

1. Macrophage et PNN : généralités, activités et modulation des fonctions immunes

- Macrophages : 1<sup>ère</sup> ligne résidents
  - ↳ phagocyte
  - ↳ sécrétion de cytokines
- Alvéoles interstitium
  - ↳ recrutement d'autres cellules
- ↳ vaisseaux voies aériennes
- PNN : principales cellules phagocytaires, agit dans les tissus infectés aérobie et anaérobie – demi- vie brève

Ma

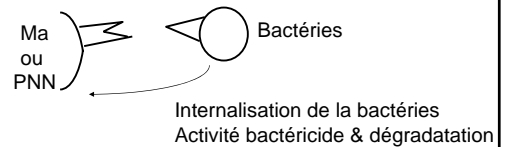
- interviennent dans l'immunité naturelle et acquise
- capable d'internaliser, de tuer et de dégrader des microorganismes
- Coopération avec les lymphocytes : l. acquise

Lors de la réponse innée, les cellules de première ligne reconnaissent des structures stables, immunes communes à de nombreux agents infectieux :

- Endotoxines (LPS)
- Peptidoglycanes
- Ac. lipoteïchoïque
- Flagelline
- mannan....

• Rôle des cellules phagocytaires dans l'immunité naturelle

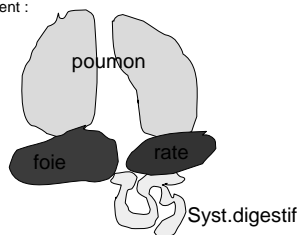
↳ Ma et PNN portent à leur surface des récepteurs qui se lient aux résidus communs de carbohydrates que l'on trouve à la surface des bactéries et qui sont absents des cellules humaines



Monocytes/macrophages

Cellules phagocytaires → Destruction des organismes pathogènes

Macrophages → [tissus] → les monocytes quittent le sang au bout de 3 à 4 jours et s'établissent dans les tissus où ils se différencient en macrophages tissulaires, adoptant parfois des caractéristiques morphologiques spécifiques du lieu où ils se trouvent :



- histiocytes du tissu conjonctif
- macrophages alvéolaires du poumon (vaisseaux, bronches...)
- cellules de Küpffer du foie
- ostéoclastes de l'os
- macrophages des synoviales
- macrophages fixes ou libres de la rate ou des ganglions

Leur durée de vie est longue (1 à 3 mois) et ils sont encore capables de se diviser. Ils meurent sur place à moins d'être entraînés par la lymphe vers les ganglions lymphatiques. Ils contiennent de grosses granulations cytoplasmiques qui sont des lysosomes contenant de nombreuses enzymes mais pas de myéloperoxydases.

MACROPHAGE

• Produit des cytokines pro et anti-inflammatoires

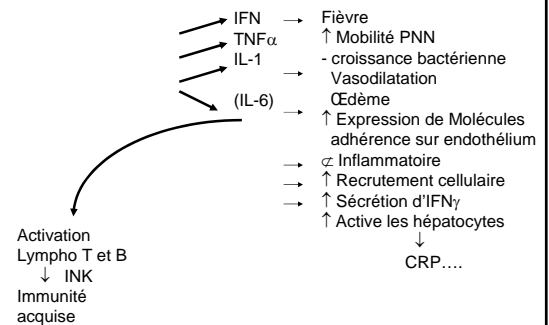
Pro-inflammatoires

- $TNF\alpha$  =
  - activation mol. adhérence (migration PNN du sang vers les tissus)
  - ↑ ICAM-1, LFA-1
  - Corrélation  $TNF\alpha$  – Apache II (pneumonies sévères) PUREN, Chest 95)
- IL-1
- IL-8 = afflux neutro +++ altération neutro +++

IL-6

- IL-1 Ra
- SR  $TNF\alpha$  I & II
- IL-10
- (-) IL-1,  $TNF\alpha$ , IL-9, PG

Anti-inflammatoires



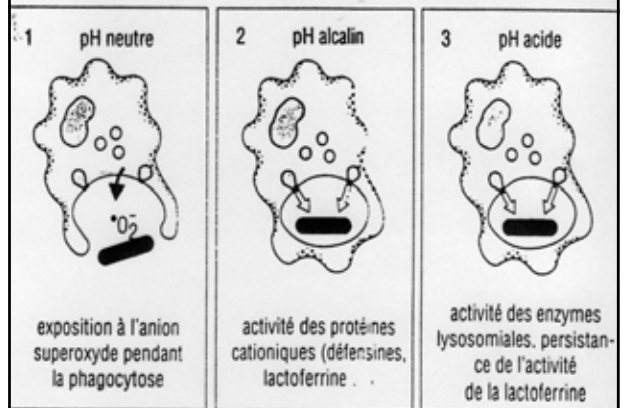
Afflux de cellules inflammatoires après activation macrophagique

- Activation cellulaire
  - libération de médiateurs
  - expression de récepteurs membranaires
- Ex =  $TNF\alpha$  → ↑ Mol. Adhérence ≈ endothélium chemotactique Macrophage
- ↑ Mol. Adhérence = PNN

**MACROPHAGE**

- Produit aussi
  - NO
  - protéase cytotolytique
  - $H_2O_2$
  - Enzymes lysosomiales
  - Lactoferrine
  - Activation du C3.....

**Mécanismes impliqués dans la lyse bactérienne**



1. adhérence  $R_1$  ) )  $R_2$

2. ingestion Pénétration de la bactérie dans la cellule, dans un phagosome

3. Formation du phagolysosome : fusion de la membrane du phagosome avec celle d'un lysosome

**4. Élimination des micro-organismes : différents mécanismes**

- acidification (production d'ac.lactique)
- libération d'hydrolases (lysozyme, phospholipase, protéase, RNAase .....
- formation d' $H_2O_2$  → Radicaux libres  $O_2$  (en présence de → Bactéricide peroxydase)
- accumulation de dérivés azotés toxiques  $NO$ ,  $NO^+$ ,  $NO_3^-$
- production de défensines (PNN) = peptides qui génèrent des canaux ioniques dans les membranes bactériennes
- Cathepsin G



## MODULATION DE LA REPOSE IMMUNE

- ↓ fonction macrophagique corrélée à l'âge  
(↓ avec les monocytes circulants)
  - ↓ % des macrophages et ↑ Ly avec l'âge } LBA
- ⇒ Dysfonction du macrophage avec l'âge = associée au facteur de mortalité du sujet âgé atteint de pneumopathie infectieuse  
(*J Invest Med 1999, Zissel*)

## - Le neutrophile

- ↳ granulocytes
- ↳ ne résident pas dans les tissus sains
- ↳ migrent rapidement du sang vers les sites d'infection
- ↳ « avant portes des défenses naturelles »
- ↳ phagocytose et bactéricidie

## POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE

- 1 % cellules alvéolaires (normal)
  - 1ère ligne de défense
  - α médullaire Myéloblaste - Tissu = 1 → 5 j
  - Granules cytoplasmiques
- | primaire                   | secondaire             |
|----------------------------|------------------------|
| = azurophiles ou lysozomes | = phosphatase alcaline |
| = hydrolases acides        | = lactoferrine         |
| = phosphatases acides      | = lysozyme             |
| = protéines cationiques    |                        |
| = myéloperoxydases         |                        |
| = élastases...             |                        |
- Mobile
  - Phagocytose, opsonisation (opsonine, IGG, fibronectine)
  - rôle radicaux libres  $O_2$  ( $H_2O_2$  +++ ...)
  - rôle prot.cationique myéloperoxydase halogène
  - après destruction du germe → Mort → pus  
débris → phagocyté par les macrophages

## IL-8

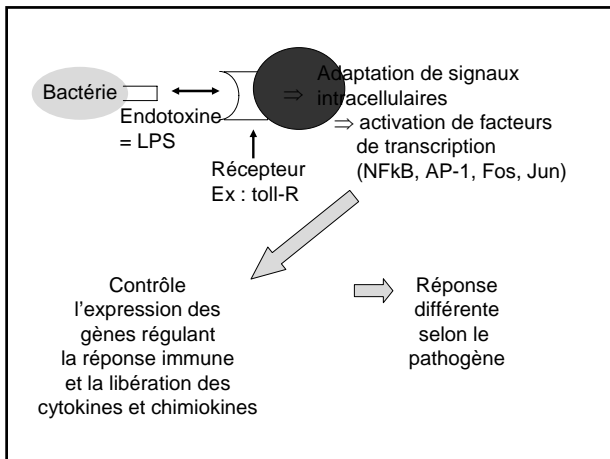
- Mono, Ly, endoth, épith ← LPS,  $TNF\alpha$ , IL-1,  $\beta$  .....
- IL-8 chemoattractant  
activation PNN
- LBA-pneumonie bactérienne  
↑ IL-8 corrélé afflux neutro  
corrélé taux élastase  
avec ↑ ratio élastase/anti-élastase  
(Villard – AJRDCCM 1995)
  - Compartmentalisé
  - ↑ IL-8 LBA pneumocytose/DC (Benfield AIDS 1995)

## MODULATION DE LA REPOSE IMMUNE

- CRP → (-) réponse chemotactique induite  
par l'IL-8 pour le PNN  
(Zhong J Immunol 1998)

Rôle d'immunomodulation +++

2. Réponse innée différente en  
fonction des bactéries et dans le temps



**Le macrophage migration inhibitory factor ou MIF**

Produite rapidement après exposition aux bactéries ou par de CK pro-inflammatoires

MIF → Module l'expression de TLR4 → permet au macrophage de répondre rapidement en cas d'infection par un micro-organisme

(Roger Nature 2001)

- La réponse inflammatoire lors de pneumonie infectieuse est compartimentalisée pour la plupart des CK (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-8) sauf pour l'IL-6, reflet d'inflammation générale (# ARDS)
- Souris déplétées en Macrophage
  - Pneumonie à BG (-) → Klebsiella
  - ↓ Survie
  - ↑ CFU (Klebsiella) poumon et sang
  - ↑ PNN (x 7)
  - (BROUG-HOLUB, Infect Immunol 1997)

(Cheung, infection and immunity, 00) **pseudomonas**

role du macrophage dans la défense anti PA

souris déplétée ou non en macrophages, infectée à PA

clairance bactérienne, recrutement cellulaire, phagocytose in vitro

- role du PNN+++ dans la clairance bactérienne de PA
- pas d'implication des MA sur la clairance pulmonaire de PA (diff pour klebsiella), ni d'implication sur le recrutement des PNN
- faible phagocytose in vitro des PA par le macrophage

**ROLE DES LEUCOTRIENES**

Klebsiella intratrachéale (1) → souris  $\perp$   
 (2) → souris ko (pas gène 5LO)

(1) ↑ neutro, ↑ LT poumon  
 (2) ↑ mortalité, ↑ bactériémie, ↑↑ PNN

↓ phagocytose | Macrophages  
 ↓ bactéricide

(Baillie J Immunol 1996)

LPS → souris ↑ PNN, ↑ Macrophages | poumon  
 ↑ MIP-1 $\alpha$

Anti MIP-1 $\alpha$  → ↓ PNN, ↓ Macrophage  
 ↓ de l'↑ de perméabilité LPS induite (bleu Evans)  
 ↓ Mortalité (24 h, 48 h id)  
 ↓ expression ICAM-1

(Standiford J Immunol 1995)

(Rudner, J Immunol 00)

Rôle de l'IL-1 et du MIP-2 dans l'infection oculaire à PA de la souris

- IL-1 produit par mono mais aussi cell. cornéennes résidentes et il y a une augmentation de l'ARNm codant pour l'IL-1 (12 h après infection cornéenne à PA)
- Il y a des souris sb à PA (B) et résistantes (balb/c)
- Evaluation IL-1 (prot et ARN)
- Pré-TT par IL-1 avant infection

- En fait, l'IL-1 est associé à la destruction cornéenne, sécrété de façon intense chez la souris susceptible au PA (B) comparée à la balb/c

- le TT par anti-IL-1 diminue les PNN et le MIP-2  
Or l'IL-1  $\Rightarrow$  MIP-2  $\Rightarrow$  PNN

L'augmentation prolongée d'IL-1 induit une lésion cornéenne via une augmentation du MIP-2 et des PNN sans améliorer la clairance bactérienne

(Jean, AJRCCM, 1998)

Endotoxine en intra-alvéolaire 16 heures avant une instillation de PA

- Endotoxine  $\rightarrow$ recrutement de PNN (rx libres, élastase, lytique in vitro pour PA)
- Comparaison à 24 h de l'infection à PA des groupes PA et endo/PA
- Le groupe endo/PA a une moindre mortalité, moins de lésions épithéliales, une meilleure clairance bactérienne (LBA et poumon)

LE LPS GENERE UN RECRUTEMENT DE PNN ACTIF FONCTIONNELLE QUI DIMINUE LA MORTALITE? PROBABLEMENT LIE AU PRE-RECRUTEMENT DES PNN

3. Mécanismes d'échappement aux cell. phagocytaires : ex : pseudomonas

### Réaction hôte/pathogène : spécificité du pseudomonas

#### 1/ effet barrière de l'épithélium

#### 2/ rôle des Ig

présence d'Ac anti-exotoxine A, exopolysaccharide mucoïde, LPS, protéines membranaires....

Rôle protecteur ?

Non suffisant

Des taux élevés sont associés à une maladie pulmonaire plus sévère (accumulation de CI ?)

#### 3/ le complément (sérum / poumon)

- les protéases provenant de PA et des PNN peuvent protéolyser le C1, C3, C5 responsables d'une diminution du rôle opsonisant du complément alors que l'activité bactéricide du sérum/PA est normale l'expression du RC3b est donc normalement régulée sur le PNN circulant dans l'infection à PA

Mais :

- il y a une diminution de l'expression de RC3b sur le PNN du poumon infecté par PA (CF) (BAL), qui est clivée par des protéases (ex : protéases des PNN et du PA)

#### 4/ cytokines

- l'élastase et la protéase alcaline du PA
  - dégrade l'IL-2
  - inactive l'IFN $\gamma$
  - inactive partiellement le TNF $\alpha$
- le PA inactive l'IL-2 et l'IL-2R

(relation T/PA)

-le Macrophage  $\rightarrow$  IL-1 et TNF  $\rightarrow$  IL-8 (fibro, cell épi, ..)  $\rightarrow$  PNN

#### 5/ activité phagocytaire et immunité cellulaire

- le macrophage intervient dans la phagocytose, et sécrète des protéases, agents oxydants, des cytokines, complément...
- Il phagocyte parfois de façon non opsonisante le PA par des récepteurs mannose

#### OR le PA

- produit des substances cytotoxiques qui modifient l'immunité cellulaire
- la leukocidin lèse les PNN et les Ly
- l'exotoxine A est cytotoxique pour le macrophage et diminue la phagocytose, elle inhibe la prolifération des PNN
- l'hémolysine détruit les granules des PNN et compromet la clairance bactérienne

#### Le PA diminue la phagocytose opsonique :

- protéolyse les IgG opsonisante
- protéolyse les récepteurs du C3b sur les phagocytes
- inhibe la fixation des Ac ou du Cpl $\alpha$  sur le PA par l'alginate de souche mucoïde
- protéolyse de la fibronectine (qui majore la phagocytose des PNN et des macrophages)
- hydrolyse de la phosphatidylcholine (75% des phospholipides du surfactant) par la phospholipase C

#### Le PA diminue la phagocytose non opsonique :

- inhibe l'attachement de PA mucoïde pour la phagocytose (PNN et macrophage) (modifie les relations hydrophobes)
- l'exotoxine A inhibe directement la phagocytose
- protéolyse du TNF
- inhibition de l'action du PNN par le PA, avec résistance à la phagocytose et à la bactéricidie du PNN

4. Sepsis et réponse innée :  
« La désactivation macrophagique »

#### Sepsis syndrome

↳ Etat d'Immunosuppression profond et prolongé

- 
- ↓ Mono / ↓ Macrophage
  - ↓ Expression HLADR
  - ↓ capacité de CPA
  - ↓ production de TNF $\alpha$   
IL-1 $\beta$   
IL-6

(Randow, J Exp Med 1987)

(Docke, Nature 1997)

( Munoz, JCI 1991)

- La « désactivation du macrophage » est associée à une

↑ infection  
↑ mortalité

- Ex : les patients septiques sont particulièrement sensibles aux Infections nosocomiales → *Pseudomonas aeruginosa*

### Rôle IL-10 dans la désactivation du macrophage

(+) x IL-10 → régulation de la réponse pro-inflammatoire  
→ la neutralisation de l'IL-10 chez le rat septique → ↑↑↑ CK pro-inflammatoire  
↑ mortalité

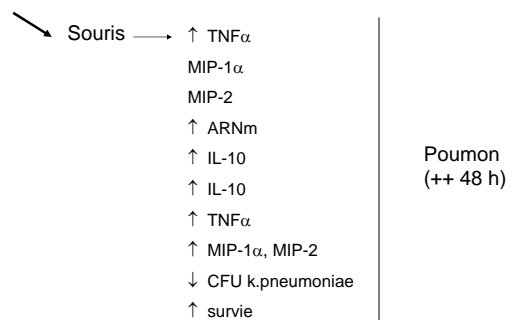
(-) x Dans la pneumonie bactérienne, l'IL-10 semble inhiber la réponse immune innée anti-bactérienne

IL-10  $\xrightarrow{(-)}$  activité phagocytaire & bactéricide des PNN & macrophage in vitro

### IL-10

- immunomodulateur
- Mono, Ly T,  $\beta$ , PNN
- $\ominus$  TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, PG...
- $\downarrow$  mortalité choc endotoxinique animal via  $\ominus$  TNF $\alpha$  (Gerard *J Exp Med* 93)

- *Klebsiella* intra-trachéale



(-) IL-10 ↑ clearance bactérie  
↑ CK Pro I (Greenberger *J Immunol* 1995)  
↑ survie souris

(Steinhauser, *J Immunol* 1999)

- Comprendre les mécanismes expliquant comment un syndrome septique peut altérer une réponse immune innée pulmonaire, et la contribution de l'IL-10 dans la « désactivation leucocytaire »

↳ Modèle de souris

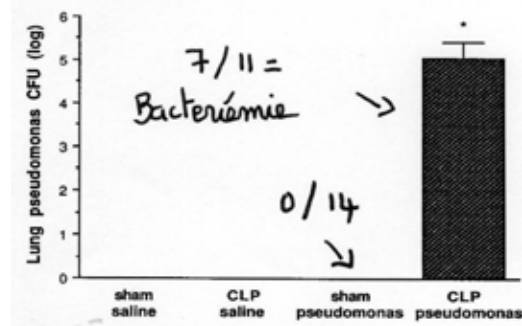
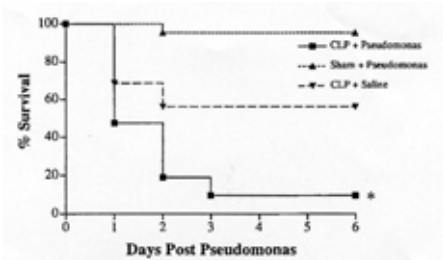
T0 ① sepsis abdominal (CLP  $\approx$  ligature coecal)  
↓  
T1 ② challenge intra-pulmonaire par *Pseudomonas aeruginosa*

(Steinhauser)

M.M. :

- ↳ LBA →  $\varnothing$
- Évaluation phagocytose/macrophage alvéolaire (x P/A / AM)
- Bactéricidie → MA
- Concentration pulmonaire IL-12, IL-10, TNF $\alpha$
- CFU *Pseudomonas aeruginosa* (sang & poumon)
- Activité myéloperoxydasique/poumon (PNN)  
Comparé souris → CLP /Sham (contrôle)

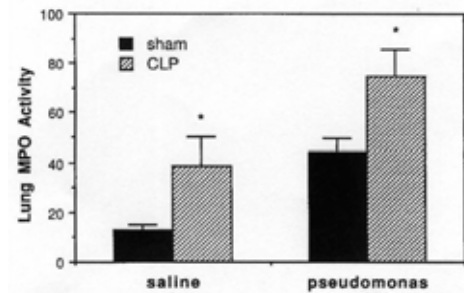
### Résultat



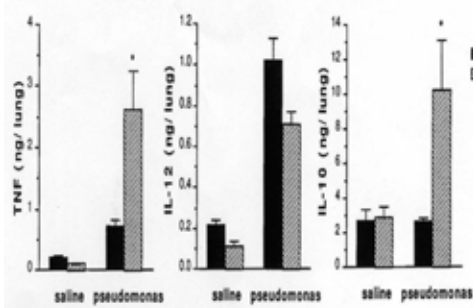
Le sepsis abdominal altère la clearance pulmonaire de PA après challenge IT

### Après PA

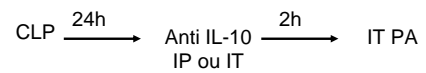
Sham CLP CLP  
 CPL + IT PA → ↑ Leucocytes + PNN



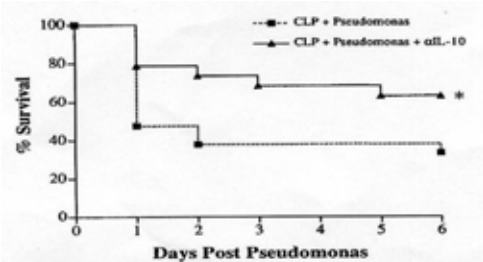
Activité MPO conservée dans les CLP-PA



Réponse en IL-10 >>> dans le groupe CPL/PA  
 ? → un deuxième foyer infectieux (IT) chez une souris septique  
 → SHIFT balance prol/anti I → IL-10

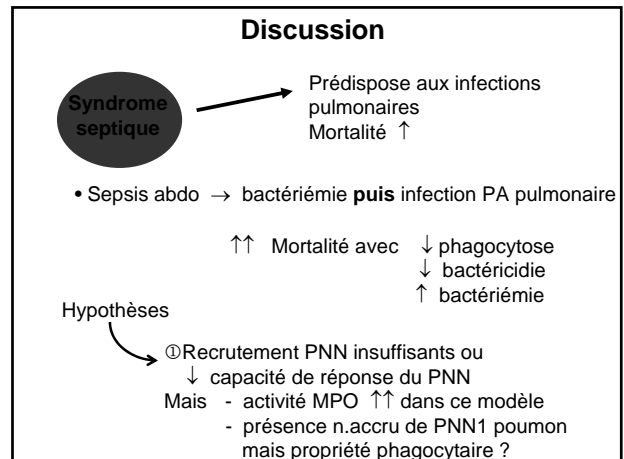


- anti IL-10 IP → ↑ survie CLP ↓ CFU PA (sang & poumon)
- anti IL-10 IT → pas de modification de la survie



Treatment	<i>P. aeruginosa</i> /AM	% Killing
Sham/IgG	0.70 ± .1	74.3 ± 3
Sham/ $\alpha$ -IL-10	0.86 ± .2	76.3 ± 5
CLP/IgG	0.29 ± .1*	44.0 ± 3*
CLP/ $\alpha$ -IL-10	0.58 ± .1	61.2 ± 4 <sup>†</sup>

<sup>a</sup> *P. aeruginosa*/AM represents mean  $\pm$  SEM number of intracellular bacteria per AM, while % Killing represents mean  $\pm$  SEM percentage of ingested bacteria that were killed. AM from six to eight animals per group were pooled.  
<sup>\*</sup>,  $p < 0.01$  as compared with AM from all other groups.  
<sup>†</sup>,  $p < 0.05$  as compared with AM recovered from sham-operated animals. Representative of two separate experiments.

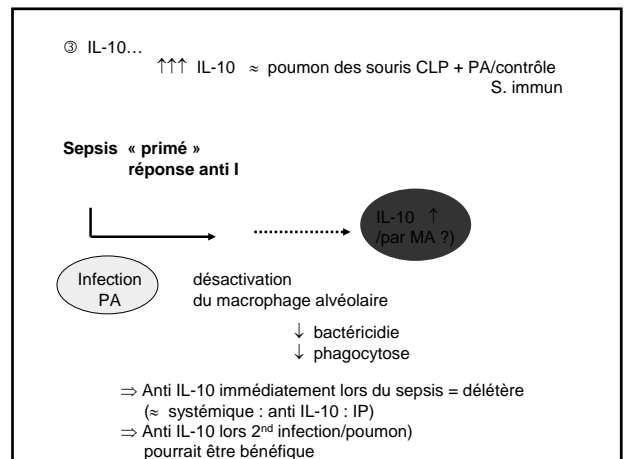


ⓐ ↓ fonction des macrophages alvéolaires dans le sepsis

→ désensibilisation

⇒ ici : ↓↓ phagocytose  
bactéricidie des MA

⇒ sepsis ↓ activation des monocytes et des macrophages alvéolaires



**Anti IL-10 → IT**

→ NON

- Compartimentalisation
- Non accès aux sites stratégiques
- Dose Ac/Ag...

### CONCLUSION

- Ma et PNN : rôle important dans la réponse innée (phagocytose et bactéricidie)
- Rôle du Ma dans le dvpt de la réponse acquise (Ly T et B)
- Sécrétion de CK pro- et anti-inflammatoires
  - Équilibre précaire...
  - Désactivation macrophagique (rôle de l'IL-10)
  - Importance des toll-R dans la qualité de la réponse innée, explique en partie la réponse variable en fonction du type bactérien
  - Altération des fonctions macrophagiques (alcool, tabac, vieillesse)...mortalité majorée dans ces cas

