.3.2.2. Les Phospholipases

Les phospholipases sont une famille d'enzymes associées à la membrane plasmique qui hydrolysent les phospholipides membranaires pour produire des seconds messagers qui initient la cascade de transduction du signal. Cette famille compte 5 classes de phospholipases sur la base du site d'action sur les phospholipides, la phospholipase A1 (PLA1), la PLA2, la PLB, la PLC et la PLD. Cependant, ce sont principalement les PLA2, les PLC et PLD qui jouent un rôle majeur dans les réponses fonctionnelles du PN stimulé par le fMLP. En effet, L'activation de la protéine G $i$  induit la dissociation de la sous-unité G $\alpha$  des deux sous-unités  $\beta\gamma$ . Les sous-unités  $\beta\gamma$  active directement la phospholipase C (PLC $\beta$ 2) alors que les phospholipases A2 et D sont indirectement activées via la sous-unité G $\alpha$  et des tyrosine kinases (Bokoch, 1995).

La PLA $_2$  catalyse la réaction de l'hydrolyse des phospholipides au niveau de la position *sn*-2-*acyl* pour induire la libération des acides gras *cis*-insaturés, préférentiellement l'acide arachidonique (AA), ainsi que les lysophospholipides (**Schéma 12**). Cette activité de la PLA $_2$  est vraisemblablement Ca $^{2+}$ -indépendant (iPLA $_2$ ) (Baggiolini *et coll.*, 1993 ; Nishizuka, 1992 *et* 1995). En outre, il a été montré également que l'activation de la PLA $_2$  est induite par la PKC (Nishizuka, 1995) et des MAP kinases telles que ERK1/2. La PLA $_2$  est impliquée dans l'induction des réponses du PN telles que le chimiotactisme (Cathcart, 2009) et l'activation NADPH oxydase. Cependant, elle ne serait pas impliquée dans la régulation du processus de la phagocytose (Levy, 2006). L'acide arachidonique et l'acide phosphatidique libérés sous l'action de la PLA $_2$  peuvent activer directement la NADPH oxydase, la dégranulation des PN ainsi que l'expression du récepteur type 3 du complément (CR3) (Bagiolini *et coll.*, 1993 ; Bokoch, 1995 ; Tithof *et coll.*, 1998 ; Moghaddami *et coll.*, 2003). L'acide arachidonique sert également de précurseur pour de nombreux médiateurs inflammatoires regroupés sous le terme d'eicosanoïdes (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes) et qui jouent des rôles importants aussi bien physiologiques que pathologiques (Tithof *et coll.*, 1998 ; Levy, 2006). D'autre part, l'acide arachidonique sert également de substrat pour la lipooxygénase pour générer les leucotriènes (LT) dont le leucotriène B $_4$  (LTB $_4$ ) qui est un médiateur inflammatoire capable d'activer des voies majeures de signalisation (PI3K et MAPK) dans le PN (Le Bel *et coll.*, 2013).

Les phospholipases C (PLC) sont un groupe de lipases qui comprend quatre familles : PLC $\alpha$ , PLC $\beta$ , PLC $\gamma$  et PLC $\delta$ . Toutes les quatre catalysent l'hydrolyse dépendante du calcium de trois phosphoinositides : le phosphatidyl inositol, le phosphatidyl inositol 4-phosphate et le phosphatidyl inositol 4,5-biphosphate (**Schéma 12**). Cependant, leur dépendance du Ca<sup>2+</sup> diffère suivant l'isoforme de la PLC (Dennis *et coll.*, 1991).

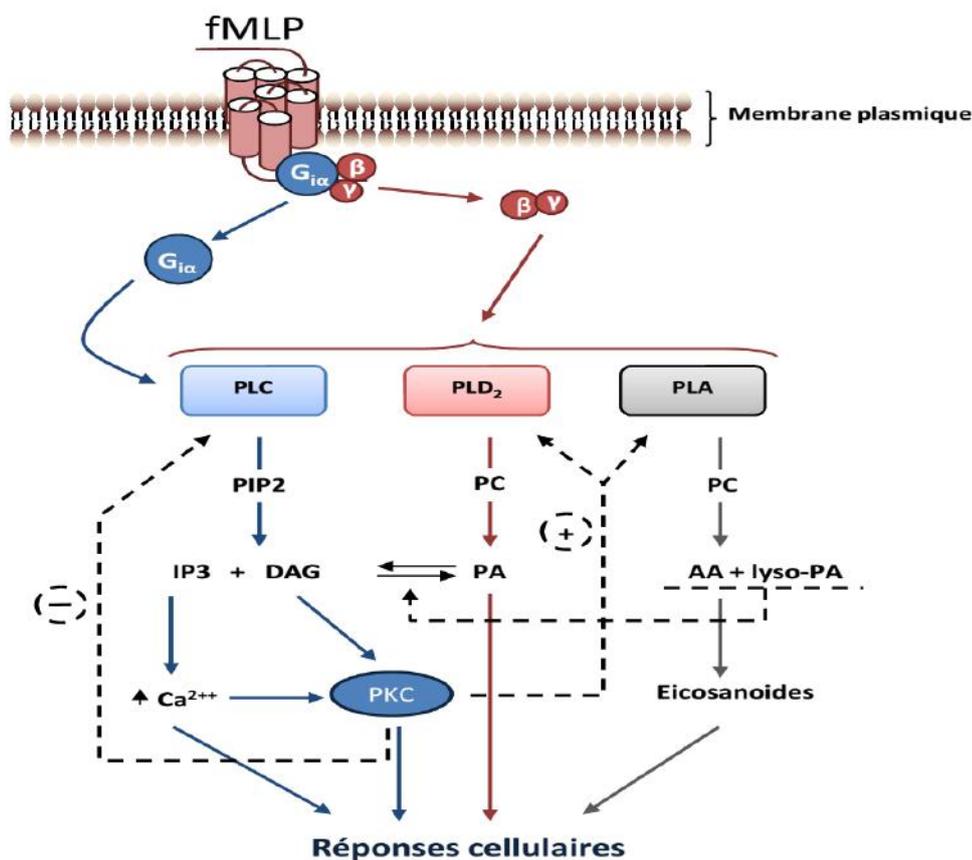
L'activité PLC permet la génération de diacylglycérol (DAG) et de l'inositol-(1,4,5)-triphosphate (IP3), qui jouent un rôle très important dans la transduction du signal (Bokoch, 1995). L'IP3 étant hydrosoluble diffuse à travers le cytosol où il se fixe sur les canaux calciques au niveau du réticulum endoplasmique et induit la libération du Ca<sup>2+</sup>. L'augmentation de la concentration du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire active de nombreuses enzymes, parmi lesquelles la PKC (Morel *et coll.*, 1992 ; Bokoch, 1995). A un certain seuil de l'augmentation du Ca<sup>2+</sup>, la PKC subit une translocation vers la membrane plasmique où son activation sera potentialisée par le DAG qui reste ancré dans la membrane plasmique de la cellule (Nishizuka, 1995). Toutefois, l'activation de la PLC est un évènement précoce et transitoire (Périanin et Snyderman 1989) qui est relayé par l'activation de la phospholipase D (PLD) qui est aussi transitoire mais un peu plus soutenue (Morel *et coll.*, 1992, Pedruzzi *et coll.*, 1998).

La phospholipase D (PLD) catalyse l'hydrolyse de la phosphatidylcholine pour produire l'acide phosphatidique et la choline (Périanin *et coll.*, 1993 ; Exton, 1999). Dans le PN ainsi que dans les cellules HL-60, l'activation de la PLD induite par le fMLP se fait via la protéine Gi et requiert la présence du calcium (revue Exton 1999). Les activateurs de la PKC, tels que les esters de phorbol, stimulent l'activité PLD (Dennis *et coll.*, 1991), ce qui est consistante avec l'observation que l'inhibition de la phosphatase PP2A favorise l'activité PLD dans le PN (Djerdjouri *et coll.*, 1994). L'acide phosphatidique généré par la PLD est rapidement déphosphorylé par une PA-phosphatase pour former des acyl/alkylglycérols (DAG, EAG), qui peuvent activer à leur tour des PKC (Dennis *et coll.*, 1991 ; Morel *et coll.*, 1992). Outre l'activation des PKC, une autre protéine kinase, mTOR, est directement activée par l'acide phosphatidique issu de la PLD (Foster, 2009). En fait, la PLD participe à la transduction du signal impliqué dans de nombreuses réponses cellulaires. Inversement, l'inhibition de la production de PA/DAG via PLD par des inhibiteurs spécifiques tels que l'éthanol via la réaction de transphosphatidylation ou par le propranolol réduit l'activation de la NADPH oxydase et la dégranulation des PN activés par le fMLP (Kaldi *et coll.*, 2002).

Les PLD possèdent dans leur domaine N-terminal un domaine conservé ressemblant fortement au domaine consensus phox (PX) qui lie les phosphoinositides (Ponting *et Kerr*, 1996). Les domaines PX sont impliqués dans une grande variété d'interaction protéine-protéine incluant la liaison à des kinases ou à des domaines de type SH3. De ce fait, la PLD est impliquée dans de

grandes variétés de fonctions des PN telles que la migration, la phagocytose, la dégranulation ou encore la production de FRO (Olson *et Lambeth*, 1996).

L'AP et le DAG sont capables de stimuler de manière synergique l'activation des composants du complexe NADPH oxydase dans un système acellulaire (Palicz *et coll.*, 2001) et l'ajout de manière exogène d'AP stimule l'explosion oxydative sans ajout de calcium (Perry *et coll.*, 1993). En outre, l'AP favorise le recrutement à la membrane de la p47<sup>phox</sup>, un composant majeur du complexe NADPH oxydase (Karathanassis *et coll.*, 2002). Dans les PN stimulés par le fMLP, c'est l'isoforme PLD2 associée à la membrane plasmique qui produit presque la totalité de l'acide phosphatidique et régule la NOX2 alors que l'autre isoforme PLD1, de localisation intracellulaire, a un rôle mineur (Paruch *et coll.*, 2006). De plus, l'activité PLD du PN est étroitement régulée par ERK1/2 (Djerdjouri *et coll.*, 1999) et implique une phosphorylation directe de la PLD2 par ERK1/2 (Paruch *et coll.*, 2007), elle-même activée via AKT1/2 (Patel *et coll.*, 2010).



**Schéma 12. Rôle des Phospholipases signalisation au cours de l'activation du neutrophile.** PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate ; PC : Phosphatidylcholine ; PA : Acide phosphatidique; AA : Acide arachidonique; lyso-PA : Acide lysophosphatidique. (+) : activation ; (-) : inhibition ; (---) : voie non confirmée. (Adapté de Baggiolini *et coll.*, 1993; Bokoch, 1995 et Nisizuka, 1995).

### I.3.2.3. La Protéine Kinase C

Les PKC constituent une famille de protéines à activité sérine/thréonine kinase dépendante de phospholipides (Nishizuka, 1995). Les PKC sont subdivisées suivant leur structure et leur mode d'activation en 3 sous-familles: les PKC conventionnelles (cPKC), les nouvelles PKC (nPKC) et les PKC atypiques (aPKC) (Nishizuka, 1995; Laudanna *et coll.*, 1998). Cependant, seulement 5 isoformes de la PKC :  $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$ ,  $\delta$  et  $\zeta$  sont identifiées au sein du PN humain (Dang *et coll.*, 2001). Mais la contribution exacte de chacune des isoformes dans l'induction des réponses du PN est encore mal connue avec cependant un rôle majeur pour la PKC $\zeta$  (Dang *et coll.*, 2001). En dépit des différentes conditions requises des cofacteurs, il y a une petite différence entre les spécificités des isoformes de la PKC vis-à-vis du substrat *in vitro* (Larsen *et coll.*, 2000).

L'activation de la PKC dans les PN est induite par le fMLP et par les esters de phorbol analogues du DAG tels que le PMA (Laudanna *et coll.*, 1998). Le PMA active directement la PKC en se fixant sur le site de liaison du DAG (Gamet-Payraastre *et coll.*, 1999). D'autres études ont rapporté la possibilité de l'activation de la PKC via la PI3-K (Vlahos, 1995 ; Le Good *et coll.*, 1998) ainsi que par les petites GTPase de la famille des Rho (Laudanna *et coll.*, 1998). D'autre part, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la PKC montre qu'elle possède de nombreux effecteurs intracellulaires. Ainsi, la PKC induit la phosphorylation des composants cytosoliques (p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup>) de la NADPH oxydase, qui est une étape primordiale pour l'assemblage et l'activation de la NADPH oxydase (Lopes *et coll.*, 1999 ; Regier *et coll.*, 2000, Dang *et coll.*, 2001). La PKC pourrait constituer un effecteur cytosolique de différents types de récepteurs pour réguler l'activité de nombreuses autres protéines kinases telles que les MAPK (Selvatici *et coll.*, 2003), probablement via l'activation de Raf (Chen *et coll.*, 2005).

Il est actuellement bien établi que la PKC joue un rôle important dans la régulation de nombreux processus au sein du PN, notamment dans l'explosion oxydative (Dang *et coll.*, 2001), la dégranulation (Faurischou *et Borregaard*, 2003), l'adhésion cellulaire dépendante des intégrines (Laudanna *et coll.*, 1998) ainsi que le chimiotactisme (Dunzendorfer *et Wiedermann*, 2000).

### I.3.2.4. L'axe PI3K-AKT-mTOR

La voie des phosphatidylinositol-3 kinases (PI3K) et de « *mammalian Target of Rapamycin* » (mTOR) a longtemps été reconnue comme voie primordiale de la régulation critique du métabolisme, de la croissance et de la survie cellulaire. Ces deux effecteurs de signalisation sont également des acteurs principaux dans la régulation et la coordination des mécanismes de défense du système immunitaire inné. Bien qu'initialement considérées comme

deux voies distinctes, la PI3K et la signalisation de mTOR sont reliées par la sérine/thréonine kinase AKT (appelée également protéine kinase B, PKB). La voie PI3K/AKT/mTOR a longtemps été connue pour être importante dans la régulation de l'activation des cellules de l'immunité adaptative. Cependant, elle a également de nombreux rôles distincts dans les cellules de l'immunité innée, incluant les PN (travaux originaux en cours dans notre laboratoire), les mastocytes, les monocytes, les macrophages ainsi que les cellules dendritiques (Weichhart et Säemann, 2008).

### **a. La Phosphatidyl Inositol 3-Kinase**

La phosphatidyl inositol 3-Kinase (PI3K) est une lipide kinase qui est impliquée dans la signalisation de nombreuses fonctions cellulaires y compris la prolifération, la génération du superoxyde, le chimiotactisme ainsi que la mobilisation des vésicules cellulaires (Walker *et coll.*, 1999; Sasaki *et coll.*, 2000). Les PI3K sont un groupe d'enzymes hétérodimériques qui phosphorylent le groupement OH en position D3 de l'inositol du phosphatidylinositol, du phosphatidylinositol 4-phosphate, et du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate pour générer le phosphatidylinositol 3-phosphate (PIP), le phosphatidylinositol 3,4-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) et le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP<sub>3</sub>), respectivement (Al-Shami *et coll.*, 1997). Ces produits lipidiques de la PI3K ne sont pas hydrolysables par la PLC, et jouent le rôle de seconds messagers dans l'activation des protéines de transduction (Payrastreet *coll.*, 2001). En plus de son activité lipide kinase, PI3K possède une activité protéine kinase intrinsèque nécessaire pour activer certaines protéines du signal (Bondeva *et coll.*, 1998).

Les PI3K sont classées en trois classes selon leur structure et leur spécificité vis-à-vis le substrat: PI3K I, PI3K II et PI3K III (Walker *et coll.*, 1999). La classe PI3K I est d'un important intérêt physiologique dans le PN. Elle est subdivisée en deux sous-classes, IA et IB. La sous-classe IA renferme des hétérodimères constitués d'une sous-unité régulatrice p85 ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) liée à une sous-unité catalytique p110 ( $\alpha$ ,  $\beta$ , ou  $\gamma$ ), l'activation de ces isoformes se fait via les tyrosine kinases. En revanche, la sous-classe IB renferme seulement un seul membre hétérodimérique constitué d'une sous-unité catalytique p110 $\gamma$  qui est associée à une sous-unité régulatrice p101 dont l'activation se fait par les sous-unités  $\beta\gamma$  de la protéine G associée aux récepteurs des chimioattractants. Les enzymes de la classe I sont exprimées dans les PN, et phosphorylent préférentiellement le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate pour générer le PIP<sub>3</sub> (Wymann *et Pirola*, 1998; Naccache *et coll.*, 2000). L'inhibition de la PI3K réduit la phosphorylation de la protéine p47<sup>phox</sup> et abolissent l'activation de la NADPH oxydase, ainsi que la mobilisation des granules intracellulaires du PN activé, ce qui reflète l'importance de la PI3K (Vlahos, 1995; Capodici *et coll.*, 1998).

Les effecteurs cibles de la PI3K sont de plus en plus nombreux. Ainsi, le PIP<sub>3</sub> après liaison au domaine d'homologie à la pleckstrine de PKB/Akt permet l'association de protéine kinases dépendantes (PDK1 et PDK2) et l'activation d'AKT par la phosphorylation de la Thr308 et de la Ser473 (Yum *et coll.*, 2001 ; Strassheim *et coll.*, 2004). Le PIP<sub>3</sub> peut également activer les isoformes de PKC dépendantes et indépendante de Ca<sup>2+</sup>, dont certaines isoformes peuvent être activées par la PDK1 (PKC ζ) (Le Good *et coll.*, 1998). Les isoforme δ, ε, τ et ζ de la PKC sont également suspectées être des cibles de la PI3K, ce qui pourrait expliquer la relation entre l'activation de la PI3-kinase et la phosphorylation de p47<sup>phox</sup> de la NADPH oxydase. D'autres candidats possibles incluent la PLD (Stoyanova *et coll.*, 1997; Wymann *et Pirola*, 1998) ainsi qu'une famille de protéine kinases cytosoliques de 69, 63, 49 et 40 kDa qui peuvent phosphoryler et activer directement la p47<sup>phox</sup>. La PI3K induit également l'activation des MAP-kinases (Bondeva *et coll.*, 1998) et de la GTPase Ras (p21<sup>ras</sup>), qui active à son tour la protéine Raf-1. Cette dernière, activée également par la PKC, phosphoryle et active une famille de MEK (MEK1, 2 et 3) responsable de l'activation des MAPK (Downey *et coll.*, 1996, Walker *et coll.*, 1999). Ceci suggérerait également un important rôle de la PI3K dans la dégranulation.

## **b. AKT/PKB**

La protéine kinase AKT, également appelée Protéine Kinase B (PKB), est une sérine/thréonine protéine kinase de 60 kDa qui fait partie de la famille des AGC kinases et qui joue un rôle crucial dans de nombreuses fonctions biologiques telles que la survie et la prolifération cellulaire (Vivanco *et Sawyer*, 2002). Elle présente une forte homologie avec PKA et PKC, et a été ainsi baptisée PKB (Rane, 2009). Il existe 3 isoformes d'AKT: AKT1 (PKBα), AKT2 (PKBβ) et AKT3 (PKBγ) qui partagent une grande homologie de structure particulièrement au niveau du domaine kinase. Toutes ces 3 isoformes d'AKT sont exprimé dans les PN (Patel *et coll.*, 2010), mais seules AKT1 et 2 ont été impliquées dans le chimiotactisme, la dégranulation et la production d'O<sub>2</sub> (Hannigan *et coll.*, 2004, Patel *et coll.*, 2010).

L'activation d'AKT implique une étape de translocation membranaire dépendante de PI3-kinase, suivie par la phosphorylation de ses deux sites régulateurs clés Ser473 et Thr308. La phosphorylation des deux sites est nécessaire pour l'activation complète d'AKT (Song *et coll.*, 2005). La translocation membranaire d'AKT est induite par le fMLP (Patel *et coll.*, 2010), ce qui l'amène à proximité de la kinase PDK1 qui la phosphoryle sur la Thr-308. La phosphorylation sur la Ser473 est réalisée notamment par PDK2 et mTORC2. Il a également été démontré que la p38-MAP kinase (p38-MAPK) activée en aval de PI3K peut réguler l'activité d'AKT par phosphorylation de Ser473.

Dans les PN, l'implication d'AKT dans l'activation de la NADPH oxydase a été suggérée par le fait qu'in vitro, AKT phosphoryle les sérines 304 et 328 de la p47<sup>phox</sup> (Hoyal *et coll.*, 2003 ; Chen *et coll.*, 2003). Il a été montré que AKT1 contribue majoritairement à la génération d'anion superoxyde induite par le fMLP dans les PN alors que la contribution d'AKT2 était plus réduite. En outre, AKT contrôle l'activité de PLD de manière dépendante de p44/42 MAPK (Patel *et coll.*, 2010). Néanmoins, des travaux réalisés dans des PN murins, où AKT1 ou AKT2 ont été inactivés, ont à l'inverse mis en évidence qu'AKT2 jouait un rôle plus important qu'AKT1 dans la production d'anion superoxyde. Au niveau de la NOX2, AKT2 contrôlait également la phosphorylation et la translocation membranaire de la p47<sup>phox</sup> (Chen *et coll.*, 2012).

AKT joue également un rôle essentiel dans l'organisation et la stabilisation de l'actine du cytosquelette lors de la migration des PN. Cette activité d'AKT est régulée non seulement par la voie PI3K, mais aussi par via le complexe mTORC2 (Zhang *et coll.*, 2013). Certaines études suggèrent qu'AKT est une composante essentielle du chimiotactisme des PN. Ceci est confirmé par des travaux récents sur des souris *knock-out* pour l'AKT (AKT-KO) qui ont montré que les trois isoformes d'AKT ont des rôles différents dans la régulation des fonctions des PN. La migration cellulaire et la phosphorylation d'AKT1 ont été fortement affectées dans des PN déficients en AKT2, alors que dans les PN sauvages, seule AKT2 mais pas AKT1 transloque vers la membrane plasmique lors de la stimulation par le chimioattractant. Ces mêmes PN déficients en AKT2 ont également montré une diminution de la dégranulation induite aussi bien par le fMLP que par le PMA (Chen *et coll.*, 2012). Ainsi, les voies régulées par AKT sont au cœur de nombreuses fonctions du PN.

### **c. La protein kinase “mammalian Target Of Rapamycin”**

Un effecteur important en aval de la voie PI3K/AKT est la protéine *mammalian Target Of Rapamycin* (mTOR) qui, comme la PI3K, appartient à la famille des « *phosphatidylinositol kinase-related kinases* (PIKK) ». mTOR est une Sérine/thréonine protéine kinase ubiquitaire atypique de 289 kDa connue initialement pour jouer un rôle important dans la survie, la mobilité et la prolifération cellulaire notamment dans les cancers (Foster, 2009). Son activité est inhibée par la Rapamycine (Sirolimus), un antibiotique initialement utilisé comme anticancéreux et maintenant comme immunosuppresseur (Ponziani *et coll.*, 2011).

La protéine mTOR constitue l'une des rares enzymes qui fonctionnent au sein de deux complexes distincts nommés *mTOR complex 1* (mTORC1) et *mTOR complex 2* (mTORC2) (Zoncu *et coll.*, 2010). Ainsi, mTOR est associée au moins à deux partenaires uniques qui forment deux complexes distincts: « *regulatory-associated protein of mTOR* » (RAPTOR) pour mTORC1 et « *rapamycin-insensitive companion of mTOR* » (RICTOR) pour mTORC2. Le

mTORC1 est sensible aux nutriments et contrôle en partie la croissance cellulaire par la phosphorylation de ses deux substrats: S6 kinase 1 (S6K1) et eIF-4E Binding Protein1 (4EBP1). Cependant, mTORC2 module la survie des cellules en réponse à des facteurs de croissance en phosphorylant ses effecteurs en aval Akt/PKB, PKA et le « *serum/glucocorticoid regulated kinase 1* (SGK1) » (Zhou *et* Huang, 2010).

mTOR constitue l'effecteur principal en aval de la PI3K et de l'AKT (Weichhart *et* Säemann, 2008). La PI3K induit l'activation d'AKT via la génération du PIP3, alors que AKT induit l'activation du complexe mTORC1 selon deux mécanismes : une levée de l'inhibition de mTORC1 via l'inactivation de l'hétérodimère TSC1/TSC2 (Inoki *et coll.*, 2002) et l'induction de la dégradation du répresseur PRAS40 (Wiza *et coll.*, 2012). Parallèlement à la voie PI3K-AKT, les protéine kinases p38-MAPK et COT activent également mTORC1 via la phosphorylation de TSC2 médiée par MK2 et ERK, respectivement (Weichhart *et coll.*, 2015). En outre, l'acide phosphatique généré par la PLD, interagit avec mTORC1 et l'active également (Yoon *et coll.*, 2011). En revanche, AKT et PKC sont des effecteurs majeurs de mTOR. Ainsi, AKT est directement phosphorylée sur la Ser473 par mTORC2 (Frias *et coll.*, 2006). Quant à l'activation des PKC, mTORC2 participe à la phosphorylation des sites thréonine 638/641 des PCK $\alpha/\beta$ II, de la thréonine 560 des PKC $\zeta$  (Li *et* Gao, 2014) ainsi que des sérines 657/660 de toutes les PKC conventionnelles et de certaines nouvelles PKC (nPKC) (Ikenoue *et coll.*, 2008).

Etant donné que PI3K-AKT, PLD, PKC, p38-MAPK et ERK sont des effecteurs majeurs de la réponse immunitaire innée du PN, ceci impliquerait que mTOR pourrait occuper une place importante dans la régulation des fonctions de ces cellules. Effectivement, l'équipe de Dr. Périanin a montré récemment que mTORC1s'active très rapidement en présence de fMLP et constitue un nouvel effecteur dans l'explosion oxydative (Rolas *et coll.*, 2013) en favorisant la phosphorylation de la Ser345 de la p47<sup>phox</sup> du complexe NOX2, très probablement via la p38-MAPK (Rolas *et coll.*, 2013). La kinase mTOR pourrait également contribuer à la régulation de l'émission des NET (Itakura *et* McCarty, 2013). Cependant, bien que mTOR soit impliquée dans le remodelage du réseau d'actine, il n'y a actuellement pas d'évidence de son implication dans les processus de dégranulation du PN ; mais nos travaux en cours suggèrent cependant que mTORC1 serait impliquée.

### **I.3.2.5. MAP Kinases (MAPK)**

Les MAP Kinases (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) sont des "*proline-directed serine/threonine kinases*", et sont subdivisées en trois familles : les ERK (*Extracellular-Regulated Kinases*), les c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK, appelées également SAPK) et les p38-MAP kinases (Downey *et coll.*, 1998). Au moins deux isoforme de ERK (ERK1 et ERK2) sont

exprimées chez le PN, ce sont des protéines de 42 et 44 kDa (p42/p44MAPK), respectivement. La famille des p38-MAPK comprend quatre homologues: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  et p38 $\delta$  MAPK, mais seulement p38 $\alpha$  et p38 $\delta$  ont été identifiées dans le PN (Chen *et coll.*, 2005). De plus, seules les voies ERK et p38 MAPK mais non pas JNK, sont activées en réponse au fMLP, PMA, GM-CSF et TNF (Dewas *et coll.*, 2003).

L'activation des MAPK se fait via une cascade dans un module comportant trois effecteurs. La première étape implique l'intervention des MEKK1 (MAP kinases Kinases Kinases 1). Les MEKK induisent l'activation d'un groupe de protéines kinases, les MEK (MAP kinases kinases). L'activation des MEKK et MEK se fait par phosphorylation au niveau des résidus sérines et thréonines (Avdi *et coll.*, 2002). Les MEK sont un groupe de protéine kinases à double spécificité qui reconnaissent et phosphorylent les MAPK au niveau des résidus thréonine et tyrosine au sein du motif Thr-Gly-Tyr (Rane *et coll.*, 2001). Les MEK3/6 (membres des MEK) activent les p38-MAPK, alors que les p42/44-MAPK (ERK1/2) sont plutôt activées par les MEK1/2 (Downey *et coll.*, 1998). L'activation des MAPK se fait par l'intermédiaire de la petite GTPase Ras (p21<sup>ras</sup>) qui facilite l'activation de Raf-1 qui phosphoryle et active la famille des MEK, aboutissant à la phosphorylation et l'activation des MAPK (Avdi *et coll.*, 1996; Downey *et coll.*, 1998). Il a également été rapporté que les MAPK peuvent être activées via de nombreuses voies transductionnelles dans le PN incluant la PI3K (Chen *et coll.*, 2005), la PKC qui active les MAPK via la protéine Raf (Krump *et coll.*, 1997), et enfin via les tyrosine kinases (Zhang *et coll.*, 1998). En outre, le blocage de p38-MAPK inhibe l'adhésion, le chimiotactisme, la dégranulation et la production de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> par les PN (Lian *et coll.*, 1999). Récemment, Rolas *et coll.* (2013) ont montré que blocage de mTORC1 par la rapamycine réduit significativement la phosphorylation de p38-MAPK ainsi que sa cible la Ser345 de la p47<sup>phox</sup>, ce qui indique que p38-MAPK pourrait constituer un effecteur en aval de mTOR.

#### **I.3.2.6. Tyrosine Kinases**

Différentes familles de tyrosine kinases sont exprimées dans les PN: les Src tyrosine kinases (Lyn, Hck, Fgr, Yes et c-Src), les Syk tyrosine kinases et les Pyk2 tyrosine kinases (*Proline rich tyrosine kinases*) (Bokoch, 1995 ; Lowell *et Berton*, 1999). L'activation des tyrosine kinases est induite via des récepteurs membranaires liés à la protéine G tel que celui du fMLP (Yamaguchi *et coll.*, 1995). Les tyrosine kinases, notamment la famille des Src-tyrosine kinases, sont activées par la sous unité  $\alpha$  de la protéine G. Les Src-tyrosine kinases activent une petite GTPase (p21<sup>ras</sup>), activée également par la PI3K, via la phosphorylation du Shc. Les Shc sont un groupe de protéines adaptatrices qui possèdent des domaines SH2 et SH3. L'association tyrosine

kinases-Shc induit le recrutement du Grb2 et Sos vers la membrane plasmique (Bokoch, 1995). L'activation de la petite GTPase p21<sup>ras</sup> par les tyrosine kinases conduit à l'activation de la protéine Raf-1 (Nishizuka, 1995) qui peut induire la cascade des MAPK (Walker *et coll.*, 1999). Le complexe formé par le membre Lyn des Src-tyrosine kinase avec le Shc (Lyn-Shc) interagit également avec la PI3K, suggérant ainsi que les tyrosine kinases jouent un rôle dans la régulation de l'activité de la PI3K (Bokoch, 1995). Cependant, certaines études ont rapporté que la phosphorylation tyrosine kinases-dépendante est sensible au wortmannin, inhibiteur de la PI3K, indiquant une possible régulation des tyrosine kinases par la PI3K. La caractérisation d'une nouvelle famille de tyrosine kinases qui contiennent un domaine PH (Plekstrin Homology), famille de Tec tyrosine kinases, a prouvé cette hypothèse et a fourni une évidence du lien possible entre les tyrosine kinases et la PI3K (Gilbert *et coll.*, 2003 ; Lachance *et coll.*, 2003). Enfin, il a été également rapporté que l'activité des tyrosine kinases peut être contrôlée par la PKC (Gaudry *et coll.*, 1993).

De nombreuses études mettent en évidence l'implication des tyrosine kinases dans la régulation des fonctions du PN notamment dans la génération du superoxyde (Mocsai *et coll.*, 1997) et la dégranulation (Ligeti *et Mocsai*, 1999). En outre, l'activation des PN par le fMLP induit la translocation du Fgr (membre des Src-tyrosine kinases) vers la membrane plasmique, cette translocation est associée avec la libération des granules secondaires des PN. Cependant, l'activation de Hck tyrosine kinase est accompagnée de la mobilisation des granules primaires vers le phagosome au sein des PN activés par le zymozan opsonisé (Mocsai *et coll.*, 1999).

### **I.3.2.7. Les petites GTPases**

De nombreuses petites GTPase jouent un rôle important comme partenaires de la signalisation dont les plus importantes sont les Rho GTPase. Ils'agit une sous famille des Ras qui comporte les membres suivants : Rho (A, B et C), Rac (1,2 et 3) et Cdc42 (Cdc42Hs et G25K). Les Rho GTPases existent dans un état inactif lié au GDP, cette liaison est renforcée par l'intervention d'un facteur régulateur de l'activité des petites GTPases, le GDI qui maintient les GTPases inactives dans le cytosol (Kim *et coll.*, 2003). Les Rho GTPases peuvent être activées directement par la sous-unité G $\beta\gamma$  de la protéine G, ainsi que par le PIP<sub>3</sub> produit par la PI3K, alors que les Rac GTPase peuvent être activées par les tyrosine kinases dans des PN humains stimulés par fMLP (Kim *et coll.*, 2003).

Les Rho GTPases interviennent dans la régulation d'un large spectre de fonctions cellulaires. L'activation de la production des ROS est la première fonction qui a été attribuée aux Rac GTPases chez les PN (Philips *et coll.*, 1995). Ainsi, les Rac1/2 sous leurs formes associées au GTP se lient au composant cytosolique p67<sup>phox</sup> et probablement au cytochrome b<sub>558</sub> au niveau

de la membrane plasmique, et participent ainsi à l'assemblage de la NOX2 (Gorzalczany *et coll.*, 2000 ; Li *et coll.*, 2002). Alors que, Les Rho GTPase participent à la dégranulation des PN (Fauschou *et Borreggard*, 2003), la phagocytose (Li *et coll.*, 2002) ainsi que dans la réorganisation du cytosquelette et la migration (Kim *et Dinauer*, 2001). D'autres études ont montré que la régulation de la dégranulation et de la phagocytose des PN humains par les Rac et le Cdc42 se fait probablement via l'activation des MAP kinases (Zhong *et coll.*, 2003

#### **I.4. Dysfonctionnements du neutrophile et pathologies**

Les PN sont des acteurs importants dans la réponse immunitaire innée, la résolution de l'inflammation et la clairance de l'infection. Pour cela, ils disposent de tous les outils moléculaires pour adapter à la perfection leurs fonctions de protection et de défense. Ces fonctions des PN sont finement contrôlées et régulées à différents niveaux. Cependant, dans certaines situations, une réponse inappropriée ou un dysfonctionnement des PN peut également s'avérer délétère pour l'organisme, et conduit ainsi à la progression de nombreuses pathologies. Ci-après sont rapportés certains exemples des désordres pathologiques qui peuvent affecter le fonctionnement des PN.

##### **I.4.1. Les désordres d'homéostasie**

Les premiers désordres affectant des PN peuvent résulter de la diminution de leur nombre dans le sang ou la neutropénie. Les neutropénies sont le résultat d'un ou de plusieurs défauts dans la différenciation ou la prolifération dans la moelle osseuse, ou de la destruction périphérique accrue. Ces désordres sont regroupés sous le terme de Neutropénies Chroniques Sévères. Bien que rares, de nombreuses mutations ont été identifiées et qui donnent lieu à des défauts de maturation des PN. Ces syndromes sont collectivement connus comme une Neutropénie Congénitale Sévère (*Severe Congenital Neutropenia, SCN*). Les PN des patients atteints de SCN présentent souvent un arrêt de maturation caractéristique au stade promyélocyte de leur différenciation. Environ 60-75% des cas SCN sont dues à des mutations dans le gène codant pour l'élastase du PN. Une autre cause de la neutropénie chronique est la destruction massive des PN circulants ou de leurs précurseurs. La cause principale de cette destruction est immunologique, des anticorps auto-immuns peuvent induire la destruction périphérique des PN et/ou inhiber la myélopoïèse dans la moelle osseuse. Cependant, les infections au cours de la neutropénie auto-immune (*Auto-Immune Neutropenia, AIN*) sont moins graves par rapport à la neutropénie congénitale sévère (Lakshman *et Finn*, 2001).

#### **I.4.2. Les désordres d'activités fonctionnelles**

Ce sont des désordres qui affectent une ou plusieurs fonctions du PN. Les désordres fonctionnels comprennent les déficits de chimiotactisme, de l'adhésion, de la phagocytose et de l'explosion oxydative. L'exemple le plus connu des déficits fonctionnels des PN est causé par une déficience génétique d'une ou plusieurs sous-unités de la NOX2 au cours de la granulomatose septique chronique (*Chronic Granulomatous Disease, CGD*) (Babior, 1999, 2004 ; Mayadas *et coll.*, 2014). La CGD est caractérisée par une absence totale ou une expression incorrecte de l'un des composants de la NOX2 se manifestant par des infections graves et/ou répétées à différents agents pathogènes principalement bactériens et fongiques. Ces agents ne pouvant être éliminés efficacement se développent dans les milieux extracellulaires et à l'intérieur de phagosomes, générant des granulomes généralement sous cutanées, c'est à dire des foyers inflammatoires chroniques sous forme d'amas de cellules épithélioïdes entourés de lymphocytes ou d'agrégats de cellules phagocytaires.

Les PN peuvent également présenter des défaillances de mouvement leur empêchant de rejoindre les foyers inflammatoires où ils sont sensés agir. Ces défaillances touchent l'adhérence des PN aux cellules endothéliale et la migration chimiotactique. Cette défaillance conduit à une altération du recrutement des PN dans les sites d'infection ou d'inflammation, avec souvent une neutrophilie relative dans le sang périphérique, voir encore formation de pus (Dinauer, 2007).

Un autre exemple d'anomalies fonctionnelles des PN est le déficit de la Myéloperoxydase. Cette atteinte est très fréquente, avec une incidence comprise entre 1/2000 et 1/4000 dans la population générale. Elle se traduit par un défaut mineur d'élimination des pathogènes causé par une absence d'activité de la MPO. Elle est due à une mutation dans le gène MPO sur le chromosome 17. Les granulocytes déficients en MPO ont une défaillance de génération de l'hypochlorite (HOCL), mais une production normale d'anion superoxyde, et une réponse phagocytaire très peu affectée. Certaines défaillances de la MPO induisent une légère altération de la phagocytose de *S aureus* mais plus importante altération de la phagocytose de *Candida albicans*. La plupart des individus présentant un déficit de la MPO sont complètement asymptomatique; alors ceux qui souffrent de candidose récurrente ou sévère peuvent aussi avoir un diabète ou d'autres compromis dans la fonction immunitaire (Lakshman *et Finn*, 2001).

#### **I.4.3. Les désordres de régulation**

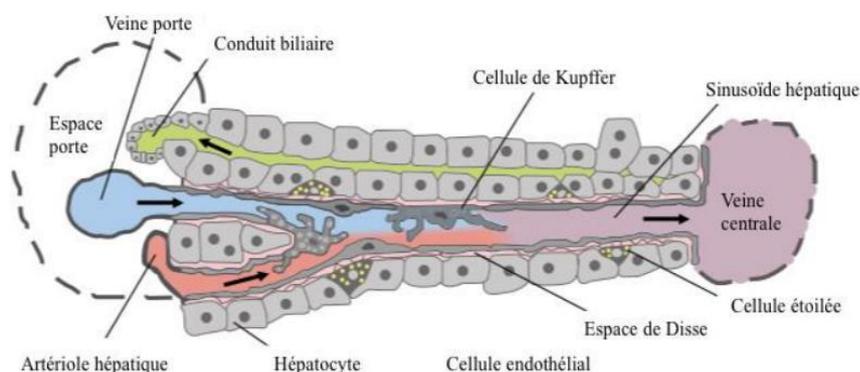
Les fonctions du PN sont finement régulées pour assurer une réponse appropriée qui permet une bonne protection contre les agents pathogènes. Cette régulation permet de limiter les réponses des PN à l'élimination des agents pathogènes sans induire des lésions tissulaires et

inflammatoires nuisibles. Lorsque les mécanismes de régulation de ces fonctions sont défaillants, le PN devient par son activation excessive la principale cause de graves lésions tissulaires qui sont à l'origine de nombreuses maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde, l'asthme et l'emphysème pulmonaire. Le foie est également un organe important qui constitue dans certains cas une cible pour les effets néfastes des réponses inappropriées des PN. Les hépatocytes représentent une cible éminente de ces effets dans le foie. Les PN n'attaquent normalement pas les hépatocytes sains. Cependant, durant l'inflammation du foie, les FRO générées par les PN activés ainsi que les enzymes libérées, endommagent les hépatocytes et déclenchent un stress oxydant intracellulaire, la dysfonction mitochondriale et éventuellement une nécrose cellulaire oncotique (Jaeschke *et* Hasegawa, 2006). Les effets induits par les PN ont été observés dans différents cas, incluant animaux incluant l'hépatite alcoolique (Bautista, 2002 ; Ramajah *et coll.*, 2004) la stéatose alcoolique (Lucey *et coll.*, 2009). Ces dommages du foie pourraient avoir, par la suite, des conséquences graves sur les activités des PN. Notre étude est consacrée à l'une de ces atteintes du foie, la cirrhose hépatique décompensée où les PN jouent un rôle important dans le développement de la maladie puis en subissent des conséquences graves. Ceci sera détaillé dans le chapitre suivant.

## II. Le neutrophile et la cirrhose hépatique décompensée

### II.1. Le Foie

Le foie est un organe vital assurant une large variété de fonctions essentielles pour l'organisme : détoxification de métabolites, synthèse d'hormones, de protéines et enzymes nécessaires pour la digestion. Le foie représente le plus grand organe solide dans le corps avec deux entrées pour son approvisionnement en sang. Il reçoit 80% de son approvisionnement en sang de l'intestin par la veine Porte, qui est riche en produits bactériens, des toxines de l'environnement, et les antigènes alimentaires. Les 20% restants proviennent de la vascularisation par l'artère hépatique. Sur le plan anatomique, est architecturé sous forme de sinusoides hépatiques (**Schéma 13**).



**Schéma 13. Architecture d'une sinusoïde hépatique** (Adapté de Frevert *et coll.*, 2005 dans Rolas, 2015)

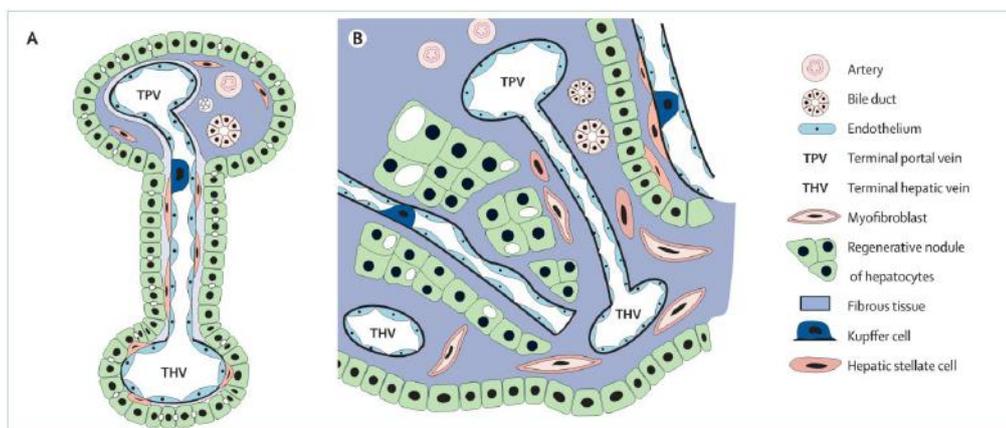
Soixante-dix pourcent des cellules (ou 80% du volume du foie) sont des cellules parenchymateuses, les hépatocytes qui répondent aux besoins métaboliques et de détoxification du corps. Les cellules restantes sont composées de cellules non parenchymateuses, y compris les cellules endothéliales qui tapissent les capillaires sanguins, les cellules de Kupffer qui représente les macrophages résidents du foie, et les cellules étoilées (Li *et coll.*, 2008 ; Gao *et coll.*, 2008).

En plus de ces fonctions métaboliques, le foie constitue un organe pivot dans l'immunité innée car il contient des leucocytes, des macrophages (cellules de Kupffer) et des natural killers NK, qui tous participent à la défense contre les bactéries et les tumeurs en produisant des cytokines pro-inflammatoires. Cependant, ces cellules sont aussi parfois impliquées dans les lésions des hépatocytes, le choc septique et la défaillance de plusieurs organes (Sek *et coll.*, 2012). Ainsi, le foie est aussi exposé aux produits bactériens, toxines et antigènes dérivés des aliments et alcools. Cependant, cette exposition continue recèle le danger que ces substances toxiques qui doivent être dégradées ou éliminées conduisent à des dommages tissulaires de

l'organe (Ramadori *et coll.*, 2008). La plupart des dommages bénins du foie sont souvent suivis d'une récupération complète du foie (Ramadori *et coll.*, 2008), en raison de sa capacité de régénération naturelle suite à un endommagement. Ainsi, à partir d'une ablation des 2/3 du foie, l'organe a la capacité de retrouver sa masse initiale en deux semaines (Michalopoulos et DeFrances, 1997). Cependant, dans certaines atteintes du foie, telles que les hépatites, la non-réparation ou la réparation inadéquate des dommages conduisent à une inflammation chronique suivie de la mort des hépatocytes et la fibrose du foie (Ramadori *et coll.*, 2008).

## II.2. La cirrhose hépatique

La cirrhose hépatite est une atteinte grave du foie suite d'un remodelage irréversible de l'architecture du foie associé à une détérioration voire perte complète des fonctions de l'organe. Sur le plan pathologique. La cirrhose est un syndrome anatomopathologique correspondant à l'évolution de la plupart des maladies chroniques du foie (Schuppan *et Afdhal*, 2008). Elle résulte de différents mécanismes de lésions hépatiques qui conduisent à une nécrose inflammatoire et une fibrogenèse. Histologiquement, elle est caractérisée par une régénération nodulaire diffuse entourée de bandes fibrotiques denses avec pour conséquence, l'extinction du parenchyme hépatocytaire et l'effondrement des structures du foie, causant ainsi une distorsion prononcée de l'architecture vasculaire hépatique (**Schéma14**). Cette déformation se traduit par une résistance accrue au flux sanguin de la veine porte et donc une hypertension portale, ainsi qu'un dysfonctionnement de synthèse hépatique. Cliniquement, la cirrhose est considérée comme une maladie en phase terminale qui conduit inévitablement à la mort, à moins que la transplantation hépatique ne soit effectuée. Les seules stratégies préventives sont le dépistage des varices œsophagiennes et le carcinome hépatocellulaire (Tsochatzis *et coll.*, 2014).



**Schéma 14. Représentation schématique des altérations vasculaires et architecturales du foie (sinusoïde hépatique) au cours de la cirrhose. (A) Un foie sain et (B) Un foie cirrhotique (Schuppan *et Afdhal*, 2008)**

L'hépatite C chronique ou la consommation excessive d'alcool représentent les causes les plus courantes de la cirrhose. L'obésité, associée à la stéatohépatite non alcoolique, devient également une cause fréquente de maladies chroniques du foie conduisant à la cirrhose, soit comme la cause unique ou en combinaison avec de l'alcool, l'hépatite C ou les deux. D'autres causes incluent l'hépatite B, l'hépatite D, la cirrhose biliaire primitive et l'hépatite auto-immune (Pinzani *et coll.*, 2011).

### **II.2.1. Physiopathologie de la cirrhose**

La cirrhose hépatique survient en conséquence d'un endommagement du foie suite à une agression alcoolique ou virale. La transition de l'hépatite chronique à la cirrhose implique une inflammation, l'activation des cellules étoilées hépatiques suivie de fibrogenèse, l'angiogenèse et la disparition des lésions parenchymateuses causées par une occlusion vasculaire (Tsochatzis *et coll.*, 2014). L'inflammation chronique conduit à des lésions qui affectent la matrice extracellulaire ou les tissus conjonctifs principalement composés de collagène. La réparation de ces tissus engendre la mise en place de cicatrises caractéristiques de fibroses hépatiques (Friedman SL *et coll.*, 2000), alors que la dégradation de la matrice extracellulaire active les cellules étoilées qui se transforment en myofibroblaste sous l'effet du TGF $\beta$  (facteur de croissance tumorale  $\beta$ ) via le TLR4 (Pal *et Ray*, 2016). Les myofibroblastes produisent une nouvelle matrice extracellulaire composée principalement du collagène type I, normalement présent au niveau des tissus cicatriciels, en remplacement du collagène type IV composant principal de la lame basale (Masuzaki R *et coll.*, 2013). L'intervention d'autres facteurs de croissance (EGF, VEGF, TGF- $\alpha$  etc.) induit une croissance artérielle (angiogenèse) et l'hyperplasie des hépatocytes sous forme de nodules de régénération, ceci est également stimulé par l'augmentation progressive de l'hypoxie tissulaire. La néo-angiogenèse de nouveaux vaisseaux sanguins se produit dans la région fibrotique qui entoure les nodules de régénération (Pinzani *et coll.*, 2011).

A leur tour, les cellules de Kupffer produisent des cytokines telles que le TNF ou d'endothéline (ET-1) (Gabriel *et coll.*, 1998). Cette dernière, l'ET-1, entraîne la contraction des cellules étoilées et des sinusoides hépatiques ralentissant le flux sanguin dans le foie créant alors un bouchon (Bosch *et coll.*, 2008). Ceci crée une résistance au flux sanguin portal conduisant ainsi à une hypertension portale. Cette désorganisation architecturale et vasculaire du foie associée à l'hypertension portale est à l'origine de nombreuses répercussions sur les autres organes (Tsochatzis *et coll.*, 2014). Ainsi, des complications majeures systémiques participent à des dysfonctionnements rénaux, cardiaques et du système endocrinien (Figueiredo *et coll.*, 2012). Au niveau de l'appareil digestif, l'hypertension portale se répercute au niveau des capillaires

sanguins intestinaux affluant et augmente la pression hydrostatique. Ceci provoque de nouvelles complications telles que le développement d'ascites, de saignements intestinaux mais encore des dommages rénaux et une hypertension pulmonaire (Bosch *et coll.*, 2008). Le développement d'ascites est un facteur de risque pour le développement spontané de péritonites tandis que l'hypertension pulmonaire se manifeste avec des défaillances cardiaques (Wiest *et coll.*, 2014). C'est alors la forme décompensée de la cirrhose hépatique.

#### I.4.2.3. Classification de la cirrhose

La cirrhose est une cause de mortalité en croissance dans le monde, responsable de 3,8% des décès (Blachier *et coll.*, 2013 ; Moreau et Rautou, 2014). La mortalité à 1 an associée à la cirrhose hépatique varie fortement, elle est comprise entre 1% et 57%. Elle dépend de l'apparition clinique de forme dite décompensée, c'est-à-dire liée à la survenue de complications et de défaillances d'autres organes (D'Amigo *et coll.*, 2006). Dans le cas de la cirrhose décompensée, et bien que le traitement aux corticoïdes soit recommandé et améliore la survie, la mortalité reste élevée et 35% des patients meurent dans 6 mois (Moreau et Rautou, 2014). Elle conduit à des complications graves tel que des ascites, le sepsis ou encore une encéphalopathie. La cirrhose peut ensuite évoluer en un carcinome hépatocellulaire (*hepatocellular carcinoma, HCC*). Selon l'état de progression et les complications associées, la cirrhose est classifiée selon 4 voire 5 stades (Tableau 5).

**Tableau 5. Evolution de la cirrhose hépatique** (d'après D'Amigo *et coll.*, 2006).

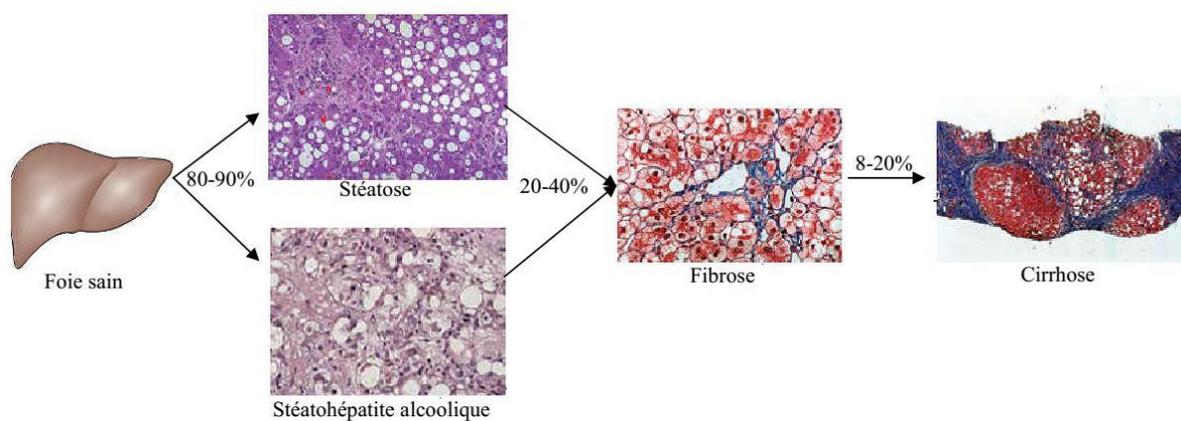
Stade	Complications	Mortalité
Stade 1	Forme compensée	1%
Stade 2	Forme compensée avec varice œsophagiennes	3-4%
Stade 3	Forme décompensée avec apparition d'ascites	20%
Stade 4	Forme décompensée avec d'ascites et saignements intestinaux	57%
Stade 5	Forme décompensée avec infections et défaillances rénales	70%

L'évaluation de la sévérité de la cirrhose est importante pour la prédiction de ses complications et de la survie des patients. Deux moyens d'évaluation généralement utilisés sont le score Child-Pugh et le score MELD (*Model for End-stage Liver Disease*). Le score Child-Pugh est utilisé pour évaluer la sévérité des atteintes hépatiques. Il se base sur les paramètres biochimiques du foie tels que le taux de bilirubine sanguine, l'albumine sérique et le temps de la prothrombine ; mais aussi les paramètres cliniques tels que l'ascite et l'encéphalopathie (Peng *et coll.*, 2016). Ce score permet de répartir la sévérité de la cirrhose en 3 groupes sur une échelle de 15 scores (Reddy et Civan, 2016). Le score MELD, introduit en 2002, incorpore 3 variables objectives seulement : la bilirubine totale, la créatinine, et le ratio normalisé international INR

(*International Normalized Ratio*). Il a été utilisé pour classer la priorité d'une transplantation hépatique (Peng *et coll.*, 2016). Le MELD permet d'évaluer l'espérance de survie des patients cirrhotique sur la base d'un score allant de 1 à 40.

### II.2.3. Rôle de l'alcool dans le développement de la cirrhose

Le spectre des lésions du foie liées à l'alcool varie de simple stéatose à la cirrhose. Ces lésions ne sont pas nécessairement des étapes distinctes de l'évolution de la maladie, mais plutôt de multiples étapes qui peuvent être présents simultanément chez un patient donné (**Schéma 15**). Elles sont souvent regroupées en trois stades histologiques, stéatose simple ou le foie gras, l'hépatite alcoolique (AH), et l'hépatite chronique avec fibrose ou la cirrhose (O'Shea *et coll.*, 2010). L'éthanol, principal composant de l'alcool, diffuse facilement à travers les membranes cellulaires et son métabolisme est favorisé par de nombreux facteurs tels que le sexe, l'âge, l'origine ethnique et le poids corporel. Environ 10% d'éthanol est directement éliminé par les poumons, les reins et la sueur sous sa forme inchangée (Louvet et Mathurin, 2015).



**Schéma 15. Progression de la cirrhose hépatique alcoolique.** Les pourcentages représentent le taux de patients qui progressent d'une étape à l'autre (adapté à partir d'Altamirano et Bataller, 2011).

L'alcool est normalement métabolisé par les hépatocytes via un mécanisme impliquant des oxydations et transformant l'alcool en composés transitoires (Acétaldéhyde, acétate) toxiques mais rapidement éliminés. Cependant, en cas de consommation excessive d'alcool, l'éthanol n'est pas assez rapidement métabolisé, provoquant ainsi l'accumulation d'intermédiaires toxiques tels que l'acétaldéhyde capables de générer également du NADH et des radicaux libres. Cette accumulation de déchets métaboliques entraîne des dégâts au foie et initie une phase stérile de l'inflammation hépatique (Rocco *et coll.*, 2014).

La principale voie métabolique impliquée dans la biotransformation de l'éthanol est l'oxydation en acétaldéhyde. Ce procédé utilise le  $\text{NAD}^+$  et se fait principalement par l'alcool

déshydrogénase principalement exprimée dans le foie. L'augmentation du NADH perturbe le métabolisme des glucides et des lipides provoquant l'augmentation de corps gras dans le foie. L'acétaldéhyde modifie les propriétés chimiques des molécules, induit la peroxydation des lipides participant ainsi à la destruction des hépatocytes, et transforme des protéines normales en protéines antigéniques. Il augmente aussi la fabrication de collagène qui tend à se déposer dans le foie et entrave la bonne cicatrisation de l'organe (Zhang *et coll.*, 2007). Deux autres systèmes peuvent conduire à l'oxydation de l'éthanol: la catalase, et le système d'oxydation microsomale qui fait intervenir les cytochromes P450. Quelle que soit la voie impliquée après oxydation, la plus grande partie de l'acétaldéhyde est convertie en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase. Cette réaction est catalysée par  $NAD^+/NADH$  et augmente les quantités de NADH dans le foie. L'alcool déshydrogénase, l'aldéhyde déshydrogénase et le P450 sont principalement exprimées dans les hépatocytes, ce qui explique la grande toxicité de l'éthanol sur ces cellules. Le métabolisme de l'éthanol conduit également à l'accumulation de FRO, principalement du peroxyde d'hydrogène et de l'anion superoxyde, qui est exacerbée par l'hypoxie, la translocation bactérienne et des cytokines pro-inflammatoires. Du fait de leur forte réactivité, ces radicaux se lient rapidement à l'éthanol ou aux atomes de fer pour former des métabolites réactifs tels que  $l'OH^\circ$ , le  $FeO$  ou l'hydroxyéthyle radicalaire ( $CH_3CHOH^\circ$ ). Ces molécules sont responsables de la peroxydation des lipides membranaires (Louvet *et Mathurin*, 2015).

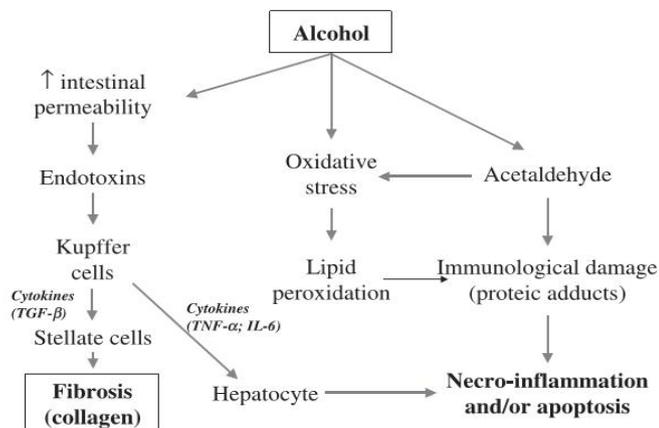


Schéma 16. Rôle de l'alcool et de ses métabolites dans la cirrhose hépatique (Gramenzi *et coll.*, 2006).

### II.3. Rôle des neutrophiles dans la physiopathologie de la cirrhose

Le foie constitue un passage obligatoire pour le sang provenant des intestins avant de rejoindre le reste des organes. Ce passage via la veine Porte apporte au foie les nutriments mais permet également le passage d'agents pathogènes et de leurs métabolites toxiques. Cette place dans l'organisme fait qu'il soit continuellement exposé aux produits bactériens, toxines et antigènes dérivés des aliments. Comme pour les autres tissus, les PN jouent un rôle important

dans le système de défense anti-infectieuse du foie. Cependant, leurs réponses inappropriées sont connues pour induire des dommages au foie. Par conséquent, l'activation des PN du foie est considérée comme une arme à double tranchant (Xu *et coll.*, 2014).

### **II.3.1. Rôle néfaste des neutrophiles**

Les PN sont pointés du doigt dans toutes les cirrhoses hépatiques à cause de leurs effets destructeurs sur les tissus du foie au cours des inflammations chroniques. Des lésions hépatiques médiées par les PN ont été rapportées dans de nombreuses atteintes du foie, y compris la cirrhose hépatique (Ramaiah *et Jaeschke*, 2007). Le premier indice d'implication des PN dans les cirrhoses est illustré par leur forte infiltration dans le foie au cours de la progression de la maladie (Xu *et coll.*, 2014). Les cellules de Kupffer, les phagocytes résidents du foie, sont capables d'éliminer des microorganismes mais facilitent également la génération de médiateurs inflammatoires conduisant au recrutement de cellules inflammatoires telles que les PN. Les médiateurs inflammatoires produits par les cellules de Kupffer comprennent le TNF- $\alpha$ , les interleukines (IL1 et IL-6), des chimiokines et des FRO. Ces médiateurs inflammatoires recrutent et activent ensuite les PN dans l'environnement hépatique (Ramaiah *et Jaeschke*, 2007).

Les PN n'attaquent normalement pas les hépatocytes sains. Cependant, durant l'inflammation du foie, la présence de chimiokines (Colletti *et coll.*, 1996) et le fait que ces hépatocytes ont une forte expression d'ICAM1 à leur surface font qu'ils deviennent une cible des PN (Farhood *et coll.*, 1995). Les FRO générées par les PN activés, en particulier l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diffusent dans les hépatocytes provoquant un stress oxydant intracellulaire perturbant la fonction des mitochondries. Les protéases (élastase) libérées par les PN activés contribuent également aux dommages hépatiques, l'activation des cellules de Kupffer et le recrutement d'autres PN, ce qui a pour conséquence d'entretenir l'état d'inflammation. Ces dommages du foie induits par les PN ont été observés dans différents modèles animaux incluant l'ischémie-reperfusion (Jaeschke *et coll.*, 1990), endotoxémie (Jaeschke *et coll.*, 1991), l'hépatite alcoolique (Bautista, 2002 ; Jaeschke *et coll.*, 2002 ; Ramaiah *et coll.*, 2004) ou cholestase obstructive (Guiral *et coll.*, 2004), ainsi que chez des patients ayant une stéatose alcoolique (Lucey *et coll.*, 2009).

La cirrhose hépatique décompensée favorise la translocation des bactéries de la flore intestinale vers la circulation systémique et le taux d'endotoxines circulants comme précédemment décrit. Les travaux de Taylor *et coll.* montrent que les patients atteints de cirrhose hépatique stable et qui présentent des PN avec une forte production spontanée de FRO sont ceux qui présentent le plus fort risque de développer des complications et des défaillances multiples d'organes (Taylor, 2014). Les travaux de Mookerjee soulignent quant à eux que la phagocytose

réduite et la production spontanée de FRO élevée des PN circulants de patients cirrhotiques sont induites par la présence d'endotoxine dans le plasma des patients (Mookerjee *et coll.*, 2007).

Tous ces éléments permettent de souligner le rôle à double tranchant du PN. Ils participeraient aux dégâts hépatiques dans les stades précoces des maladies hépatiques alors qu'à l'inverse leurs dysfonctions participent à l'apparition des défaillances multiples associées aux cas graves de cirrhose hépatique. Cependant de récents travaux viennent complexifier l'état des lieux et commencent à suggérer l'hypothèse que l'activité des PN serait également bénéfique dans les pathologies hépatiques (Moreau *et Rautou*, 2014; Rolas, 2015).

### **II.3.2. Rôle protecteur des neutrophiles**

Malgré leurs effets néfastes, les PN pourraient jouer un rôle dans la protection du foie contre les lésions et les invasions de pathogènes. Les PN recrutés au niveau du foie par les différents médiateurs inflammatoires sécrétés par les cellules de Kupffer et d'autres cellules du foie, participent activement à l'élimination des pathogènes par la mise en œuvre de leurs fonctions microbicides. Dans les lésions stériles (absence de pathogènes), les PN ne fonctionnent pas comme effecteurs antimicrobiens; mais ils nettoient les débris des dommages tissulaires et lancent le processus de cicatrisation (Xu *et coll.*, 2014).

En plus de leur capacité à éliminer les agents pathogènes, les PN ont également le potentiel pour réguler la réponse immunitaire. Ainsi, les neutrophiles participent à la résolution de l'inflammation par la libération des protéases qui peuvent dégrader et inactiver les cytokines pro-inflammatoires. Les PN sont également capables de libérer des cytokines anti-inflammatoires qui contribuent à la résolution de l'inflammation. En plus, l'infiltration du foie par des PN pourrait être bénéfique pour la survie des patients (Altamirano *et coll.*, 2014). Ainsi, la collagénase libérée par les PN infiltrant le foie joue un rôle important dans la bonne réparation tissulaire et la diminution de la fibrose hépatique car elle dégrade les filaments de collagène (Siller-Lopez *et coll.*, 2004). En outre, le traitement de rats par la MMP8 entraîne l'augmentation de HGF dans le foie et permet la prolifération des hépatocytes en remplacement de ceux détruits (Michalopoulos *et coll.*, 1984 ; Siller-Lopez *et coll.*, 2004). Le PN peut être, en outre, une source de HGF et donc jouer un rôle dans la régénération normale du foie (Taïeb *et coll.*, 2002).

### **II.4. Dysfonctionnements du neutrophile au cours de la cirrhose hépatique**

De nombreuses études impliquent les PN, comme rapporté ci-avant, dans la progression de la cirrhose hépatique. Les PN sont considérés comme des effecteurs aggravant l'état de détérioration du foie, mais ils subissent eux-mêmes des modifications nuisibles graves au cours de la progression de la cirrhose, entraînant de nombreux dysfonctionnements. Ainsi, un

dysfonctionnement des PN caractérisé par une forte explosion oxydative en absence de stimulant *in vitro* et une capacité réduite de phagocytose ont été démontrées dans la cirrhose décompensée ainsi que dans l'hépatite alcoolique, et ont été associées à un risque accru d'infection et de mortalité (Tritto *et coll.*, 2011). Les PN montrent également une altération de chimiotactisme au foyer d'infection et une diminution de la migration transendothéliale en conséquence à une adhérence réduite aux cellules endothéliales microvasculaires. Ces dysfonctionnements des PN ont été liés à la persistance de la stimulation *in vivo*, surtout observée chez les patients ayant des taux sériques élevés de cytokines pro-inflammatoires, à cause des multiples infections et de l'état de sepsis général observé au cours de la cirrhose (Albillos *et coll.*, 2014). Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces défaillances de PN sont encore méconnus. Cependant, une défaillance de l'activation de la phospholipase C a été rapportée (Garfia *et coll.*, 2004). Récemment, l'équipe du Dr. Périanin a montré que les PN de patients cirrhotiques sont fortement défaillants pour la production d'anion superoxyde en réponse au fMLP. Cette défaillance est associée à un déficit de phosphorylation de la p47<sup>phox</sup>, liée à un déficit d'activation de p38-MAPK via la kinase mTOR (Rolas *et coll.*, 2013).

Ces données suggèrent que la cirrhose hépatique induit des déficits au niveau moléculaire et de signalisation intracellulaire qui seraient à l'origine des défaillances fonctionnelles des PN des patients cirrhotiques. Dans la partie expérimentale de notre étude, nous apportons d'autres éléments de réponse concernant les mécanismes de dégranulation des PN de patients cirrhotiques.

## **II.5. Traitement de la cirrhose**

Pour le moment, il n'y a pas de traitements curatifs efficaces pour la cirrhose hépatique ni pour les dysfonctionnements des PN associés à cette pathologie. Les patients cirrhotiques dans la phase décompensée de la maladie présentent des infections multiples et un sepsis général, et meurent au bout de 6 mois s'ils sont hospitalisés et de 1 mois pour les non-hospitalisés (Moreau *et Rautou*, 2014). Les traitements classiques à base d'antibiotiques et d'antifongiques sont peu satisfaisants du fait du pourcentage de mortalité encore élevé (35% au bout de Six mois d'hospitalisation), ceci d'autant que ces antibiotiques altèrent aussi les fonctions de défense des PN (Labro, 2000). Certains traitements à base de Prednisolone ont permis une amélioration à 90 jours de la survie de patients atteints d'hépatite grave (Ramond MJ *et coll.*, 1992). D'autres approches mettent en avant l'effet bénéfique d'un traitement par le G-CSF sur des patients atteints d'hépatites graves. Une survie des patients a pu également être obtenue (Garg *et coll.*, 2012 ; Singh *et coll.*, 2014). Cependant, ces traitements restent insuffisants pour remédier la défaillance sévère du foie cirrhotique et à inverser l'état de dysfonctionnement des PN.

# *Etude Expérimentale*

# *Matériels et Méthodes*

### III. Matériels et Méthodes

#### III.1. Matériels

##### III.1.1. Patients

Le sang a été obtenu à partir de patients hospitalisés dans l'unité du Foie de l'hôpital Beaujon (Clichy, France). Les critères d'inclusion étaient : âge supérieur à 18 ans, cirrhose hépatique prouvée par biopsie avec un score Child-Pugh de classe B ou C, historique d'abus excessif d'alcool (50g/jour), mais aucune autre cause d'affection hépatique. Les sérologies virales pour l'hépatite B et C étaient négatives. La consommation d'alcool a été arrêtée depuis au moins 3 jours. Les patients non traités ou récemment traités (moins d'une semaine) contre les infections bactériennes ou l'hémorragie gastro-intestinale n'étaient pas inclus dans l'étude. Les cultures effectuées avec l'ascite, l'urine et le sang au moment de l'inclusion étaient toutes négatives. D'autres critères d'exclusion étaient le traitement avec des corticostéroïdes, la pentoxifylline ou d'autres traitements immunosuppresseurs pendant les 30 derniers jours, ainsi que la présence du carcinome hépatocellulaire, de tout autre cancer ou infection par le virus d'immunodéficience humaine (HIV). Les autres scores cliniques des patients sont résumés dans le tableau (**Tableau 6**).

Les sujets sains (contrôles) étaient des personnes volontaires employées de l'hôpital Bichat ou de l'hôpital Beaujon, ou des donneurs sains obtenus à partir de l'Etablissement Français du Sang (EFS, Paris, France). Un consentement écrit des patients a été obtenu et l'étude a été approuvée par le comité d'examen institutionnel de l'INSERM.

**Tableau 6. Caractéristiques et scores des patients**

<b>Nombre de Patients</b>	32	Score de Child-Pugh	10,4(±0,3)
Age, année	57,4(±1,4)	Child-Pugh Classe C, n(%)	21(66)
Femmes, n(%)	6(19)	Score MELD*	19,1(±1,1)
Ascite, n(%)	28(88)	Globules blancs, par mm <sup>3</sup>	7 650(±645)
Carcinome hépatocellulaire, n(%)	0(0)	Traitement aux β-bloquants, n(%)	9(28)
Hépatite alcoolique aiguë, n(%)	13(40)	Traitement aux antibiotiques, n(%)	15(47)
Encéphalopathie, n(%)	8(25)	Traitement aux corticostéroïdes, n(%)	0(0)
Albumine sérique, g/L	24,7(1,1)		
Bilirubine sérique, µmol/L	116,2(±21,2)	<b>Historique des Patients</b>	
Créatinine sérique, µmol/L	94,6(±11,1)	Décompensation aiguë, n(%)	28(88)
La protéine C réactive (CRP), mg/L	17,3(±3,5)	Infections bactériennes, n(%)	18(56)
Temps de prothrombine, %	45,7(±2,6)	Hémorragies variqueuses aiguës, n(%)	12(37)
Ration international normalisé	1,8(±0,1)	Hépatite alcoolique aiguë, n(%)	13(40)

± Les valeurs de la variation standard de la moyenne, \* MELD : Model of End-Stage Liver Disease.

### III.1.2. Réactifs

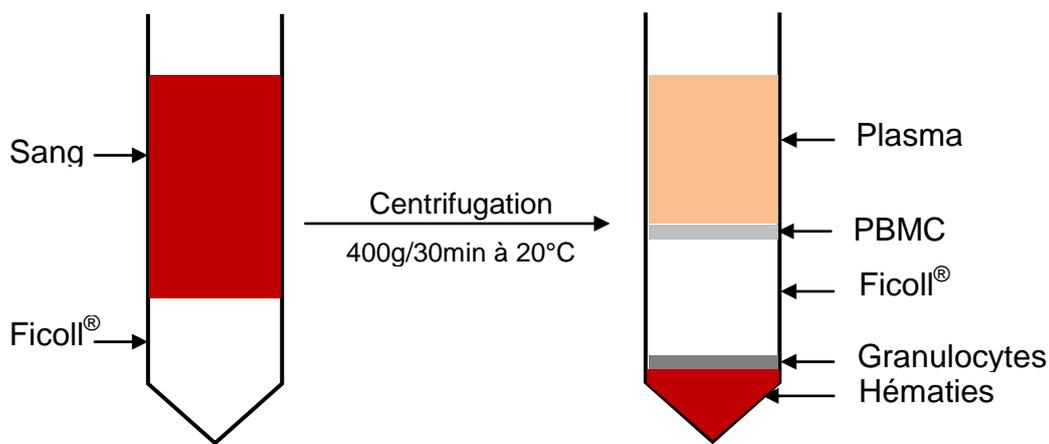
Les anticorps utilisés : antiphospho-ERK1/2(Thr202/Tyr204), antiphospho-p38MAP-Kinases (Thr180/Tyr182), et antiphospho-AKT (S473) provenaient de CellSignaling (Leyde, Pays-Bas), anti-ERK1 et les anticorps conjugués à la peroxydase de Santa Cruz (Heidelberg, Allemagne) et l'anti-actine provenait de Millipore (Saint Quentin-en-Yvelines, France). Le substrat de la myéloperoxydase, Dichlorure d'Ortho-Dianisidine (O-Dianisidine), provenait de Sigma Aldrich (Saint Louis, Michigan, USA). Le substrat fluorescent de Myéloperoxydase (Kit K-747) provenait de Biovision (Milpitas, Etat-Unis). Le cocktail d'inhibiteurs des protéases provenait de Roche (Complete™, Roche). Le tampon de 'stripping' et de traitement des membranes d'immuno-empreinte (western blot) provenaient de Pierce (Pierce Technology ; Rockford, Etat-Unis). Les réactifs de préparation des gels polyacrylamide pour électrophorèse des protéines et pour l'immuno-empreinte provenaient de BioRad (Marnes la Coquette, France). Le kit de transfert des protéines (Ibлот®) provenait de Life Technologies (Saint Aubin, France). CL097 était d'InvivoGen (San Diego, Etats-Unis). Le Ficoll-Hypaque était de GE Healthcare (Life Science, Suède). Tous les autres réactifs étaient de Sigma Aldrich.

## III.2. Méthodes

### III.2.1. Isolement des neutrophiles

Les PN ont été isolés à partir de sang veineux hépariné (10 U/ml) provenant de patients ou de donneurs sains. L'isolement des PN a été effectué dans des conditions d'asepsie totale en trois étapes principales, une sédimentation des globules rouges avec du Dextran, une centrifugation du surnageant sur un gradient Ficoll-Hypaque pour éliminer les leucocytes mononucléés et une lyse des globules rouges (El Benna *et coll.*, 1994). Brièvement, le sang a été dilué au demi avec du DextranT500 à 2% préparé dans du NaCl 0,9% stérile, puis laissé à température ambiante pendant 30 min pour la sédimentation des globules rouges. Le surnageant clair a été récupéré puis centrifugé à 400 g pendant 10 min à 20°C. Les culots ont été suspendus dans du tampon phosphate (PBS) et la suspension cellulaire a été déposée délicatement sur un coussin de Ficoll-Hypaque (2:1, V/V). Les tubes ont été alors centrifugés à 400 g pendant 30 min à 20°C. Les cellules mononucléés (lymphocytes et monocytes) ou "PBMC" (Peripheral Blood Mononuclear Cells) et plaquettes se retrouvaient ainsi concentrés à mi-hauteur du tube, en dessous du plasma dilué et bien séparés des PN qui étaient concentrés dans le culot au fond du tube avec les hématies (**Schéma 17**). Les PBMC ont été ensuite éliminés par aspiration. Le culot des PN a été décollé délicatement et débarrassé des hématies par une brève lyse osmotique

pendant 30-40 sec par addition d'un volume d'eau distillée. L'isotonicité a été rétablie par ajout d'un même volume de NaCl 1,8%. Les PN ainsi purifiés ont été centrifugés (400 g, 10 min), puis lavés une fois avec du PBS et finalement resuspendus dans du tampon HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*), pH 7,4 et contenant 0,90 mM Mg<sup>2+</sup> et 1,2 mM Ca<sup>2+</sup>. Les PN ont ensuite été comptés manuellement à l'aide d'une cellule de Malassez après coloration avec du Bleu Turck, ou à l'aide d'un compteur de cellules, le Scepter (Millipore-Merck KGA, Darmstadt, Germany). Les cellules ainsi préparées contenaient environ 95-98% de PN viables, quantifiées à l'aide du test au Trypan bleu.



**Schéma 17. Séparation des différentes populations cellulaires au cours de l'isolement des neutrophiles à partir du sang humain.**

### III.2.2. Dégranulation des neutrophiles

La dégranulation des PN a été évaluée en mesurant préférentiellement l'activité de la myéloperoxydase (MPO) libérée au cours de la stimulation des PN. Dans certaines expériences, l'activité élastase a également été évaluée. Brièvement, les PN ( $2 \times 10^6 / 400 \mu\text{l}$  HBSS) ont été incubés dans des tubes Eppendorf à 37°C pendant 5min puis stimulés ou pas avec du fMLP dans des conditions indiquées dans la légende des figures. Dans certaines expériences, la dégranulation des PN a été potentialisée en prétraitant les cellules à l'aide de la cytochalasine B (CB) à 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pendant 5 min (Nowak, 1990). Pour arrêter la dégranulation, les tubes ont été maintenus dans le méthanol glacé (- 80°C) pendant 4-5 sec puis conservés dans la glace. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 4°C et les surnageants ont été utilisés immédiatement pour le dosage de l'activité de la MPO et de l'élastase. Dans certains tests, les culots de cellules ont été

homogénéisés ( $10^7$  cells/ml) dans du PBS contenant un cocktail d'antiprotéases pour dosage de l'activité de la MPO totale, ou lysés dans le tampon Laemmli (Rolas *et coll.*, 2013) et conservés à  $-80^\circ\text{C}$  pour des analyses par immuno-empreinte.

L'activité de la MPO a été mesurée à l'aide d'une méthode spectrophotométrique adaptée pour les microplaques de 96 puits, en utilisant son substrat colorimétrique spécifique, l'O-Dianisidine (Nowak, 1990). Brièvement, les surnageants de dégranulation ( $50\ \mu\text{l}$ ) ont été pré-incubés à  $37^\circ\text{C}$  dans des microplaques avec l'O-Dianisidine ( $200\ \mu\text{M}$ ) et la réaction a été déclenchée par ajout de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) à la concentration finale de  $4,4\ \text{mM}$  dans un volume final de  $250\ \mu\text{l}$  de tampon HBSS. La cinétique de l'activité de la MPO a été suivie en continu par lecture de l'absorbance ( $\Delta\text{DO}$ ) à  $460\ \text{nm}$  à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques thermostaté (THERMOmax<sup>TM</sup>, Molecular Device ; Californie, USA). L'activité MPO a été calculée pendant les 3 premières minutes de la réaction et exprimée en  $\text{A}/10^6$  cellules ou en pourcentage des valeurs de contrôle. Dans quelques expériences, l'activité MPO a été mesurée en utilisant son substrat fluorescent (Biovision) selon le protocole du fournisseur, à l'aide d'un fluorimètre lecteur de plaques (Berthold Mithras LB 940).

Dans certains tests, la dégranulation des PN a été évaluée par dosage de l'activité élastase, un autre marqueur des granules azurophiles. L'activité de l'élastase des PN humains a été mesurée en utilisant son substrat spécifique, le peptide N-méthoxy-Succinyl-Alanyl-Alanyl-Prolyl-p-Nitroanalide (PBS pH7,4 ; DMSO 1%) (Vocks *et coll.*, 2003). Les surnageants de dégranulation ( $50\ \mu\text{l}$ ) ont été incubés avec le substrat ( $1,5\ \text{mM}$ ) dans des microplaques de 96 puits dans un volume final de  $250\ \mu\text{l}$  de tampon HBSS. L'activité de l'élastase a été évaluée en mesurant l'absorbance à  $405\ \text{nm}$  à  $37^\circ\text{C}$  à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaques (THERMOmax<sup>TM</sup>, Molecular Device, Californie, USA). En fin, L'activité de l'élastase a été exprimée en valeurs de DO pendant 3 min de lecture ou, dans certains tests, en pourcentage du contrôle.

### **III.2.3. Implication des effecteurs de signalisation**

La contribution d'AKT, de p38-MAPK et ERK1/2 dans la dégranulation a été étudiée par une approche pharmacologique en prétraitant les PN normaux pendant 15 min avec leurs antagonistes sélectifs, AKTib1/2 ( $1-10\ \mu\text{M}$ ), SB202190 ( $1-10\ \mu\text{M}$ ) et U0126 ( $1-10\ \mu\text{M}$ ) respectivement. Ensuite, les PN ont été stimulés avec du fMLP ( $1\ \mu\text{M}$ ) et la dégranulation a été étudiée selon le protocole détaillé auparavant. L'inhibition des trois effecteurs de signalisation a été vérifiée par immuno-empreinte à l'aide d'anticorps spécifiques pour les formes phosphorylées de ces effecteurs. Les anticorps utilisés étaient: antiphospho-S473 pour AKT, antiphospho-Thr180/Tyr182 pour p38-MAPKinases, et antiphospho-Thr202/Tyr204 pour ERK1/2. Le

protocole d'immuno-empreinte est détaillé ci-après. Dans certaines expériences, la contribution des TRL7/8 dans la dégranulation des PN a été étudiée en prétraitant les cellules à l'aide d'un agoniste synthétique de ces récepteurs, le CL097, dans les conditions indiquées dans les légendes des figures.

#### **III.2.4. Activité bactéricide des neutrophiles**

Les PN ( $5 \times 10^5$  cellules) ont été préincubés à 37°C dans 200µl d'HBSS contenant 1% de sérum et des bactéries ( $5 \times 10^4$ ) d'*E.coli* vivantes opsonisées (Rolas *et coll.*, 2013). La suspension PN/bactéries a été ensuite stimulée avec du fMLP (1 µM) pendant 25 min sous agitation (200 rpm), et les tubes ont été stockés dans la glace. Les échantillons cellulaires ont été ensuite lysés avec du Triton X100 (0,1%) pendant 10 min à température ambiante puis conservés dans la glace, avant l'étalement (10 à 20 µl) sur un milieu Agar LB dans des boîtes de Pétri. Les boîtes ont été incubées à 37°C pour une nuit et les colonies bactériennes formées ont été comptées soit manuellement ou à l'aide d'un logiciel qui traite les images (ImageJ).

#### **III.2.5. Explosion oxydative des neutrophiles**

L'explosion oxydative (EO) a été évaluée en utilisant le test de réduction du cytochrome c (Rolas *et coll.*, 2013) spécifique pour le dosage de la production d'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ). Les PN ( $10^6$ ), prétraités ou non, ont été incubés dans des cuvettes en plastique de 1 ml ( $10^6$  cellules/ml de tampon HBSS). Le cytochrome c (80 mM) a été ensuite ajouté aux suspensions cellulaires, et l'absorbance a été suivie à 550 nm pendant 5 min (valeurs de base) dans un spectrophotomètre thermostaté (Perkin Elmer Lambda 40). Les cellules ont ensuite été stimulées avec du fMLP (1 µM). La réduction de cytochrome c se traduit par une augmentation de l'absorbance qui a été enregistrée en continu. La production totale d'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) a été calculée en soustrayant les valeurs de base de celles obtenues au plateau avec le fMLP. Les résultats sont exprimés en nanomole d'anion superoxyde produit par  $10^6$ PN.

L'EO a également été mesurée à l'aide d'un test plus sensible, la chimiluminescence amplifiée par le luminol (CL) (Rolas *et coll.*, 2013). Brièvement, les cellules ( $0,5 \times 10^6$  cellules / 0,5 ml de tampon HBSS) ont été incubées avec 10 mM de luminol pendant 5 min. La CL a été mesurée pendant 10 min (CL basale), puis les cellules ont été stimulées avec le fMLP (1µM) et la réponse chimioluminescente été enregistrée à l'aide d'un luminomètre thermostaté (Berthold Autolumat LB953). La réponse des PN a été calculée par soustraction les valeurs basales de celles des pics obtenus avec le fMLP. Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs du contrôle considérées comme 100%.

### III.2.6. Analyse des protéines phosphorylées par immuno-empreinte (western-blot)

L'expression et l'activation des protéines d'intérêt étudiées dans ce travail ont été analysées par immuno-empreinte après séparation des protéines sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Brièvement, les cellules ( $3 \times 10^6$  PN) ont été lysées dans 200 $\mu$ l de tampon Tris-HCL (50 mM, pH 6,8) contenant l'orthovanadate (2,5 mM), EDTA (2,5 mM), Urée (5 M), DTT, un cocktail d'antiprotéases (Complete<sup>TM</sup>, Roche) et 1X Laemmli (Tris-HCl 63 mM pH 6.8, Glycérol 10%, SDS 2%, 2-Mercaptoéthanol 0,1%, Bleu de Bromophénol 0,01%) (Rolas *et coll.*, 2013). Les protéines ont été dénaturées pendant 5 min à 100°C et les échantillons ont été stockés à -80°C en vue des expériences d'immuno-empreinte. Pratiquement, les échantillons ont été homogénéisés par sonication (5 sec) et les protéines ont été séparées sur un gel de gradient (3-12%) d'acrylamide en utilisant un tampon de migration contenant 0,025M de Tris-Base, 0,192M de Glycine et 0,1% de SDS. Les protéines ainsi séparées ont été ensuite soumises à un transfert sur membrane de nitrocellulose de 0,4  $\mu$ m de diamètre (Millipore) pendant 1h30min à 350mA en milieu semi-sec en utilisant un tampon de transfert à base de Tris (0,05M de Tris-Base, 0,095 M de Glycine, 0,08 % de SDS et 20% de Méthanol). Dans certaines expériences, le transfert a été effectué en milieu semi-sec dans en utilisant le kit Iblot<sup>®</sup> selon les recommandations du fournisseur.

Après transfert des protéines, la membrane a été colorée à l'aide du rouge Ponceau afin de visualiser les protéines puis saturée pendant 1h dans du lait écrémé 5% préparé dans du PBS-tween20 (PBS pH7,4 ; Tween20 0,05%). Les membranes ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires appropriés soit pendant 2 heures à température ambiante ou durant la nuit à 4°C. Après trois lavages avec un tampon PBS-Tween, les membranes ont été traitées pendant 45 min à température ambiante avec l'anticorps secondaire approprié marqué à la peroxydase de Raifort (Horse Radish Peroxydase) en vue de la révélation des complexes protéines-anticorps. La visualisation des protéines a été réalisée à l'aide du Kit ECL (Enhanced ChemiLuminescence) (SantaCruz, Californie, USA) où les signaux générés ont été détectés après exposition d'un film photosensible et révélés dans une développeuse automatique (Colenta 600 - Cégelec ; Courtaboeuf, France). Dans certaines expériences, la révélation a été réalisée à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la phosphatase Alcaline ; la détection des protéines a été alors faite en ajoutant le substrat BCIP/NBT (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-phosphate/Nitro Blue Tetrazolium) qui permet une révélation colorimétrique de l'activité phosphatase alcaline. Les différents signaux obtenus ont été quantifiés à l'aide du logiciel ImageJ (NIH ImageJ 1.62 software).

### **III.2.7. Restauration des réponses des PN de patients par l'agoniste des TLR7/8**

Les PN ( $2 \times 10^6$ ) des patients et des contrôles sains ont été prétraités avec l'agoniste des TLR7/8, CL097 (0,5-2  $\mu\text{g/ml}$ ), pendant 15 min à 37°C. Ensuite, les cellules ont été stimulées avec du fMLP (1  $\mu\text{M}$ ) pendant 2 min et la dégranulation a été mesurée comme précédemment décrit. Pour étudier l'effet de CL097 sur les effecteurs de la signalisation, les PN ont été prétraités avec le CL097 (1  $\mu\text{g/ml}$ ), puis stimulés avec du fMLP (1  $\mu\text{M}$ ) pendant 1 min. L'activation des effecteurs de signalisation a été étudiée par la technique d'immuno-empreinte selon le protocole détaillé ci-dessus.

L'effet de l'agoniste des TLR7/8 sur la bactéricidie des PN a également été évalué. Pour ce faire, les PN ( $5 \times 10^5$ ) ont été prétraités avec du CL097 (1,5  $\mu\text{g/ml}$ ) pendant 15 min, puis le test de bactéricidie a été effectué en respectant le protocole rapporté ci-avant.

### **III.2.8. Quantification de l'ARNm de TLR7/8**

L'expression du gène des récepteurs « Toll-Like » 7/8 (TLR7/8) dans les PN de patients et les témoins a été étudiée par quantification des ARNm des deux récepteurs par la méthode d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) quantitative. L'ARN total a été extrait à partir de  $5 \times 10^6$  PN homogénéisés dans 1ml Trizol<sup>®</sup> selon le protocole du fournisseur, et stocké à -80°C jusqu'à utilisation. La quantification relative des ARNm des protéines d'intérêt a été réalisée par une PCR quantitative en temps réel (qPCR). L'ADN complémentaire (cDNA) a été synthétisé à partir de 1 $\mu\text{g}$  d'ARNm en utilisant 10mM d'Oligo dT et 200 unités de la reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Les séquences des amorces d'ADN utilisées pour la qPCR sont les suivantes : TLR8 sens : GAGCCGAGACAAAACGTTC, TLR8 antisens : TGTCGATGATGGCCAATCC ; TLR7 sens : TTACCTGGATGGAAACCAGCTAC, TLR7 antisens : TCAAGGCTGAGAAGCTGTAAGCTA. Les réactions de la qPCR ont été réalisées dans un thermocycleur Roche LightCycler<sup>®</sup> 480 en utilisant un kit qPCR spécifique (CliniSciences Kapa Sybr Fast qPCR kit) suivant le protocole du fournisseur. La quantification de chaque échantillon a été faite en duplicata, et la courbe de fusion et le pic ont été contrôlés pour chaque paire d'amorce. Les niveaux relatifs d'expression pour chaque gène ont été calculés suivant la méthode  $2^{-\Delta\text{ct}}$ , avec normalisation à la GAPDH. Les résultats sont exprimés par rapport à l'ARNm du TLR8 du groupe témoin (n=12 dans chacun des groupes).

### **III.2.9. Effet du plasma des patients cirrhotiques sur la dégranulation**

Pour évaluer l'effet du plasma des patients cirrhotiques sur la dégranulation des PN, les PN de témoins sains ( $5 \times 10^6$  cellules) ont été incubés pendant 12h à 37°C dans un incubateur

sous CO<sub>2</sub>, en présence soit de plasma de volontaires sains, de patients cirrhotiques ou du RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium 1640*, Gibco). Après traitement, les PN ont été lavés avec du PBS, suspendus dans le HBSS, leur viabilité a été mesurée à l'aide du Trypan bleu. Les cellules ont ensuite été stimulées avec du fMLP (1 µM/2 min) et la dégranulation a été évaluée selon le protocole détaillé ci-dessus. Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs du contrôle RPMI.

### **III.2.10. Analyse statistique**

Les résultats exprimés représentent la moyenne d'au moins 3 tests différents ± l'écart moyen (SEM). Les différences significatives entre les moyennes ont été évaluées en utilisant le test *t* de Student ou le test U de Mann-Whitney, avec un seuil de risque  $P < 0,05$ . La signification statistique est indiquée sur les graphes par un astérisque (\*).

# *Résultats*

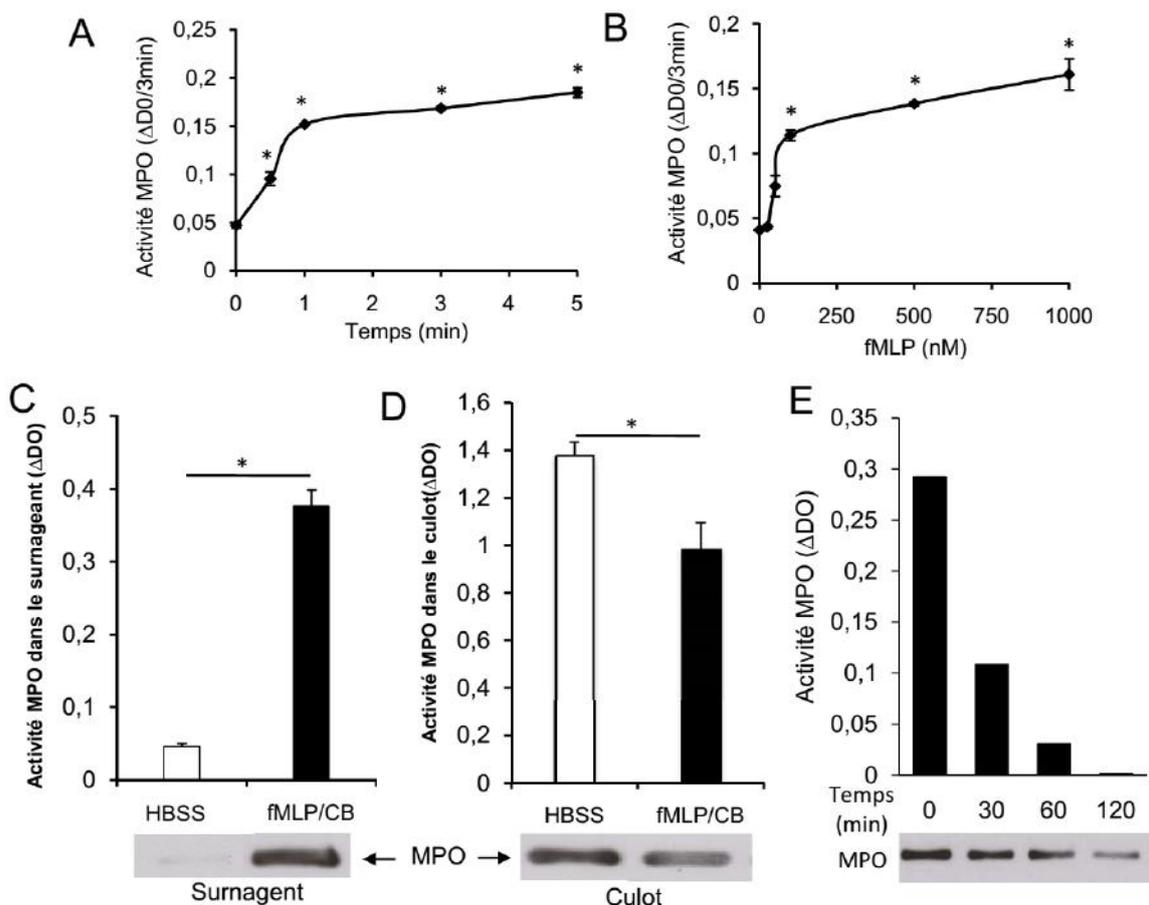
## IV. Résultats

### IV.1. Caractérisation de la dégranulation de la MPO des neutrophiles humains stimulés par le fMLP

, L'objectif de cette première partie est de définir les conditions optimales de dégranulation de la MPO des PN de manière approfondie en vue de rechercher des paramètres permettant de comprendre la grande susceptibilité aux infections bactériennes des patients atteints d'une cirrhose hépatique alcoolique décompensée. La dégranulation de la MPO a également été étudiée au niveau transductionnel en comparant l'état d'activation des effecteurs majeurs de signalisation dans des PN normaux et issus de patients, en réponse à leur stimulation à l'aide du tripeptide d'origine bactérienne, le fMLP. L'activité de la MPO libérée dans le milieu extracellulaire a été utilisée comme marqueur de la dégranulation des PN.

Dans une première étape, il était important de déterminer les conditions optimales de la dégranulation des PN induite par le fMLP, en fonction du temps et de la concentration de fMLP. Ces deux paramètres nous permettraient de déceler d'éventuelles anomalies au niveau la dégranulation de la MPO et/ou l'activation des effecteurs de la signalisation intracellulaire. Ainsi, la cinétique de libération de la MPO des PN stimulés avec du fMLP (1  $\mu$ M) a été suivie pendant 5 min. Elle montre une activation rapide des PN par le fMLP, avec cependant 2 phases distinctes (**Figure 1A**). Le fMLP induit une libération extrêmement rapide de la MPO pendant la première minute de stimulation, soit environ 75% de la dégranulation maximale mesurée. Ensuite, l'intensité de dégranulation diminue et tend à se stabiliser même après une durée d'incubation relativement longue avec le fMLP (jusqu'à 30 min). Ces résultats montrent que deux mécanismes distincts de dégranulation sont mis en œuvre dès les premières minutes de stimulation des PN. Ainsi, afin de détecter une possible anomalie de libération de la MPO, il conviendrait d'étudier la dégranulation dans les temps précoces d'activation des PN (1-3 min) lorsque les mécanismes de dégranulation optimales sont mis en œuvre.

Pour examiner l'effet concentration du fMLP, les PN ont été stimulés avec des faibles et fortes concentrations de fMLP variant de 10 à 1000 nM pendant 3 min. Les résultats montrent qu'une faible dégranulation de la MPO est détectable en présence de 100 nM de fMLP (**Figure 1B**). A partir de 200 nM, la dégranulation de la MPO augmente progressivement avec une activité de la MPO maximale atteint avec 1  $\mu$ M de fMLP, concentration qui sera adoptée pour les futures expériences.



**Figure 1. Détermination des paramètres de dégranulation des neutrophiles humains.** Les neutrophiles de donneurs sains ont été stimulés avec du fMLP (1 $\mu$ M) pendant différentes périodes (0-5 min) (A), ou avec du fMLP (10-1000 nM) pendant 2min (B). La dégranulation de PN a été suivie par mesure de l'activité de la MPO dans le surnageant (A-C, E) ou dans les culots (D). La libération de la MPO a également été évaluée par détection de la protéine en immuno-empreinte (Western blot). L'activité de la MPO est exprimée en  $\Delta DO$  pendant 3min ( $n=3$  dans chaque expérience,  $*p<0.05$ )

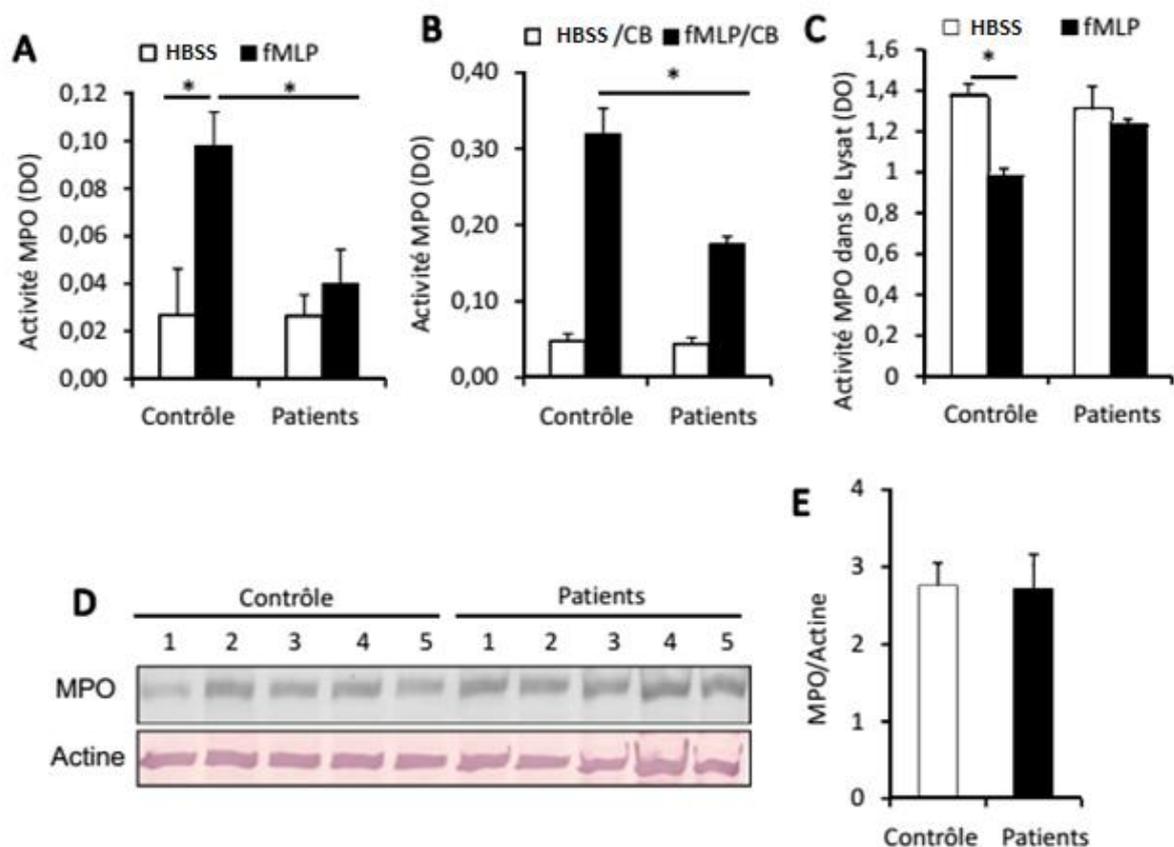
La dégranulation de la MPO a également été mesurée par une autre technique, par immuno-empreinte à l'aide d'un anticorps spécifique de la MPO. Les résultats montrent que l'augmentation de l'activité de la MPO dans le surnageant de PN stimulés par le fMLP/CB est bien associée à une augmentation de la protéine (Figure 1C). D'autre part, cette augmentation d'activité de la MPO dans le surnageant de dégranulation est associée avec une diminution de l'activité de la MPO résiduelle dans les culots des PN stimulés, également corrélée avec une diminution de la protéine détectée par immuno-empreinte (Figure 1D). Cette approche permet d'avoir un autre moyen de contrôle pour évaluer une possible anomalie d'expression de la protéine et qui affecterait la dégranulation des PN provenant notamment des patients. Cependant, cette approche nécessite certaines précautions techniques. En effet, nous avons observé que l'incubation prolongée à 37°C des surnageant de dégranulation induite par le fMLP induit une diminution de l'activité de la MPO qui est proportionnelle au temps d'incubation (Figure 1E).

Cette diminution serait due à une dégradation protéolytique de la MPO comme le montre l'analyse par immuno-empreinte de la MPO (**Figure 1E**). Ces résultats montrent la nécessité de bien conserver les surnageants de dégranulation dans la glace et de doser son activité de la MPO rapidement pour éviter la dégradation de la MPO et la perte de son activité qui pourrait apporter des artefacts à l'analyse des résultats.

#### **IV.2. Défaillance sévère de dégranulation de la MPO des neutrophiles de patients ayant une cirrhose alcoolique décompensée**

La MPO joue un rôle important dans les mécanismes de défense anti-infectieuse de l'organisme, en participant directement à la fonction bactéricide des phagocytes. Dans certaines pathologies comme la cirrhose hépatique décompensée, les patients meurent généralement d'infection (sepsis, péritonite) en raison d'une défaillance des activités antibactériennes des PN. En vue de rechercher des anomalies de dégranulation de la MPO des PN de patients cirrhotiques, l'activité de la MPO libérée dans le milieu extracellulaire a été évaluée après stimulation des PN dans les conditions optimales déterminées ci-dessus à l'aide du peptide fMLP. Les conditions standard d'analyse de la dégranulation ont été ainsi utilisées tout le long de l'étude de manière à pouvoir comparer les réponses des PN de patients et celles des PN de donneurs sains, obtenues à des jours différents.

La stimulation des PN de donneurs sains dans les conditions optimales avec du fMLP (1  $\mu$ M) induit une dégranulation de la MPO d'environ 10% (**Figure 2A**) par rapport au contenu total de la MPO (**Figure 2C**), ce qui reste relativement faible. Dans ces mêmes conditions, les PN des patients cirrhotiques présentent un déficit de dégranulation de la MPO de 75 %, comparé à celle des PN contrôles (**Figure 2A et C**). Pour rechercher des pistes biochimiques derrière cette défaillance, la dégranulation de la MPO a été ensuite étudiée à l'aide de la cytochalasine B (CB), un agent pharmacologique largement utilisé pour booster la dégranulation des PN en raison de son action sur le cytosquelette. Le prétraitement des PN par la CB (0.5  $\mu$ g/ml) améliore nettement la dégranulation des PN induite par le fMLP (**Figure 2B**). Cependant, l'efficacité de la CB est du même ordre (3-4 fois) dans les deux groupes de PN, contrôles et patients (**Figure 2B**). Ces résultats suggèrent que la défaillance de dégranulation observée chez les patients cirrhotiques ne serait pas due à une altération majeure du cytosquelette des PN, mais à d'autres causes incluant une possible altération du stock intracellulaire, de l'activité de la MPO, ou encore des mécanismes de signalisation qui régulent la dégranulation des PN.



**Figure 2. Défaillance sévère de dégranulation de la MPO des neutrophiles de patients ayant une cirrhose alcoolique décompensée.** Les PN de donneurs sains (Contrôle) et de patients cirrhotiques ont été prétraités en absence (A) ou en présence de la cytochalasine B (5 µg/ml; 5 min) (B) avant leur stimulation avec le fMLP (1µM; 2min).L'activité de la MPO a été mesurée dans le surnageant de dégranulation et est exprimée en ΔDO pendant 3min ( $n= 14$  dans chaque groupe;  $*p < 0.05$  versus contrôle). (C) L'activité de la MPO dans l'homogénat des PN au repos ou stimulés avec le fMLP, exprimée en ΔDO pendant 3min ( $n=7$ ,  $*p < 0.05$ ). (D) Expression de la MPO analysée par immuno-empreinte dans les PN contrôle et de patients cirrhotiques, et quantification de la MPO (E) exprimée pourcentage de l'actine ( $n= 13$  dans chaque groupe).

Pour examiner si le stock de la MPO des PN des patients cirrhotiques était altéré, les PN (contrôles et patients) au repos ou stimulés avec du fMLP (1µM) ont été lavés une fois pour se débarrasser du surnageant de dégranulation. Ensuite les PN ont été homogénéisés par sonication en vue de quantifier la MPO intracellulaire par deux méthodes : dosage de l'activité, et analyse de l'expression par immuno-empreinte. Les résultats montrent qu'en absence de stimulation, l'activité de la MPO est similaire dans les homogénats des PN issus des deux groupes (Figure 2C). Cependant, après stimulation par le fMLP, l'activité de la MPO diminue significativement dans l'homogénat des PN contrôles suite à sa libération par exocytose, contrairement aux PN de patients cirrhotiques (Figure 2D). De plus, l'expression totale de la MPO analysée par immuno-empreinte ne montre pas de différence significative dans les deux groupes, indiquant ainsi que la synthèse de la MPO n'est pas altérée au cours de la cirrhose alcoolique avancée.

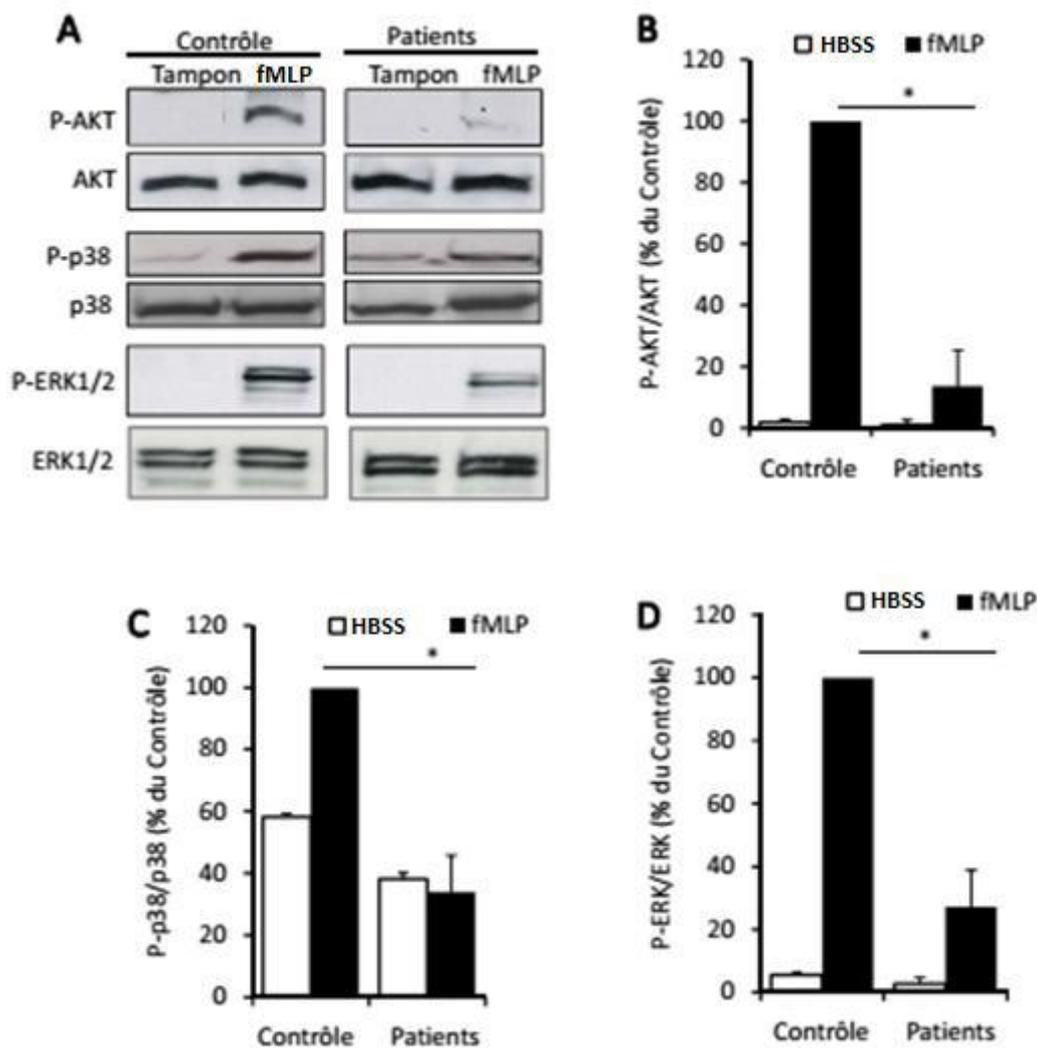
### **IV.3. La défaillance de dégranulation des PN des patients cirrhotiques est associée à un défaut de signalisation intracellulaire initié par le fPR, le récepteur du fMLP**

Les résultats rapportés ci-dessus indiquent que la défaillance de dégranulation de la MPO induite par le fMLP dans les PN de patients cirrhotiques ne proviendrait pas d'un déficit du pool intracellulaire de la MPO, ni de son activité. Ceci laisse suggérer que cette défaillance serait probablement due à une dérégulation des mécanismes de signalisation intracellulaire induits via le récepteur du fMLP (fPR) qui contrôle la dégranulation des PN.

Afin d'explorer davantage cette hypothèse, nous nous sommes proposés d'étudier la signalisation intracellulaire initié par le fMLP, tout d'abord au niveau de l'état d'activation de trois effecteurs majeurs, AKT (protéine kinase B, PKB), p38-MAPK et p44/42-MAP Kinase (ERK1/2). Ensuite, la contribution respective de ces trois effecteurs dans la dégranulation des PN n'étant pas connue, a été ainsi étudiée dans les PN normaux. Pour ce faire, les PN ont été stimulés dans des conditions optimales avec du fMLP (1  $\mu$ M) pendant 2min et la phosphorylation des trois effecteurs a été analysée par immuno-empreinte à l'aide d'anticorps spécifiques des formes phosphorylées de ces effecteurs.

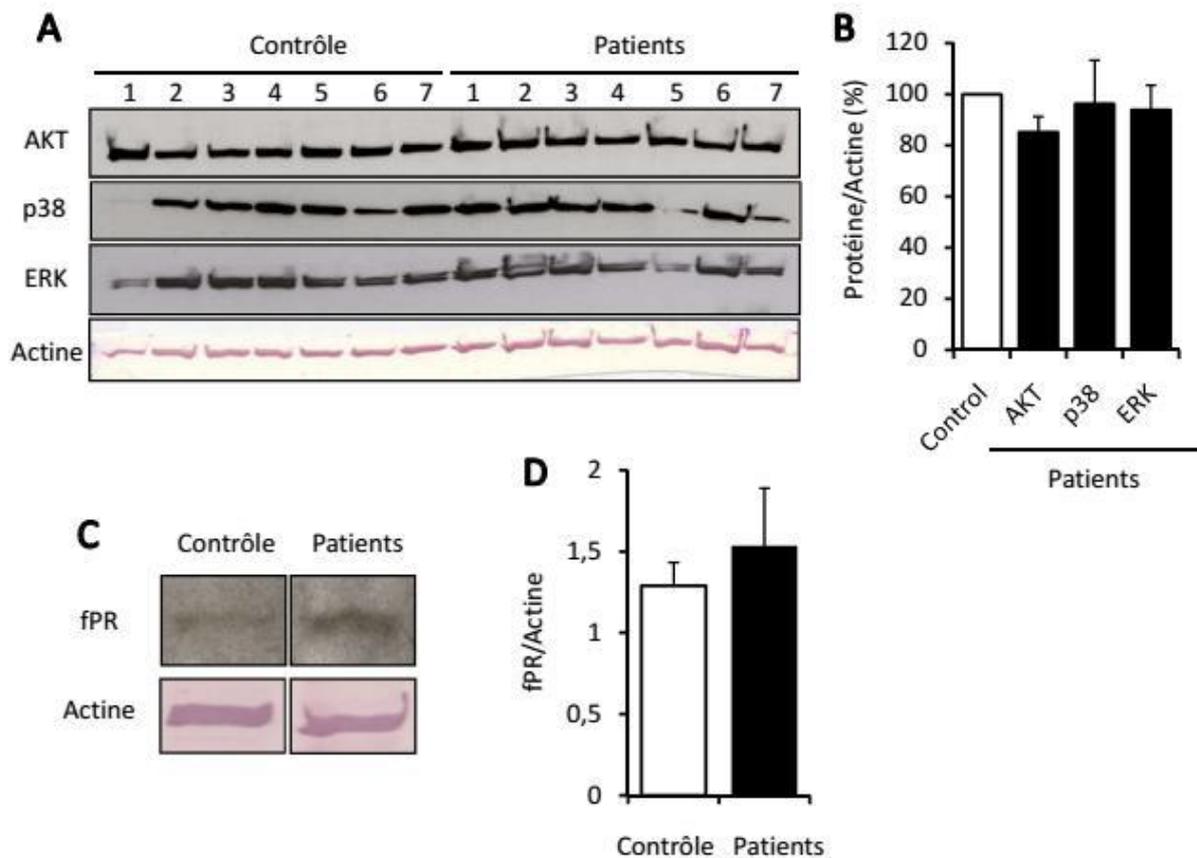
Nos résultats montrent qu'en absence de stimulation (au repos), la p38-MAPK montre une faible phosphorylation basale dans les deux groupes de PN, ce qui n'est pas observé pour AKT et ERK1/2 dans les deux groupes de PN. La stimulation des PN par le fMLP, entraîne une forte phosphorylation rapide d'AKT, p38-MAPK et ERK 1/2 dans les PN sains (**Figure 3A**). Par contre, la phosphorylation de ces trois effecteurs dans les PN des patients cirrhotiques était fortement défaillante (**Figure 3B, C et D**). Pour déterminer si cette défaillance d'activation des effecteurs n'est pas due à un déficit de protéines, leur expression a été également quantifiée par immuno-empreinte. Les résultats montrent que l'expression des trois effecteurs étudiés n'est pas significativement altérée dans les PN issus de patients cirrhotiques (**Figure 4A et B**).

Nous avons ensuite analysé l'état d'expression du récepteur membranaire du fMLP (fPR) par immuno-empreinte, car c'est à ce niveau que sont initiés les signaux à l'origine des différentes cascades de signalisation intracellulaire. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative dans l'expression du fPR des PN de patients par rapport à celle des PN normaux(**Figure 4C et D**), suggérant ainsi que la défaillance de dégranulation des PN de patients cirrhotiques n'est pas liée à un déficit de synthèse du fPR.



**Figure 3. Défaillance de l'activation des effecteurs de signalisation induite par le fMLP dans les PN des patients cirrhotiques.** (A) les PN sains (Contrôle) et de patients cirrhotiques ont été stimulés avec du fMLP (1 $\mu$ M; 1min). (B-D) La phosphorylation d'AKT(S473), p38-MAPKinase et p44/42-MAPKinase (ERK1/2) a été quantifiée et exprimée en pourcent des valeurs Contrôle obtenues avec le fMLP ( $n= 4-6$  dans chaque groupe; \* $p < 0.05$  versus contrôle).

L'ensemble des résultats ci-dessus indiquent que les PN de patients cirrhotiques présentent un défaut d'activation des trois effecteurs majeurs (AKT, p38-MAPK et ERK1/2) impliqués dans la transduction intracellulaire du signal initialement généré à la membrane plasmique par l'interaction du fPR avec le fMLP. Cependant, la contribution respective de ces trois effecteurs majeurs dans la libération de la MPO des PN reste inconnue à ce jour. Il était ainsi important d'évaluer leur degré d'implication dans les mécanismes de la dégranulation des PN.

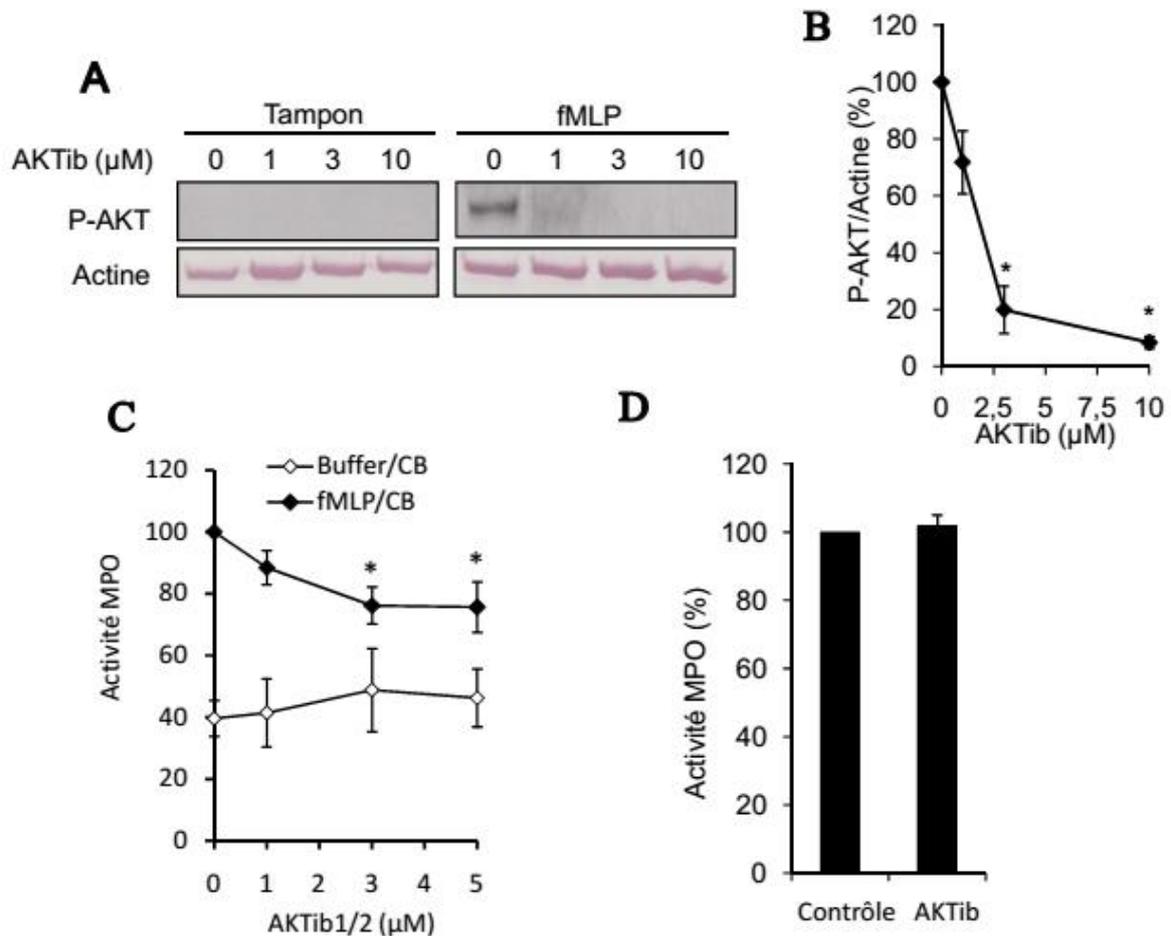


**Figure 4.** L'expression des effecteurs majeurs de signalisation n'est pas altérée dans les PN des patients cirrhotiques. Les PN sains (Contrôle) ou de patients cirrhotique ont été homogénéisés dans le tampon Trizol® pour l'extraction des protéines. L'expression totale des protéines d'intérêt (AKT, p38, ERK et fPR) a été étudiée par immuno-empreinte (A, C), quantifiée (B, D) et exprimée en pourcent de contrôle ou de l'actine ( $n=7$  dans chaque groupe).

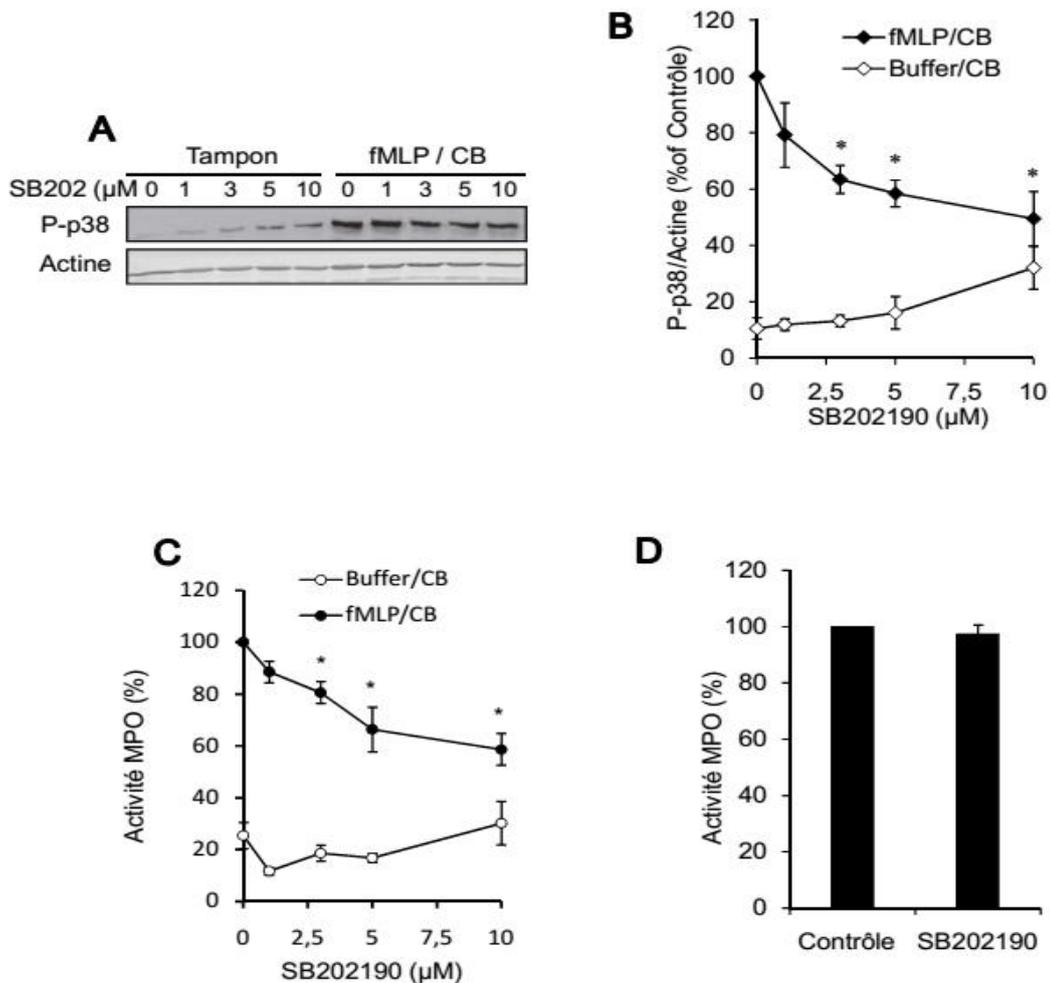
#### IV.4. Implication majeure d'AKT et p38-MAPK mais pas deERK1/2 dans la dégranulation de la MPO des PN stimulés par le fMLP

Pour étudier la contribution d'AKT, de p38-MAPK et ERK1/2 dans la libération de la MPO des PN, une approche pharmacologique a été choisie basée sur l'inhibition des effecteurs à l'aide d'antagonistes sélectifs dans des PN de donneurs sains.

L'inhibition des effecteurs de signalisation a été vérifiée par immuno-empreinte à l'aide d'anticorps spécifiques pour les formes phosphorylées de ces effecteurs. Ainsi, le prétraitement des PN avec des concentrations d'AKTib1/2 (1-10  $\mu$ M) qui inhibent complètement la phosphorylation d'AKT induite par le fMLP (Figure 5A et B), réduit la dégranulation nette induite par le fMLP d'environ 40 à 50% (Figure 5C), sans altérer la dégranulation basale ni l'activité de la MPO (Figure 5D). Pareillement, le blocage de la phosphorylation de p38-MAPK (Figure 6A et B) par le SB202190 (1-10  $\mu$ M) inhibe de 50% la dégranulation des PN normaux stimulés avec du fMLP (Figure 6C), sans affecter la dégranulation basale ni l'activité de la MPO (Figure 6D).



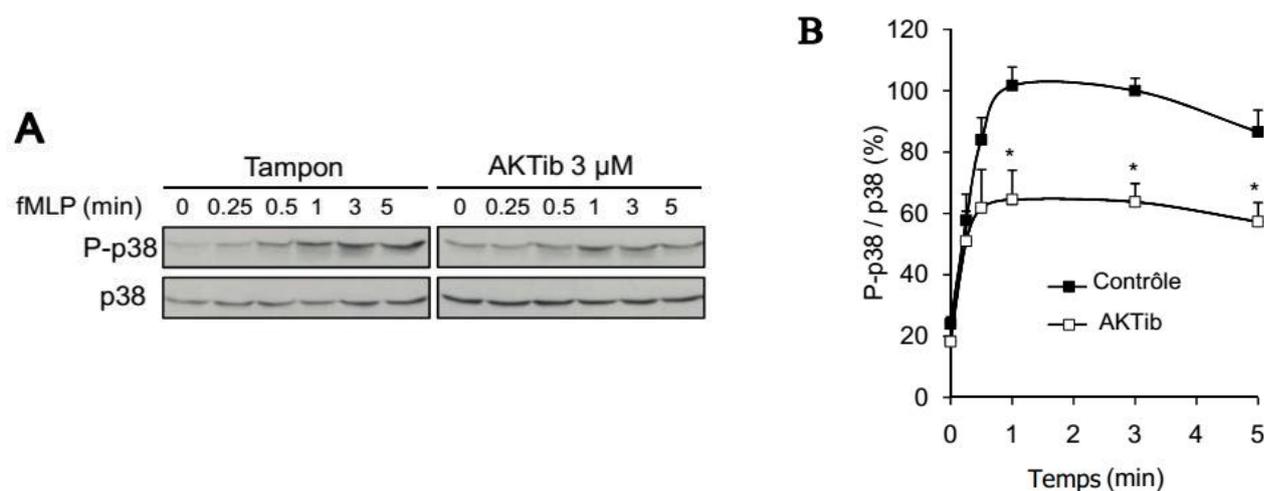
**Figure 5. AKT est un effecteur majeur dans la dégranulation de la MPO dans les PN.** (A-B) Les PN de donneurs sains ont été prétraités pendant 20min en absence (contrôle) ou en présence de l'antagoniste d'AKT, l'AKTib1/2 (0-10 $\mu\text{M}$ ), puis stimulés avec du fMLP (1 $\mu\text{M}$ /2min). La phosphorylation d'AKT(S473) a été quantifiée et exprimée en pourcent des valeurs contrôles obtenues avec le fMLP ( $n=4$ ;  $*p < 0.05$ ). (C) Les PN de donneurs sains ont été prétraités pendant 20min en absence (contrôle) ou en présence d'AKTib1/2 (0-10 $\mu\text{M}$ ), puis avec de la cytochalasine B pendant 5 min. Les cellules ont été ensuite stimulées avec du fMLP (1 $\mu\text{M}$ /2min), la libération de la MPO a été quantifiée et exprimée en pourcent des valeurs du contrôle fMLP ( $n=6$ ;  $*p < 0.05$ ). (D) Le surnageant de dégranulation obtenu avec le fMLP a été incubé en présence d'AKTib1/2(10 $\mu\text{M}$ ) pendant 20 min puis l'activité de la MPO a été quantifiée et exprimée en pourcent des valeurs du contrôle.



**Figure 6. La p38-MAPKinase est un effecteur majeur dans la dégranulation de la MPO dans les PN.** (A-B) Les PN de donneurs sains ont été prétraités pendant 20min en absence (contrôle) ou en présence de l'antagoniste de p38-MAPK, le SB202190 (0-10  $\mu\text{M}$ ), puis stimulés avec du fMLP (1  $\mu\text{M}$ /2 min). La phosphorylation de p38-MAPK a été quantifiée et exprimée en pourcent des valeurs Contrôle obtenues avec le fMLP ( $n=4$ ;  $*p < 0.05$ ). (C) Les PN de donneurs sains ont été prétraités pendant 20min en absence (contrôle) ou en présence de SB202190 (0-10 $\mu\text{M}$ ), puis avec de la cytochalasine B pendant 5 min. Les cellules ont été ensuite stimulées avec du fMLP (1  $\mu\text{M}$ /2 min), la libération de la MPO est quantifiée et exprimée en pourcent des valeurs du contrôle fMLP ( $n=6$ ;  $*p < 0.05$ ). (D) Le surnageant de dégranulation obtenu avec le fMLP a été incubé en présence le SB202190 (10 $\mu\text{M}$ ) pendant 20min puis l'activité de la MPO est quantifiée et exprimée en pourcent des valeurs du contrôle.

Ces résultats montrent que AKT et p38-MAPK sont des effecteurs majeurs dans la transduction du signal de dégranulation dans les PN activés avec du fMLP. Cependant, AKTib1/2 et SB202190 réduisent la dégranulation des PN avec la même efficacité (près de 50%) (Valeurs d'IC<sub>50</sub> dans le **Tableau 7**), suggérant la possibilité que les deux effecteurs AKT et p38-MAPK interviennent dans la même voie de signalisation.

Ceci nous a incité à examiner si p38-MAPK serait activée en aval d'AKT. Pour cela, les PN ont été traités avec AKTib1/2 (3 $\mu$ M), ce qui réduit de 50% la phosphorylation de p38-MAPK induite par le fMLP (**Figure 7A et B**). Cependant, cette réduction est observée sur la phosphorylation mesurée après une minute de stimulation des PN, mais pas pour des temps plus courts (30sec). Ces résultats indiquent que la p38-MAPK est activée via deux processus, l'un est inhibable par AKTib1/2 confirmant ainsi notre hypothèse que p38-MAPK serait activée en aval d'AKT, et l'autre indépendant d'AKT.

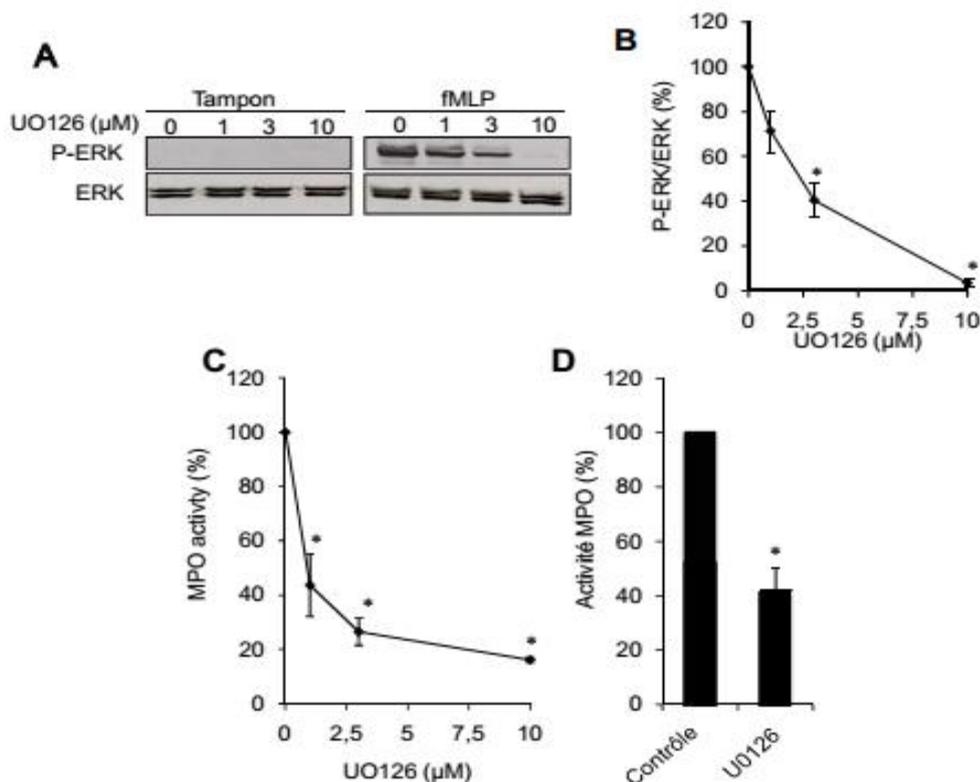


**Figure 7. La p38-MAPKinase est activée en aval d'AKT dans la cascade de signalisation induite par le fMLP dans le neutrophile. (A-B)** Les PN de donneurs sains ont été prétraités pendant 20min en absence (contrôle) ou en présence de l'antagoniste d'AKT, l'AKTib1/2 (0-10 $\mu$ M), puis stimulés avec du fMLP (1  $\mu$ M/2 min). La phosphorylation d'AKT(S473) et de la p38-MAP Kinase a été quantifiée et exprimée en pourcent des valeurs contrôles obtenues avec le fMLP ( $n=4$ ;  $*p < 0.05$ ).

**Tableau 7. Valeurs d'IC<sub>50</sub> des différents inhibiteurs sur la dégranulation et l'activation des effecteurs majeurs de la signalisation.**

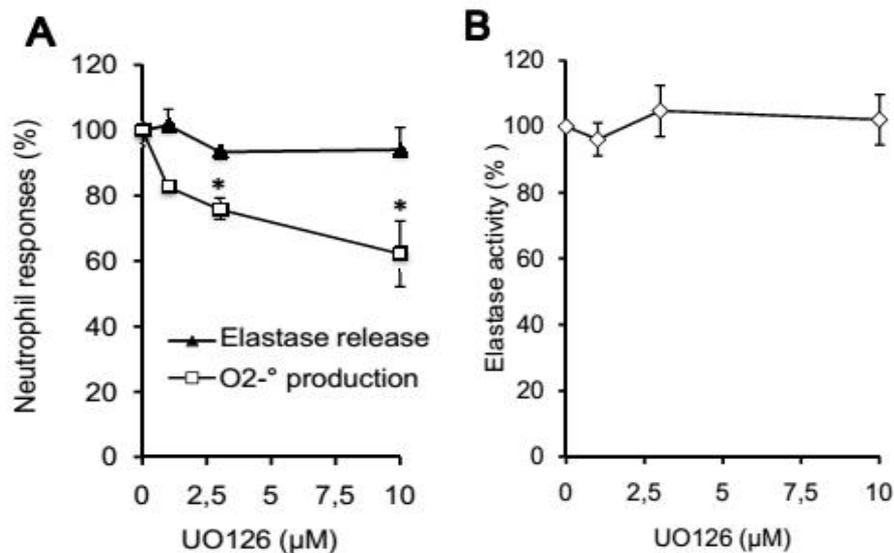
Inhibiteur	Dégranulation*	AKT	p38-MAPK	ERK1/2
<b>Aktib1/2</b>	3-5 $\mu$ M	2-3 $\mu$ M	2-3 $\mu$ M	-
<b>SB202190</b>	3-5 $\mu$ M	-	3-5 $\mu$ M	-
<b>U0126</b>	-	-	-	2-3 $\mu$ M

\*IC<sub>50</sub> déterminée sur la réponse nette du fMLP après soustraction de la dégranulation basale



**Figure 8. L'antagoniste de ERK1/2, U0126, interfère avec l'activité de la MPO dans le surnageant de dégranulation.** (A-B) Les PN de donneurs sains ont été prétraités pendant 20min en absence (contrôle) ou en présence de l'antagoniste de p44/42-MAPK (ERK1/2), l'U0126 (0-10 μM), puis stimulés avec du fMLP (1 μM/2 min). La phosphorylation de p44/42-MAPK a été quantifiée et exprimée en pourcent des valeurs contrôles obtenues avec le fMLP ( $n=4$ ;  $*p < 0.05$ ). (C) Les PN de donneurs sains ont été prétraités pendant 20min en absence (contrôle) ou en présence de U0126 (0-10μM), puis avec de la cytochalasine B pendant 5 min. Les cellules ont été ensuite stimulées avec du fMLP (1μM/2min), la libération de la MPO est quantifiée et exprimée en pourcent des valeurs du contrôle fMLP ( $n=6$ ;  $*p < 0.05$ ). (D) Le surnageant de dégranulation obtenu avec le fMLP est incubé en présence le U0126 (10μM) pendant 20min puis l'activité de la MPO est quantifiée et exprimée en pourcent des valeurs du contrôle.

Concernant, la voie des p44/42MAPK, l'inhibition complète de l'activation de ERK1/2 par son antagoniste U0126 (**Figure 8A et B**) est également associée à une très forte inhibition de la dégranulation de la MPO des PN stimulés avec du fMLP (**Figure 8C**). Cette inhibition quasi-complète nous est apparue suspecte suggérant un possible artefact technique. En fait, elle s'est avérée être due à une interférence de l'U0126 avec l'activité de la MPO comme le montre la forte inhibition de l'activité de la MPO d'un surnageant de dégranulation qui avait été prétraité avec l'antagoniste U0126 (**Figure 8D**). Pour pallier à cette contrainte technique, nous avons choisi de mesurer un autre marqueur de dégranulation, l'activité de l'élastase qui est localisée dans les mêmes granules azurophiles que la MPO.



**Figure 9. ERK1/2 ne serait pas impliquée dans la dégranulation des PN stimulés par le fMLP.** (A) Les PN de donneurs sains ont été prétraités pendant 20min en absence (contrôle) ou en présence de UO126 (0-10  $\mu\text{M}$ ), puis avec de la cytochalasine B pendant 5 min. Les cellules ont été ensuite stimulées avec du fMLP (1  $\mu\text{M}$ /2 min), la libération de l'élastase a été quantifiée et exprimée en pourcent des valeurs du contrôle fMLP ( $n=6$ ;  $*p<0.05$ ). (B) Le surnageant de dégranulation obtenu avec le fMLP est incubé en présence le UO126 (10  $\mu\text{M}$ ) pendant 20 min puis l'activité élastase a été quantifiée et exprimée en pourcent des valeurs du contrôle.

L'inhibition de ERK1/2 par UO126 dans les PN ne montre aucun effet ni sur la libération de l'élastase induite par du fMLP (**Figure 9A**), ni sur l'activité élastasique dans le surnageant (**Figure 9B**). Cependant, l'UO126 est bien actif car il inhibe partiellement (35%) la génération du superoxyde induite par le fMLP (**Figure 9A**). Ces résultats suggèrent ainsi que ERK1/2 ne seraient pas significativement impliquées dans les mécanismes de dégranulation des PN induite par le fMLP. Cependant, ERK1/2 contribuerait partiellement dans la signalisation impliquée dans la réponse oxydative des PN, ce qui est en accord avec d'autres travaux antérieurs (Djerdjouri *et coll.*, 1999 ; Paruch *et coll.*, 2006 ; Patel *et coll.*, 2010).

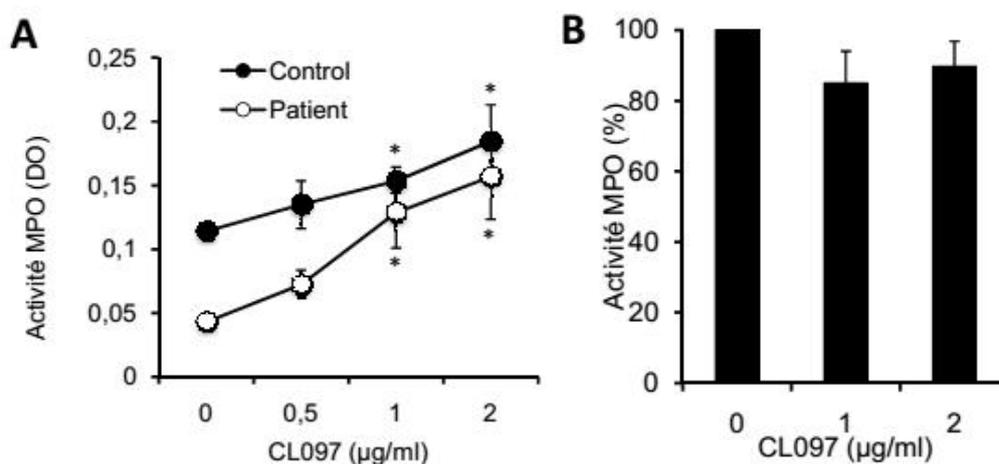
#### IV.5. L'agoniste des récepteurs Toll 7/8 (TLR7/8), le CL097, potentialise la dégranulation des PN normaux et corrige la défaillance de dégranulation dans les PN des patients cirrhotiques

Les résultats rapportés ci-dessus suggèrent fortement que le déficit de la dégranulation des PN de patients cirrhotiques serait lié à une défaillance d'activation de la voie AKT/p38-MAPK. Il a été montré par ailleurs que la p38-MAPK peut également être activée dans des PN normaux via d'autres types de récepteurs de l'immunité, les récepteur de type "Toll" (Toll-Like Receptors 7/8,

TLR7/8) intracellulaires, notamment à l'aide du CL097, un de leurs agonistes synthétiques. Les travaux du laboratoire d'accueil avaient montré que cet agent potentialise également l'explosion oxydative des PN, mesurée par la production d'anion superoxyde (Makni-Maleej *et coll.*, 2012). Dans ce contexte, il nous paraissait ainsi judicieux de déterminer si les PN de patients cirrhotiques répondent à l'activation des TLR7/8 et si cette approche pouvait permettre d'améliorer la dégranulation de la MPO, ce qui présenterait un intérêt thérapeutique potentiel.

Dans cette deuxième partie de ce travail, notre objectif principal était de comparer les effets de l'activation des TLR7/8 par le CL097 sur la dégranulation de la MPO des PN normaux et issus de patients cirrhotiques, sur les voies de signalisation intracellulaires impliquées, ainsi que l'activité bactéricide des PN.

Le prétraitement des PN normaux avec du CL097 (0.5, 1 et 2  $\mu\text{g/ml}$ ) pendant 10min induit une potentialisation de la dégranulation de la MPO induite par le fMLP de manière dépendante de la concentration (**Figure 10A**). Cet effet potentialisateur est également observé sur les PN des patients (**Figure 10A**). De façon intéressante, la potentialisation de la dégranulation de la MPO est plus prononcée avec les PN des patients et permet ainsi de restaurer un taux de dégranulation physiologique comparable à celui observé avec les PN normaux (**Figure 10A**). Ces résultats montrent ainsi que le déficit de dégranulation de la MPO des PN chez les patients cirrhotiques est réversible. Ils suggèrent par ailleurs que cet effet bénéfique du CL097 proviendrait d'une modification des voies de signalisation induite par le fMLP dans les PN.



**Figure 10. L'antagoniste des TLR7/8 restaure la dégranulation induite par le fMLP des PN de patients cirrhotiques.** (A) Les PN de donneurs sains (contrôle) et de patients cirrhotiques ont été prétraités pendant 15min en absence (contrôle) ou en présence de l'agoniste des TLR7/8, le CL097 (0.5-2  $\mu\text{g/ml}$ ), puis stimulés avec du fMLP (1  $\mu\text{M}$ ) pendant 2 min. La libération de la MPO a été quantifiée et exprimée en DO nette obtenue pour  $10^6$ cellules/3min ( $n=5$ ;  $*p<0.05$  versus contrôle). (B) Le surnageant de dégranulation obtenu avec le fMLP a été incubé en présence le CL097 (2 $\mu\text{g/ml}$ ) pendant 20min, puis l'activité de la MPO est quantifiée et exprimée en pourcent des valeurs du contrôle.

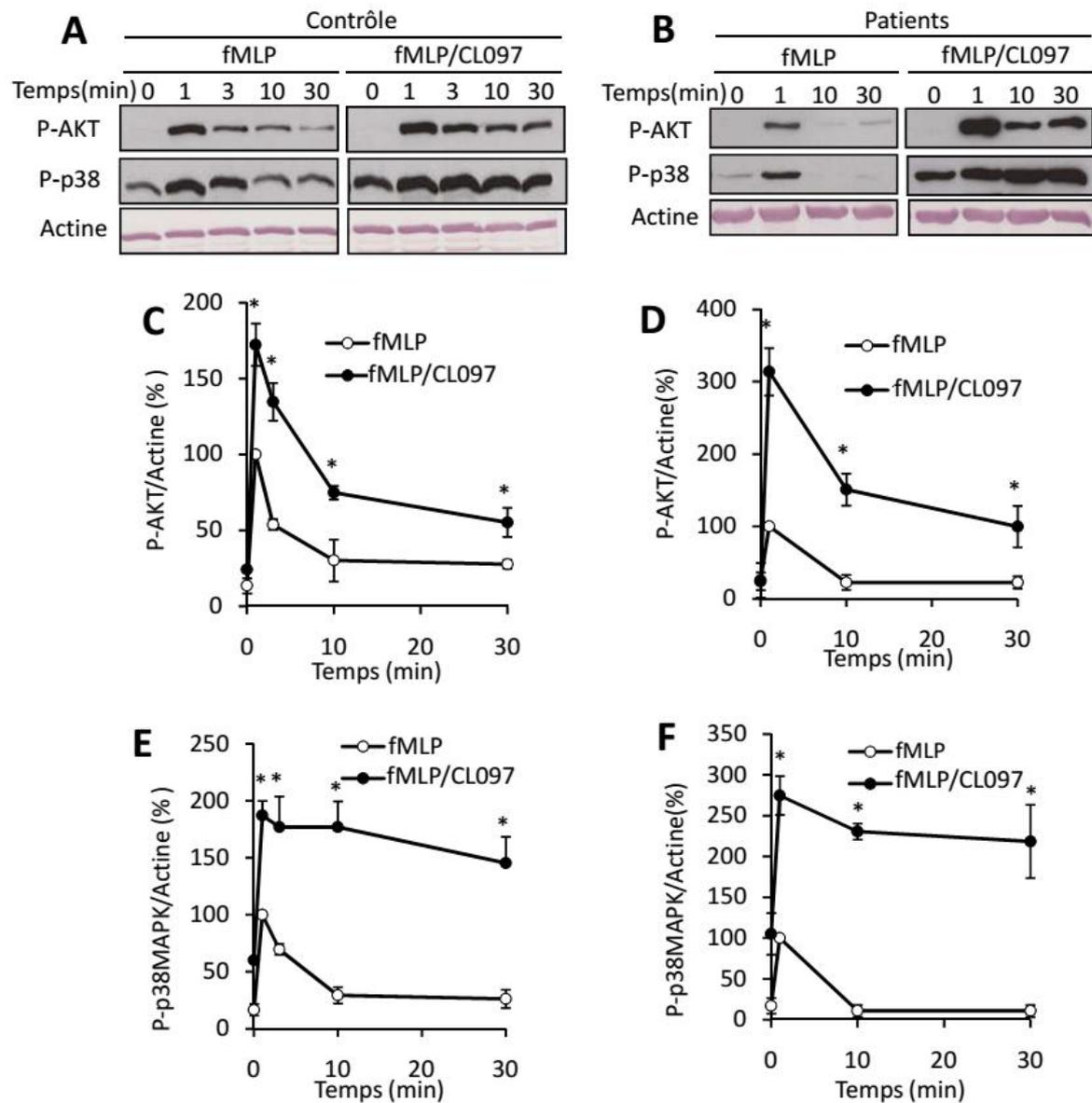
#### **IV.6. Le CL097 potentialise la phosphorylation d'AKT et de p38-MAPK et réverse leur activation défailante dans les PN des patients**

Pour mieux comprendre le mécanisme par lequel le CL097 corrige le déficit de la dégranulation des PN des patients, nous avons étudié son effet sur les deux effecteurs majeurs de la signalisation impliquée dans la dégranulation, en l'occurrence : AKT et p38-MAPK dont l'activation était défailante dans les PN des patients cirrhotiques (**Figure 2**).

Le prétraitement des PN sains et des patients avec le CL097 (1.5 µg/ ml) pendant 10 min induit une forte potentialisation de la phosphorylation d'AKT induite par le fMLP (**Figure 11A-D**). Cette potentialisation est beaucoup plus prononcée dans les PN des patients cirrhotiques où on observait une faible phosphorylation induite par le fMLP (**Figure 11B et D**). De plus, la phosphorylation d'AKT induite par le fMLP est maintenue dans le temps (jusqu'à 30min) en présence de CL097, alors qu'elle retourne rapidement au niveau basal en absence de l'agoniste des TLR7/8 (**Figure 11A-D**). L'effet potentialisant de CL097 était plus flagrant sur l'activation de p38-MAPK. Le CL097 potentialise fortement la phosphorylation basale de p38-MAPK ainsi que celle induite par le fMLP (**Figure 11A, B, E et F**). Pareillement à son effet sur AKT, la phosphorylation de p38-MAPK induite par le fMLP est maintenue pour longtemps (plus de 30 min) en présence de CL097 dans les deux groupes de PN, alors qu'elle retourne rapidement au niveau basal en absence de l'agoniste des TLR7/8 (**Figure 11A, B, E et F**).

Pareillement à son effet sur AKT, la phosphorylation de p38-MAPK induite par le fMLP est maintenue pour longtemps (plus de 30min) en présence de CL097 dans les deux groupes de PN, alors qu'elle retourne rapidement au niveau basal en absence de l'agoniste des TLR7/8 (**Figure 11A, B, E et F**).

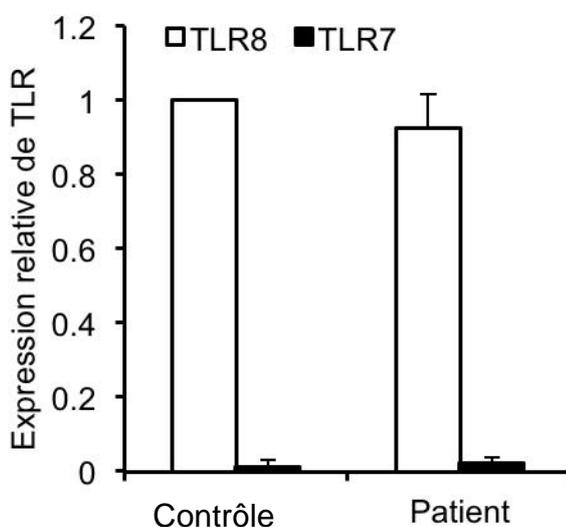
Ces résultats confirment clairement notre hypothèse, avancée ci-avant, que le déficit de dégranulation de la MPO des PN des patients est liée à une défailance de l'activation de la voie AKT et de p38-MAPK, que nous avons impliquées comme effecteurs majeurs dans la dégranulation de la MPO induite par le fMLP. Ceci suggère également qu'une défailance de transduction des signaux en amont d'AKT pourrait être à l'origine de ce déficit, du fait que le CL097 restaure l'activation des effecteurs de la signalisation ainsi que la dégranulation de la MPO chez les patients cirrhotiques.



**Figure 11. Le CL097 potentialise la phosphorylation d'AKT et de p38-MAPK et reverse leur activation défailante dans les PN des patients.** (A, B) Les PN de donneurs sains (contrôle) et de patients cirrhotiques ont été prétraités pendant 10 min en absence ou présence de l'agoniste des TLR7/8, le CL097 (1 µg/ml), puis stimulés avec du fMLP (1 µM) pendant différentes périodes de temps.(C-F) La phosphorylation d'AKT et de p38-MAPK a été quantifiée et normalisée par rapport à l'actine, et le rapport est exprimé en pourcent des valeurs maximales du contrôle obtenues avec le fMLP ( $n=4-5$ ;  $*p<0.05$  versus contrôle).

#### IV.7. La restauration de la dégranulation de la MPO et de l'activation d'AKT et de p38-MAPK par le CL097 est médiée principalement via TLR8

Le CL097 est connu pour activer à la fois TLR7 et TLR8. Cependant, dans le PN humain, l'existence du TLR7 fait l'objet de débat (Janke *et coll.*, 2009 ; Berger *et coll.* 2012). Pour vérifier l'expression des TLR8/7 dans les PN des patients cirrhotiques, nous avons procédé dans un premier temps par l'analyse en immuno-empreinte, mais nous avons rencontré quelques problèmes techniques liés aux anticorps primaires utilisés, notamment un signal très faible, plusieurs bandes reconnus (produits dégradés ou signal non spécifique) et aucun signal pour TLR7. Nous avons donc changé de stratégie et nous avons analysé l'expression de TLR au niveau de l'ARNm en utilisant un kit spécifique de RT-qPCR. Les résultats montrent une expression similaire de TLR8 dans les PN des contrôles et des patients cirrhotiques (**Figure 12**). Cependant, le TLR7 n'était pas détectable dans les PN des deux groupes de donneurs, ce qui est en accord avec les données de la littérature. Ces résultats nous permettent ainsi de proposer que la restauration de l'activation d'AKT et de la p38-MAPK, associée à une restauration de la dégranulation de la MPO par le CL097, est médiée préférentiellement via le TLR8.

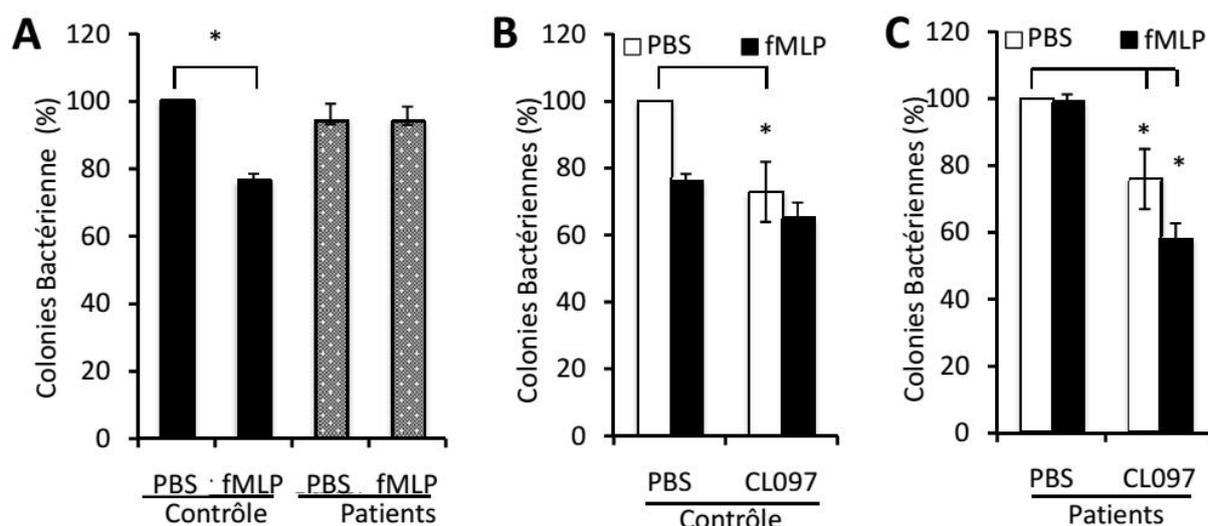


**Figure 12. Expression des TLR7/8 dans les PN de donneurs sains et de patients.** L'ARN de  $5 \times 10^6$  PN de contrôles et de patients cirrhotiques a été extrait dans le Trizol<sup>®</sup>. Ensuite, la RT-qPCR de TLR7 et TLR8 a été réalisée en duplicata. Les moyennes ( $\pm$  SEM) de différentes valeurs de contrôle et de patients sont calculées, et l'expression relative de TLR7 et 8 est exprimée en utilisant les valeurs de TLR8 du contrôle comme référence ( $n=12$  dans chaque groupe).

#### IV.8. Défaillance de l'activité bactéricide dans les PN des patients cirrhotiques, et sa restauration par le CL097

La dégranulation des PN humains est l'un des mécanismes majeurs impliqués dans leur fonction bactéricide. Il en résulterait ainsi que la défaillance de signalisation et de libération de la MPO des PN des patients pourrait affecter l'activité bactéricide des PN. Pour examiner cette hypothèse, nous avons utilisé un modèle particulier de bactéricidie par les PN stimulés par le fMLP mis au point dans notre laboratoire (Rolas *et coll.*, 2013). L'incubation des PN témoins avec des bactéries *E.coli* opsonisées, suivie de leur stimulation par le fMLP réduit significativement (25-30%) la viabilité bactérienne (**Figure 13A**), contrairement aux PN des patients qui ne montrent aucun effet bactéricide (**Figure 13A**).

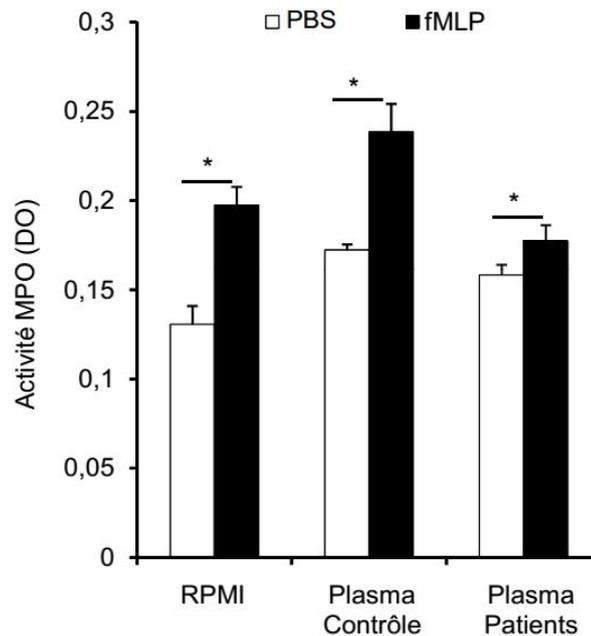
Dans d'autres tests, les PN ont été prétraités avec du CL097 (1.5 µg/ml) pendant 10 min préalablement à leur incubation avec les bactéries. De façon intéressante, le CL097 seul induit une activité bactéricide significative des PN de deux groupes, contrôles et patients (**Figure 13 B et C**). De plus, le CL097 potentialise fortement l'activité bactéricide dans les PN des patients stimulés par le fMLP, tandis qu'une augmentation non significative a été observée avec les PN des contrôles. Cet effet bénéfique du CL097 est bien dépendant des PN car l'incubation des bactéries seules avec le CL097 *in vitro*, ne modifie pas leur viabilité (Résultats non montrés). L'ensemble des résultats permettent ainsi de déduire que l'activation de TLR8 pourrait corriger le déficit de bactéricidie des PN des patients cirrhotiques.



**Figure 13. Défaillance de l'activité bactéricide des PN de patients cirrhotiques et restauration par le CL097.** (A) Les PN de donneurs sains (Contrôle) et de patients cirrhotiques ont été incubés avec *E. coli* pendant 5min, puis stimulés ou non (PBS) avec du fMLP (1 µM) pendant 25min. (B, C) Les PN incubés avec les bactéries ont été prétraités en absence (PBS) en présence de CL097 (1µg/ml) pendant 2min avant leur stimulation avec le fMLP (1 µM) pendant 25 min. Les cellules ont été lysées et les bactéries viables ont été quantifiées et exprimées en pourcent du contrôle (A), ou en % de cellules non traitées (PBS) dans les deux populations cellulaires (B, C) (n=6 dans chaque groupe, \*p < 0.05).

#### **IV.9. Le plasma des patients cirrhotiques réduit la dégranulation de la MPO des PN normaux stimulés avec du fMLP**

En vue de comprendre davantage les mécanismes initiateurs de défaillance de dégranulation des PN de patients, nous avons exploré l'effet du plasma des patients cirrhotiques sur la dégranulation des PN stimulés par du fMLP, considérant que les jeunes PN qui arrivent dans le sang subissent des modifications du fait de leur interaction avec les substances nuisibles du plasma. Pour cela, l'effet du plasma des patients et de donneurs sains a été comparé sur la dégranulation de la MPO dans les PN normaux. Les PN ont été prétraités toute la nuit dans 1ml RPMI en présence de 25% de plasma de patients ou de contrôles, puis lavés deux fois dans le PBS. Les PN sont ensuite stimulés avec du fMLP (1 $\mu$ M) pour la dégranulation. Les résultats montrent que le plasma des témoins augmente aussi bien la dégranulation basale de la MPO que celle induite par le fMLP en comparaison avec le RPMI pris comme contrôle (**Figure 14**). En revanche, le plasma des patients cirrhotiques, qui a aussi tendance à augmenter la dégranulation basale du même ordre que le plasma control, réduit fortement la dégranulation des PN stimulés avec le fMLP. Ces résultats suggèrent que le plasma des patients contiendrait des substances qui agissent vraisemblablement via des protéines membranaires induisant des modifications persistantes qui inhibent la signalisation intracellulaire et la dégranulation des PN stimulés avec le fMLP.



**Figure 14. Le plasma des patients cirrhotiques inhibe la dégranulation des PN normaux stimulés avec du fMLP.** Les PN de donneurs sains ( $5 \cdot 10^6$  cellules) ont été incubés à  $37^\circ\text{C}$  dans le RPMI (atmosphère de  $\text{CO}_2$  à 5%) pendant 12 heures en l'absence (PBS) ou en présence de 25% de plasma provenant de patients atteints de cirrhose ou de donneurs sains ( $n=6$  dans chaque groupe). Les cellules ont été lavées, remises en suspension dans le tampon HBSS contenant du calcium et du magnésium. La viabilité des cellules prélevées évaluées par le test d'exclusion au bleu de Trypan était d'environ 92-95%. La dégranulation des PN ( $0,5 \cdot 10^6$  cellules /  $400\mu\text{l}$ ) a été induite par le fMLP ( $1\mu\text{M}$ ) pendant 2 minutes et l'activité MPO a été quantifiée dans le milieu extracellulaire et exprimé en  $\text{DO}$  à  $3\text{min} / 10^6$  cellules ( $n=6$ ,  $*p < 0,05$ ).

# *Discussion*

## V. Discussion

La cirrhose alcoolique décompensée est une affection hépatique sévère due à un abus de consommation d'alcool, et caractérisée par une défaillance fonctionnelle du foie avec des répercussions de défaillances multi-viscérales (Moreau *et coll.*, 2013). Elle est la cause de près de 4% de la mortalité mondiale (Rehm *et coll.*, 2009). A leur admission hospitalière, environ 26% des patients cirrhotiques décompensés présentent des infections bactériennes (Ramaiah *et Jaeschke*, 2007), et approximativement un tiers d'entre eux décèdent au bout de six mois à cause du développement des défaillances multi-viscérales, ou d'infections bactériennes (sepsis, péritonites) (Moreau *et coll.*, 2013). Ces données constituent une indication de l'incapacité des systèmes de défense des patients à développer des activités antimicrobiennes efficaces. Toutes les stratégies visant à prévenir les défaillances des systèmes immunitaires ou à les corriger sont ainsi d'un grand intérêt pour les patients.

Les PN sont la première ligne de défense cellulaire antimicrobienne de l'organisme, et jouent un rôle clé dans l'élimination des microorganismes envahisseurs (Babior, 2004). Cette fonction de défense innée exige une coordination fine de deux activités importantes du PN, la libération de la myéloperoxydase (MPO) des granules azurophiles (dégranulation) et la production massive des formes réactives de l'oxygène (FRO) par le complexe NADPH oxydase (NOX2) producteur d'anion superoxyde ( $O_2^{\circ}$ ), phénomène nommé également explosion oxydative. L'anion superoxyde dismute instantanément pour former le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). La MPO utilise alors l' $H_2O_2$  et le chlorure pour former l'hypochlorite et la chloramine, qui sont des agents très toxiques pour les bactéries (Klebanoff, 2005 ; Nauseef, 2014). L'importance biologique de la MPO est bien illustrée chez des souris "knock-out" qui montrent une augmentation des infections par *klebsiella pneumoniae* et *candida albicans*, une mortalité accrue (Aratani *et coll.*, 2004), et une inflammation prolongée (El Kebir *et coll.*, 2008). La libération de la MPO et la production de FRO sont déclenchées par divers médiateurs pro-inflammatoires, parmi lesquels les peptides bactériens formylés qui sont aussi des chimioattractants qui alertent les PN en cas d'infection via la stimulation d'un récepteur membranaire, le fPR, un récepteur couplé à une protéine G (Dorward *et coll.*, 2015). Les activités antibactériennes de PN sont étroitement régulées par des événements de signalisation déclenchés par le fPR et impliquant des phospholipases, des protéines G trimériques et monomériques, des protéines kinases telles que la protéine kinase C (PKC), des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK) et mTOR, la cible de la rapamycine (Costa *et coll.*, 2010 ; Futosi *et coll.*, 2010 ; Rolas *et coll.*, 2013). L'altération des mécanismes de signalisation a comme conséquence les dysfonctionnements de

PN qui portent atteinte à la défense de l'hôte (Dinauer, 2014 ; Kruger *et coll.*, 2015 ; Dorward *et coll.*, 2015).

De nombreux dysfonctionnements de PN ont été rapportés au cours de la progression de cirrhose : défaillance de la phagocytose, de la production des FRO, déficit de dégranulation (exocytose) ou de chimiotactisme (Feliu *et coll.*, 1977 ; Rajkovic *et coll.*, 1986 ; Garfia *et coll.*, 2004 ; Panasiuk *et coll.*, 2005 ; Tritto *et coll.*, 2011). Ces défaillances sont plus au moins prononcées en fonction du degré de la sévérité de la pathologie et se développent aussi bien dans les cirrhoses alcooliques que non alcooliques (Lebrun *et coll.*, 1992 ; Garfia *et coll.*, 2004 ; Markwick *et coll.*, 2015). Ceci suggère ainsi que les mécanismes initiateurs des déficits ne sont pas dus à l'alcool en soi, même si l'alcool peut avoir un effet aggravant. En effet, l'éthanol est connu pour inhiber de nombreuses activités du PN en raison notamment de sa capacité d'inhiber la production d'acide phosphatidique/Diacylglycérol via la phospholipase D (phénomène appelé transphosphatidylolation). Les mécanismes biochimiques et moléculaires intervenant dans ces dysfonctionnements des PN induits au cours de la cirrhose hépatique sont encore mal connus.

Notre étude apporte de nouvelles données biochimiques sur les mécanismes par lesquels la cirrhose alcoolique paralyse les systèmes de défense anti-infectieux de l'organisme. Elle fournit les premières preuves que la cirrhose hépatique décompensée induit une défaillance sévère de l'activation d'AKT, p38-MAPK et ERK1/2 dans les PN humains stimulés par un agent bactérien, le fMLP, sans altérer l'expression de ces effecteurs de signalisation, ni celle du récepteur membranaire du fMLP, le fPR. Ces résultats indiquent que les origines moléculaires de tels déficits pourraient se situer en amont des trois effecteurs précédents, dans les étapes précoces de la cascade de signalisation orchestrée par le fPR. Parmi les candidats potentiels impliqués dans les étapes précoces de signalisation, la phospholipase C spécifique de l'inositol (InsPLC) a été rapportée défaillante dans les PN des patients cirrhotiques stimulés par le fMLP (Garfia *et coll.*, 2004). L'InsPLC est responsable de la génération du diacylglycérol (DAG), et de l'inositol triphosphate (IP3) qui induit l'augmentation de la concentration du calcium cytosolique (Berridge *et Irvine*, 1984) ; ce dernier joue le rôle d'effecteur majeur de l'exocytose (Lacy, 2006). D'autre part, le DAG et le calcium activent de nombreuses protéine Kinases C (PKC) qui à leur tour activent AKT et les MAPK (Tang *et coll.*, 2011 ; Chiariello *et coll.*, 2010). Dans les PN stimulés par le fMLP, la PLC (PLC $\beta$ 2) est directement activée par les sous-unités  $\beta\gamma$  de la protéine G trimérique (Gi) couplé au fPR (Ward *et coll.*, 2000), ce qui suggère des altérations potentielles, biochimique ou d'expression, au niveau des protéines G trimériques de type Gi couplées au fPR. En accord avec cette hypothèse, la production des FRO induite par les activateurs directs des protéines G tels que le fluorure de sodium (NaF) ou d'aluminium (ALF4), était également défaillante dans les PN des patients cirrhotiques (Garfia *et coll.*, 2004). Il a été également

rapporté que d'autres défaillances des étapes précoces de signalisation pourraient affecter l'axe PI3K/AKT dans les monocytes issus des patients cirrhotiques (Lee *et coll.*, 1993).

Les dysfonctionnements des PN induits au cours de la cirrhose hépatique résultent des altérations cellulaires intrinsèques, vu que ces dysfonctionnements persistent après lavage des cellules (Lebrun *et coll.*, 1992 ; Garfia *et coll.*, 2004). Cependant, une réversibilité des dysfonctionnements a été rapportée après élimination des endotoxines du plasma des patients (Mookerjee *et coll.*, 2007). Dans notre étude, seuls les plasmas des patients étaient capables de réduire l'exocytose de la MPO induite par le fMLP dans les PN des donneurs sains, ce qui suggère la présence d'inhibiteurs diffusibles dans ces plasmas. En fait, les lipopolysaccharides (LPS) ont été proposés comme candidats pour un tel effet inhibiteur (Mookerjee *et coll.*, 2007). Néanmoins, leurs mécanismes d'action pourraient être directs. En effet, les faibles concentrations des LPS stimulent la dégranulation des PN (Tazi *et coll.*, 2006) et potentialisent la production des FRO induite par de nombreux agents y compris le fMLP (Guthrie *et coll.*, 1984). En revanche, les fortes concentrations des LPS induisent directement une faible production du superoxyde (Etheredge *et Spitzer*, 1993). Nous supposons que cette stimulation et les effets oxydants des FRO pourraient induire une désensibilisation des PN suite à leur stimulation. De plus, d'autres agents présents dans le plasma des patients à des concentrations élevées pourraient également avoir des effets nocifs sur les réponses des PN, tels que l'ammoniac qui réduit la capacité phagocytaire des PN mais induit une production spontanée des FRO (Shawcross *et coll.*, 2008).

Parmi les trois effecteurs majeurs de signalisation étudiés dans ce travail, seules AKT et p38-MAPK sont impliquées dans la régulation de la dégranulation de la MPO des PN, comme le montrent l'inhibition induite par les antagonistes spécifiques de ces effecteurs. Les résultats montrent également que la p38-MAPK est activée en aval d'AKT. En fait, l'implication de la p38-MAPK dans l'exocytose des granules primaires dans notre étude vient confirmer d'autres résultats obtenus avec des souris Knock-out pour les Src tyrosine kinases, et qui ont montré que p38-MAPK est activée en aval de ces tyrosine kinases (Mócsai *et coll.*, 2000). Cependant, le mécanisme par lequel AKT régule l'activation de p38-MAPK dans le PN humain reste inconnu. D'autres protéine kinases ont été proposées comme régulatrices de la libération de la MPO, parmi lesquelles la PKC dont la preuve de l'implication est fournie par l'observation que le PMA stimule la dégranulation de la MPO (Rajkovic *et coll.*, 1986). Il a été rapporté que la dégranulation induite par le PMA était également défaillante dans les PN des patients cirrhotiques (Rajkovic *et coll.*, 1986). Effectivement, nos résultats montrent également que la dégranulation de la MPO induite par le PMA est défaillante dans les PN des patients cirrhotiques. Ces résultats sont confirmés par la mesure de l'élastase extracellulaire, qui est un deuxième marqueur de

l'exocytose des granules azurophiles (Résultats supplémentaires : Figure S2 et S3, partie Annexes).

De façon inattendue, ERK1/2 dont l'activation a été fortement altérée dans les PN des patients, ne semblent pas réguler la dégranulation de la MPO/Elastase, ce qui est en accord avec d'autres résultats (Mócsai *et coll.*, 2000). Toutefois, un rôle d'ERK1/2 dans les fonctions de défense de PN n'est pas exclu, car le blocage d'ERK1/2 réduit d'environ 30% la production de FRO des PN sains, ce qui devrait impacter l'activité de la MPO car elle est étroitement dépendante de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La défaillance d'activation d'ERK1/2 observée dans les PN des patients pourrait contribuer dans le déficit de production de FRO par les PN chez ces mêmes patients, comme cela a été rapporté dans un autre travail du laboratoire d'accueil (Rolas *et coll.*, 2013).

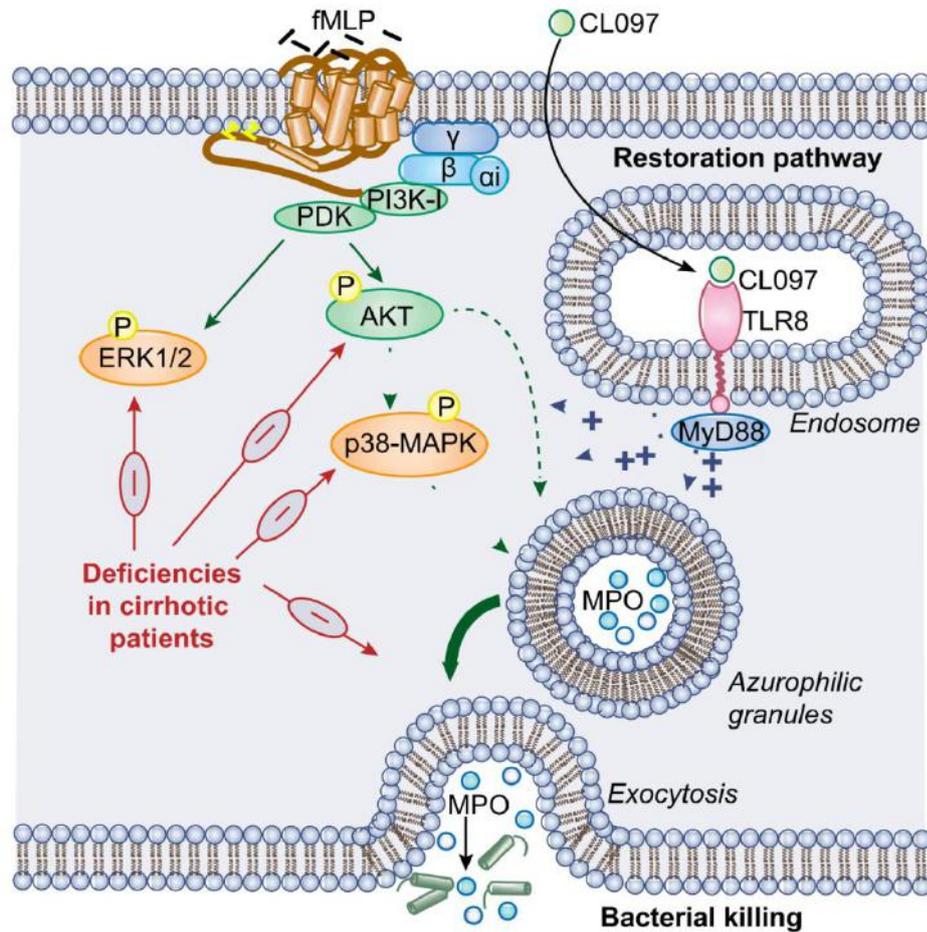
Dans la présente étude, 90% des patients qui étaient défailants pour la dégranulation de la MPO, présentaient également une forte défaillance de la production du superoxyde (30-35% du contrôle ; Résultats supplémentaires : Figure S1, partie Annexes), ce qui est en accord avec des résultats précédents (Rolas *et coll.*, 2013). L'activité défailante de la NADPH oxydase serait reliée à la défaillance d'activation d'AKT et de p38-MAPK car ces deux protéine kinases phosphorylent un composant essentiel de la NADPH oxydase, la p47<sup>phox</sup>, au niveau de S304/S328 (Chen *et coll.*, 2003) et S345 (El Benna *et coll.*, 1996), respectivement. Cette double défaillance de la production de FRO et de la libération de la MPO des PN de patients pourrait expliquer la défaillance de leur fonction bactéricide que l'on constate dans la présente étude, et qui en accord avec d'autres études (Panasiuk *et coll.*, 2005 ; Mookerjee *et coll.*, 2007 ; Stadlbauer *et coll.*, 2008).

Dans une deuxième partie de ce travail, nous avons pu montrer que la défaillance de la signalisation intracellulaire et de dégranulation des PN des patients était réversible, et pouvait être complètement corrigée *ex-vivo* à l'aide d'un agoniste des TLR7/8, le CL097, ce qui ouvre des perspectives thérapeutiques pour lutter contre les infections chez des patients immuno-déprimés. D'autres tentatives avaient été faites pour améliorer les fonctions des PN des patients cirrhotiques, soit *in vitro* par élimination des endotoxines du plasma des patients (Mookerjee *et coll.*, 2007), soit *in vivo* par le traitement des patients avec le G-CSF (Tritto *et coll.*, 2011). Ce dernier agent est une cytokine qui agit via des récepteurs membranaires spécifiques et favorise la granulopoïèse *in vivo* et les activités de défense des PN *in vitro*. Notre nouvelle stratégie basée sur l'activation des récepteurs TLR7/8 par le CL097 présente au moins deux avantages stratégiques majeurs. Le premier est le fait que les TLR7/8 sont intracellulaires localisés dans les endosomes et sont en quelque sorte protégés comparativement aux récepteurs exprimés en surface à la membrane plasmique et qui subissent des modifications du fait d'inhibiteurs présents

dans le plasma des patients. Le deuxième avantage est le fait que le CL097 est un agent synthétique d'une grande stabilité. Il a déjà été montré que le CL097 stimule la phosphorylation de p47<sup>phox</sup> et augmente la production des FRO dans des PN sains, et ce de façon dépendante des MAP-Kinases (Makni-Maalej *et coll.*, 2012). De façon intéressante, dans notre étude le CL097 restaure l'exocytose de la MPO ainsi que la bactéricidie des PN des patients. Cette propriété à la fois originale et prometteuse du CL097 serait reliée au pouvoir du CL097 à potentialiser et à maintenir l'activation d'AKT et de p38-MAPK, car en absence de CL097 l'activation des deux kinases est défaillante, transitoire et insuffisante pour induire une réponse physiologique dans les PN des patients cirrhotiques. Etant donné que l'expression de TLR7 était très faiblement détectable dans les PN humains (Janke *et coll.*, 2012 ; Berger *et coll.*, 2012), comme le confirment ici nos résultats, ceci suggère que ce sont les agonistes de TLR8 qui pourraient constituer des candidats prometteurs pour améliorer les activités de défense des PN chez les patients immunodéprimés. Dans ce sens, de nombreuses activités immuno-stimulatrices des agonistes de TLR7/8 ont été rapportées dans les PN, telles que la production des cytokines (Hayashi *et coll.*, 2003) et des médiateurs lipidiques (Hattermann *et coll.*, 2007) ; ainsi que dans d'autres leucocytes tels que les monocytes, les cellules présentatrices de l'antigène et les lymphocytes T régulateurs, avec un effet de protection immunitaire particulier des leucocytes des nouveau-nés (Philbin *et Levy*, 2007). Il a aussi été rapporté que le CL097 restaure également la production du G-CSF qui est inhibée dans les monocytes suite au prétraitement avec de l'INF $\gamma$ , une cytokine qui induit une neutropénie (Tajuddin *et coll.*, 2010). Le CL097 est également utilisé comme adjuvant pour induire la réponse des Th1 spécifique pour l'Ag de l'hépatite B dans des états d'immuno-tolérance (Wang *et coll.*, 2014). Enfin, le développement de nouveaux agonistes de TLR7/8 avec améliorations thérapeutiques significatives ont été obtenues avec un agoniste de TLR7, l'imiquimod, dans le traitement génital et les verrues périanales causées par certaines souches de papillomavirus humaine, et l'herpès génital (Philbin *et Levy*, 2007).

En conclusion, cette étude fournit les premières indications que la cirrhose alcoolique avancée altère sévèrement l'activation d'effecteurs de signalisation ; AKT, p38-MAP kinases, et ERK1/2, ainsi que la dégranulation de la MPO qui est étroitement lié aux deux premiers effecteurs (mécanismes résumés dans la **figure 15**). Ces carences, combinées avec la sévère défaillance de la production de FRO par les PN des patients décrite récemment chez les mêmes patients (Rolas *et coll.*, 2013), permettent d'expliquer le déficit d'activité bactéricide déficiente des PN, ce qui peut contribuer à augmenter la susceptibilité des patients cirrhotiques à l'infection bactérienne. Fait intéressant, les déficits d'activités de signalisation et de défense des PN des patients peuvent être inversés via l'activation des TLR7/8, ce qui suggère des perspectives

thérapeutiques pour améliorer les mécanismes de défense anti-infectieuse de l'hôte chez les patients immunodéprimés.



**Figure 15. Modèle proposé pour la dégranulation de la MPO induite par le fMLP via AKT/MAPK dans les PN sains et de patients cirrhotiques.** La stimulation des PN par le peptide bactérien fMLP via son récepteur couplé à la protéine Gi (fPR) induit une activation rapide d'AKT et de lap38-MAPK qui contribuent à la libération de la MPO. Chez les patients cirrhotiques, la signalisation, la libération de la MPO et l'activité bactéricide sont sévèrement défaillantes. La stimulation du récepteur Toll 8 (TLR8) intracellulaire, potentialise l'activation d'AKT/MAPK et restaure la dégranulation de la MPO et la fonction bactéricide des PN.

*Conclusion*  
*et*  
*Perspectives*

## VI. Conclusions et Perspectives

### VI.1. Conclusions

Dans cette étude, nous apportons de nouvelles données physiologiques, biochimiques et moléculaires sur les défaillances de la dégranulation et d'activation des effecteurs majeurs de la signalisation intracellulaires dans les PN de patients atteints de cirrhose hépatique alcoolique. Nous proposons également une nouvelle approche thérapeutique, en corrigeant ces défaillances biochimiques et fonctionnelles, par activation des récepteurs Toll-Like 7 et 8 (TLR7/8).

En combinant une étude approfondie de la dégranulation de PN induite par un agent bactérien, le fMLP, et une étude de l'activation des effecteurs majeurs de signalisation intracellulaire, nous montrons que les PN de patients ayant une cirrhose alcoolique avancée, sont sévèrement défaillants pour la dégranulation de la MPO des granules azurophiles, l'activité bactéricide et pour l'activation d'AKT, p38-MAPK et ERK1/2, mesurée par leur forme phosphorylée. Cependant, la défaillance de la dégranulation est liée à celle d'AKT et p38-MAPK mais pas de ERK1/2. En revanche, la défaillance d'activation de ERK1/2 contribue au déficit de production d'anion superoxyde par les PN de patients. Par ailleurs, toutes ces défaillances ne sont pas dues à un déficit d'expression des protéines étudiées, y compris la MPO et fPR, le récepteur du fMLP.

Enfin, nous avons pu corriger *in vitro* le déficit de dégranulation de la MPO et l'activité bactéricide des PN des patients cirrhotiques, ceci à l'aide d'un agoniste de récepteurs TLR7/8, le CL097. Cet agoniste agit en potentialisant le niveau d'activation des voies AKT, p38-MAPK et ERK1/2 et leur maintien dans le temps. De plus, le CL097 agit préférentiellement via le TLR8 qui s'avère être fortement exprimé dans les PN, à l'inverse du TLR7.

Au final, cette thèse a contribué à de nouvelles avancées sur la régulation biochimique de la dégranulation de la MPO des PN normaux et pathologiques, et propose une nouvelle piste thérapeutique en vue de restaurer cette fonction majeure de défense anti-infectieuse chez certains patients immunodéprimés.

## VI.2. Perspectives

Cette étude sur la dégranulation des PN sains et de patients atteints de cirrhose hépatique alcoolique décompensée a apporté de nouvelles données physiologiques, biochimiques et moléculaires sur la régulation de leur fonction anti-infectieuse et ses implications physiopathologiques.

Ce travail nous a permis de mettre en lumière les effets nuisibles de la cirrhose alcoolique sur l'activation de trois effecteurs majeurs de la signalisation dans les PN des patients, en l'occurrence AKT, p38 et ERK1/2. Ces voies de signalisation sont ubiquitaires et sont très bien étudiées dans notre laboratoire depuis de nombreuses années (Equipe du Dr. Axel Périanin). Cependant, leurs interactions moléculaires induites dans un contexte pro-inflammatoire et leurs conséquences fonctionnelles restent à clarifier (Djerdjouri *et coll.*, 1999; Paruch *et coll.*, 2006; Patel *et coll.*, 2010; Rolas *et coll.*, 2013). Elles ont permis récemment d'identifier (Rolas *et coll.*, 2013) un nouvel effecteur de la régulation de l'activité NADPH oxydase, mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*). La kinase mTOR constitue un effecteur important dans l'axe AKT/mTOR/p-38MAPK/p47<sup>phox</sup>, et joue un rôle important dans la régulation de l'explosion oxydative des PN (Rolas *et coll.*, 2013). De plus, son inhibition par le médicament rapamycin aggrave le déficit d'explosion oxydative des PN de patients, ce qui suscite des réserves concernant le traitement des patients immunodéprimés par les inhibiteurs de mTOR. Cependant, le rôle de cet effecteur dans la régulation de dégranulation des PN sains et de patients cirrhotiques est encore inconnu. Mes perspectives de recherches s'articulent ainsi autour de deux axes complémentaires.

Le premier vise à étudier la contribution de mTOR dans la régulation de la dégranulation des PN normaux et de patients cirrhotiques. Pour cela, deux approches différentes seront mises en place :

Une approche pharmacologique en utilisant un inhibiteur spécifique de mTOR, notamment la Rapamycin. Les PN sains et de patients cirrhotique seront prétraités en présence et absence de la rapamycine pour bloquer mTOR, puis la dégranulation sera étudiée pas dosage de l'activité de la MPO, ou d'autres marqueurs (Elastase) après stimulation des cellules, notamment par le fMLP.

Une deuxième approche de biologie moléculaire qui consiste à réprimer l'expression de mTOR dans les cellules de la lignée promyélocytaire HL-60. La déplétion de l'expression de mTOR sera réalisée à l'aide de courtes séquences d'ARN, siRNA (small interfering RNA), spécifiques pour bloquer l'ARNm et inhiber l'expression de mTOR. La capacité de dégranulation

des cellules ainsi déplétées sera évaluée par dosage de l'activité de la MPO dans les surnageant de dégranulation après stimulation des cellules.

Cette première partie a déjà été entamée au cours de mon séjour scientifique (bourse PNE) dans le laboratoire du Dr Périanin. Des résultats originaux ont été obtenus et font l'objet d'un manuscrit en cours de préparation.

La dégranulation des PN fait intervenir toute une panoplie de molécules (SNAP et SNARE) qui font partie de la machinerie effectrice d'exocytose. Ces protéines (SNAP23-25, Munc18, Synatxines, Rab ...etc) seraient activées par phosphorylation par les différents effecteurs de la signalisation. Dans le deuxième axe de nos perspectives, nous souhaitons étudier les mécanismes d'activation de ces protéines dans les PN sains. L'étude de la phosphorylation de ces protéines se fera par immuno-empreintes en utilisant des anticorps spécifiques des formes phosphorylées. La contribution des effecteurs de signalisation dans la phosphorylation des protéines de la machinerie d'exocytose sera étudiée en utilisant les inhibiteurs spécifiques de ces effecteurs, puis la vérification de la phosphorylation des protéines d'exocytose par immuno-empreinte. Par la suite, il sera question d'examiner l'état de phosphorylation et d'activation de ces protéines de la machinerie d'exocytose dans les PN de patients atteints de cirrhose décompensée, afin de déterminer les répercussions des défaillances observées dans ces PN sur l'activation de la machinerie d'exocytose. Il serait également intéressant de vérifier l'état d'expression de ces protéines dans les cellules des patients cirrhotiques.

Les nouvelles connaissances fondamentales que nous avons apportées durant cette thèse concernant la régulation de la dégranulation des PN normaux et les défaillances dans les PN pathologiques nous ont permis de proposer une stratégie permettant de corriger le déficit de dégranulation de PN de patients cirrhotiques déficients. Nous avons pour cela utilisé comme outil un agoniste des TLR7/8 qui a permis d'augmenter la phosphorylation d'AKT et des MAPK induite par le fMLP, et de restaurer le déficit de dégranulation ainsi que la bactéricidie des PN pathologiques. D'autres agonistes de la même famille (Imidazoquinoline) sont en cours d'évaluation et un analogue du CL097 (R848) s'est avéré beaucoup plus efficace dans le modèle de sang total. Ces agonistes seront testées dans un premier temps dans un modèle murin de sepsis disponible dans notre laboratoire afin d'évaluer leur efficacité *in vivo*. Ensuite, les molécules seront testées de façon spécifique en vue de cibler principalement les PN afin de limiter les effets secondaires observés chez des patients. D'une manière générale, ce projet serait bénéfique aux patients qui présentent des déficiences immunitaires d'origine diverse (certaines CGD, ARDS, maladie de Crohn, infections virales, médicaments, brûlures, radiothérapie, chimiothérapie), ce qui représente une nouvelle approche thérapeutique ciblée et très prometteuse.

*Références*

*Bibliographiques*

## Références Bibliographiques

- Akira S, Uematsu S and Takeuchi O (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*; 124(4): 783-801.
- Albillos A, Lario M, Álvarez M, Alcalá U De, Salud I and Lii C (2014). Cirrhosis-associated immune dysfunction : Distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol*; 61(6):1385-96
- Ali H, Richardson RM, Haribabu B and Snyderman R (1999). Chemoattractant receptor Cross-desensitization. *J Biol Chem*; 274(10): 6027-6030.
- Al-Shami A, Bourgoin SG and Naccache PH (1997). Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Activated signalling pathways in human neutrophils. I. Tyrosine phosphorylation-dependent stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase and inhibition by phorbol esters. *Blood*; 89(3): 1035-1044.
- Altamirano J and Bataller R (2011). Alcoholic liver disease: pathogenesis and new targets for therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*; 8: 491-501
- Altamirano J, Miquel R, Katoonizadeh A, Abalde JG, Duarte-Rojo A, Louvet A, Augustin S, Mookerjee RP, Michelena J, Smyrk TC, Buob D, Leteurtre E, Rincón D, Ruiz P, García-Pagán JC, Guerrero-Marquez C, Jones PD, Barritt AS, Arroyo V, Bruguera M, Bañares R, Ginès P, Caballería J, Roskams T, Nevens F, Jalan R, Mathurin P, Shah VH and Bataller R (2014). A histologic scoring system for prognosis of patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology*; 146(5):1231-9.e1-6.
- Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD and Zychlinsky A (2012). Neutrophil Function : From Mechanisms to Disease. *Annu Rev Immunol*; 30: 459-89.
- Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Suzuki K, Dinauer MC, Maeda N and Koyama H (2004). In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. *Jpn J Infect Dis*; 57: S15.
- Arnhold J and Flemmig J (2010). Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. *Arch Biochem Biophys*; 500(1): 92-106
- Arnljots K, Sørensen O, Løllike K, Borregaard N (1998). Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells. *Leukemia*; 12(11):1789-95
- Avdi NJ, Malcom KC, Nick JA and Worthen GS (2002). A role for protein phosphatase-2A in p38 Mitogen-activated Protein Kinase-mediated regulation of the c-Jun NH2-terminal Kinase pathway in human neutrophils. *J Biol Chem*; 277(43): 40687-40696.
- Avdi NJ, Winston BW, Russel M, Young SK, Johnson GL, Worthen GS (1996). Activation of MEKK by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. Mapping pathways for mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*; 271(52):33598-606.
- Babior BM (1999). NADPH oxidase: An update. *Blood*; 93: 1464-1476.
- Babior BM (2004). NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*, 16(1), 42-47.
- Baggiolini M, Boulay F, Badwey JA and Curnutte JT (1993). Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. *FASEB* ; 7: 1004-1010.
- Bautista AP. Neutrophilic infiltration in alcoholic hepatitis (2002). *Alcohol*; 27(1): 17-21
- Bedard K and Krause K (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases : Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev*; 87(1): 245-313.
- Belambri SA, Hurtado-Nedelec M, Senator A, Makni-Maalej K, Fay M, Gougerot-Pocidaloma MA, Marie JC, Dang PM, El-Benna J (2012). Phosphorylation of p47phox is required for receptor-mediated NADPH oxidase/NOX2 activation in Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *Am J Blood Res*; 2(3): 187-93

- Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzone A, Davies DR and Segal DM (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol*; 24(10): 528-33.
- Ben-Baruch A, Michiel DF and Oppenheim JJ (1995). Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J Biol Chem*; 270(20): 11703-11706.
- Berger MI, Hsieh CY, Bakele M, Marcos V, Rieber N, Kormann M, Mays L, Hofer L, Neth O, Vitkov L, Krautgartner WD, von Schweinitz D, Kappler R, Hector A, Weber A and Hartl D (2012). Neutrophils express distinct RNA receptors in a non-canonical way. *J Biol Chem*; 287(23): 19409-17.
- Berridge MJ and Irvine RF (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*; 312(5992): 315-21.
- Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC and Roudot-Thoraval F (2013). The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol*; 58(3): 593-608.
- Bokoch GM (1995). Chemoattractants signalling and leukocyte activation. *Blood*; 86(5): 1649-1660.
- Bokoch GM and Diebold BA (2002). Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood*; 100(8): 2692-6.
- Bondeva T, Pirola L, Bulgarelli-Leva G, Rubio I, Wetzker R and Wymann MP (1998). Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3K $\gamma$  to the protein kinases PKB and MAPK. *Sci*; 282: 293-296.
- Borregaard N and Cowland JB (1997). Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood*; 89(10): 3503-3521.
- Borregaard N, Sørensen OE and Theilgaard K (2007). Neutrophil granules : a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol*; 28(8): 340-345.
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils , from Marrow to Microbes. *Immunity*; 33(5): 657-670.
- Bosch J, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC and Abraldes JG (2008). The management of portal hypertension: rational basis, available treatments and future options. *J Hepatol*; 48 (Suppl 1):S68-92
- Boulay F, Tardif M, Brouchon L and Vignais P (1990). The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochem*; 29(50): 11123-33.
- Boussif A, Rolas L, Weiss E, Bouriche H, Moreau R and Périanin A (2016). Impaired intracellular signaling, myeloperoxidase release and bactericidal activity of neutrophils from patients with alcoholic cirrhosis. *J Hepatol*; 64(5): 1041-8.
- Brinkmann V and Zychlinsky A (2012). Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin?. *J Cell Biol*; 198(5): 773-83.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y and Zychlinsky A (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Sci* ; 303(5663): 1532-5.
- Brochetta C, Vita F, Tiwari N, Scanduzzi L, Soranzo MR, Guérin-Marchand C, Zabucchi G and Blank U (2008). Involvement of Munc18 isoforms in the regulation of granule exocytosis in neutrophils. *Biochim Biophys Acta*; 1783(10): 1781-91.
- Bufe B, Schumann T, Kappl R, Bogeski I, Kummerow C, Podgórska M, Smola S, Hoth M, Zufall F (2015). Recognition of Bacterial Signal Peptides by Mammalian Formyl Peptide Receptors. *J Biol Chem*, 290(12): 7369-7387.
- Campanelli D, Melchior M, Fu Y, Nakata M, Shuman , Nathan C and Gabay JE (1990). Cloning of cDNA for proteinase 3: a serine protease, antibiotic, and autoantigen from human neutrophils. *J Exp Med*; 172: 1709-1715.

- Capodici C, hanft S, Feoktistov M and Pillinger MH (1998). Phosphatidylinositol 3-kinase mediates chemoattractant-stimulated, CD11b/CD18-dependent Cell-Cell adhesion of human neutrophils: Evidenc for an ERK-Independent pathways. *J Immunol*; 160: 1901-1909.
- Cathcart MK (2009). Signal-activated phospholipase regulation of leukocyte chemotaxis. *J Lipid Res*; 50: S231–S236.
- Catz SD (2014). The role of Rab27a in the regulation of neutrophil function. *Cell Microbiol*; 16(9): 1301–1310.
- Chen J, Tang H, Hay N, Xu J, Ye RD, and Dc W (2012). Akt isoforms differentially regulate neutrophil functions Akt isoforms differentially regulate neutrophil functions. *Hematology*, 115(21): 4237–4246.
- Chen LW, Lin MW and Hsu CM (2005). Different pathways leading to activation of extracellular signa-regulated kinase and p38 MAP kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine or platelet activating factor in human neurophils. *J Biomed Sci*, 12: 1-5.
- Chen Q, Powell DW, Rane MJ, Singh S, Butt W, Klein JB and McLeish KR (2003). Akt phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils. *J Immunol*; 170(10): 5302-8
- Chen YA and Scheller RH (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2: 98-106.
- Chiariello M, Vaqué JP, Crespo P and Gutkind JS (2010). Activation of Ras and Rho GTPases and MAP Kinases by G-protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol*; 661: 137-50.
- Chistiakov, DA, Bobryshev YV and Orekhov AN (2015). Neutrophil's weapons in atherosclerosis. *Exp Mol Pathol*; 99(3): 663–671.
- Chtanova T, Schaeffer M, Han SJ, van Dooren GG, Nollmann M, Herzmark P, Chan SW, Satija H, Camfield K, Aaron H, Striepen B and Robey EA (2008). Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection. *Immunity*; 29(3): 487-96
- Clark RA (1999). Activation of neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis*, 179(2), S309-317.
- Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM (1996). The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology*; 23(3):506-14
- Costa C, Germena G and Hirsch E (2010). Dissection of the interplay between class I PI3Ks and Rac signaling in phagocytic functions. *ScientificWorld J*; 10:1826-1839.
- Cowland JB, Borregaard, N and Ha M (2010). Neutrophil granules in health and disease. *J Intrn Med*; 268: 25–34 25–34.
- Cui BB, Tan CY, Schorn C, Tang HH, Liu Y and Zhao Y (2012). Neutrophil extracellular traps in sterile inflammation: the story after dying. *Autoimmunity*; 45(8): 593-6
- Dahlgren C, Gabl M, Holdfeldt A, Winther M and Forsman H (2016). Basic characteristics of the neutrophil receptors that recognize formylated peptides, a danger-associated molecular pattern generated by bacteria and mitochondria. *Biochem Pharmacol*; 114:22-39.
- D'Amigo G, Garcia-Tsao G and Pagliaro L (2006). Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol*; 44(1):217-31
- Dang PMC, Dewas C, Gaudry M, Fay M, Pedruzzi E, Gougerot-Pocidallo MA and El-Benna J (1999). Priming of human neutrophil respiratory burst by Granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) involves partial hosphorylation of p47phox. *J Biol Chem*, 274(29), 20704-20708.
- Dang PMC, Fontayne A, Jacques H, El-Benna J and Périanin A (2001). Protein kinase C $\zeta$  phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. *J Immunol*; 166: 1206-1213.

- Dennis E, Rhee SG, Billah MM and Hannun YA (1991). Role of phospholipases in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J*; 5: 2068-2077.
- Dewas C, Dang PM, Gougerot-Pocidallo M-A, El Benna J (2003). TNF induces phosphorylation of p47phox in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol*; 171:4392-4398.
- Dinauer MC (2007). Disorders of Neutrophil Function, An Overview. *Neutrophil Methods and Protocols. Methods Mol Biol*; 412: 489-504
- Dinauer MC (2014). Disorders of neutrophil function: An overview. *Neutrophil Methods and Protocols. Methods Mol Biol*; 1124: 501–515.
- Djerdjouri B, Lenoir M, Giroud JP and Périanin A (1999). Contribution of Mitogen-Activated Protein Kinase to stimulation of phospholipase D by the chemotactic peptide fMet-Leu-Phe in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*; 264: 371-375.
- Djerdjouri B, Pédruzzi E, Hakim J and Périanin, A (1994). Okadaic acid, an inhibitor of type 1 and 2A phosphatases, modulates the activation of phospholipase D in formyl peptide and mastoparan-stimulated human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*; 205: 1481-1487.
- Dorward DA, Lucas CD, Chapman GB, Haslett C, Dhaliwal K and Rossi AG (2015). The Role of Formylated Peptides and Formyl Peptide Receptor 1 in Governing Neutrophil Function during Acute Inflammation. *Am J Pathol*; 185(5): 1172–1184
- Downey GP, Butler JR, Brumell J, Borregaard N, Kjeldsen L, Sue-A-Quan AK and Grinstein S (1996). Chemotactic peptide-induced activation of MEK-2, the predominant isoform in human neutrophils: Inhibition by wortmannin. *J Biol Chem*; 271(35): 21005-21011.
- Downey GP, Butler JR, Tapper H, Fialkow L, Saltiel AR, Rubin BB and Grinstein S (1998). Importance of MEK in neutrophil microbicidal responsiveness. *J Immunol*; 160(1): 434-43.
- Droge W (2003). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*; 83 (1): 47-95.
- Dunzendorfer S and Wiedermann CJ (2000). Modulation of neutrophil migration and superoxide anion release by metoprolol. *J Mol Cell Cardiol*; 32(6): 915-24.
- El Benna J, Faust LP and Babior BM (1994). The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J Biol Chem*; 269(38): 23431-23436.
- El Benna J, Hayem G, Dang PM, Fay M, Chollet-Martin S, Elbim C, Meyer O and Gougerot-Pocidallo MA (2002). NADPH oxidase priming and p47phox phosphorylation in neutrophils from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and spondylarthropathy. *Inflammation*; 26(6): 273-8.
- El kebir D and Filep JG (2013). Modulation of neutrophil apoptosis and the resolution of inflammation through  $\beta$ 2-integrins. *Front Immunol*; 4: 1-15.
- El Kebir D, Jozsef L, Pan W and Filep JG (2008). Myeloperoxidase Delays Neutrophil Apoptosis Through CD11b/CD18 Integrins and Prolongs Inflammation. *CircRes*; 103: 352-359.
- El Benna J, Dang PM, Gaudry M, Fay M, Morel F, Hakim J and Gougerot-pocidallo M (1997). Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67phox during Human neutrophil activation. Regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways. *J Biol Chem*; 272(27): 17204-17208.
- Etheredge EE and Spitzer JA (1993). Chronic endotoxemia reversibly alters respiratory burst activity of circulating neutrophils. *J Surg Res*; 55(3): 261-8.
- Exton JH (1999). Regulation of phospholipase D. *Biochim Biophys Acta*; 1439(2): 121-33.

- Farhood A, McGuire GM, Manning AM, Miyasaka M, Smith CW and Jaeschke H (1995). Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia reperfusion injury in rat liver. *J Leukoc Biol*; 57(3): 368-74
- Fattori V, Amaral FA and Verri WJ (2016). Neutrophils and arthritis: Role in disease and pharmacological perspectives. *Pharmacol Res*; 112:84-98
- Faurschou M, Sorensen OE, Johnsen AH, Askaa J and Borregaard N (2002). Defensin-rich granules of human neutrophils: Characterization of secretory properties. *Biochim Biophys Acta*; 1591: 29-35.
- Faurschou M and Borregaard N (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microb Infect*; 5(14): 1317-27.
- Feliu E, Gougerot MA, Hakim J, Cramer E, Auclair C, Rueff B and Boivin P (1977). Blood polymorphonuclear dysfunction in patients with alcoholic cirrhosis. *Eur J Clin Invest*; 7(6): 571-7.
- Figueiredo A, Romero-Bermejo F, Perdigo R and Marcelino P (2012). The end-organ impairment in liver cirrhosis: appointments for critical care. *Crit Care Res Pract*; 2012(Article ID 539412): 1-13.
- Foster DA (2009). Phosphatidic acid signaling to mTOR: signals for the survival of human cancer cells. *Biochim Biophys Acta*; 1791(9): 949-55.
- Frevert U, Engelmann S, Zougbedé S, Stange J, Matuschewski NB, Liebes L and Yee H (2005). Intravital observation of plasmodium berghei sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol*; 3(6): 1034–1046.
- Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA and Sabatini DM (2006). mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol*; 16(18): 1865-70.
- Friedman SL (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*; 275(4): 2247-50.
- Futosi K, Fodor S and Mocsai A (2013). Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Inter Immunopharmacol*; 17(3), 638–650.
- Gabriel A, Kuddus RH, Rao AS, Watkins WD and Gandhi CR (1998). Superoxide-induced changes in endothelin (ET) receptors in hepatic stellate cells. *J Hepatol*; 29(4): 614-27
- Gamet-Payraastre L, Manenti S, Gratacap MP, Tulliez J, Chap H and Payraastre B (1999). Flavonoids and the inhibition of PKC and PI3kinase. *Gen Pharmacol*, 32, 279-286.
- Gao B, Jeong W and Tian Z (2008). Liver : An Organ with Predominant Innate Immunity. *Hepatology*; 47: 729-736.
- Garfia C, García-Ruiz I and Solís-Herruzo JA (2004). Deficient phospholipase C activity in blood polymorphonuclear neutrophils from patients with liver cirrhosis. *J Hepatol*; 40(5): 749-56.
- Garg V, Garg H, Khan A, Trehanpati N, Kumar A, Sharma BC, Sakhuja P and Sarin SK (2012). Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes CD34(+) cells and improves survival of patients with acute-on-chronic liver failure. *Gastroenterology*; 142(3):505-512
- Gaudry M, Caon AG and Naccache PH (1993). Modulation of the activity and subcellular distribution of protein tyrosine kinases in human neutrophil by phorbol esters. *FASEB J*; 7: 687-393.
- Gilbert C, Levasseur S, Dsaulnier P, Dusseault AA, Thibault N, Bourgoin S and Naccache PH (2003). chemotactic Factor-induced recruitment and activation of Tec family kinases in human neutrophils. II. Effects of LFM-A13, a specific Btk inhibitor. *J Immunol*; 170: 5235-5243.
- Gorzalczany Y, Sigal N, Itan M, Lotan O and Pick E (2000). Targeting of Rac1 to the phagocyte membrane is sufficient for the induction of NADPH oxidase assembly. *J Biol Chem*; 275(51): 40073-40081.

- Gramenzi, A., Caputo, F., Biselli, M., Kuria, F., Loggi, E., Andreone, P., & Bernardi, M. (2006). Review article: Alcoholic liver disease - Pathophysiological aspects and risk factors. *Aliment Pharmacol Ther*; 24(8): 1151–1161.
- Grisham MB and Ganger DN (1988).neutrophil mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig Dis Sci*; 33: 6S-15S.
- Gullberg U, Bengtsson N, Bulow E, Garwicz D, Lindmark A and Olsson I (1999). Processing and targeting of granule proteins in human neutrophils. *J Immunol Methods*; 232: 201–210
- Guthrie LA, McPhail LC, Henson PM and Johnston RB (1984).Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide.Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J Exp Med*; 160(6): 1656-1671.
- Hampton MB, Kettle AJ and Winterbourn CC (1998). Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase and Bacteria killing. *Blood*; 92(9): 3007-3017.
- Hannigan MO, Huang CK and Wu DQ (2004).Roles of PI3K in neutrophil function. *Curr TopMicrobiol Immunol*; 282: 165-75.
- Hattermann K, Picard S, Borgeat M, Leclerc P, Pouliot M and Borgeat P (2007). The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B<sub>4</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub> and platelet-activating factor biosynthesis. *FASEB J*; 21:1575-1585.
- Hayashi F, Means TK and Luster AD (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*; 102(7): 2660–2669.
- Hoyal CR, Gutierrez A, Young BM, Catz SD, Lin JH, Tschlis PN and Babior BM (2003). Modulation of p47<sup>PHOX</sup> activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100(9): 5130-5
- Ikenoue T, Inoki K, Yang Q, Zhou X and Guan KL (2008). Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J*; 27(14): 1919-31.
- Itakura A and McCarty OJ (2013). Pivotal role for the mTOR pathway in the formation of neutrophil extracellular traps via regulation of autophagy. *Am J Physiol Cell Physiol*; 305(3):C348-54.
- Jaeschke H (2002). Neutrophil-mediated tissue injury in alcoholic hepatitis. *Alcohol*; 27(1): 23–27.
- Jaeschke H and Farhood A (1991). Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol*; 260: G355–G362.
- Jaeschke H and Hasegawa T (2006). Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int*; 26(8): 912-9.
- Jaeschke H, Farhood A and Smith CW (1990). Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J*; 4(15): 3355-9
- Janeway DW, Travers P, Walport M and Shlomchik M (2001). An introduction to immunobiology and innate immunity. In *Immunology*, 5th edition, (New York); pp:347-380.
- Janke M, Poth J, Wimmenauer V, Giese T, Coch C, Barchet W, Schlee M and Hartmann G (2009). Selective and direct activation of human neutrophils but not eosinophils by Toll-like receptor 8. *J Allergy Clin Immunol*; 123(5): 1026-33
- Johnson JL, Hong H, Kiosses WB and Catz, D (2011).Munc13-4 Restricts Motility of Rab27a-expressing Vesicles to Facilitate Lipopolysaccharide-induced Priming of Exocytosis. *J Biol Chem*; 286(7): 5647-56
- Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S and Medzhitov R (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol*; 9(4): 361-8.
- Kaldi K, Szeberenyi J, Rada BK, Kovacs P, Geiszt M, Mocsai A and Ligeti E (2002). Contribution of phospholipase D and a brefeldin A-sensitive ARF to chemoattractant-induced superoxide production and secretion of human neutrophils. *J Leukoc Biol*, 71: 695-700.

- Kantari C, Pederzoli-Ribeil M and Witko-sarsat V (2008). The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. In "Trends in Innate Immunity". Egesten A, Schmidt A, Herwald H (eds): Contrib Microbiol. Basel, Karger; 15: 118-146.
- Kaplan MJ and Radic M (2012). Neutrophil extracellular traps: Double-Edge Swords of innate immunity. *J Immunol*; 189: 2689-2695.
- Karathanassis D, Stahelin RV, Bravo J, Perisic O, Pacold CM, Cho W and Williams RL (2002). Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *EMBO J*; 21(19): 5057-68
- Kim C and Dinauer MC (2001). Rac2 is essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signalling pathways. *J Immunol*, 166, 1223-1232.
- Kim C, Marchal CC, Penninger J and Dinauer MC (2003). The hemopoietic Rho/Rac Guanine nucleotide Exchange Factor Vav1 regulates N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-activated neutrophil functions. *J Immunol*; 171: 4425-4430.
- Kim MS, Kuehn HS, Metcalfe DD and Gilfillan AM (2008). Activation and function of the mTORC1 pathway in mast cells. *J Immunol*; 180(7): 4586-95
- Klebanoff SJ (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*; 77(5): 598-625.
- Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak C and DeLeo FR (2005). Neutrophils in the innate immune response. *Arch Immunol Ther Exp*; 53: 505-517
- Köckritz-Blickwede MV and Victor Nizet V (2009). Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. *J Mol Med*; 87(8): 775-783.
- Kogut MH, Genovese KJ, and Lowry VK (2001). Differential Activation of Signal Transduction Pathways Mediating Phagocytosis, Oxidative Burst, and Degranulation by Chicken Heterophils in Response to Stimulation with Opsonized Salmonella enteritidis. *Inflamm*, 25(1), 7-15.
- Kruger P, Saffarzadeh M, Weber ANR, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H and Hartl D (2015). Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathog*; 11(3) : 1-22.
- Krump E, Sanghera JS, Pelech SL, Furuya W and Grinstein S (1997). Chemotactic peptide N-formyl-Met-Leu-Phe activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and MAPK-activated Protein Kinase-2 in human neutrophils. *J Biol Chem*; 272(2): 937-944.
- Kumar V and Sharma A (2010). International Immunopharmacology Neutrophils : Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol*; 10(11): 1325-1334.
- Lachance G, Lévassieur S and Naccache PH (2003). Chemotactic factor-induced recruitment and activation of Tec family kinases in human neutrophils. *J Biol Chem*; 277(24): 21537-21541.
- Lacy P (2006). Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin Immunol*; 2(3): 98-108.
- Lakshman R and Finn A (2001). Neutrophil disorders and their management. *J Clin Pathol*; 54: 7-19.
- Larsen FC, DiGennaro JA, Saito N, Mehta S, Loegering D, Mazurkiewicz JF and Lennartz MR (2000). Differential requirements for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW264.7 cells. *J Immunol*; 165: 2809-2817.
- Lau D and Baldus S (2006). Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther*; 111(1): 16-26.
- Laudanna C, Mochly-Rosen D, Liron T, Constantin G and Butcher EC (1998). Evidence of  $\zeta$  protein kinase C involvement in polymorphonuclear neutrophil integrin-dependent adhesion and chemotaxis. *J Biol Chem* ; 273(46) : 30306-30315.
- Le Bel M, Brunet A and Gosselin J (2014). Leukotriene B4, an endogenous stimulator of the innate immune response against pathogens. *J Innate Immun*; 6(2): 159-168.

- Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P and Parker PJ (1998). Protein kinase C isoatypes controlled by Phosphoinositide 3-Kinase through the protein kinase PDK1. *Sci*; 281: 2042-2046.
- Lebrun L, Pelletier G, Briantais MJ, Galanaud P and Etienne JP (1992). Impaired functions of normal peripheral polymorphonuclear leukocytes in cirrhotic ascitic fluid. *J Hepatol*; 16: 98-101.
- Lee SB, Shin SH, Hepler JR, Gilman AG, Rhee SG (1993). Activation of phospholipase C-beta 2 mutants by G protein alpha q and beta-gamma subunits. *J Biol Chem*; 268: 25952-25957.
- Levy R (2006). The role of cytosolic phospholipase A 2 -alfa in regulation of phagocytic functions. *BBA-Mol Cell Biol L*, 1761(11): 1323–1334.
- Ley K, Smith E and Stark MA (2006). IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol Res*; 34: 229–242.
- Li JT, Liao ZX, Ping J, Xu D and Wang H (2008). Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. *J Gastroenterol*; 43(6): 419-28
- Li S, Yamauchi A, Marchal CC, Molitoris JK, Quilliam LA and Dinauer MC (2002). Chemoattractant-Stimulated Rac activation in Wild-type and Rac2-deficient murine neutrophils: preferential activation of Rac2 and Rac2 gene dosage effect on neutrophil functions. *J Immunol*; 169: 5043-5051.
- Li X and Gao T (2014). mTORC2 phosphorylates protein kinase C $\zeta$  to regulate its stability and activity. *EMBO Rep*; 15(2):191-8
- Lian JP, Huang RY, Robinson D and Badwey JA (1999). Activation of p90RSK and cAMP response element binding protein in stimulated neutrophils: Novel effects of the Pyridinyl Imidazol SB 203580 on activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade. *J Immunol*; 163: 4527-4536.
- Ligeti E and Mocsai A (1999). Commentary: Exocytosis of Neutrophil Granulocytes. *Biochem Pharmacol*; 57(11): 1209-1214.
- Liu Y, Shaw SK, Ma S, Yang L, Luscinskas FW and Parkos CA (2003). Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interactions and signalling events. *J Immunol*; 172: 7-13.
- Logan MR and Odemuyiwa SO (2003). Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: The molecular basis of mediator secretion. *J Allergy Clin Immunol*; 111:923-32
- Lopes LR, Hoyal CR, Knaus UG and Babior BM (1999). Activation of the leukocyte NADPH oxidase by Protein Kinase C in a partially recombinant cell-free system. *J Biol Chem*; 274(22): 15533-15537.
- Louvet A (2016). Restoration of bactericidal activity of neutrophils by myeloperoxidase release: A new perspective for preventing infection in alcoholic cirrhosis. *J Hepatol*; 64(5): 1006–1007.
- Louvet A and Mathurin P (2015). Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*; 12(4): 231–42.
- Lowell CA and Berton G (1999). Integrine signal transduction in myeloid leukocytes. *J Leuk Biol*; 65: 313-317.
- Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR (2009). Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med*; 360(26): 2758-69
- Makni-Maalej K, Boussetta T, Hurtado-Nedelec M, Belambri SA, Gougerot-Pocidal MA and El-Benna J (2012). The TLR7/8 agonist CL097 primes N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated NADPH oxidase activation in human neutrophils: critical role of p47phox phosphorylation and the proline isomerase Pin1. *J Immunol*; 189(9): 4657-65
- Makni-Maalej K, Marzaioli V, Boussetta T, Belambri SA, Gougerot-Pocidal MA, Hurtado-Nedelec M, Dang PM and El-Benna J (2015). TLR8, but not TLR7, induces the priming of the NADPH oxidase activation in human neutrophils. *J Leukoc Biol*; 97(6):1081-7.
- Mantovani A, Cassatella M, Costantini C and Jaillon S (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*; 11(8): 519–531.

- Manz MG and Boettcher S (2014). Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol*; 14(5): 302- 14
- Markwick LJJ, Riva A, Ryan JM, Cooksley H, Palma E, Tranah TH, Godhev K; Vijay K, Vergis N, Thursz M, Evans A, Wright G, Tarff S, O'Grady J, Williams R, Shawcross DL and Chokshi S (2015). Blockade of PD1 and TIM3 Restores Innate and Adaptive Immunity in Patients With Acute Alcoholic Hepatitis. *Gastroenterology*; 148(3): 590–602.
- Martinez-Cayueta M (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*; 77: 147-161.
- Martin-Martin B, Nabokina SM, Blasi J, Lazo PA and Mollinedo F (2000). Involvement of SNAP-23 and syntaxin 6 in human neutrophil exocytosis. *Blood*; 96(7): 2574-2583.
- Masuzaki R, Zhao SR, Csizmadia E, Yannas I, Karp SJ (2013). Scar formation and lack of regeneration in adult and neonatal liver after stromal injury. *Wound Repair Regen*; 21(1): 122-30
- Mayadas TN Cullere X and Lowell CA (2014). The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu Rev Pathol Mech Dis*; 9: 181–218
- Medvedev AE (2013). Toll-Like Receptor Polymorphisms, Inflammatory and Infectious Diseases, Allergies, and Cancer. *J Interferon Cytokine Res*; 33(9): 467–484.
- Michalopoulos G, Houck KA, Dolan ML and Leutteke NC (1984). Control of hepatocyte replication by two serum factors. *Cancer Res*; 44(10): 4414-9
- Michalopoulos GK and DeFrances MC (1997). Liver regeneration. *Science*; 276(5309): 60-6
- Miettinen HM, Gripenrot JM, Mason MM, Jesaitis AJ (1999). Identification of putative sites of interaction between the human formyl peptide receptor and G protein. *J Biol Chem*; 274(39): 27934-42
- Mocsai A, Banfi B, Kapus A, Farkas G, Geiszt M, Buday L and Ligeti FE (1997). Differential effects of tyrosine kinase inhibitors and an inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade on degranulation and superoxide production of human neutrophil granulocytes. *Biochem Pharmacol*; 54(07): 781-789.
- Mocsai A, Ligeti E, Lowell CA and Berton G (1999). Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J Immunol*; 162: 1120-1126.
- Moghaddami N, Costabile M, Grover PK, Jersmann HPA, Huang Z, Hii CST and Ferrante A (2003). Unique effect of arachidonic acid on human neutrophil TNF receptor expression: up-regulation involving Protein Kinase C, Extracellular Signal-regulated Kinase, and phospholipase A2. *J Immunol*; 171: 2616-2624.
- Mollinedo F (2003). Human neutrophil granules and exocytosis molecular control. *Immunologia*, 22: 340–358.
- Mookerjee RP, Stadlbauer V, Lidder S, Wright GA, Hodges SJ, Davies NA and Jalan R (2007). Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts the outcome. *Hepatology*; 46(3): 831-40.
- Moreau R and Rautou P (2014). G-CSF Therapy for Severe Alcoholic Hepatitis : Targeting Liver Regeneration or Neutrophil Function ?. *Am J Gastroenterol*; 109(9): 1424–1426.
- Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, Durand F, Gustot T, Saliba F, Domenicali M, Gerbes A, Wendon J, Alessandria C, Laleman W, Zeuzem S, Trebicka J, Bernardi M and Arroyo V (2013). Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology*; 144(7): 1426-37
- Morel F, Boulay F, Doussi re J and Vignais P (1992). Bases moléculaires de la granulomatose septique chronique. *MedSci*; 8: 912-920.
- Naccache PH (2013). Signalling in Neutrophils : A Retro Look. *Physiology*; p:1-13.
- Naccache PH, Levasseur S, Lachance G, Chakravarti S, Bourgoin SG and McColl SR (2000). Stimulation of human neutrophils by chemotactic factors is associated with the activation of phosphatidylinositol 3-kinase  $\gamma$ . *J Biol Chem*; 275: 23636-23641.

- Nauseef WM, Volpp BD, Mckormick S, Leidal KJ and Clark RA (1990). Assembly of the Neutrophil Respiratory Burst Oxidase. Protein kinase C promote cytoskeletal and membranes association of cytosolic oxidase components. *J Bio Chem*; 266(9): 5911-5917.
- Nauseef WM (2014). Microreview Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cell Microbiolo*; 16(8): 1146–1155.
- Nauseef, W. M. (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes : an integrated view. *Immunol Rev*; 219: 88–102.
- Nishizuka Y (1992). Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*; 58: 607-614.
- Nishizuka Y (1995). Protein kinase C and lipid signalling for sustained cellular responses. *FASEB J*; 9: 484-496.
- Nowak D (1990). Hydrogen peroxide release from human polymorphonuclear leukocytes measured with horseradish peroxidase and o-dianisidine. Effect of various stimulators and cytochalasin B. *Biomed Biochim Acta*; 49: 353-62
- Nussbaum C, Klinke A, Adam M, Baldus S and Sperandio M (2013). Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal*; 18(6): 692-713.
- O’Shea RS, Dasarathy S and McCullough AJ (2010).Alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol*; 105(1): 14–32.
- Olson SC, Lambeth JD (1996). Biochemistry and cell biology of phospholipase D in human neutrophils. *Chem Phys Lipids* ; 80(1-2):3-19.
- Otonello L, Cutolo M, Frumento G, Arduino N, Bertolotto M, Mancini M, Sottofattori E and Dallegri F (2002). Synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis inhibits neutrophil apoptosis: role of adenosine and proinflammatory cytokines. *Rheumatology*; 41 : 1249–1260.
- Pal P and Ray S (2016). Alcoholic Liver Disease : a Comprehensive Review. *EurMedJ*; 1(2): 85–92.
- Palicz A, Foubert TR, Jesaitis AJ, Marodi L and McPhail LC (2011). Phosphatidic acid and diacylglycerol directly activate NADPH oxidase by interacting with enzyme components. *J Biol Chem*; 276(5): 3090-7
- Panasiuk A, Wysocka J, Maciorkowska E, Panasiuk B, Prokopowicz D, Zak J and Radomski K (2005). Phagocytic and oxidative burst activity of neutrophils in the end stage of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*; 11: 7661–7665.
- Paruch S, El-Benna J, Djerdjouri B, Marullo S and Périanin A (2006). A role of p44/42 mitogen-activated protein kinases in formyl-peptide receptor-mediated phospholipase D activity and oxidant production. *FASEB J*; 20(1): 142-4
- Patel S, Djerdjouri B, Raoul-Des-Essarts Y, Dang PM, El-Benna J and Périanin A. Protein kinase B (AKT) mediates phospholipase D activation via ERK1/2 and promotes respiratory burst parameters in formylpeptide-stimulated neutrophil-like HL-60 cells (2010). *J Biol Chem*; 285(42): 32055-63
- Payrastra P, Missy K, Giuriato S, Bodin S, Plantavid M and Gratacap MP (2001). Phosphoinositides key players in cell signalling, in time and space. *Cell Signal*; 13: 377-387.
- Pédruzzi E, Giroud JP, Hakim J and Périanin A (1998). Analysis of choline and phosphorylcholine content in human stimulated neutrophils stimulated by fMet-Leu-Phe and phorbolmyristate acetate - Contribution of phospholipase D and C. *Cell Signalling*; 10: 481-489.
- Périanin A and Snyderman R (1989a). Mastoporan, a wasp venom peptide, identifies two discrete mechanisms for elevating cytosolic calcium and inositol trisphosphates in human neutrophils. *J Immunol*; 143: 1669-1673.

- Périanin A and Snyderman R (1989b). Analysis of calcium homeostasis in activated human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for two distinct mechanisms for lowering cytosolic calcium. *J Biol Chem*; 264: 1005-1009.
- Périanin A, Combadière C, Pédruzzi E, Djerdjouri B and Hakim J (1993). Staurosporine induces phospholipase D activation in human polymorphonuclear leukocytes. *Febs Lett*; 315: 33-37.
- Périanin A, Labro MT, Hakim J (1982). Chemokinetic activity of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine on human neutrophils, and its modulation by phenylbutazone. *Biochem Pharmacol*; 31(19):3071-6.
- Perry DK, Stevens VL, Widlanski TS and Lambeth JD (1993). A novel ecto-phosphatidic acid phosphohydrolase activity mediates activation of neutrophil superoxide generation by exogenous phosphatidic acid. *J Biol Chem*; 268(34): 25302-10
- Philbin VJ and Levy O (2007). Immunostimulatory activity of Toll-like receptor 8 agonists towards human leucocytes: basic mechanisms and translational opportunities. *Biochem Soc Trans*; 35(Pt 6): 1485-91.
- Philips MR, Feoktistov A, Pillinger MH and Abramson SB (1995). Translocation of p22rac2 from cytosol to plasma membrane is neither necessary nor sufficient for neutrophil NADPH oxidase activity. *J Biol Chem*; 270(19): 11514-11521.
- Pinzani M, Rosselli M and Zuckermann M (2011). Liver cirrhosis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*; 25(2): 281–290.
- Ponting CP and Kerr ID (1996). A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Sci*; 5(5): 914-22
- Prince LR, Whyte MK, Sabroe I and Parker LC (2011). The role of TLRs in neutrophil activation. *Curr Opin Pharm*; 11(4): 397–403.
- Pruchniak MP, Arazna M and Urszula D (2013). Life of neutrophil: From stem cell to neutrophil extracellular trap. *Respir Physiol Neurobiol*; 187: 68– 73.
- Quinn MT and Gauss KA (2004). Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leuk Bio*; 76: 760-781.
- Radel SJ, Genco RJ, De Nardin E (1994). Structural and functional characterization of the human formyl peptide receptor ligand-binding region. *Infect Immun*; 62(5): 1726-32
- Rajkovic IA and Williams R (1986). Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatology*; 6:252–262
- Ramadori G, Moriconi F, Malik I, and Dudas J (2008). Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *J Physiol Pharmacol*; 59(SUPPL.1): 107–117.
- Ramaiah S, Rivera C and Arteel G (2004). Early-phase alcoholic liver disease: an update on animal models, pathology, and pathogenesis. *Int J Toxicol*; 23(4): 217-31
- Ramaiah SK and Jaeschke H (2007). Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicol Pathol* ; 35(6) : 757–766.
- Ramond MJ, Poynard T, Rueff B, Mathurin P, Théodore C, Chaput JC and Benhamou JP (1992). A randomized trial of prednisolone in patients with severe alcoholic hepatitis. *N Engl J Med*; 326(8): 507-12
- Rane MJ, Coxon PY, Powell DW, Webster R, Klein JB, Pierce W, Ping P and McLeish KR (2001). p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-Phosphoinositide-dependent Kinase-2 for Akt in human neutrophils. *J Biol Chem*; 276(5): 3517-3523.
- Reddy SS and Civan JM (2016). From Child-Pugh to Model for End-Stage Liver Disease: Deciding Who Needs a Liver Transplant. *Med Clin North Am*; 100(3):449-64.
- Regier DS, Greene DG, Sergean S, Jesaitis AJ and McPhail LC (2000). Phosphorylation of p22phox is mediated by phospholipase D-dependent and -independent mechanisms. Correlation of NADPH

- oxidase activity and p22phox phosphorylation. *J Biol Chem*; 275(37): 28406-28412.
- Remijsen Q, Kuijpers TW, Wiraman E, Lippens S, Vandenabeele P and Berghe V (2011). Dying for a cause: Netosis, mechanism behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ*; 18: 581-588.
- Ren Y, Xie Y, Jiang G, Fan J, Yeung J, Li W, Tam PK and Savill J (2008). Apoptotic cells protect mice against lipopolysaccharide-induced shock. *J Immunol*; 180: 4978–4985
- Rocco A, Compare D, Angrisani D, Sanduzzi Zamparelli M and Nardone G (2014). Alcoholic disease: liver and beyond. *World J Gastroenterol*; 20(40): 14652-9
- Rolas L (2015). Identification de nouveaux facteurs de régulation physiopathologique de la NADPH oxydase du neutrophile : Importance de mTOR, de la dégradation de NOX2 via l'élastase et perspectives de traitement des déficits induits au cours de la cirrhose alcoolique. Thèse de Doctorat, Université Paris-Sud Ecole Doctorale 419 – Biosigne ; 12-274.
- Rolas L, Makhezer N, Hadjoudj S, El-Benna J, Djerdjouri B, Elkrief L, Moreau R and Périanin A (2013). Inhibition of mammalian target of rapamycin aggravates the respiratory burst defect of neutrophils from decompensated patients with cirrhosis. *Hepatology*; 57(3): 1163-71
- Roos D (1991). The respiratory burst of phagocytic leukocytes. *Drug Invest*; 3(2): 48-53.
- Roos D and Van Bruggen R (2000). Genetic analysis of patients with chronic granulomatous disease: insights in a clinical situation. *Centr Eur J Immunol*; 25: 106-112.
- Sabroe I, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN, Dower SK and Whyte MK (2003). Selective roles for Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol*; 170(10):5268-75
- Sasaki T, Iri-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-Dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, Wakeham A, Itie A, Bouchard D, Kozieradzki I, Joza N, Mak TW, Ohashi PS, Suzuki A and Penninger JM (2000). function of PI3K $\gamma$  in Thymocyte development, T cell activation and Neutrophil migration. *Science*; 287: 1040-1046.
- Schreiber RE, Prossnitz ER, Ye RD, Cochrane CG and Bokoch GM (1994). Domains of the human neutrophil N-formyl peptide receptor involved in G protein coupling. Mapping with receptor-derived peptides. *J Biol Chem*; 269(1):326-31
- Schuppan D and Afdhal NH (2008). Liver cirrhosis. *Lancet*; 371(9615):838-51.
- Schwarzenberger P, Huang W, Ye P, Oliver P, Manuel M, Zhang Z, Bagby G, Nelson S and Kolls JK (2000). Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *J Immunol* ; 164 : 4783– 4789.
- Seely AJE, Pascual JL and Christou NV (2003). Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Crit Care*; 7: 291-307.
- Selvatici R, Falzarano S, Mollica, A and Spisani S (2006). Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *Eur J Pharmacol*. 534, 1–11.
- Selvatici R, Falzarano S, Traniello S, Zecchini GP and Spisani S (2003). formyl peptide trigger selective molecular pathways that are required in the physiological functions of human neutrophil. *Cell Signal*; 15: 377-383.
- Sengelov H, Kjeldsen L and Borregaard N (1993). Control of Exocytosis in Early Neutrophil Activation. *J Immunol*, 150(4), 1535-1543.
- Sertayn D, Grulke S, Franck T, Mouithys-Mickalad A and Deby-Dupont G (2003). La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann Méd Vét* ; 147: 79-93
- Shaw DE, Berry MA, Hargadon B, McKenna S, Shelley MJ, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ and Pavord ID (2007). Association between neutrophilic airway inflammation and airflow limitation in adults with asthma. *Chest*; 132(6):1871-5

- Shawcross DL, Wright GA, Stadlbauer V, Hodges SJ, Davies NA, Wheeler-Jones C, Pitsillides AA and Jalan R (2008). Ammonia impairs neutrophil phagocytic function in liver disease. *Hepatology*; 48: 1202–1212.
- Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJD, Banerjee A and Silliman CC (2005). Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leuk. Biol*; 78: 1025-1042.
- Singh V, Sharma AK, Narasimhan RL, Bhalla A, Sharma N and Sharma R (2014). Granulocyte colony-stimulating factor in severe alcoholic hepatitis: a randomized pilot study. *AmJGastroenterol*; 109(9):1417-23
- Sinha S, Watorek W, Karr S, Giles J, Bode W and Travis J (1987). Primary structure of human neutrophil elastase. *Proc Natl Acad Sci*; 84: 2228–2232.
- Snyder D, Kelly M L and Woodbury DJ (2006). SNARE complex regulation by phosphorylation. *Cell Biochem. Biophys* ; 45(1): 111–123.
- Snyderman R and Pike MC (1984). Chemoattractant receptors on phagocytic cells. *Annu Rev Immunol*; 2: 257-81.
- Song G, Ouyang G and Bao S (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*; 9(1), 59–71.
- Stadlbauer V, Mookerjee RP, Hodges S, Wright GA, Davies NA and Jalan R (2008). Effect of probiotic treatment on deranged neutrophil function and cytokine responses in patients with compensated alcoholic cirrhosis. *J Hepatol*; 48(6):945-51.
- Stoyanova S, Bulgarelli-Leva G, Kirsch C, Hanck T, Klinger R, Wetzker R and Wymann MP (1997). Lipid kinase and protein kinase activities of G-protein-coupled phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$ : structure-activity analysis and interactions with wortmannin. *Biochem J*; 324: 489-495.
- Strassheim D, Asehnoune K, Park JS, Kim JY, He Q, Richter D, Kuhn K, Mitra S And Abraham E (2004). Phosphoinositide 3-Kinase and Akt occupy central roles in inflammatory responses of Toll-Like receptor 2-stimulated neutrophils. *J Immunol*; 172: 5727-5733.
- Sumimoto H, Hata K, Mizuki K, Ito T, Kage Y, Sakaki Y, Fukimaki Y, Nakamura M and Takeshige K (1996). Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*; 271(36): 22152-22158.
- Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM and Chilvers ER (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*; 31(8): 318–324.
- Taïeb J, Mathurin P, Elbim C, Cluze P, Bernard B, Gougerot-pocidallo MA and Poynard T (2000). Blood neutrophil functions and cytokine release in severe alcoholic hepatitis effect of corticosteroids. *J Hepatol*; 32: 579–586.
- Tajuddin T, Ryan EJ, Norris S, Hegarty JE and O'Farrelly C (2010). Interferon- $\alpha$  suppressed granulocyte colony stimulating factor production is reversed by CL097, a TLR7/8 agonist. *J Gastroenterol Hepatol*; 25(12):1883-90
- Tang W, Zhang Y, Xu W, Harden TK, Sondek J, Sun L, Li L and Wu D (2011). A PLC $\beta$ /PI3K $\gamma$ -GSK3 signaling pathway regulates cofilin phosphatase slingshot2 and neutrophil polarization and chemotaxis. *Dev Cell*; 21(6): 1038-1050.
- Taylor NJ, Manakkat Vijay GK, Abeles RD, Auzinger G, Bernal W, Ma Y, Wendon JA and Shawcross DL (2014). The severity of circulating neutrophil dysfunction in patients with cirrhosis is associated with 90-day and 1-year mortality. *Aliment Pharmacol Ther*; 40(6): 705-15
- Tazi KA, Quioc JJ, Saada V, Bezeaud A, Lebrec D and Moreau R (2006). Upregulation of TNF- $\alpha$  production signaling pathways in monocytes from patients with advanced cirrhosis: possible role of Akt and IRAK-M. *J Hepatol*; 45: 280–289.
- Tecchio C, Micheletti A and Cassatella MA (2014). Neutrophil-derived cytokines: Facts beyond expression. *Front Immunol*; 5: 1–7.

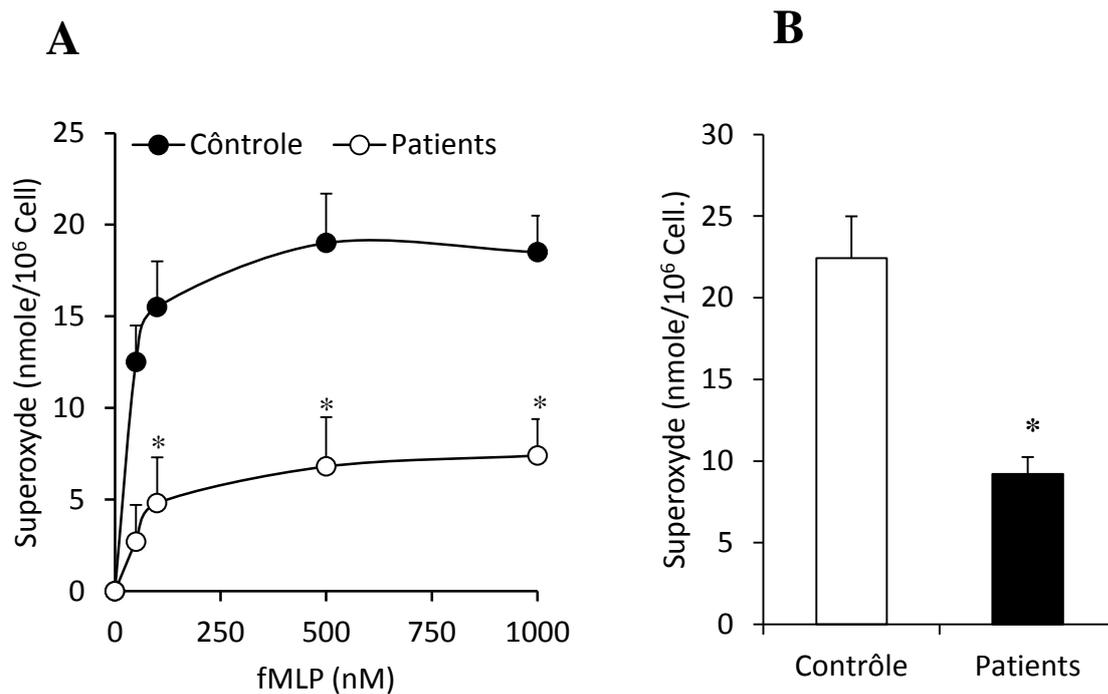
- Theilgaard-Mönch K, Jacobsen LC, Borup R, Rasmussen T, Bjerregaard MD, Nielsen FC, Cowland, JB and Borregaard N (2005). The transcriptional program of terminal granulocytic differentiation. *Blood* ;105 : 1785-796.
- Tithof PK, Peters-Golden M and Ganey PE (1998). Distinct phospholipases A2 regulated release of arachidonic acid for eicosanoid production and superoxide anion generation in neutrophils. *J Immunol* ; 160: 953-960.
- Tritto G, Bechlis Z, Stadlbauer V, Davies N, Francés R, Shah N, Mookerjee RP, Such J, Jalan R (2011). Evidence of neutrophil functional defect despite inflammation in stable cirrhosis. *J Hepatol*; 55(3): 574–581.
- Tsochatzis EA Bosch J and Burroughs AK (2014). Liver cirrhosis. *Lancet*; 6736(14): 1–13.
- Ueyama T, Lennartz MR, Noda Y, Kobayashi T, Shirai Y, Rikitake K, Yamasaki T, Hayashi S, Sakai N, Seguchi H, Sawada M, Sumimoto H and Saito N (2004). Superoxide production at phagosomal cup/phagosome through  $\beta$ I protein kinase C during Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis in microglia. *J Immunol*; 173: 4582-4589.
- Vines CM and Prossnitz ER (2004). Mechanisms of G protein-coupled receptor-mediated degranulation. *FEMS Microbiol Immunol*; 236: 1-6.
- Vlahos CJ (1995). Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors and their effects on cell signalling pathways. *DrugsFuture*; 20(2): 165-171.
- Vocks A, Petkovic M and Arnhold J (2003). Involvement of phosphatidic acid in both degranulation and oxidative activity in fMet-Leu-Phe stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Cell Physiol Biochem*; 13: 165-172.
- Von Vietinghoff S and Ley K (2009). IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice. *J Immunol*; 183: 865–873.
- Wagner JG and Roth RA (2000). Neutrophil migration mechanisms, with emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev*; 4: 509-513.
- Walker EH, Perisic O, Ried C, Stephens L and Williams RL (1999). Structure insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature*; 402: 313-320.
- Ward RA, Nakamura M and McLeish KR (2000). Priming of the neutrophil respiratory burst involves p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-dependent exocytosis of flavocytochrome b558-containing granules. *J Biol Chem*; 275(47): 36713-36719.
- Weichhart T and Säemann MD (2008). The PI3K/Akt/mTOR pathway in innate immune cells: emerging therapeutic applications. *Ann Rheum Dis*; 67(Suppl III): iii70–iii74
- Weichhart T, Hengstschläger M and Linke M (2015). Regulation of innate immune cell function by mTOR. *Nat Rev Immunol*, 15(10): 599-614.
- Wiest R, Lawson M and Geuking M (2014). Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol*; 60(1): 197-209
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P and Halbwachs-Mecarelli L (2000). Neutrophils : Molecules, functions and pathological aspects. *Lab invest*; 80: 617-653.
- Wiza C, Nascimento EB and Ouwens DM (2012). Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 302(12):E1453-60.
- Wymann MP and Pirola L (1998). Structure and function of phosphoinositide 3-kinase. *Biochim Biophys Acta*; 1436: 127-150.
- Xu R, Huang H, Zhang Z and Wang F (2014). The role of neutrophils in the development of liver diseases. *Cell Mol Immunol*; 11(3): 224–231.
- Yamaguchi C, Ogita K, Nakamura S and Nishizuka Y (1995). The protein kinase C isoforms leading to MAP-kinase activation in CHO cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 210(3): 659-647.

- Yoon MS, Du G, Backer JM, Frohman MA, Chen J (2011). Class III PI-3-kinase activates phospholipase D in an amino acid-sensing mTORC1 pathway. *J Cell Biol*; 195(3): 435-47
- Yum HK, Arcaroli J, Kupfner J, Shenkar R, Penninger JM, Sasaki T, Yang KY, Park JS and Abraham E (2001). Involvement of phosphoinositide 3-Kinases in neutrophil activation and the development of Acute Lung Injury. *J Immunol*; 167: 6601–6608.
- Zhang H, Garlich CD, Mugge A and Daniel W (1998). Involvement of tyrosine kinases, Ca<sup>2+</sup> and PKC in activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in human polymorphonuclear neutrophils. *J Physiol*; 513(2): 359-367.
- Zhang W, Wang M, Xie HY, Zhou L, Meng XQ, Shi J and Zheng S (2007). Role of reactive oxygen species in mediating hepatic ischemia-reperfusion injury and its therapeutic applications in liver transplantation. *Transplant Proc*; 39(5): 1332-7
- Zhang Y, Wang X, Yang H, Liu H, Lu Y, Han L and Liu G (2013). Kinase AKT controls innate immune cell development and function. *Immunology*; 140(2):143-52.
- Zhong B, Jiang K, Gilvary DL, Epling-Burnette PK, Ritchey C, Liu J, Jackson RJ, Hong-Geller E and Wei S (2003). Human neutrophils utilize a Rac/Cdc42-dependent MAPK pathway to direct intracellular granule mobilization toward ingested microbial pathogens. *Blood*, 101, 3240-3248.
- Zhou H and Huang S (2010). Role of mTOR signaling in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Curr Protein Pept Sci*; 12(1):30-42.
- Zoncu R, Efeyan A and Sabatini DM (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 12(1):21-35.

# *Annexes*

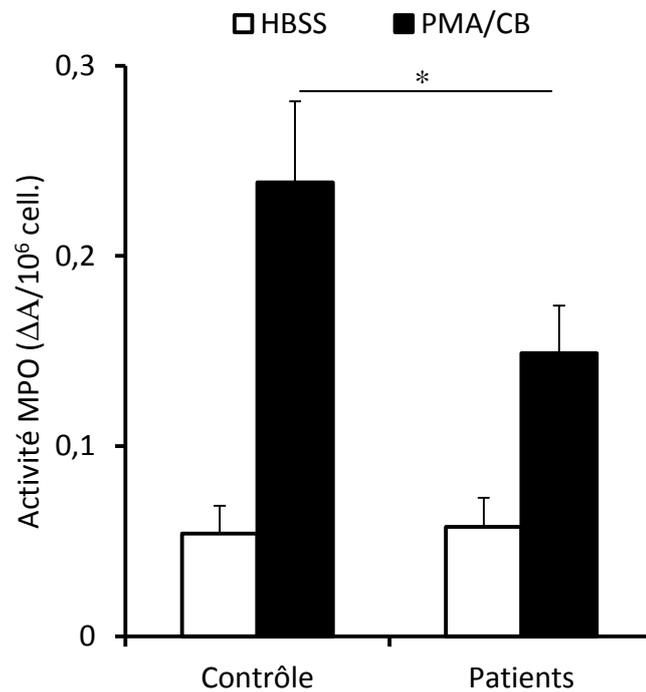
## I. Résultats Supplémentaires

### I.1. La production d'anion superoxyde $O_2^{\circ}$ (explosion oxydative) est défaillante dans les PN des patients cirrhotiques



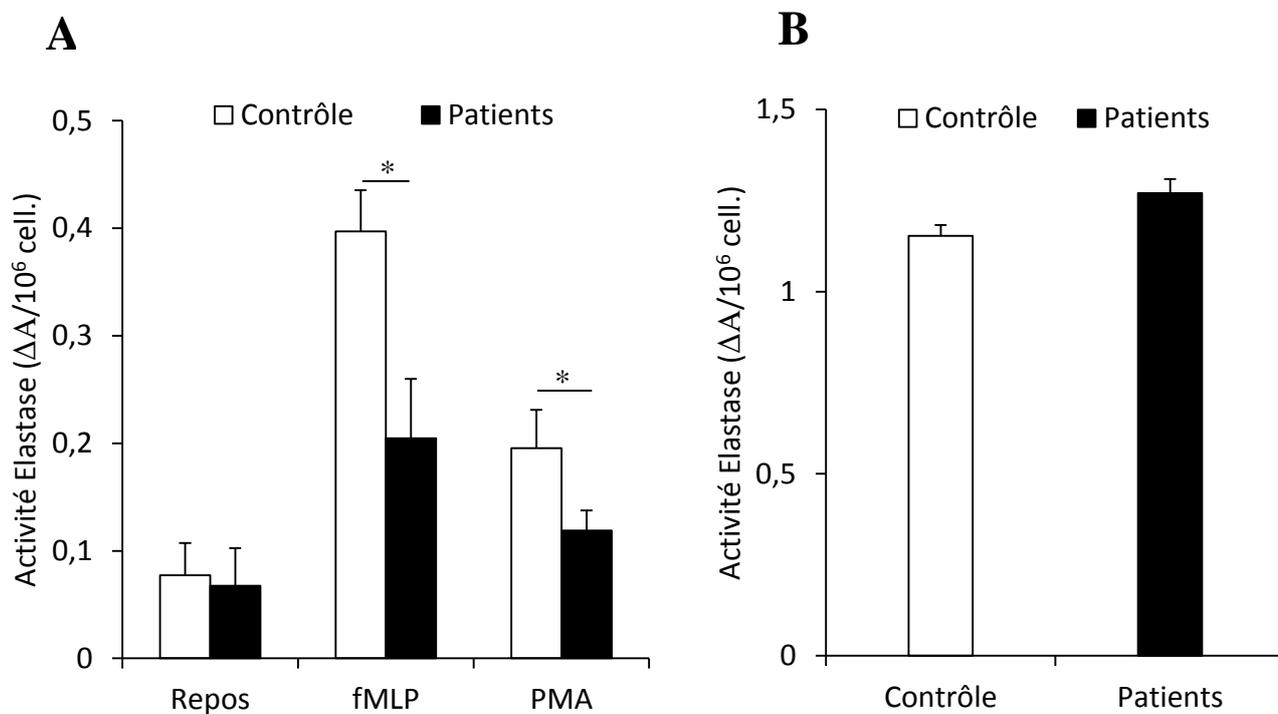
**Figure S1. Les PN des patients cirrhotiques montrent une défaillance de production du superoxyde (explosion oxydative) induite par différentes concentrations de fMLP.** (A) Les PN ( $10^6$ /ml) de donneurs sains (Contrôle) ou de patients cirrhotiques ont été incubés à 37°C en présence du cytochrome c (80 mM) pendant 5min à 37°C, puis stimulés avec du fMLP (50-1000nM). La production d' $O_2^{\circ}$  est mesurée par mesure de la DO à 550nm et est exprimée en nmole /  $10^6$  cellules (n = 15 dans chaque groupe, \**p* > 0.5 patients *versus* contrôle). (B) La production totale d'anion superoxyde par les PN des patients cirrhotiques et des volontaires sains (Contrôle) stimulés par le fMLP (1  $\mu$ M) est exprimé en nmole /  $10^6$  cellules (n = 15 dans chaque groupe, \**p* > 0.5 patients *versus* contrôle).

## I.2. Défaillance de la dégranulation de la MPO induite par le PMA des PN de patients cirrhotiques



**Figure S2. Défaillance sévère de dégranulation de la MPO induite par le PMA dans les PN de patients ayant une cirrhose alcoolique décompensée.** Les PN de donneurs sains (Contrôle) et de patients cirrhotiques ont été prétraités en présence de la cytochalasine B (5 µg/ml ; 5 min) avant leur stimulation avec le PMA (100nM; 5min). L'activité de la MPO a été mesurée dans le surnageant de dégranulation et est exprimée en ΔA pendant 3min ( $n= 14$  dans chaque groupe;  $*p < 0.05$  versus contrôle).

### I.3. Défaillance de dégranulation de l'élastase des PN des patients cirrhotiques



**Figure S3. Défaillance sévère de dégranulation de l'élastase par les PN de patients ayant une cirrhose alcoolique décompensée.** Les PN de donneurs sains (Contrôle) et de patients cirrhotiques ont été prétraités (A) en présence de la cytochalasine B (5 µg/ml ; 5 min) avant leur stimulation avec le fMLP (1µM; 2min) ou le PMA (100nM/5min). L'activité élastase a été mesurée dans le surnageant de dégranulation et est exprimée en ΔDO pendant 3min ( $n=7$  dans chaque groupe;  $*p < 0.05$  versus contrôle). (B) L'activité élastase dans l'homogénat des PN au repos est exprimée en ΔDO pendant 3min ( $n=7$ ,  $*p < 0.05$ ).

# *Publications*



## Impaired intracellular signaling, myeloperoxidase release and bactericidal activity of neutrophils from patients with alcoholic cirrhosis<sup>☆</sup>

Abdelali Boussif<sup>1,2,3,4</sup>, Loïc Rolas<sup>1,2,3</sup>, Emmanuel Weiss<sup>1,2,3,5</sup>, Hamama Bouriche<sup>6</sup>, Richard Moreau<sup>1,2,3,7</sup>, Axel Périanin<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMRS-1149, Faculté de Médecine X. Bichat, 75018 Paris, France; <sup>2</sup>CNRS ERL 8252, Centre de Recherche sur l'Inflammation, 75018 Paris, France; <sup>3</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire d'excellence INFLAMEX, 75018 Paris, France; <sup>4</sup>Université de Batna, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Algeria; <sup>5</sup>Département d'Anesthésie Réanimation, Hôpital Beaujon, APHP, 92118 Clichy, France; <sup>6</sup>Laboratoire de Biochimie Appliquée, Département de Biochimie, Faculté des Sciences de la Nature et de Vie, Université Ferhat Abbas, Sétif 1, Algeria; <sup>7</sup>Département Hospitalo-Universitaire (DHU) Unity, Service d'Hépatologie, Hôpital Beaujon, APHP, 92118 Clichy, France

See Editorial, pages 1006–1007

**Background & Aims:** Myeloperoxidase exocytosis and production of hydrogen peroxide via the neutrophil superoxide-generating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase contribute to efficient elimination of bacteria. Cirrhosis impairs immune functions and increases susceptibility to bacterial infection. We recently showed that neutrophils from patients with decompensated alcoholic cirrhosis exhibit a severe impairment of formylpeptide receptor (fPR)-mediated intracellular signaling and superoxide production. Here, we performed *ex vivo* studies with these patients' neutrophils to further investigate myeloperoxidase release, bactericidal capacity and signaling events following fPR stimulation by the formylpeptide formyl-met-leu-phe (fMLP).

**Methods:** Myeloperoxidase release was studied by measuring extracellular myeloperoxidase activity. Activation of signaling effectors was studied by Western blot and their respective contribution to myeloperoxidase release studied using pharmacological antagonists.

**Results:** fMLP-induced myeloperoxidase release was strongly impaired in patients' neutrophils whereas the intracellular myeloperoxidase stock was unaltered. The fMLP-induced phosphorylation of major signaling effectors, AKT, ERK1/2 and p38-MAP-Kinases, was also strongly deficient despite a similar

expression of signaling effectors or fPR. However, based on effector inhibition in healthy neutrophils, AKT and p38-MAPK but not ERK1/2 upregulated fMLP-induced myeloperoxidase exocytosis. Interestingly, patients' neutrophils exhibited a defective bactericidal capacity that was reversed *ex vivo* by the TLR7/8 agonist CLO97, through potentiation of the fMLP-induced AKT/p38-MAPK signaling axis and myeloperoxidase release.

**Conclusions:** We provide first evidence that neutrophils from patients with decompensated alcoholic cirrhosis exhibit a deficient AKT/p38-MAPK signaling, myeloperoxidase release and bactericidal activity, which can be reversed via TLR7/8 activation. These defects, together with the previously described severe deficient superoxide production, may increase cirrhotic patients' susceptibility to bacterial infections.

© 2015 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### Introduction

Neutrophils play a key role in the elimination of invading microorganisms [1]. This innate defence function requires a fine coordination of two major neutrophil activities; the release of myeloperoxidase (MPO) from azurophilic granules (exocytosis) and production of reactive oxygen species (ROS) by the superoxide-generating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, a phenomenon termed respiratory burst. MPO utilizes hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) derived from superoxide dismutation, and chloride to form hypochlorite and chloramine, which are toxic agents for bacteria [2,3]. MPO biological importance is further illustrated in the findings in MPO-knockout mice of increased infections by *Klebsiella* and *Candida*, increased mortality [4] and prolonged inflammation [5]. MPO release and ROS production are triggered by various pro-inflammatory mediators amongst which bacterial formylated peptides which also act as chemoattractants, thus alerting neutrophils in case of infection through stimulation of formylpeptide receptor (fPR), a G-protein

Keywords: Exocytosis; Host-defence; Hepatitis; Phagocytes; Signaling; Reactive oxygen species.

Received 15 June 2015; received in revised form 13 November 2015; accepted 8 December 2015; available online 21 December 2015

\* Guest editor: Didier Samuel

\*\* DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.018>.

\* Corresponding author. Address: INSERM-1149, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France. Tel.: +33 157277473; fax: +33 157277411.

E-mail address: [axel.perianin@inserm.fr](mailto:axel.perianin@inserm.fr) (A. Périanin).

Abbreviations: MPO, myeloperoxidase; fMLP, formyl-met-leu-phe; MAPK, mitogen-activated protein kinases; ERK1/2, Extracellular Signal-Regulated Kinases1/2; ROS, reactive oxygen species; fPR, formylpeptide receptor; TLR, Toll-like receptors.



## Research Article

coupled receptor [11]. Neutrophil antibacterial activities are tightly regulated by signaling events triggered via fPR including phospholipases, G-proteins, protein kinases such as protein kinase C (PKC), mitogen-activated protein kinases (MAPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) [6–8]. Signaling impairment under pathological situations or by drugs leads to neutrophil dysfunctions, which are detrimental to host-defence [9–11].

Alcoholic cirrhosis is a consequence of excessive alcohol consumption and represents a major cause of mortality worldwide with an estimated 3.8% of all global death [12]. This pathology combines different features of the liver disease including steatosis, inflammation, necrosis and fibrosis [13,14]. Cirrhosis is associated with immune dysfunctions and inability of host-defence systems to protect against infections [15]. Neutrophils contribute to the pathogenesis of cirrhosis through induction of liver injury in animal models (reviewed in [16]) as well in patients with alcoholic steatohepatitis [17]. Direct evidence for a role of neutrophils inducing liver injury was proposed by the observation of an intracellular oxidant stress in hepatocytes during neutrophil attack [18]. However, the view that neutrophils are systematically deleterious is not universally recognized. Indeed, Altamirano *et al.* showed that the higher neutrophil liver infiltration, the better the prognosis [19]. Neutrophils may exert their beneficial effects through production of hepatocyte growth factor [20], collagen degradation [21] or through granulopoiesis following G-CSF treatment [22]. Moreover, at least one study shows that G-CSF therapy is beneficial in patients with severe alcoholic hepatitis [23]. Finally, G-CSF therapy was found to improve survival in patients with acute-on-chronic liver failure, the most severe complication of cirrhosis [24]. Another common complication of cirrhosis is the development of sepsis, a major cause of death [12,25]. Although medical treatments exist to improve survival, about 35% of patients die within six months [26]. Of the numerous circulating host-defence mechanisms available, neutrophil production of ROS, microbicidal activity and phagocytosis are impaired in cirrhotic patients [27–35]. An impaired ROS production was also observed in liver transplanted recipients suffering from post-hepatic cirrhosis [36]. However, the impact of alcoholic cirrhosis on receptor-mediated signaling events underlying neutrophil antibacterial activities remains largely unknown. We recently showed that neutrophils from patients with decompensated alcoholic cirrhosis, exhibit impaired signaling and ROS production induced by the bacterial tripeptide formyl-met-leu-phe (fMLP), which was further aggravated by the mTOR antagonist rapamycin [8]. This dysfunction was associated with a defective MAPK-dependent phosphorylation of p47phox, a major component of NADPH oxidase. Whether the defective signaling impacts other neutrophil defence activities is unknown.

In this study, we took advantage of these neutrophils from these cirrhotic patients to investigate possible alterations of MPO exocytosis induced by fMLP, and bactericidal activity. The state of activation of three major signaling effectors, AKT, p38-MAP-kinases and p44/42 MAP-kinases (ERK1/2), was also determined, and their respective contribution in MPO release was studied in healthy neutrophils using selective antagonists. Data reveal a severe deficient activation of the three signaling effectors in patients' neutrophils, impaired MPO release and bactericidal activity. Interestingly, these deficiencies can be reversed by a TLR7/8 agonist.

## Patients and methods

### Patients

Blood was obtained from patients hospitalized in the Liver Unit of Beaujon Hospital (Clichy, France). Inclusion criteria were age over 18 years, biopsy-proven cirrhosis, and Child-Pugh class B or C cirrhosis. Patients had a history of excessive alcohol ingestion (50 g/day), but no other causes of liver disease. Viral serologies for hepatitis B and C virus were negative. Alcohol consumption was stopped for at least 3 days. Clinical characteristics of patients are shown in Table 1. Patients with untreated or recently treated (less than one week) bacterial infection or gastrointestinal haemorrhage were not included. Cultures of ascites, urine and blood performed at the time of inclusion were all negative. Other exclusion criteria were treatment with corticosteroids, pentoxifylline or other immunosuppressive drugs in the past 30 days, and presence of hepatocellular carcinoma (HCC), other cancer, or human immunodeficiency virus infection. Healthy subjects (controls) were hospital employee volunteers or obtained from the blood bank (EFS, Paris, France). This study was approved by our institutional review board, and written informed consent was obtained from patients.

### Materials and methods

Please see the [Supplementary materials](#) for details regarding neutrophil isolation [8], MPO exocytosis and assay [37], bactericidal activity [8], Western blot analyses of protein phosphorylation [8] and RNA quantification.

### Statistical analysis

Unless otherwise stated, data represent means  $\pm$  SEM. Statistically significant differences between means were identified using the Student's paired *t* test or Mann-Whitney *U* test, with a threshold of  $p < 0.05$  and designated by \*.

## Results

### Severe impairment of fMLP-induced MPO release and signaling in neutrophils from patients with advanced alcoholic cirrhosis

Stimulation of healthy neutrophils under optimal conditions by fMLP (1  $\mu$ M) induced a weak release of MPO of approximately 10% of the total MPO content (Fig. 1A, C). Under these conditions, neutrophils from cirrhotic patients exhibited an impaired MPO release compared to that of healthy neutrophils. Optimizing the degranulation process by pretreating cells with the microtubule-disrupting agent cytochalasin B [37], potentiated fMLP-induced MPO release with the same efficacy, i.e. about 3–4 fold in both healthy and patients' neutrophils (Fig. 1B), suggesting no major alteration of the cytoskeleton mobilization efficiency. However, the fMLP-induced MPO exocytosis of neutrophils from cirrhotic patients, remained impaired relative to controls, while basal degranulation was not altered (Fig. 1B). To examine whether this deficient induction of MPO release was related to alteration of MPO intracellular stock, resting and stimulated cells were lysed, and MPO was quantified by measuring both MPO activity and expression by Western blot. In lysates of resting cells, the MPO activity was similar in both control and patients' neutrophils (Fig. 1C). In fMLP-stimulated cells, MPO activity decreased significantly in control neutrophils due to their MPO exocytosis (Fig. 1) but not in patients' neutrophils. MPO expression analyzed by Western blot in resting cells was not altered. Thus, the MPO intracellular pool was not impaired, which suggests that the deficient MPO release induced by fMLP in patients' neutrophils (Fig. 1A, B) may likely

**Table 1. Characteristics of patients.**

N. of patients	32
Age, years	57.4 (±1.4)
Female (%)	6 (19)
Ascites, n (%)	28 (88)
Hepatocellular carcinoma (HCC), n (%)	0
Acute alcoholic hepatitis n (%)	7 (22)
Encephalopathy, n (%)	8 (25)
Serum albumin, g/L	24.7 (±1.1)
Serum bilirubin, µmol/L	116.2 (±21.2)
Prothrombin time, %	45.7 (±2.6)
International normalized ratio	1.8 (±0.1)
Serum creatinine, µmol/L	94.6 (±11.1)
C-reactive protein (CRP), mg/L	17.3 (±3.5)
Child-Pugh score	10.4 (±0.3)
Child-Pugh class C, n (%)	21 (66)
MELD score	19.1 (±1.1)
White blood cell count, per mm <sup>3</sup>	7.650 (±0.645)
Treatment with β-blockers, n (%)	9 (28)
Antibiotics, n (%)	15 (47)
Corticosteroids, n (%)	0 (0)
Previous history	
Acute decompensation, n (%)	28 (88)
Bacterial infection, n (%)	18 (56)
Acute variceal bleeding, n (%)	12 (37)
Acute alcoholic hepatitis, n (%)	13 (40)

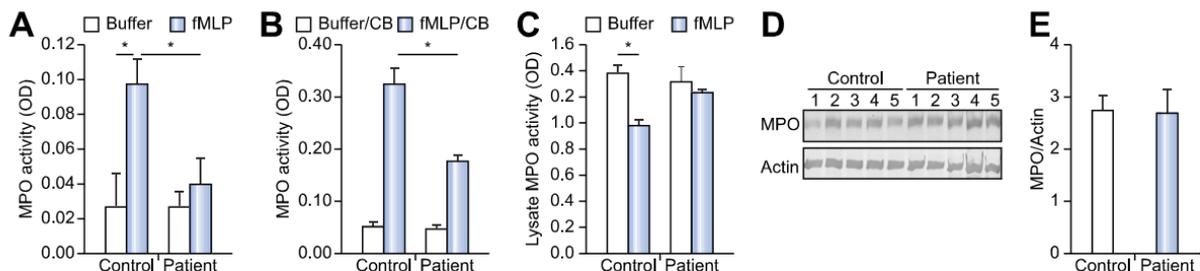
± values indicate standard error of the mean. MELD, Model of End-Stage Liver Disease.

due to altered fPR-mediated signaling. To further explore this hypothesis, neutrophils were stimulated under optimal conditions with fMLP, and the activated phosphorylated forms of major signaling effectors were detected using Western blot [8,38,39]. Stimulation of healthy neutrophils induced a rapid phosphorylation of AKT, p38-MAPK and p44/42-MAPK (ERK1/2) (Fig. 2A). By contrast, in patients' neutrophils, the phosphorylation of the three effectors was dramatically impaired (Fig. 2B–D), whereas no alteration was observed in the expression of the three effectors (Fig. 3A, B) and the fMLP receptor fPR (Fig. 3C, D).

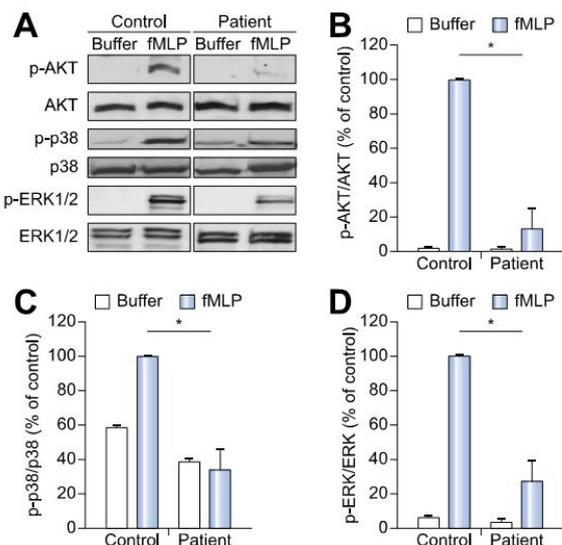
The signaling mechanisms by which bacterial peptides stimulate neutrophil MPO release remain largely unknown. To examine the respective contribution of AKT, p38-MAPK and ERK1/2 to MPO release, selective antagonists of these effectors were used in healthy neutrophils to prevent their activation. Treatment of neutrophils with AKTib1/2 (1–10 µM) to block AKT activation [38], as confirmed here (Supplementary Fig. 1A, B), reduced fMLP-induced MPO release by approximately 40–50%, without altering basal MPO release (Fig. 4A) or MPO catalytic activity measured in cell-free homogenates (Supplementary Fig. 1C). The inhibition of fMLP-induced p38-MAPK activation by SB202190 (2–10 µM) (Supplementary Fig. 2A, B), also reduced fMLP-induced MPO release by approximately 50% without altering basal MPO release (Fig. 4B) or MPO catalytic activity (Supplementary Fig. 2E). Since both antagonists reduced MPO release with similar efficiency, we examined whether p38-MAPK activation occurred downstream of AKT. Interestingly, p38-MAPK activation was reduced by about 50% in AKTib1/2-pretreated neutrophils (Supplementary Fig. 2C, D), suggesting that p38-MAPK is activated downstream of AKT. To examine the contribution of ERK1/2 to MPO release, cells were pretreated with U0126 (1–10 µM) to prevent fMLP-induced ERK1/2 phosphorylation [38], as confirmed here (Supplementary Fig. 3A, B). Surprisingly, the fMLP-induced MPO release was also blocked (Supplementary Fig. 3C). However, this complete inhibition was artefactual due in part to a direct interference effect of U0126 with MPO activity measured in neutrophil degranulation supernatants (Supplementary Fig. 3D). To bypass this pharmacological interference and examine whether ERK1/2 regulate exocytosis, the effect of U0126 was examined on the release of elastase, another marker of primary granules. Blocking ERK1/2 activation with U0126 did not alter fMLP-induced elastase release while superoxide production was impaired (Fig. 4C). These results suggest that ERK1/2 may not regulate MPO degranulation, in agreement with other works [40].

A TLR7/8 agonist restored MPO release from neutrophils of cirrhotic patients

The above data strongly suggest that the impaired activation of AKT/p38-MAPK observed in patients' neutrophils (Fig. 2A, C)

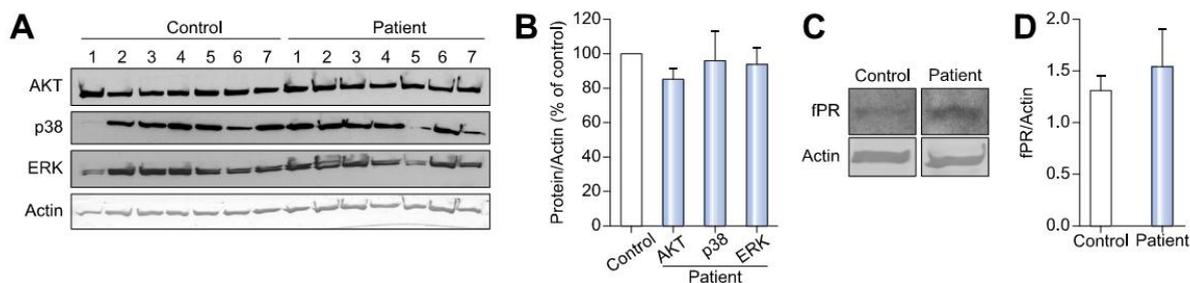


**Fig. 1. Impaired fMLP-induced MPO release in neutrophils from patients with alcoholic cirrhosis.** Neutrophils from healthy donors (control) and cirrhotic patients were pretreated without (A) or with cytochalasin B (5 µg/ml; 5 min) (B) prior stimulation with fMLP (1 µM; 2 min). MPO activity in degranulation supernatants is expressed as OD over 3 min (n = 14 in each group; \*p <0.05 vs. control). (C) MPO activity in homogenates of resting and fMLP-stimulated neutrophils, expressed as OD per 3 min (n = 7, \*p <0.05). (D) A representative Western blot of MPO of neutrophils from control and cirrhotic patients, and MPO quantification (E) expressed as MPO/actin ratio (n = 13 in each group).

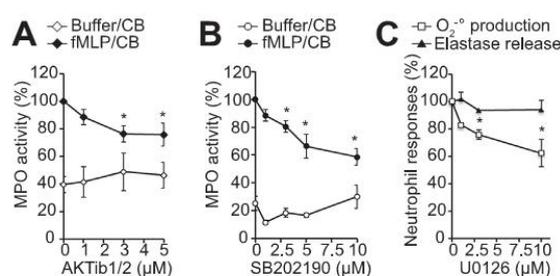


**Fig. 2. Impaired fMLP-induced activation of signaling effectors in neutrophils from patients with alcoholic cirrhosis.** (A) Neutrophils from control and patients with cirrhosis were stimulated with fMLP (1  $\mu$ M; 1 min). (B–D) The phosphorylation of AKT (S473), p38-MAP-Kinases and p44/42-MAP-kinases (ERK1/2) is expressed as the percentage of control values obtained with fMLP (n = 4–6 in each group; \*p <0.05 vs. control).

may contribute to the defective MPO release (Fig. 1A, B). It has been shown that p38-MAPK can be also activated upon stimulation of intracellular Toll-like receptors (TLR) 7/8 by the cell-permeable agonist CL097 leading to potentiation of neutrophil stimulation, as detected by superoxide production [41]. To determine whether the deficient MPO release from patients' neutrophils can be improved following TLR7/8 activation, the effect of CL097 was examined on MPO exocytosis and signaling. Pretreatment of patients' neutrophils in the presence of CL097 (0.5–2  $\mu$ g/ml) for 10 min, induced a concentration-dependent potentiation of fMLP-induced MPO release, reaching physiological levels (Fig. 5A). This CL097 potentiation property was also observed on MPO release by neutrophils from healthy donors. Interestingly, CL097 also potentiated fMLP-induced phosphorylation of AKT in neutrophils from both control and cirrhotic patients and maintained the level of activated AKT up to 30 min, while in the absence of CL097, AKT phosphorylation



**Fig. 3. Expression of signaling effectors and fPR in neutrophils of healthy donors and patients.** Neutrophils from control and cirrhotic patients were disrupted in Trizol buffer for protein extraction. Proteins of interest were detected using Western blot (A, C), quantified (B, D) and expressed as percentage of control (n = 7 in each group).

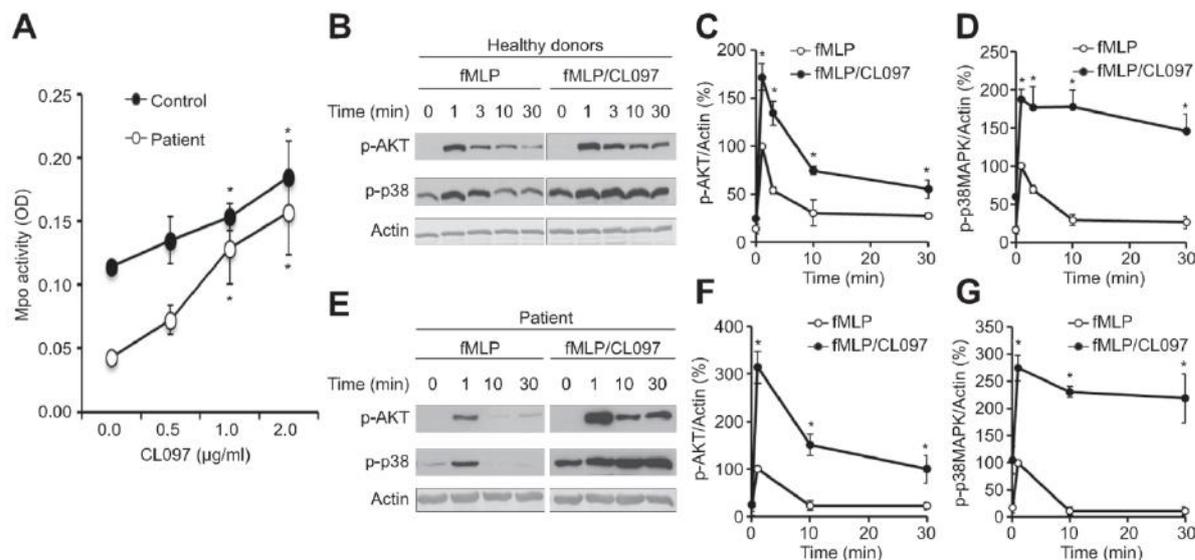


**Fig. 4. A role of AKT and p38-MAPK but not ERK1/2 in fMLP-induced release of MPO from neutrophils.** (A–C) Healthy neutrophils were pretreated for 15 min without (control) or with the antagonist of AKT (AKTib1/2), p38-MAPK (SB202190) or ERK1/2 (U0126), then with cytochalasin B for 5 min before stimulation with fMLP (1  $\mu$ M, 2 min). MPO release is expressed as the percentage of control fMLP values (n = 6; \*p <0.05 vs. control).

returned to basal level, more rapidly in patients' neutrophils (Fig. 5B–E). More strikingly, CL097 potentiated both basal and fMLP-induced phosphorylation of p38-MAPK maintaining a high level of activated enzyme for at least 30 min in neutrophils of both control and cirrhotic patients (Fig. 5B–D and E–G). By contrast, in cells not treated with CL097, p38-MAPK phosphorylation was transient returning to baseline levels within 5 min. These CL097 potentiating effects may be mediated mainly through TLR8 since TLR7 was barely detectable in neutrophils (Supplementary Fig. 4), in agreement with other studies [42,43]. TLR8 was similarly expressed in both control and patients neutrophils,

*Impaired bactericidal activity of patients' neutrophils and beneficial CL097 effects*

The deficient signaling and MPO exocytosis of patients' neutrophils suggest that alterations may impact neutrophil bactericidal activities. We explored this hypothesis using a model of bacterial killing induced by fMLP [8]. Control neutrophils incubated with *E. Coli* induced significant bacterial killing (25–30%) upon stimulation with fMLP, in contrast to patients' neutrophils which were not responsive (Fig. 6A). Interestingly, CL097 alone induced significant bacterial killing by neutrophils from both controls and cirrhotic patients (Fig. 6B and C). CL097 also strongly potentiated fMLP-induced bacterial killing by patients' neutrophils whereas a non-significant increase was observed with control neutrophils. Thus, TLR8 activation may provide beneficial



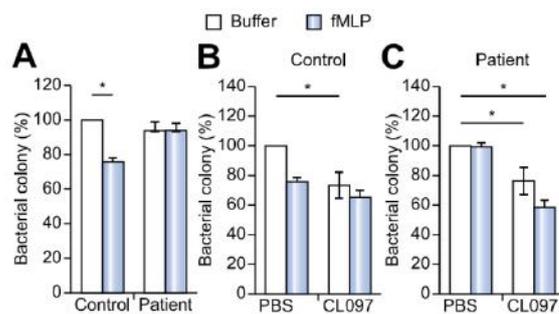
**Fig. 5. The TLR7/8 agonist CL097 potentiated fMLP-induced MPO release and AKT/p38-MAPK signaling in neutrophils.** (A) Neutrophils from healthy donors (control) and cirrhotic patients were pretreated for 15 min without or with CL097 (0.5–2 µg/ml), then stimulated with fMLP (1 µM) for 2 min. MPO release is expressed as OD × 10<sup>6</sup> cells/3 min (n = 5; \*p < 0.05 vs. control). (B–C) Neutrophils were pretreated in the absence or presence of CL097 (1 µg/ml) for 10 min before stimulation with fMLP (1 µM) for various times. Phosphorylated AKT and p38-MAP kinase are expressed relative to actin and the ratio represented as percentage of maximal control values obtained with fMLP (n = 4–5 experiments); \*p < 0.05 vs. control.

effects on neutrophil host-defence activities in patients with cirrhosis.

**Discussion**

Decompensated alcoholic cirrhosis is a severe liver disease with about 26% of patients having bacterial infection on hospital admission [17]. Approximately one third of patients die within the first month due to the development of multiorgan failure [44]. Neutrophils, the first cellular line of defence against microorganisms, become altered during cirrhosis progression with impaired phagocytosis, ROS production, exocytosis or chemotaxis [27–34,45]. Deficiencies were more or less marked as a function of the disease severity and occurred in both alcoholic and non-alcoholic cirrhosis [28–30,35] indicating that deficiencies may not result from direct effects of alcohol. The biochemical mechanisms underlying these neutrophil dysfunctions remain largely unknown.

This study provides first evidence that decompensated alcoholic cirrhosis severely impaired the activation of AKT, p38-MAPK and ERK1/2 induced by fMLP in human neutrophils without alteration of overall protein expression of signaling effectors, MPO (Fig. 3A, B) or the fMLP receptor fPR (Fig. 3C, D; Fig. 7). These data indicate that the molecular origins of such deficiencies may take place upstream of the three effectors, and at early steps of fPR signaling cascade (Fig. 7). Amongst potential upstream candidates, inositol-specific phospholipase C (InsPLC) was also impaired in fMLP-stimulated patients' neutrophils [30]. InsPLC generates diacylglycerol (DAG) and inositol trisphosphate known to increase cytosolic calcium concentration [46], a major effector of exocytosis [47]. DAG and calcium activate several PKC, which in turn stimulate AKT and MAP-kinases [48,49]. In neutrophils,



**Fig. 6. Impaired bactericidal activity of neutrophils from cirrhotic patients and beneficial effects of the TLR7/8 agonist CL097.** (A) Neutrophils from healthy volunteers (control) and cirrhotic patients were incubated with *E. coli* for 5 min, then treated or not (Buffer) with fMLP (1 µM) for 25 min. (B, C): Neutrophils incubated with bacteria were treated without (PBS) and with CL097 (1 µg/ml) for 2 min before stimulation with fMLP for 23 min. Cells were lysed and the number of bacterial colony is expressed as percentage of that of control resting cells (A, n = 6), or % of that of resting cells (PBS) in both cell populations (B, C, n = 6); \*p < 0.05.

fMLP-induced PLC (PLCβ2) is directly activated by the βγ subunits of a trimeric G-protein (Gi) [50] coupled to fPR, which suggests potential biochemical alterations at the G-protein level. Consistent with this hypothesis, ROS production induced by direct activators of G-proteins such as NaF or ALF4, was also impaired in neutrophils from cirrhotic patients [30]. Other early signaling events impaired by cirrhosis include the PI3-kinase/AKT signaling pathway observed in monocytes [51].

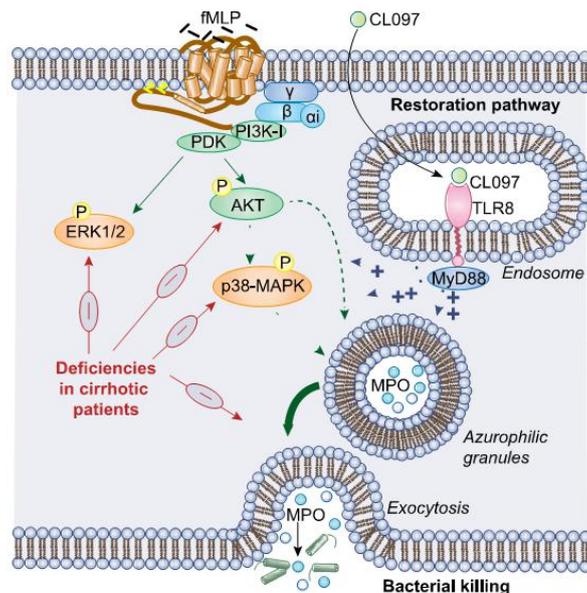
Neutrophil dysfunctions induced by cirrhosis result from intrinsic cellular alterations as they persisted after cell washing [27–30]. However, reversible dysfunctions were reported after

## Research Article

removal of endotoxins from patients' plasma [32]. In this study, patients' but not control plasmas also decreased fMLP-induced MPO exocytosis of neutrophils from healthy volunteers (Supplementary Fig. 5), which reveals the presence of diffusible inhibitors. Lipopolysaccharide (LPS) has been proposed as a candidate for this interference effect [32]. However, its mechanism of action may be indirect. Indeed, low LPS concentrations stimulate exocytosis [52] and prime neutrophils, leading to enhanced superoxide production induced by various agents including fMLP [53], whereas high LPS concentrations stimulate a weak superoxide production [54]. We thus speculate that this neutrophil stimulation and ROS oxidant effect may desensitize early signaling effectors leading to functional deficiencies upon subsequent stimulation of neutrophils. Other agents present in patients' plasma at high concentrations such as ammonia, may also provide deleterious effects, since it decreased neutrophil phagocytic capacity but simulated spontaneous production of ROS [55].

Of the three major signaling effectors studied here, only AKT and p38-MAPK regulate MPO release, as supported by inhibitory effects of their antagonists (Fig. 4A, B), their deficient activation in patients' neutrophils (Fig. 2) and the fact that p38-MAPK is activated downstream of AKT (Supplementary Fig. 2C, D). The involvement of p38-MAPK in exocytosis of primary granules confirms other works with neutrophils from *Src* knock-out mice, which identify p38-MAPK downstream of *Src* tyrosine kinase [40]. However, the mechanism by which AKT regulates p38-MAPK activity in neutrophils remains not known. Other protein kinases are suspected to regulate the release of MPO, including PKC based on the observation that phorbol myristate acetate (PMA) stimulates MPO release [28]. The PMA-induced degranulation was also impaired in neutrophils from cirrhotic patients [28], as well in our study (data not shown). Unexpectedly, ERK1/2, whose activation was strongly impaired in patients' neutrophils, did not regulate MPO/elastase release (Fig. 4C), in agreement with other studies [40]. However, a role of ERK1/2 in neutrophil defence functions is not excluded, since ERK1/2 regulated approximately 30% of ROS production of healthy neutrophils (Fig. 4C), thus providing the MPO substrate  $H_2O_2$ . The deficient ERK1/2 activation observed here in patients' neutrophils may contribute to their defective ROS production we previously reported [8]. In this study, 90% of the patients which were defective for MPO release, also exhibited a strongly deficient superoxide production (30–35% of control values), in agreement with our previous works [8]. The defective NADPH oxidase activity may be related to the deficient activation of AKT and p38-MAPK since both protein kinases phosphorylate a main component of NADPH oxidase, p47<sup>phox</sup>, on respectively S304/S328 [56] and S345 [57]. The impairment of both MPO release and ROS production in patients' neutrophils may explain their deficient neutrophil antibacterial function (Fig. 6), in agreement with previous studies [27–33].

Attempts to improve neutrophil functions in cirrhosis have been undertaken both *in vitro* based on removal of endotoxins in patients plasmas [32] or *in vivo* with patients' treated with G-CSF [45]. Our observations that cirrhosis impaired fPR signaling, prompts us to explore a novel strategy based on activation of endosomal TLR7/8 receptors by CL097, a compound shown to stimulate MAPK-dependent phosphorylation of p47<sup>phox</sup> and to increase ROS production in healthy neutrophils [41]. Interestingly, CL097 restored fMLP-induced MPO release and bactericidal activity of patients' neutrophils. This original and promising



**Fig. 7. Proposed model for fMLP-induced MPO release via the AKT/MAPK signaling in neutrophils from healthy donors and patients with alcoholic cirrhosis.** Stimulation of neutrophils by the bacterial formylpeptide fMLP via its G-protein-coupled receptor (fPR) induces a rapid activation of AKT and p38-MAPK signalling, which contributes to MPO release. In cirrhotic patients, signaling, MPO release and bactericidal activity were impaired. Stimulation of the intracellular Toll-like receptor TLR8 potentiates AKT/p38-MAPK signaling and restores neutrophil MPO release and antimicrobial function of neutrophils.

CL097 property may be related to its ability to potentiate AKT and p38-MAPK activation and to maintain their activation state, since in the absence of CL097, the activation of these two kinases in patients' neutrophils was weak and transient, and not sufficient to trigger physiological defence activities (Fig. 5). Since TLR7 was hardly detectable in human neutrophils, in contrast to TLR8 [42,43] as confirmed here (Supplementary Fig. 4), these data strongly suggest that TLR8 agonists may constitute promising candidates to improve neutrophil defence activities of immunodepressed patients. Furthermore, a number of TLR7/8 agonist immuno-stimulatory activities have been reported on neutrophil production of cytokines [58] and lipid mediators [59] and in other leukocytes including monocytes, antigen-presenting cells and Tregs cells, with a particular protective immunity of new born leukocytes [60]. It is worth noting that CL097 restored the production of G-CSF that was previously inhibited in monocytes pretreated with  $IFN\alpha$ , a cytokine that causes neutropenia [61]. CL097 is also used as an adjuvant for the induction of hepatitis B antigen-specific Th1 responses in an immune tolerant state [62]. Finally, translational developments of TLR7/8 agonists with significant ameliorations were obtained with the TLR7 agonist Imiquimod in the treatment of genital and perianal warts caused by certain strains of human papillomavirus and genital herpes (reviewed [60]).

In conclusion, this study provides evidence that advanced alcoholic cirrhosis severely impaired the activation of AKT, p38-MAPK-kinases, ERK1/2, and MPO release which was related to

the two deficient former signaling effectors. These deficiencies, together with our previously reported impaired ROS production led to a deficient bactericidal activity of patients' neutrophils, which may contribute to increase patient' susceptibility to bacterial infection. Interestingly, the defective signaling and defence activities of patients' neutrophils can be reversed upon TLR7/8 activation, which raises perspectives to improve host-defence mechanisms in immuno-depressed patients.

**Financial support**

This work was supported by the Algerian Minister of High Education (Fellowship to A.B.), the Labex Inflammex (Fellowship to L.R.), Inserm and CNRS.

**Conflict of interest**

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

**Authors' contributions**

A.B., R.M. and A.P. designed experiments; A.B., L.R. and A.P. performed the experiments; E.W. and R.M. selected patients and analysed characteristics. All authors discussed and interpreted the results, and A.P. wrote the manuscript.

**Acknowledgements**

We thank Magali Fasseu and Viviana Marzaioli for her expertise in RT-qPCR.

**Supplementary data**

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.12.005>.

**References**

[1] Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 2004;16:42–47.  
 [2] Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005;77:598–625.  
 [3] Nauseef W. Myeloperoxidase in human neutrophil host defense. *Cell Microbiol* 2014;16:1146–1155.  
 [4] Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Suzuki K, et al. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. *Jpn J Infect Dis* 2004;57:S15.  
 [5] El Kebir D, Jozsef L, Pan W, Filep JG. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. *Circ Res* 2008;103:352–359.  
 [6] Costa C, Germena G, Hirsch E. Dissection of the interplay between class I PI3Ks and Rac signaling in phagocytic functions. *Sci World J* 2010;10:1826–1839.  
 [7] Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol* 2013;17:638–650.

[8] Rolas L, Makhezer N, Hadjoudj S, El-Benna J, Djerdjouri B, Elkrief L, et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin aggravates the respiratory burst defect of neutrophils from decompensated patients with cirrhosis. *Hepatology* 2013;57:1163–1171.  
 [9] Dinanuer MC. Disorders of neutrophil function: an overview. *Methods Mol Biol* 2014;1124:501–515.  
 [10] Kruger P, Saffarzadeh M, Weber AN, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H, et al. Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog* 2015;11 e1004651.  
 [11] Dorward DA, Lucas CD, Chapman GB, Haslett C, Dhaliwal K, Rossi AG. The role of formylated peptides and formyl peptide receptor-1 in governing neutrophil function during acute inflammation. *Am J Pathol* 2015;185:1172–1184.  
 [12] Rehm J, Mathers C, Popova S, Thavorncharoensap M, Teerawattananon Y, Patra J. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *Lancet* 2009;373:2223–2233.  
 [13] Naveau S. Current trend: alcoholic liver diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 2006;30:550–553.  
 [14] Ceni E, Mello T, Galli A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism. *World J Gastroenterol* 2014;20:17756–17772.  
 [15] Albillos A, Lario M, Álvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol* 2014;61:1385–1396.  
 [16] Ramaiah SK, Jaeschke H. Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicol Pathol* 2007;35:757–766.  
 [17] Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic hepatitis. *N Eng J Med* 2009;25:2758–2769.  
 [18] Jaeschke H, Ho YS, Fisher MA, Lawson JA, Farhood A. Glutathione peroxidase deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress. *Hepatology* 1999;29:443–445.  
 [19] Altamirano J, Miquel R, Katoonizadeh A, Abroades JG, Duarte-Rojo A, Louvet A, et al. A histologic scoring system for prognosis of patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 2014;146:1231–1239.  
 [20] Taieb J, Delarche C, Paradis V, Mathurin P, Grenier A, Crestani B, et al. Polymorphonuclear neutrophils are a source of hepatocyte growth factor in patients with severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2002;36:342–348.  
 [21] Harty MW, Muratore CS, Papa EF, Gart MS, Ramm GA, Gregory SH, et al. Neutrophil depletion blocks early collagen degradation in repairing cholestatic rat livers. *Am J Pathol* 2010;176:1271–1281.  
 [22] Eash KJ, Means JM, White DW, Link DC. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood* 2009;113:4711–4719.  
 [23] Singh V, Sharma AK, Narasimhan RL, Bhalla A, Sharma N, Sharma R. Granulocyte colony-stimulating factor in severe alcoholic hepatitis: a randomized pilot study. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1417–1423.  
 [24] Garg V, Garg H, Khan A, Trehanpati N, Kumar A, Sharma BC, et al. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes CD34(+) cells and improves survival of patients with acute-on-chronic liver failure. *Gastroenterology* 2012;142:505–512.  
 [25] Arvaniti V, D'Amico G, Fede G, Manousou P, Tsochatzis E, Pleguezuelo M, et al. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology* 2010;139:1246–1256.  
 [26] Moreau R, Rautou PE. G-CSF therapy for severe alcoholic hepatitis: targeting liver regeneration or neutrophil function? *Am J Gastroenterol* 2014;109:1424–1426.  
 [27] Feliu E, Gougerot MA, Hakim J, Cramer E, Auclair C, Rueff B, et al. Blood polymorphonuclear dysfunction in patients with alcoholic cirrhosis. *Eur J Clin Invest* 1977;7:571–577.  
 [28] Rajkovic IA, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing, and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatology* 1986;6:252–262.  
 [29] Lebrun L, Pelletier G, Briantais MJ, Galanaud P, Etienne JP. Impaired functions of normal peripheral polymorphonuclear leukocytes in cirrhotic ascitic fluid. *J Hepatol* 1992;16:98–101.  
 [30] Garfia C, Garcia-Ruiz I, Solis-Herruzo JA. Deficient phospholipase C activity in blood polymorphonuclear neutrophils from patients with liver cirrhosis. *J Hepatol* 2004;40:749–756.  
 [31] Panasiuk A, Wysocka J, Maciorkowska E, Panasiuk B, Prokopowicz D, Zak J, et al. Phagocytic and oxidative burst activity of neutrophils in the end stage of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2005;11:7661–7665.  
 [32] Mookerjee RP, Stadlbauer V, Lidder S, Wright GA, Hodges SJ, Davies NA, et al. Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts the outcome. *Hepatology* 2007;46:831–840.

## Research Article

- [33] Stadlbauer V, Mookerjee RP, Hodges S, Wright GA, Davies NA, Jalan R. Effect of probiotic treatment on deranged neutrophil function and cytokine responses in patients with compensated alcoholic cirrhosis. *J Hepatol* 2008;48:945–951.
- [34] Ward PA. Role of C5 activation products in sepsis. *Sci World J* 2010;10:2395–2402.
- [35] Markwick LJ, Riva A, Ryan JM, Cooksley H, Palma E, Tranah TH, et al. Blockade of PD1 and TIM3 restores innate and adaptive immunity in patients with acute alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 2015;148:590–602.
- [36] Juttner B, Younes A, Weissig A, Ahrens J, Becker T, Scheinichen D. Reduced post-operative neutrophil activation in liver transplant recipients suffering from post-hepatic cirrhosis. *Clin Transplant* 2009;23:921–929.
- [37] Nowak D. Hydrogen peroxide release from human polymorphonuclear leukocytes measured with horseradish peroxidase and o-dianisidine. Effect of various stimulators and cytochalasin B. *Biomed Biochim Acta* 1990;49:353–362.
- [38] Paruch S, El-Benna J, Djerdjouri B, Marullo S, Perianin A. A role of p44/42-mitogen-activated protein kinases in formyl-peptide receptor-mediated phospholipase D activity and oxidant production. *FASEB J* 2006;20:142–144.
- [39] Patel S, Djerdjouri B, Raoul-Des-Essarts Y, Dang PM, El-Benna J, Perianin A. Protein kinase B (AKT) mediates phospholipase D activation via ERK1/2 and promotes respiratory burst parameters in formyl-peptide-stimulated neutrophil-like HL-60 cells. *J Biol Chem* 2010;285:32055–32063.
- [40] Mócsai A, Jakus Z, Vántus T, Berton G, Lowell CA, Ligeti E. Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38-mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *J Immunol* 2000;164:4321–4331.
- [41] Makni-Maalej K, Boussetta T, Hurtado-Nedelec M, Belambri SA, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. The TLR7/8 agonist CL097 primes N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated NADPH oxidase activation in human neutrophils: critical role of p47phox phosphorylation and the proline isomerase Pin1. *J Immunol* 2012;189:4657–4665.
- [42] Janke M, Poth J, Wimmenauer V, Giese T, Coch C, Barchet W, et al. Selective and direct activation of human neutrophils but not eosinophils by Toll-like receptor 8. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:1026–1033.
- [43] Berger M, Hsieh CY, Bakele M, Marcos V, Rieber N, Kormann M, et al. Neutrophils express distinct RNA receptors in a non-canonical way. *J Biol Chem* 2012;287:19409–19417.
- [44] Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, et al. Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology* 2013;144:1426–1437.
- [45] Tritto G, Bechlis Z, Stadlbauer V, Davies N, Frances R, Shah N, et al. Evidence of neutrophil functional defect despite inflammation in stable cirrhosis. *J Hepatol* 2011;55:574–581.
- [46] Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984;312:315–321.
- [47] Lacy P. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2006;2:98–108.
- [48] Tang W, Zhang Y, Xu W, Harden TK, Sondek J, Sun L, et al. A PLC $\beta$ /PI3K $\gamma$ -GSK3 signaling pathway regulates cofilin phosphatase slingshot2 and neutrophil polarization and chemotaxis. *Dev Cell* 2011;21:1038–1050.
- [49] Chiariello M, Vaqué JP, Crespo P, Gutkind JS. Activation of Ras and Rho GTPases and MAP Kinases by G-protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol* 2010;661:137–150.
- [50] Ward RA, Nakamura M, McLeish KR. Priming of the neutrophil respiratory burst involves p38 mitogen-activated protein kinase-dependent exocytosis of flavocytochrome b558-containing granules. *J Biol Chem* 2000;275:36713–36719.
- [51] Lee SB, Shin SH, Hepler JR, Gilman AG, Rhee SG. Activation of phospholipase C- $\beta$  2 mutants by G protein  $\alpha$  q and  $\beta$ - $\gamma$  subunits. *J Biol Chem* 1993;268:25952–25957.
- [52] Tazi KA, Quioc JJ, Saada V, Bezeaud A, Lebrec D, Moreau R. Upregulation of TNF- $\alpha$  production signaling pathways in monocytes from patients with advanced cirrhosis: possible role of Akt and IRAK-M. *J Hepatol* 2006;45:280–289.
- [53] Guthrie LA, McPhail LC, Henson PM, Johnston Jr RB. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J Exp Med* 1984;160:1656–1671.
- [54] Etheredge EE, Spitzer JA. Chronic endotoxemia reversibly alters respiratory burst activity of circulating neutrophils. *J Surg Res* 1993;55:261–268.
- [55] Shawcross DL, Wright GA, Stadlbauer V, Hodges SJ, Davies NA, Wheeler-Jones C, et al. Ammonia impairs neutrophil phagocytic function in liver disease. *Hepatology* 2008;48:1202–1212.
- [56] Chen Q, Powell DW, Rane MJ, Singh S, Butt W, Klein JB, et al. Akt phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils. *J Immunol* 2003;170:5302–5308.
- [57] El Benna J, Faust RP, Johnson JL, Babior BM. Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1996;271:6374–6378.
- [58] Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003;102:2660–2669.
- [59] Hattermann K, Picard S, Borgeat M, Leclerc P, Pouliot M, Borgeat P. The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B<sub>4</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub> and platelet-activating factor biosynthesis. *FASEB J* 2007;21:1575–1585.
- [60] Philbin VJ, Levy O. Immunostimulatory activity of Toll-like receptor 8 agonists towards human leucocytes: basic mechanisms and translational opportunities. *Biochem Soc Trans* 2007;35:1485–1491. Review.
- [61] Tajuddin T, Ryan EJ, Norris S, Hegarty JE, O'Farrelly C. Interferon- $\alpha$  suppressed granulocyte colony stimulating factor production is reversed by CL097, a TLR7/8 agonist. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:1883–1890.
- [62] Wang Y, Chen K, Wu Z, Liu Y, Liu S, Zou Z, et al. Immunizations with hepatitis B viral antigens and a TLR7/8 agonist adjuvant induce antigen-specific immune responses in HBV-transgenic mice. *Int J Infect Dis* 2014;29:31–36.

**L'éditorial de la revue *Journal of hepatology* dédié à notre article.**

## Restoration of bactericidal activity of neutrophils by myeloperoxidase release: A new perspective for preventing infection in alcoholic cirrhosis

Alexandre Louvet\*

Service des maladies de l'appareil digestif, Hôpital Huriez, Lille Cedex, France; LIRIC – Lille Inflammation Research International Center, U995, Univ. Lille, Inserm, Lille, France

See Article, pages 1041–1048

Advances in the management of decompensated cirrhosis have dramatically improved patient outcomes in the past years. Significant progress has been made in the management of gastrointestinal bleeding, severe alcoholic hepatitis, hepatorenal syndrome and the management of patients in the intensive care unit. Nevertheless, decompensated cirrhosis is still associated with a high risk of short-term death. Severe infection is one of the major causes of mortality. For example, patients with cirrhosis were shown to have a higher probability of dying from sepsis (relative risk of 2) compared to those without cirrhosis in a large series from the USA [1]. In the specific setting of severe alcoholic hepatitis treated with corticosteroids, patients who develop infection after the initiation of treatment have a lower survival at 2 months than those who do not (relative risk of death of around 1.5) [2]. It is interesting to note that patients who do not respond to corticosteroids have a far higher risk of developing infection than responders (relative risk of 4). This suggests that patients with the greatest impairment in liver function have a higher probability of developing infection during follow-up. The relationship between severely impaired liver function and the risk of infection has been confirmed in a pooled analysis of studies performed in decompensated cirrhosis [3]. Thus, any improvement in liver function should result in a lower incidence of infection. However, in patients with alcoholic cirrhosis, the only strategy that has been shown to be associated with an improved prognosis is withdrawal from alcohol, even in patients with very severe liver impairment [4]. Nevertheless, many of these patients do not improve and die or require liver transplantation after a short period of time.

A new concept in the management of patients with cirrhosis, whatever the origin of underlying disease, is so-called acute-on-chronic liver failure (ACLF). This acute decompensation of

cirrhosis is associated with a mortality that can reach 90% at one month in the most severe form, which is classified as ACLF-3 [5]. In this subgroup of patients, alcoholic cirrhosis is the leading cause of underlying liver disease and the precipitating event of ACLF is infection in about 50% of cases. Considering that ACLF in general and sepsis in particular are associated with multiorgan failure (encephalopathy, kidney injury, circulatory failure etc.) and immune paralysis [6], any strategy to prevent this severe deterioration would be of great interest for the management of these patients.

The prognosis of sepsis has improved along with the global management of cirrhosis due to several factors such as a better and earlier diagnosis, new antibiotics and the prevention of hepatorenal syndrome [7]. Thus, mortality has decreased by 10% in the past few years but remains high. It is important to mention that the management of sepsis in cirrhosis is essentially focused on treatment rather than prevention. Indeed, the prevention of infection in cirrhosis is restricted to antibioprophyllaxis for gastrointestinal bleeding and after a first episode of spontaneous peritonitis. Most of the few ongoing studies to evaluate the prevention of infection in cirrhosis are testing probiotics or new antibiotic regimens ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). So far, there is no strategy to restore the immune defects associated with cirrhosis. This immune dysfunction is multifactorial and extremely complex because it associates systemic inflammation, characterized by neutrophil burst, elevated circulating cytokines and activated blood white cells, which is counterbalanced by a relative immune deficiency (e.g. damage of circulating immune cells and a defect in hepatic synthesis of immunity proteins) [8]. To date, no strategy has been shown to trigger this immune defect.

This issue of the *Journal of Hepatology* includes a study with the goal to dissect the pathways associated with a functional defect of polymorphonuclear neutrophils in alcoholic cirrhosis. This translational study is based on human samples from patients with decompensated alcoholic cirrhosis (Child-Pugh class B and C). Boussif *et al.* provide evidence for altered release of myeloperoxidase in patients with alcoholic cirrhosis compared to healthy controls. However, one could suggest that the choice of controls is not fully appropriate. Indeed, this raises the question of the selectivity of the functional defect of neutrophils: is it related

Received 4 February 2016; received in revised form 10 February 2016; accepted 11 February 2016

\* DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.12.005>.

\* Corresponding author. Address: Service des maladies de l'appareil digestif, Hôpital Huriez, Rue Polonovski, 59037 Lille Cedex, France. Tel.: +33 320445343; fax: +33 320445564.

E-mail address: [alexandre.louvet@chru-lille.fr](mailto:alexandre.louvet@chru-lille.fr).



ELSEVIER

to cirrhosis by itself, to liver decompensation or to the alcoholic etiology? Although an ideal study would test neutrophils from populations with different severities and etiologies of cirrhosis, by definition, studies are dependent upon recruitment from the medical unit where the blood samples are collected and many translational studies have not overcome this limitation.

In terms of mechanisms of action, Boussif *et al.* show that patients with decompensated cirrhosis do not have a defect in myeloperoxidase production, but present instead with a defect in cellular signaling leading to lower myeloperoxidase exocytosis. This defect is associated with a reduced capacity to kill bacteria in neutrophils from patients with cirrhosis, which is demonstrated by the incubation of neutrophils with *E. coli*. This paper nicely shows that this defect in myeloperoxidase release and bacterial killing is reversible following administration of CL097, a TLR7/8 agonist. Using this stimulation, neutrophils from patients with alcoholic cirrhosis have the same properties as healthy controls. This study contributes to our knowledge of the immune defense against infection in decompensated alcoholic liver disease and, in association with the data on blockade of PD-1 and TIM-3 in alcoholic hepatitis reported by Markwick *et al.* [9], this study suggests that immunodeficiency is reversible.

It is important to keep in mind that neutrophils have different functions in alcoholic liver disease. Besides their crucial role in the host defense against pathogens, these cells are central in the pathogenesis of alcoholic hepatitis. Alcohol-induced liver injury is characterized by neutrophil recruitment driven by the activation of Kupffer cells via bacterial translocation (mostly lipopolysaccharide LPS), and also hepatocyte damage, oxidative stress and lipid peroxidation [10]. Neutrophil infiltrates are one of the key hallmarks of the histological diagnosis of alcoholic hepatitis with Mallory-Denk bodies and hepatocyte ballooning [11]. Besides this apparent paradox, future studies are strongly needed to investigate why the same cell can be regarded as beneficial against infection and detrimental in terms of exacerbated liver inflammation in the same patient.

The study by Boussif *et al.* provides new therapeutic perspectives in alcoholic cirrhosis because restoration of the antibacterial properties of the immune system by the TLR7/8 agonist. This can be considered a potential new target for patients with severe liver dysfunction. Thus, future management of decompensated

cirrhosis could be viewed as a combination of several targets: improving liver function, restoring immune paralysis, targeting liver inflammation, promoting liver regeneration and treating complications. This is an exciting prospect because recent medical progress has mainly involved the treatment of complications.

**Conflict of interest**

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

**References**

- [1] Foreman MG, Mannino DM, Moss M. Cirrhosis as a risk factor for sepsis and death: analysis of the National Hospital Discharge Survey. *Chest* 2003;124:1016–1020.
- [2] Louvet A, Wartel F, Castel H, et al. Infection in patients with severe alcoholic hepatitis treated with steroids: early response to therapy is the key factor. *Gastroenterology* 2009;137:541–548.
- [3] Arvaniti V, D’Amico G, Fede G, et al. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology* 2010;139:1246–1256, 1256, e1–e5.
- [4] Verrill C, Markham H, Templeton A, et al. Alcohol-related cirrhosis–early abstinence is a key factor in prognosis, even in the most severe cases. *Addiction* 2009;104:768–774.
- [5] Gustot T, Fernandez J, Garcia E, et al. Clinical Course of acute-on-chronic liver failure syndrome and effects on prognosis. *Hepatology* 2015;62:243–252.
- [6] Jalan R, Gines P, Olson JC, et al. Acute-on chronic liver failure. *J Hepatol* 2012;57:1336–1348.
- [7] Jalan R, Fernandez J, Wiest R, et al. Bacterial infections in cirrhosis: a position statement based on the EASL Special Conference 2013. *J Hepatol* 2014;60:1310–1324.
- [8] Albillos A, Lario M, Alvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol* 2014;61:1385–1396.
- [9] Markwick LJ, Riva A, Ryan JM, et al. Blockade of PD1 and TIM3 restores innate and adaptive immunity in patients with acute alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 2015;148 e10.
- [10] Louvet A, Mathurin P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;12:231–242.
- [11] Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med* 2009;360:2758–2769.



تلعب الخلايا المتعادلة دورا رئيسيا في دفاع الجسم ضد الجراثيم. ترتبط هذه الوظيفة ارتباطا وثيقا باستجابتين رئيسيتين؛ إنتاج كمية ضخمة من Superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) (انفجار الأوكسدة) من طرف NADPH oxidase، الذي هو مصدر تشكيل بيروكسيد الهيدروجين ( $H_2O_2$ )، وإفراز الإنزيمات من الحبيبات (تحبب)، بما في ذلك Myeloperoxidase (MPO) التي تستخدم  $H_2O_2$  في تدمير مسببات الأمراض. في بعض الأمراض مثل تليف الكبد الكحولي اللاعويضي، يظهر المرضى ارتفاعا في التعرض للعدوى الميكروبية التي تهدد الحياة، مما يشير إلى فشل الإستجابات الدفاعية للخلايا المتعادلة.

تم في هذا العمل دراسة قدرة إفراز إنزيم Myeloperoxidase من طرف الخلايا المتعادلة لمرضى التليف الكبدي المحفزة بثلاثي البيبتيد fMLP، وكذلك حالة تنشيط بعض المسارات الهامة لنقل الإشارة التي يمكن أن تلعب دورا في تنظيم هذه الاستجابة. من جهة أخرى، تمت دراسة تدخل هذه المسارات في تنظيم إفراز الحبيبات في الخلايا السليمة. بينت النتائج قصورا حادا في إفراز Myeloperoxidase من طرف خلايا مرضى التليف الكبدي المنشطه بـ fMLP، في حين أن المخزون الحبيبي لم يتغير. لوحظ أيضا تثبيط شديد لفسفرة AKT، p38MAPK و ERK1/2، في حين لم يلاحظ أي تغير في تعبير هذه البروتينات ولا في تعبير المستقبل الغشائي للفMLP (fPR). أظهر استعمال المثبطات النوعية لهذه المسارات أن AKT و p38MAPK فقط يتدخلان في تنظيم إفراز إنزيم Myeloperoxidase في الخلايا المتعادلة المنشطة بـ fMLP. أظهرت الخلايا المتعادلة لمرضى التليف الكبدي حالة تثبيط حاد في قتل البكتيريا، ولكن أظهر البحث أنه يمكن تصحيح الوضع *ex vivo* عن طريق تحفيز مستقبلات TLR7/8 باستعمال CL097، ويتم ذلك عبر تنشيط المحور p38MAPK/AKT، وتنشيط إفراز Myeloperoxidase بـ fMLP.

يبين في هذا العمل للمرة الأولى أن الخلايا المتعادلة لمرضى التليف الكبدي تعاني تثبيطا نقل الإشارة عبر AKT، p38MAPK و ERK1/2، وقصورا حادا في إفراز Myeloperoxidase وكذا ضعف النشاطية ضد البكتيريا. في حين يمكن تصحيح هذه الاختلالات عن طريق تحفيز مستقبلات TLR7/8. تساهم هذه الاختلالات في تضاعف قابلية مرضى التليف الكبدي للإصابة بالتهابات البكتيرية.

**الكلمات المفاتيح:** الخلية المتعادلة، إفراز الحبيبات، Myeloperoxidase، التليف الكبدي، البالعات، نقل الإشارة، الأنواع الأوكسجينية النشطة

## RESUME

Le polynucléaire neutrophile (PN) joue un rôle clé dans la défense antimicrobienne de l'organisme. Cette fonction innée dépend étroitement de deux réponses majeures du PN; la production massive d'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) par le système NADPH oxydase, (explosion oxydative) qui est à l'origine de la formation de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), et la libération des enzymes granulaires (dégranulation), parmi lesquelles la myéloperoxydase (MPO) qui utilise l' $H_2O_2$  pour détruire les pathogènes. Dans certaines pathologies telles que la cirrhose hépatique alcoolique décompensée, les patients ont une susceptibilité accrue aux infections microbiennes parfois mortelles, suggérant une défaillance des réponses défensives des PN.

Dans ce travail, nous avons comparé la dégranulation de la MPO des neutrophiles de ces patients cirrhotiques et témoins, induite par le peptide d'origine bactérienne fMet-Leu-Phe (fMLP), ainsi que l'état d'activation de plusieurs effecteurs majeurs de signalisation intracellulaire potentiellement impliqués (AKT, p44/42-MAP kinases (ERK1/2) et p38-MAP-kinases). Par ailleurs, la contribution respective de ces effecteurs dans la dégranulation de la MPO a été explorée dans des neutrophiles sains à l'aide d'antagonistes pharmacologiques des effecteurs. Nos résultats montrent que la dégranulation de myéloperoxydase induite par le fMLP est fortement altérée dans les neutrophiles des patients alors que le taux d'expression de la myéloperoxydase intracellulaire n'a pas été modifié. En revanche, l'activation des trois effecteurs de signalisation induite par le fMLP et, mesurée par leur niveau de phosphorylation, était aussi fortement déficiente en dépit d'une expression normale de ces effecteurs et du récepteur de fMLP (fPR). Cependant, le blocage pharmacologique de ces effecteurs dans les neutrophiles sains, montre que AKT et p38-MAPK, mais pas ERK1/2, régulent positivement l'exocytose de la myéloperoxydase induite par le fMLP. De façon intéressante, les neutrophiles de patients cirrhotiques présentent également un déficit de bactéricidie que nous avons pu corriger *ex vivo* à l'aide d'un agoniste des récepteurs de type Toll (TLR7/8). Le CL097 potentialise à la fois le niveau et la durée d'activation de la voie AKT/p38-MAPK induite par le fMLP, favorisant ainsi la libération de la myéloperoxydase.

En conclusion, cette étude apporte les premières indications que les neutrophiles de patients atteints de cirrhose hépatique décompensée présentent une forte défaillance de signalisation via l'axe AKT/p38-MAPK, de la libération de la myéloperoxydase et de l'activité bactéricide. Ces défaillances qui contribuent à la susceptibilité accrue des patients cirrhotiques aux infections peuvent être corrigées via l'activation des TLR7/8, ce qui ouvre des perspectives thérapeutiques pour les patients immunodéprimés.

**Mots clés :** Neutrophile, Exocytose, Myéloperoxydase, Hépatite, Phagocytes, Signalisation, Espèces réactives de l'oxygène

## ABSTRACT

Polymorphonuclear neutrophils (PN) play a key role in host defense mechanisms against microbial infections. This innate function is dependent on two major PN responses; a massive production of superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) by the NADPH oxidase system (a phenomenon termed respiratory burst) leading to the formation of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and the release of granular enzymes (degranulation) among which Myeloperoxidase (MPO) which uses  $H_2O_2$  to kill bacteria. In some pathologies such as decompensated alcoholic cirrhosis, patients exhibit an increased susceptibility for mostly lethal infections suggesting deficiencies of defensive responses of PN.

In this study, we compared the MPO release from PN of these cirrhotic patients and healthy volunteers in response to stimulation by the bacterial peptide fMet-Leu-Phe (fMLP), and the activation state of major signaling effectors potentially involved (AKT, p44/42-MAP kinases (ERK1/2) and p38-MAP-kinases). In addition, the respective contribution of the three signaling effectors in MPO degranulation was explored using healthy PN and pharmacological antagonists. Our results show that fMLP-induced myeloperoxidase release was strongly impaired in patients' neutrophils whereas the intracellular myeloperoxidase stock was unaltered. The fMLP-induced activation of signaling effectors measured by their phosphorylated forms was also strongly deficient despite a normal expression of the three effectors and the fMLP receptor, fPR. However, based on the pharmacological inhibition of the signaling effectors in healthy neutrophils, AKT and p38-MAPK, but not ERK1/2, up-regulated fMLP-induced myeloperoxidase exocytosis. Interestingly, patients' neutrophils also exhibited a defective bactericidal capacity that was reversed *ex-vivo* by the Toll-like receptor 7/8 agonist CL097. This agent potentiated both the degree and duration of the AKT/p38-MAPK signaling axis induced by fMLP, thus enhancing myeloperoxidase release.

In conclusion, this study provides first evidences that neutrophils from patients with decompensated alcoholic cirrhosis exhibit a deficient AKT/p38-MAPK signaling, myeloperoxidase release and bactericidal activity. These deficiencies which may increase patients' susceptibility to bacterial infections, can be reversed via TLR7/8 activation, and thus raises therapeutical perspectives to boost host-defense mechanisms of immuno-depressed patients.

**Key words:** Neutrophil, Exocytosis, Myeloperoxidase, Hepatitis, Phagocytes, Signaling, Reactive oxygen species