

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou



Faculté des Sciences biologiques et agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie
Filière : Sciences Biologiques
Option : Biochimie appliquée

Mémoire de fin de cycle
En vue de l'obtention du diplôme de Master en biochimie appliquée

Thème :

**Effets des métaux lourds « Mercure et
Plomb » sur quelques fonctions du
neutrophile humain**

Présenté par :

BERKAINE Dassine

BILEK Saadia

SERRADJI Zina

Devant le jury :

Présidente

M^{me} SENANI-OULARBI N.

MCB

UMMTO

Promotrice

M^{me} BEDOUHENE-FENANE S.

MCA

UMMTO

Examinatrice

M^{me} MOHAMDI-MESSAOUDI D.

MCB

UMMTO

Année : 2021/2022

Remerciements

Nous tenons à remercier infiniment M^{me} **BEDOUHENE-FENANE S.**

Maître de conférences classe A, pour nous avoir proposé ce sujet de mémoire, pour sa patience et ses conseils précieux. Permettez-nous Mme de vous exprimer nos remerciements les plus sincères pour votre encadrement scientifique.

Nous présentons nos remerciements à M^{me} **SENANI-OULARBI N.**

Maître de Conférences classe B à L'UMMTO, pour sa patience et ses conseils précieux et aussi pour avoir accepté de présider et participer à notre jury.

Nous remercions aussi M^{me} **MOHAMDI-MESSAOUDI D.** Maître de Conférences classe B à L'UMMTO pour avoir accepté de juger ce travail.

Nos remerciements sont destinés aussi à tous les membres du laboratoire LABAB pour leur gentillesse et leur aide précieuse, ils nous ont permis de mener à bien ce travail.

Dédicaces

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail

A mes chers parents, pour leur amour, leur encouragement, leur soutien, leur sacrifice. Merci d'avoir toujours cru en moi. J'espère vous avoir rendu fières ;

A mon petit frère ;

A la mémoire de mes grands-parents ;

A toute ma famille maternelle et paternelle ;

A mes amis ;

A mon trinôme, Saadia et Zina.

Dassine

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents qui n'ont jamais douté de moi et qui m'ont aidé et encouragé tout au long de mes études ;

A mon cher petit frère ;

A mon adorable petite sœur ;

A toute ma famille ;

A mon trinôme Dassine et Saadia, avec qui j'ai partagé d'agréables moments en réalisant ce travail ;

A tous mes amis ;

A tous ceux qui me sont chers.

Ressentir de la fierté à travers vos yeux est ce qui compte le plus pour moi.

Zina.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes chers parents ;

Mes sœurs et mon frère ;

A ma famille ;

A mon trinôme Dassine et Zina ;

A tous mes amis et toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à
l'élaboration de ce travail.

Saadia

Résumé

Le Plomb et le Mercure sont parmi les métaux lourds les plus polluants de l'environnement et les plus réponsus, ils sont connus pour leur forte toxicité pour la santé de l'homme notamment le système immunitaire. Actuellement, l'exposition à ces métaux toxiques est devenue inévitable et se fait en continue, d'où la nécessité d'étudier les mécanismes moléculaires par lesquels les métaux lourds interfèrent avec les fonctions physiologiques des cellules. Dans cette optique, nous avons choisi les polynucléaires neutrophiles (PN), pivots de l'immunité innée et un puissant système de défense de l'homme, afin de mettre en évidence l'impact de ces molécules toxiques. Ce présent travail a été entrepris pour montrer quels effets ont le Mercure et le Plomb sur les fonctions effectrices et les propriétés, respectivement la dégranulation et l'adhérence des PN. Tous les tests sont réalisés en triplicate sur des neutrophiles fraîchement isolés de sang de donneurs sains, les PN sont soumis à des concentrations croissantes de Plomb et de Mercure allant de 10 à 100µg/ml. Le comptage des cellules non adhérentes a été effectué sur la cellule de Malassez, et la dégranulation a été quantifiée en mesurant l'activité de la myéloperoxydase (MPO), marqueur des granules primaires par spectrophotométrie. Les résultats ont montré qu'en fonction de la concentration des deux métaux, l'adhérence et la dégranulation du neutrophile sont modifiées, avec une concentration de 25µg/ml du Mercure et du Plomb, plus de 80% et 100% de cellules sont adhérentes, respectivement. Pour la même concentration, le Mercure induit une dégranulation égale à 50% de celle obtenue avec le fMLP et Cytochalasine B (contrôle positif). Les résultats de cette étude ont permis de conclure que le Plomb et le Mercure influencent l'adhérence des cellules, mais le Mercure semble induire la dégranulation (45%) des PN comparé au fMLP (100%).

Mots clés : Polynucléaires neutrophiles, Plomb, Mercure, Adhérence, Dégranulation, Myéloperoxydase.

Abstract

Lead and Mercury are among the most polluting heavy metals in the environment and are known to be highly toxic to human health, especially the immune system. Currently, exposure to these toxic metals has become unavoidable and is continuous, hence the need to study the molecular mechanisms by which heavy metals interfere with the physiological functions of cells. In this context, we have chosen neutrophils (PN), pivot of innate immunity and a powerful defense system in humans, to demonstrate the impact of these toxic molecules. The present work was undertaken to show the effects of Mercury and Lead on the effector functions and properties, respectively degranulation and adhesion of PN. All tests are performed in triplicate on neutrophils freshly isolated from healthy donor blood, the PN are subjected to increasing concentrations of Lead and Mercury going from 10 to 100 μ g/ml. No adherent cells were counted on the Malassez cell, and degranulation was quantified by measuring the activity of myeloperoxidase (MPO), a marker of primary granules by spectrophotometry. The results showed that depending on the concentration of the two metals, the adhesion and degranulation of the neutrophil are modified, with a concentration of 25 μ g/ml of Mercury and Lead, more than 80% and 100% of cells are adhered, respectively. For the same concentration, Mercury induces a degranulation equal to 50% of that obtained with fMLP and Cytochalasin B (positive control). The results of this study concluded that both Lead and Mercury influence cell adhesion, but Mercury seems to induce degranulation (45%) of NPs compared to fMLP (100%).

Key words: Neutrophils, Lead, Mercury, Adhesion, Degranulation, Myeloperoxidase.

Table des matières

Liste des figures et des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Introduction 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Les polynucléaires neutrophiles 3

1. Origine et caractéristiques morphologiques 4

2. Propriétés..... 6

a. L'adhérence 6

b. Le chimiotactisme..... 7

3. Les fonctions effectrices des neutrophiles..... 7

a. La phagocytose 7

b. La dégranulation 9

c. Les pièges extracellulaires du neutrophile..... 13

d. Le marqueur de la dégranulation des granules azurophiles : La myéloperoxydase .. 14

II. L'étude des métaux lourds « Mercure et Plomb » et leurs effets sur la santé humaine 16

1. Caractéristiques du Mercure..... 17

2. Les effets toxiques du Mercure 17

3. Caractéristiques du Plomb..... 18

4. Les effets toxiques du Plomb 18

Chapitre II : Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes 20

1. Matériel	20
a. Matériel biologique.....	20
b. Produits chimiques.....	20
c. Appareillage.....	20
2. Méthodes	21
a. Isolement et purification des neutrophiles humains.....	21
b. Dénombrement des PN	23
c. Traitement des PN avec des métaux lourds et vérification de certaines caractéristiques du neutrophile.....	24
d. Dosage des protéines sécrétoires des neutrophiles	24
e. Dosage de la myéloperoxydase	25
f. Dosage de l'ADN des NET	25
II. Résultats et discussion	27
1. Observation du sang total.....	27
2. Isolement et purification des PN	27
3. Effet des métaux lourds « Plomb et Mercure » sur l'adhérence et la dégranulation des neutrophiles	28
a. Test d'adhérence.....	28
b. Dégranulation des neutrophiles stimulé avec les différents agonistes.....	32
c. La dégranulation des neutrophiles en présence du Mercure	34
d. Dosage des protéines sécrétoires	36
e. Dosage de l'ADN	36
Conclusion.....	39
Références bibliographiques	41

Liste des figures

Figure 1 : Le neutrophile humain sous microscope.....	4
Figure 2 : L'origine des neutrophiles	5
Figure 3 : Les étapes de l'adhérence	6
Figure 4 : Les étapes de la phagocytose	9
Figure 5 : Mécanisme et produits de la dégranulation des neutrophiles.....	11
Figure 6 : Formation de NET's par les neutrophiles.....	14
Figure 7 : Diagramme d'isolement et de purification des neutrophiles	22
Figure 8 : Photo originale du dénombrement des neutrophiles sous microscope optique	23
Figure 9 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines	25
Figure 10 : Photo originale de la morphologie des cellules sanguines révélées sous microscope photonique	27
Figure 11 : Mise en évidence du noyau polylobé du neutrophile sous microscope photonique.	28
Figure 12 : Observation des cellules non adhérentes traitées avec les métaux sous microscope ..	29
Figure 13 : Pourcentage d'adhérence des neutrophiles traités avec les métaux lourds	30
Figure 14 : L'effet des différents agonistes sur la dégranulation des neutrophiles.....	32
Figure 15 : Les voies de signalisation mobilisées suite à l'activation du neutrophile par le fMLP et PMA.....	33
Figure 16 : Cinétique de la dégranulation des neutrophiles stimulées par le fMLP et PMA ...	33
Figure 17 : L'effet du Mercure sur la dégranulation des neutrophiles.....	34

Liste des tableaux

Tableau I : Composition des granules du neutrophile humain.....	10
Tableau II : Taux des protéines sécrétées des neutrophiles en ($\mu\text{g/ml}$)	36
Tableau III : Taux d'ADN libéré par les neutrophiles	36

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADHP : 10-Acétyl-3,7-dihydroxyohénoxazine

ATP : Adénosine triphosphate

BSA : Albumine sérique bovine

C5a : Complément 5a

CD : Cluster de différenciation

CXCR1 : Récepteur de chimiokine à motif C-X-C 1

EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique

fl : Femtolitre

fMLP : N-formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine

fMLP-R/ FRP : Récepteur du formyl-Méthionyl-Leucyl-Phényl alanine

G-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes

GM-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages

GTP : Guanosine triphosphate

H₂O₂ : Peroxyde

H₂SO₄ : Acide sulfurique

Hg : Mercure

HOCl : Acide hypochlorique

ICAM : Molécules d'Adhésion InterCellulaire

IgG : Immunoglobuline G

Il-6 : Interleukine 6

Il-8 : Interleukine

KCl : Chlorure de potassium

KH₂PO₄ : Phosphate de mono potassium

LTB₄ : Leucotriène B₄

MAC 1 : Macrophage antigène-1

MPO : Myéloperoxydase

Min : Minutes

Na₂HPO₄ : Hydrogénophosphate de potassium

NaCl : Chlorure de sodium

NADPH : Oxydase nicotinamide d'adénine dinucléide phosphate

NET : Pièges extracellulaire des neutrophiles

PAF : Facteur d'activation plaquettaire

PAMPs : Motifs moléculaires associés aux agents pathogènes

Pb : Plomb

PBS : Tampon phosphate salin.

PKC : Protéine kinase C.

PMA : Acétate de phorbol 12-myristate 13-acétate.

PRR : Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires.

PN : Polynucléaire neutrophile.

PMN : Polymorphonucléaire

Rap : Protéine liée au Ras.

ROS : Espèce réactive à l'oxygène.

Sec : secondes.

TLR : Récepteur de type Toll.

TMB : Tétraméthylbenzidine.

TNF-R : Récepteur du facteur de nécrose tumorale.

Introduction

La pollution par les métaux lourds constitue une menace majeure pour toutes les formes de vie du fait qu'ils sont persistants et ne peuvent pas être dégradés en forme non toxiques. Ces métaux sont très réactifs à de faibles concentrations et perturbent les écosystèmes, détériorent les sols, les eaux de surface et les nappes phréatiques, les forêts et les cultures et s'accumulent dans la chaîne alimentaire.

L'exposition de l'homme par l'alimentation, l'environnement ou les soins (amalgames dentaires, vaccins, médicaments...) à ces métaux qui sont pour certains cancérigène et mutagène, peut entraîner des maladies articulaires, rénales, des troubles du système circulatoire et nerveux, perturber le système endocrinien et provoquer le développement de l'auto-immunité (Ayansin *et al.*, 2016).

Le neutrophile qui représente la première ligne de défense de l'hôte contre l'intrusion d'un pathogène via le processus inflammatoire, cette réponse immunitaire innée menée par le neutrophile (PN) peut être une cible potentielle pour les métaux lourds. D'où l'objectif de ce travail dans lequel les neutrophiles sont exposés à deux types de métaux lourds à savoir le Mercure et le Plomb, dans ces conditions la propriété d'adhérence et la fonction effectrice de dégranulation du PN sont évalués. L'activité de la myéloperoxydase qui est le marqueur de dégranulation est dosée par spectrophotométrie.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Les polynucléaires neutrophiles

Décrits pour la 1^{ère} fois en 1900 par Paul Ehrlich, appelés leucocytes polymorphonucléaires (PMN). Le terme « neutrophile » réfère à la coloration neutre issue d'une coloration simultanée d'un colorant acide et basique (St-Onge, 2005).

Les neutrophiles (PN) sont les leucocytes les plus abondants dans la circulation sanguine (40 à 65 %) avec une concentration de 3 à 5 X 10⁶ cellules/ml (Steven, 1994) et aussi le granulocyte le plus abondant à 95 % contrairement aux éosinophiles à 4 % et les basophiles à 1 % (St-Onge, 2005). Elles ont une durée de vie relativement courte (8-20h) dans la circulation sanguine qui peut changer lors du passage de ces cellules du sang vers les tissus (de quelques heures à quelques jours) (Steven, 1994).

Les PN humains représentés dans la figure 1 sont une des premières barrières de défense lors de l'introduction d'un agent pathogène dans l'organisme, et sont un des pivots de l'immunité innée. Ils constituent un puissant système de défense contre les agents pathogènes, principalement les bactéries et les champignons, mais aussi contre des cellules ou des molécules endogènes altérées. Les activités microbicides et cytotoxiques des PN dépendent de mécanismes très intriqués, comprenant la libération d'enzymes protéolytiques et la production rapide de formes réactives de l'oxygène. Ce dernier phénomène s'appelle l'explosion oxydative des PN (Bene *et al.*, 2013).

L'activation excessive prolongée ou se déroulant dans un site inapproprié, peut conduire à des lésions tissulaires sévères, impliquées dans la physiopathologie de différentes maladies inflammatoires aiguës ou chroniques (Bene *et al.*, 2013).



Figure 1 : Le neutrophile humain sous microscope (Judy *et al.*, 2014).

1. Origine et caractéristiques morphologiques

Les neutrophiles sont produits dans la moelle osseuse, issus d'une cellule souche hématopoïétique pluripotente, qui se transforme en précurseur myéloïde menant à la formation de différents types cellulaires, dont les PN sous l'effet des facteurs de croissances tels que le Granulocyte- Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) et Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) (Gougerot Pocidalo *et al.*, 2011). La figure 2 résume le processus de formation du neutrophile.

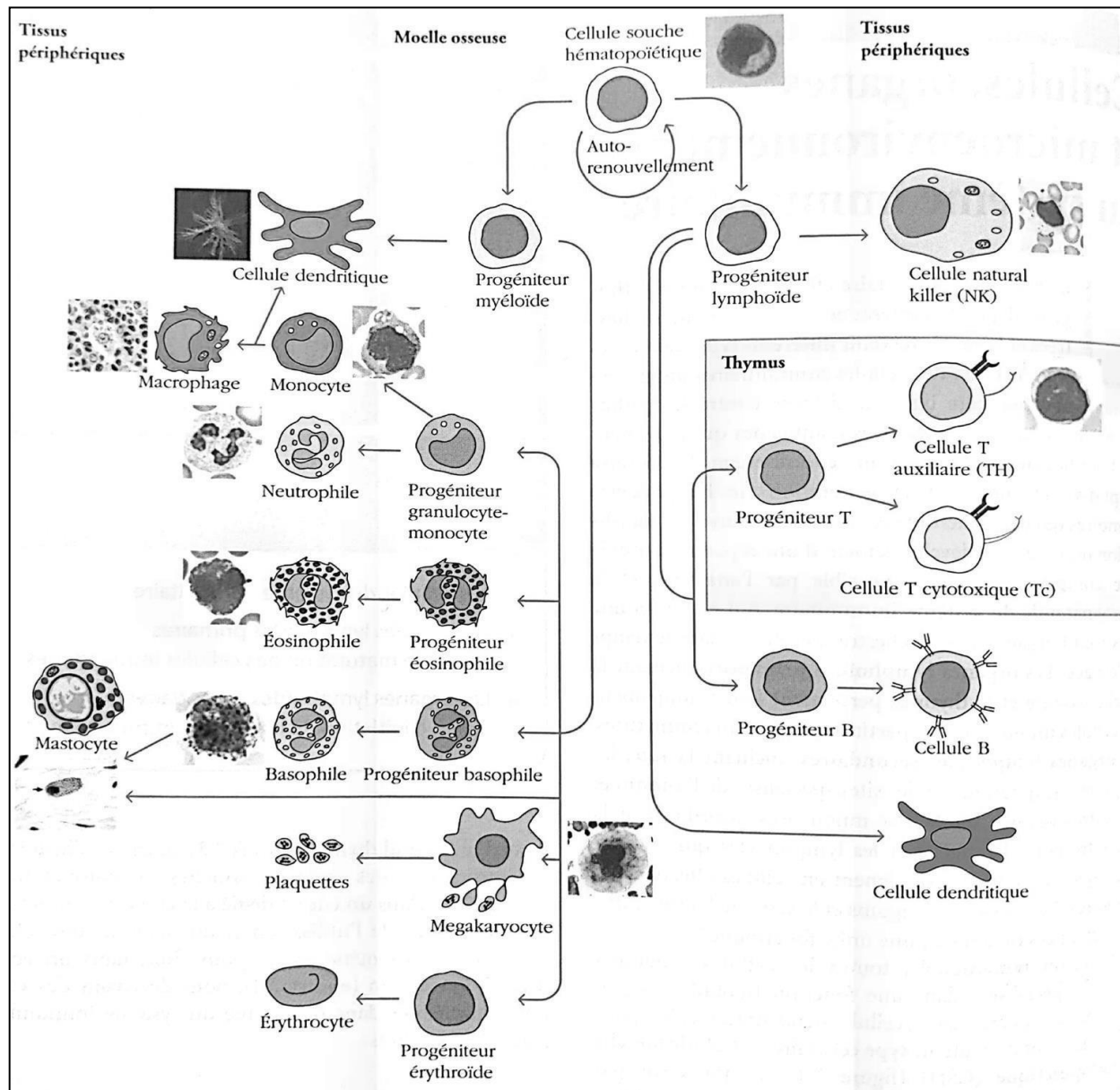


Figure 2 : L'origine des neutrophiles (Judy *et al.*, 2014).

Les PMN ont une forme sphérique avec un diamètre de 10-12 μm , et un volume d'environ 350 fl. Le cytoplasme représente 65 % du volume total, comportant les différents organites tel que la mitochondrie qui est très peu distinguable étant donné que ces cellules ne puisent pas leurs énergies de la respiration mitochondriale (la phosphorylation oxydative), mais plutôt de la glycolyse qui est indépendante d'oxygène ; ainsi que l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique qui sont identifiables. Le noyau polylobé (3 à 5 lobes) représente 20 % et enfin les granules 15 % qui sont regroupés en 4 grandes classes, les granulations azurophiles (primaires), granulations spécifiques (secondaires), granulations à gélatinases (tertiaires) et vésicules sécrétoires (Steven, 1994).

2. Propriétés

a. L'adhérence

Pour arriver au foyer infectieux, les PN adhèrent et traversent la paroi de l'endothélium grâce aux médiateurs de l'inflammation, et sous la dépendance de molécules d'adhérence exprimées par les PN (L-sélectine) et les cellules endothéliales (E et P-selectines), activées par des médiateurs issus du foyer inflammatoire (Deoliveral *et al.*, 2016).

Cette adhérence représentée dans la figure 3 est initialement réversible et de faible affinité, les sélectines interagissent avec les groupements sialyl-Lewis^X présents sur les deux partenaires cellulaires. Les liaisons effectuées par les sélectines entre les PN et les cellules endothéliales ralentissent le flux des PN et initient la phase de roulement à la surface de l'endothélium activé. Ces cellules activées vont produire des facteurs chimio attractants qui vont activer les PN. Cette activation provoque la perte des L-sélectine par une lyse protéolytique due à l'activation d'une métalloprotéase et l'élévation de l'expression membranaire, par dégranulation, de $\beta 2$ -intégrines activées, en particulier CD11b/CD18. Les $\beta 2$ -intégrines activées se lient aux molécules d'adhérence ICAM (Intercellular Adhesion Molecules) exprimées à la surface des cellules endothéliales. La modulation de l'expression des molécules d'adhérence à la surface des PN produit une adhérence de forte affinité et non réversible qui arrête le roulement et consolide l'ancrage du PN à l'endothélium inflammatoire grâce au réarrangement du cytosquelette autour de la partie intracytosolique des $\beta 2$ -intégrines. Au final, ouverture des jonctions interendothéliales pour permettre le passage des PN vers le site d'infection (Gougerot Pocidallo *et al.*, 2011).

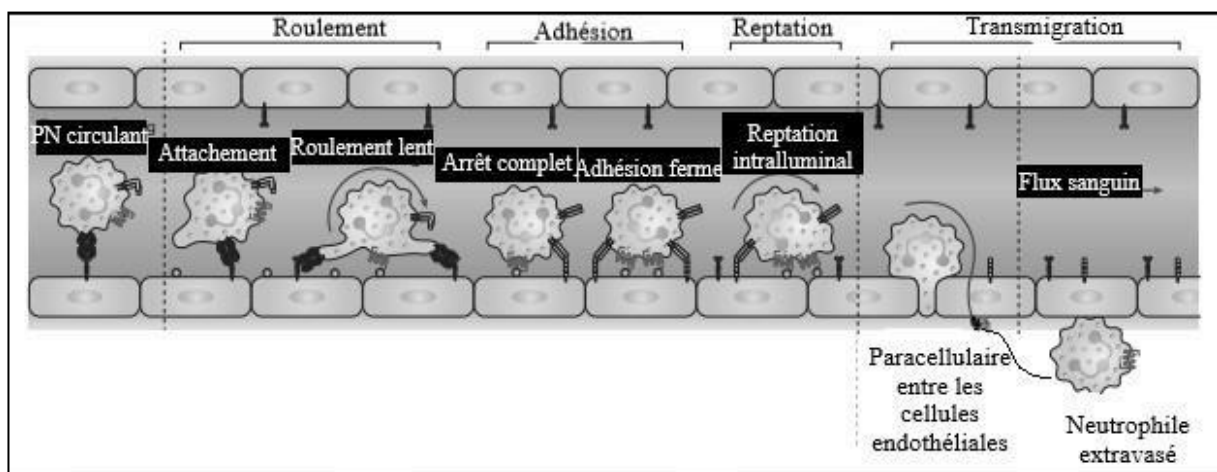


Figure 3 : Les étapes de l'adhérence (Elzbieta *et al.*, 2013)

b. Le chimiotactisme

Les PN sont les premières cellules à migrer du sang circulant vers le foyer inflammatoire, dont le déplacement est unidirectionnel et selon un gradient de concentration de chimio attractants (Mark *et al.*, 2007). Ces derniers proviennent de la cible ou peuvent être produits suite à une induction de la cible ; qui sont principalement : N-formyl, le C5a, LTB4, PAF, IL8 qui est le prototype des PN. Ces facteurs se fixent à des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G hétérotrimérique. Les mécanismes du mouvement sont complexes, faisant intervenir de nombreuses voies de transduction aboutissant au déclenchement de la polymérisation/ dépolymérisation des filaments d'actines et à la polarisation du PN, c'est-à-dire qu'il prend une forme triangulaire en lançant en avant des pseudopodes et plaçant son noyau à l'arrière de la cellule (Gougerot Pocidallo *et al.*, 2011).

3. Les fonctions effectrices des neutrophiles

Les granules des neutrophiles sont constitués d'un ensemble d'antimicrobiens dotés d'un large spectre d'action, qui peuvent endommager les tissus, d'où le fait que leur sécrétion est régulée par 3 mécanismes majeurs : phagocytose, dégranulation et les pièges extracellulaires des neutrophiles (NET) (Sergio *et al.*, 2020).

a. La phagocytose

Au site inflammatoire, les neutrophiles ont pour rôle d'éliminer les bactéries, virus et particules étrangères afin de limiter leur propagation dans les tissus sains et pour cela, ils ont recours à la phagocytose (St-Onge, 2005), qui est subdivisée en trois étapes : adhésion, ingestion et digestion, la figure 4 résume l'ensemble de ces étapes.

Les PN phagocytent sans opsonisation en reconnaissant les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) des bactéries, virus et particules étrangères grâce aux PRR (Pattern Recognition Receptors) afin de limiter leur propagation dans le tissu sain (St-Onge, 2005), en déclenchant différentes voies de signalisations suite à l'activation des TLR (Toll Like Receptors) ; ou par l'intervention d'opsonine tels que le fragment Fc des immunoglobulines (IgG) et les protéines du complément, ce qui rend la phagocytose plus efficace (Warren *et al.*, 2003).

Les PN émettent des pseudopodes qui vont encercler le pathogène dans un phagosome dont la membrane est identique à celle entourant la cellule phagocytaire (Raichvarg *et al.*, 1981). Une

fois le phagosome formé, il rentre dans une phase de maturation qui permet la formation du phagolysosome qui contient plusieurs granulations où leur fusion permet la destruction du pathogène (Vieira *et al.*, 2002).

Les mécanismes bactéricides au cours de la phagocytose peuvent être séparés arbitrairement en mécanismes oxygène-indépendants et oxygène dépendant (Raichvarg *et al.*, 1981).

- Mécanisme oxygène-indépendants

Ils sont soit de nature enzymatique et incluent le lysozyme, soit de nature non enzymatique et font intervenir les acides, les lactoferrines et les protéines cationiques.

- Mécanisme oxygène-dépendants

Juste après l'ingestion de la bactérie, des mécanismes biochimiques complexes se produisent au sein du PN traduisant une « explosion respiratoire » suite au contact avec la particule à endocyter. Les agents activateurs peuvent être des substances particulières ou non particulières.

L'explosion respiratoire est caractérisée par une consommation subite et élevée d'oxygène. Cette consommation permet la synthèse d'anion superoxyde via un système oxydasique membranaire qui est la NADPH oxydase. Cette dernière est constituée d'au moins six composants localisés au niveau membranaire ou au niveau cytosolique.

Le complexe NADPH oxydase n'est actif et complet qu'après la migration vers la membrane des protéines cytosoliques. Cette activation dépend de plusieurs enzymes activées par les différentes voies de transductions (Witko *et al.*, 2000).

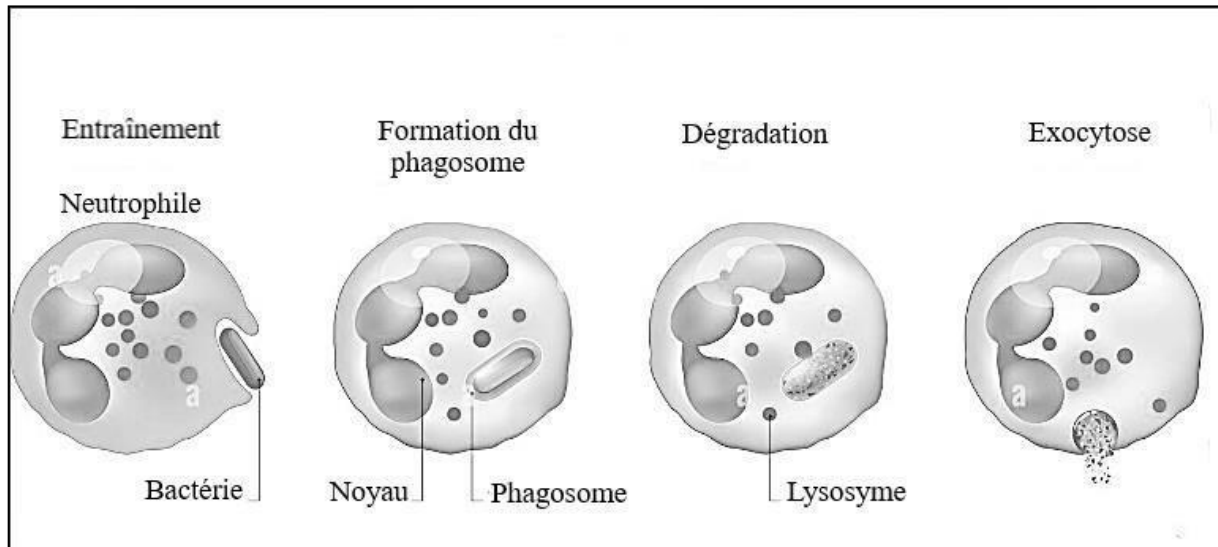


Figure 4 : Les étapes de la phagocytose (Judy *et al.*, 2014).

b. La dégranulation

Une des activités biologiques importante du neutrophile humain est la dégranulation vue qu'il renferme un certain nombre de granules d'où l'appellation « granulocyte », ces granules sécrètent et produisent des substances pro-inflammatoires très toxiques et non spécifiques qui participent à la réponse inflammatoire, mais qui ne doivent pas être générés par le neutrophile circulant (Deree *et al.*, 2006 ; Borregaard *et al.*, 2009).

1. Types de granules

Il a été démontré ces dernières années que le neutrophile est une cellule très complexe, capable de communiquer avec son environnement en mobilisant 4 types différents de granules et de vésicules intracellulaires, dont le contenu de chaque type est détaillé dans le tableau I. Certaines sont essentielles à l'interaction avec l'endothélium et à la migration, d'autres à la phagocytose et l'élimination des microorganismes (Borregaard *et al.*, 1993). Autrefois, subdivisés en peroxyde positive (azurophile ou primaire) et peroxyde négative (spécifique ou secondaire), mais des études récentes ont révélé une hétérogénéité des sous classes de granules concernant leur formation, contenance et mobilisation. Ces premiers granules à être mobilisés libèrent deux marqueurs ayant des activités utiles pour le suivi de la dégranulation, entre autres la myéloperoxydase plus détaillée en dessous (Marqueurs des granules azurophiles). Les granules secondaires ont été subdivisés en spécifique (secondaire) et gélatinase (tertiaire) basés sur la concentration relative en lactoferrine et gélatinase, respectivement (Paige, 2006). Les vésicules sécrétoires sont des véhicules exocytaires spécialisés, qui ont le même rôle que les granules mais une structure membranaire légère,

hautement mobilisable contenant de la phosphatase alcaline (Borregaard *et al.*, 2009). En absence de stimulation, la libération des différents granules est bloquée par un mécanisme de contrôle (Paige, 2006).

Tableau I : Composition des granules du neutrophile humain (Borregaard *et al.*, 2009).

Types de granules	Dans la membrane	Dans la matrice extracellulaire
Granules primaires	CD63 CD68	Défensines Lysozyme Elastase Myéloperoxydase Azurocidine
Granules secondaires	CD15 CD66 CD67 fMLP-R Cytochrome b Fibronectine-R Rap1, Rap2 TNF-R	Lysozyme Collagénase Gélatinase Histaminase β_2 -microglobuline Lactoferrine
Granules tertiaire	MAC 1 fMLP-R	Gélatinase Acétyl transférase
Vésicules sécrétoires	Phosphatase alcaline Cytochrome b MAC 1 fMLP-R CD1, CD13, CD45 CD16	Protéines plasmatique

2. Mécanisme de dégranulation des neutrophiles

La libération de ces granules est contrôlée par des mécanismes couplés aux récepteurs de la membrane plasmique ou de la membrane phagosomale, qui envoient un signal au cytoplasme pour activer leur migration vers la membrane cellulaire, afin de sécréter leur contenu par

dégranulation. Cette exocytose se déroule en quatre étapes successives ; débute par le recrutement des granules du cytoplasme vers la membrane cible et cela en assemblant les microtubules et le cytosquelette d'actine. Cette étape est suivie par l'amarrage des vésicules, ce qui engendre le contact de la surface externe de la membrane des granules avec la surface interne de la membrane cible. Par la suite, se fait la formation des pores de fusions après l'amorçage des granules pour garantir leur fusionnement. La fusion des granules avec la membrane cible s'accomplit après l'expansion des pores et la libération du contenu granulaire (Paige, 2006), ce mécanisme est résumé dans la figure 5.

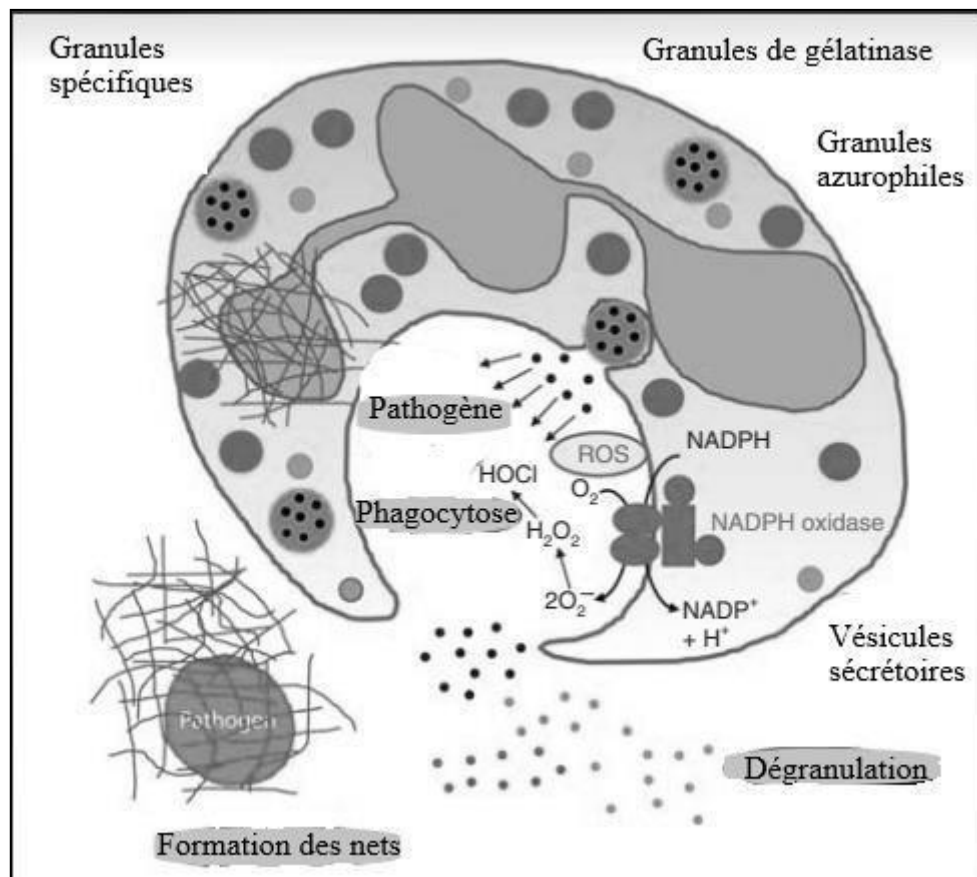


Figure 5 : Mécanisme et produits de la dégranulation des neutrophiles (Fournier *et al.*, 2012).

3. Voies de signalisation de la dégranulation

La translocation et l'exocytose des granules dans les neutrophiles requièrent, au minimum, une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire ainsi que l'hydrolyse de l'ATP et du GTP. Les molécules cibles de ces effecteurs sont nombreuses et comprennent des protéines liant le Ca^{2+} , telles que les annexines et la calmoduline, les protéines de liaison au GTP comme les protéines G et les petites protéines monomériques ainsi que l'ATP qui est utilisé par les

kinases. L'activation de ces molécules effectrices est accompagnée d'une réorganisation du cytosquelette d'actine, qui crée autour de la périphérie de la cellule un maillage qui doit être désassemblé pour permettre l'accès des granules à la surface interne de la membrane plasmique.

Il existe une hiérarchie de la libération des granules en réponse à des concentrations élevées de Ca^{2+} qui est le suivant : vésicules sécrétoires > granules tertiaires > granules secondaires > granules primaires. Cette libération est régulée par différentes voies de signalisation intracellulaire. Le niveau de Ca^{2+} et protéines G membranaire sont augmentés par les récepteurs des neutrophiles tels que le récepteur du fMLP et des chimiokines (comme le CXCR1). De nombreuses études ont indiqué un rôle des phospholipides dans la régulation de la dégranulation des neutrophiles, ainsi, les lipides membranaires constituent un composant essentiel.

La phosphorylation des protéines est un événement critique dans l'activation des neutrophiles, qui va de la stimulation des récepteurs à l'exocytose. Stimulation des récepteurs par le fMLP entraîne la phosphorylation d'un large éventail de kinases, qui activent ensuite leurs voies effectrices respectives. Le recrutement sélectif des kinases Src et p38 indique que différentes voies de signalisation existent dans les neutrophiles pour induire la libération de chaque population de granules (Paige, 2006).

4. Régulation de la dégranulation

La désactivation des mécanismes qui contrôlent la dégranulation des PN est par conséquent aussi importante que l'activation, puisque la prolongation de cette fonction provoque des dommages. La dégranulation excessive des neutrophiles peut causer des troubles inflammatoires (épisodes asphyxiants graves de l'asthme, la polyarthrite rhumatoïde...) et de nombreuses maladies (septicémie, maladies auto immunes...), donc sa régulation devient essentielle.

Cette régulation peut être effectuée par des molécules inhibitrices telles que la Rab27a présente dans les granules tertiaires (Sergio *et al.*, 2020). Selon des études récentes, un ensemble de stratégies ont été proposé :

-Identification d'un certain nombre de voies de signalisation qui seront utiles comme cibles pour une intervention pharmacologique (Paige, 2006).

-Utilisation de plantes du fait de leur richesse en polyphénols et flavonoïdes peuvent être une source intéressante en agents immuno modulateurs (Boudoukha *et al.*, 2015).

-La régulation du pH extracellulaire pourrait devenir un traitement de maladies (Shannan *et al.*, 2015).

5. Quantification et suivi de la dégranulation

Pour vérifier la présence de dégranulation, ses produits tels que la MPO, élastase, F-actine, ROS... sont mesurés par différentes techniques. Les méthodes de marquages par sonde de fluorescence et le dosage par chimioluminescence (pour le ROS), les techniques d'imageries (pour les F-actines), immunoprécipitation et Western blot (gluthionylation de l'actine) (Shannan *et al.*, 2015).

La MPO est mesurée par immunohistochimie, coloration cytochimique, ELISA ou par cytométrie en flux. Des dosages sont effectués en utilisant différents substrats tel que le tétraméthylbenzidine (TMB), le 10-ac

c. Les pièges extracellulaires du neutrophile

Une étude récente de Brinkmann et de ses collègues décrit un nouveau mécanisme par lequel les PN tuent les bactéries qui est la NETose. Cette dernière se déclenche par une stimulation microbienne ou mitogénique dans les tissus ou muqueuses (Knacksted *et al.*, 2019) comme c'est représenté dans la figure 6.

Lors d'une infection, les neutrophiles peuvent créer des pièges extracellulaires pour capturer et éliminer les agents pathogènes : bactéries, virus, champignons et parasites (Knacksted *et al.*, 2019), et empêcher leur propagation dans l'organisme (Sergio *et al.*, 2020). Les pièges extracellulaires du neutrophile (NET) sont considérés comme étant un nouveau mécanisme de défense de l'organisme (Yue Zhang *et al.*, 2020), ils sont libérés lors de la mort cellulaire en présence des ROS (Reactive Oxygen Species) produits par le complexe NADPH- oxydase (Constantin *et al.*, 2009), ils sont constitués d'ADN issue majoritairement du noyau mais aussi de la mitochondrie, associés à des protéines granulaires, cytosolique et des histones (Najmeh *et al.*, 2015 ; Sergio *et al.*, 2020). Des études récentes ont démontré que les NET sont aussi impliqués dans les processus pathologique (Najmeh *et al.*, 2015), en effet une production élevée en NET peut engendrer différentes maladies (Falko *et al.*, 2018), tel que le cancer, maladies auto-immunes, thrombose (Najmeh *et al.*, 2015).

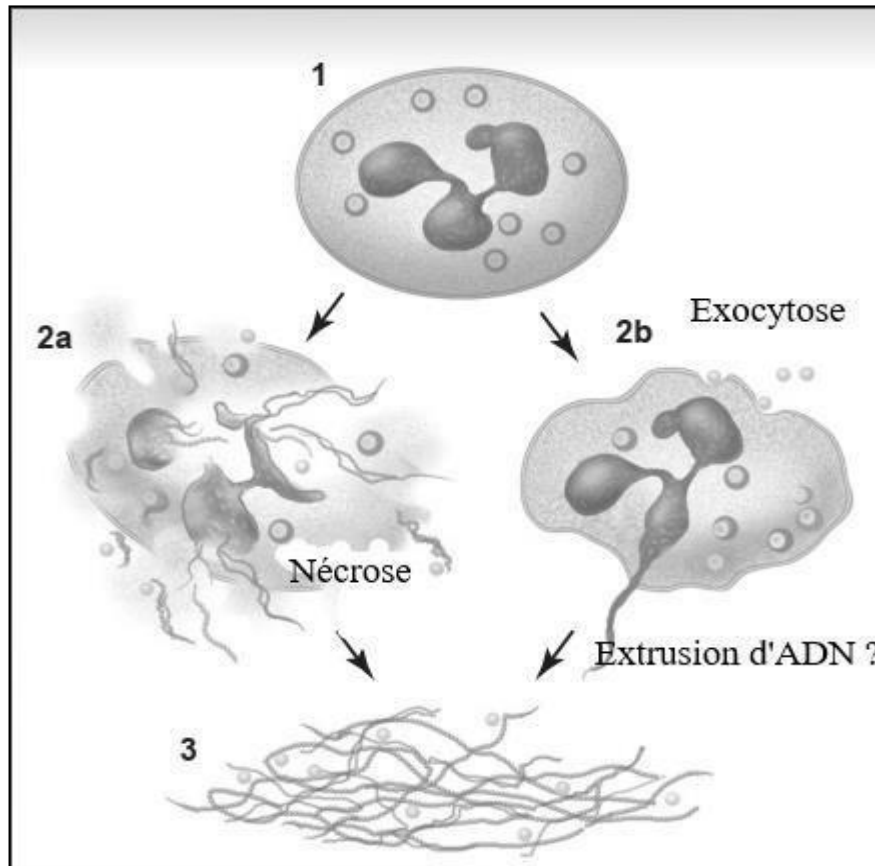


Figure 6 : Formation de NET's par les neutrophiles (Warren *et al.*, 2004).

d. Le marqueur de la dégranulation des granules azurophiles : La myéloperoxydase

Les PN produisent diverses molécules ayant des propriétés antimicrobiennes, la plus abondante est la myéloperoxydase (MPO). C'est une enzyme qui appartient à la famille des peroxydases (EC 1.11.1.7). Elle est stockée dans les granules azurophiles liés à la membrane plasmique et exprimée non seulement par les cellules leucocytaires mais aussi par d'autres cellules de l'organisme.

La MPO est capable d'interagir avec plusieurs entités ioniques, atomiques et moléculaires, soit par son cycle peroxydase en utilisant le H_2O_2 comme substrat pour produire la chloramine et l'hypochlorite..., soit par son cycle d'halogénéation en oxydant exclusivement le Cl^- en $HOCl$. Ces espèces présentent une grande toxicité pour les microorganismes, ainsi jouant un rôle important dans le système immunitaire.

Cette enzyme est présente sous forme inactivée dans les PN au repos et son activation est induite par divers facteurs *in vivo* tel qu'une infection bactérienne, mais aussi par des stimulations *in vitro* comme : le facteur de stimulation des colonies de macrophages

granulocytaires (GM-CSF), N-Formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine (fMLP), Acétate de Maysristate de Phorbol (PMA). Cependant, une expression excessive ou une libération irrégulière de la MPO par les PN activés induit des lésions et provoque de multiples maladies. Afin de réduire ou éliminer ces dernières, plusieurs molécules naturelles jouent le rôle d'inhibiteurs de la MPO, particulièrement : les polyphénols, les flavonoïdes, la mélatonine, ...etc. En plus de ces molécules naturelles, d'autres composés antioxydants et anti-inflammatoires possèdent une activité inhibitrice de la MPO, notamment : le diclofénac, l'acide caféique, l'acide férulique, le resvératrol... (Amjad *et al.*, 2018).

II. L'étude des métaux lourds « Mercure et Plomb » et leurs effets sur la santé humaine

Le cycle géochimique des métaux lourds induit leur accumulation dans l'environnement provoquant ainsi une accumulation dans le réseau alimentaire et affectant la santé des humains et des animaux en perturbant le système immunitaire (Yue Zhang *et al.*, 2020).

Le métal est un composé le plus souvent issue d'un minerai ou d'un autre métal, capable de se lier à d'autres éléments aisément pour former des alliages utilisables dans l'industrie. Anciennement appelé « métaux pesants » par rapport à leur masse volumique importante (supérieur à 5g/cm^3). Il est présent « en trace » du fait de sa très faible quantité dans l'environnement.

Certains métaux sont indispensables au bon fonctionnement des processus biologiques (le fer, le cuivre...), tandis que d'autres sont des éléments uniquement toxiques tels que le Mercure et le Plomb (Miquel *et al.*, 2001).

L'homme est exposé à ces métaux et peut-être contaminé par inhalation, ingestion et exposition cutanée ; ce qui provoque une toxicité même à faible concentration par bioaccumulation dans l'organisme (Roeijadi, 1994). À l'échelle cellulaire l'absorption des métaux lourds nécessite le passage à travers la membrane plasmique des cellules qui se fait soit par diffusion simple ou par des mécanismes de transport spécifiques (Shechter, 2004), mais généralement ces métaux utilisent les transports spécifiques des métaux essentiels à l'organisme tel que Ca, Fe, Zn (Luckey *et al.*, 1977).

La toxicité des métaux lourds dépend de divers éléments comme : la formation de complexes métaux-protéines, les interactions avec les métaux essentiels, la biodisponibilité et la forme chimique du métal, l'âge et le mode de vie de l'individu et les conditions du système immunitaire de l'hôte. Cette toxicité affecte de manière considérable les jeunes enfants et les personnes âgées suite à une exposition de métaux (Goyer *et al.*, 2001). Ces derniers notamment le Mercure et le Plomb possèdent des effets cytotoxiques du fait de leur capacité d'induire une apoptose ou une nécrose dans les cellules du système immunitaire en particulier les PN, ce qui entraîne une diminution de la résistance aux infections (Kouassi *et al.*, 2003).

On distingue deux sources d'émission du Mercure et du Plomb dans l'environnement :

- Une source naturelle : du fait qu'ils sont des éléments naturels présents dans tous les compartiments de l'environnement (l'air, l'eau et les sols).
- Les sources anthropiques : L'activité humaine dans les différents domaines a permis le changement de la répartition des métaux, leurs formes chimiques (ou spéciations) et encore leurs concentrations par l'introduction de nouveaux modes de dispersion (fumées, égouts, voitures...) sans modifier le volume des métaux.

1. Caractéristiques du Mercure

Le Mercure est le seul métal liquide à température ambiante, volatile, très toxique et qui se combine très facilement avec d'autres molécules (métaux, molécules organiques ou inorganiques). Il est présent dans l'écorce terrestre à une teneur moyenne de 0,08mg/kg (Friberg *et al.*, 1972).

En fonction de la température du milieu, le Mercure prend différentes formes chimiques, appelé la spéciation. Il se présente en deux familles :

- Le Mercure métallique ou inorganique qui prend trois formes différentes : liquide (Hg^0), gazeuse (Hg^0) et ionique (Hg^{2+}).
- Le Mercure organique, lorsqu'il se combine avec une molécule qui contient du carbone.

Le passage d'une forme à une autre se fait de façon permanente sous l'effet de différents facteurs du milieu. On obtient soit une oxydation (du Mercure métallique aux ions mercuriques) ou une méthylation (des ions mercuriques au Mercure organique).

Le Mercure et ses dérivés sont utilisés pour la fabrication des thermomètres, de lampes à rayonnement UV, les amalgames dentaires, mais aussi comme fongicide dans les traitements des eaux et dans les peintures (Miquel *et al.*, 2001).

2. Les effets toxiques du Mercure

L'oxydation du Mercure (Hg^{2+}) cause des effets neurologiques et néphrotoxiques suite à son accumulation dans différents organes (Schuppe *et al.*, 1998). Le Mercure en particulier le méthylmercure est connu pour sa lipophilie et sa grande liposolubilité de ce fait il est absorbé par tous les organismes vivants et donc apte à traverser la barrière hémato-encéphalique et affaiblir le système nerveux (Kerper *et al.*, 1992 ; Sujiyama, 1993).

L'exposition au Mercure présent dans l'environnement atteint le système immunitaire peut induire la libération des cytokines inflammatoire IL6 et IL8 dans les macrophage (Yue Zhang *et al.*, 2020) et peut altérer les fonctions du neutrophile (adhérence, chimiotactisme, production des ROS...) (Worth *et al.*, 2001). Quant au dichlorure de Mercure, il cause des signaux de transduction irréguliers car il est responsable de plusieurs liaisons croisées entre les récepteurs des cellules T, mais aussi la phosphorylation exagérée des tyrosines kinases (Demoor *et al.*, 2000).

Le Mercure présent dans les amalgames dentaires cause des allergies ou des dermatites car il se vaporise très lentement ce qui induit une exposition chronique (Zelikoff *et al.*, 1994).

3. Caractéristiques du Plomb

Le Plomb est issu d'un minerai, la galène. L'utilisation du Plomb est directement liée à la métallurgie (Miquel *et al.*, 2001). Il fait partie des principaux polluants métalliques de l'atmosphère, formant une couche d'oxyde de Plomb qui le protège de toute corrosion (Bliefert *et al.*, 2004).

Pendant la 1^{ère} moitié du siècle, le Plomb a été utilisé dans l'industrie, l'imprimerie et la peinture. Dans la seconde moitié du siècle, l'utilisation dominante était liée aux carburants automobiles, le Plomb étant ajouté à l'essence comme antidétonant. Cette utilisation est aujourd'hui prohibée, et l'introduction de l'essence sans Pb à largement réduit l'émission atmosphérique de ce dernier dans l'environnement.

4. Les effets toxiques du Plomb

Les effets chez l'adulte : l'intoxication par le Plomb est appelée saturnisme. Une fois dans le sang il est mobilisé par les érythrocytes et distribué dans tous les organes mous principalement le système nerveux et les reins (Miquel *et al.*, 2001). L'oxyde de Plomb inhalé provoque une réduction sévère du nombre de macrophages pulmonaires (Vijay *et al.*, 2003). Plusieurs études ont montré que l'exposition au Plomb induit des cancers (Kang *et al.*, 1980).

Les effets chez l'enfant : le risque de saturnisme est plus important chez les jeunes enfants en raison d'une absorption digestive des dérivés du Pb qui est plus élevée. Les effets toxiques sur le système nerveux centrale en développement sont plus sévères dus à sa sensibilité au Pb. Cette neurotoxicité est causée par le dérèglement des mécanismes de libération des neurotransmetteurs qui sont régulés par le Calcium (Godwin *et al.*, 2001).

Chapitre II : Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

Notre travail a pour objectif l'étude de l'effet des métaux lourds « Mercure et Plomb » sur la dégranulation et l'adhérence des neutrophiles humains. Le stage pratique a été réalisé au sein du laboratoire du département de biologie moléculaire et cellulaire de l'université Mouloud Mammeri (LABAB).

1. Matériel

a. Matériel biologique

Prélèvement de sang humain frais sur tube EDTA à partir d'un ensemble de volontaires sains, ne prenant aucun traitement anti inflammatoire ou autres.

b. Produits chimiques

-Dextran T500, Ficoll, NaCl, KCl, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , bleu de méthylène, métaux lourds (Mercure et Plomb), fMLP, PMA, BSA, réactif de folin.

c. Appareillage

- Agitateur magnétique (Labinco)
- Autoclave (Mettler)
- Bain marie (Mettler)
- Balance (Denver)
- Balance de précision (Denver)
- Centrifugeuse de paillasse (Sanyo) et centrifugeuse réfrigérer (Sigma)
- Etuve (Mettler)
- Hotte
- Lecteur ELISA
- Microscope inverse et Microscope photonique
- pH mètre (Hanna)
- Spectrophotomètre (UVmini-1240)
- Vortex (TechnoKartell)

2. Méthodes

a. Isolement et purification des neutrophiles

L'isolement des neutrophiles s'est fait selon la méthode classique Dextran/Ficoll qui sépare les composants du sang en fonction un gradient de densité suivant ces étapes :

- Prélever du sang sur tube EDTA afin d'éviter la coagulation ;
- Ajouter du Dextran 2 % (volume/volume) homogénéiser et laisser sédimenter à température ambiante pendant 25 à 30 min pour permettre la sédimentation des hématies au fond du tube ;
- Récupérer le surnageant puis le centrifuger à 1600 tr pendant 8 min à 18 °C ;
- Solubiliser le culot dans du PBS (2/3 du volume) puis le déposer sur un coussin de ficoll (1/3 du volume) et centrifuger pendant 30 min à 1600 tr et à 18 °C ;
- Eliminer le surnageant et l'anneau gris et garder un petit volume du culot contenant les PN ;
- Réaliser l'hémolyse en ajoutant un volume de NaCl 0.2 % froid pendant 30 sec pour lyser les hématies restantes, ajouter par la suite le même volume de NaCl 1.8 % afin de rétablir l'isotonicité et compléter par la suite avec un volume de PBS afin d'arrêter la réaction ;
- Centrifuger pendant 8 min à 1600 tr à 18 °C puis éliminer le surnageant et garder le culot contenant les PN ;
- Suspendre le culot de cellules dans un volume de PBS et conserver à 4 °c jusqu'à utilisation.

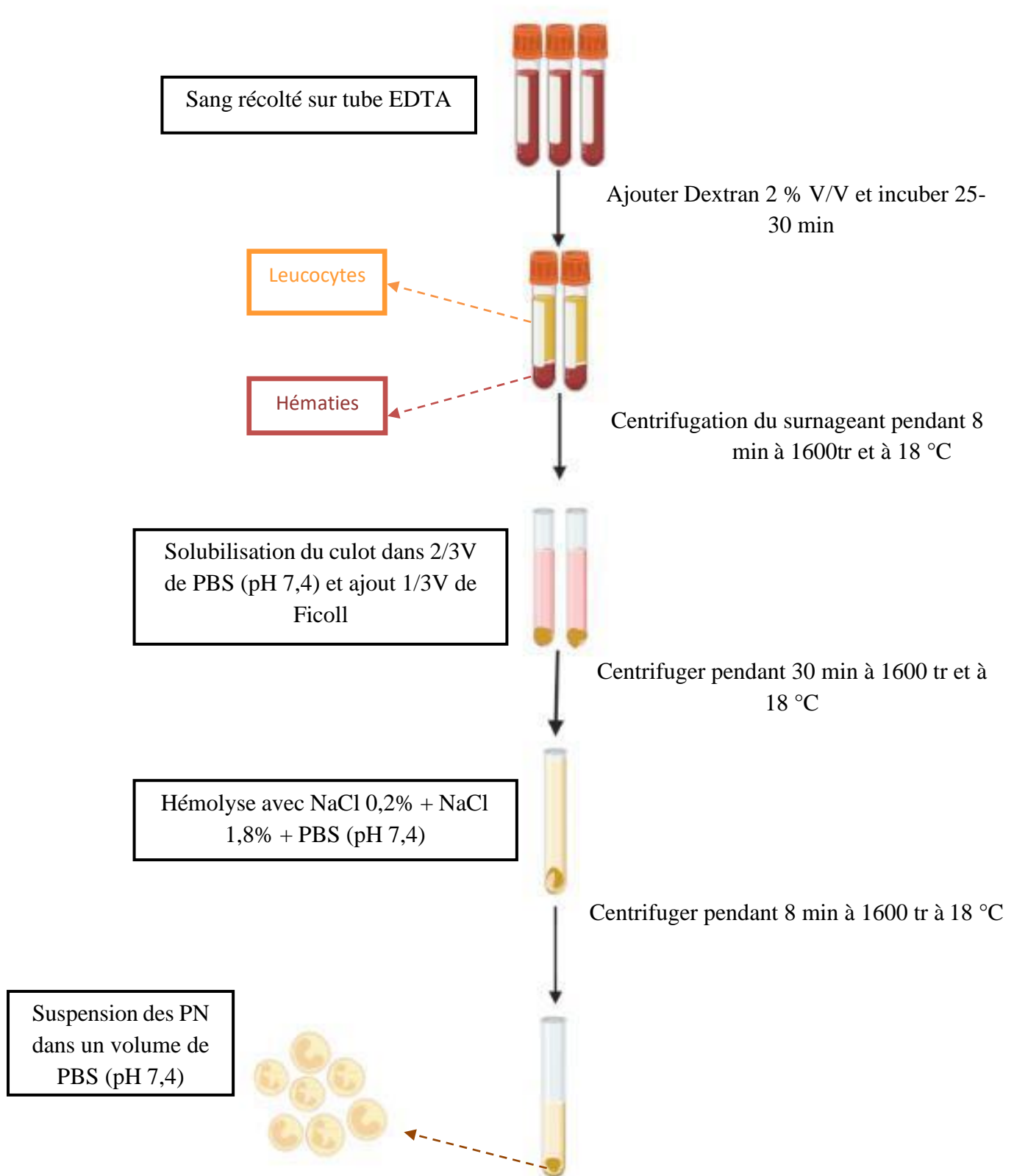


Figure 7 : Diagramme d'isolement et de purification des neutrophiles

b. Dénombrement des neutrophiles

Le dénombrement permet de quantifier les PN isolés suivant le protocole précédent. Diluer les PN dans un volume de cristal violet qui confère la couleur violette au noyau des cellules, et donc permet l'observation des noyaux polylobés, déposer par la suite une goutte sur une cellule de Malassez et observer sous microscope optique grossissement X40.

Le calcul des cellules colorées se fait de gauche à droite au niveau de 3 lignes, le nombre de cellules est donné selon la règle suivante :

$$N = n \times 10 \times F \times 1000 \text{ml} \times V_t$$

Avec : N : Nombre de PN.

n : Moyenne des trois lignes.

F : Facteur de dilution.

V_t : volume total des PN.

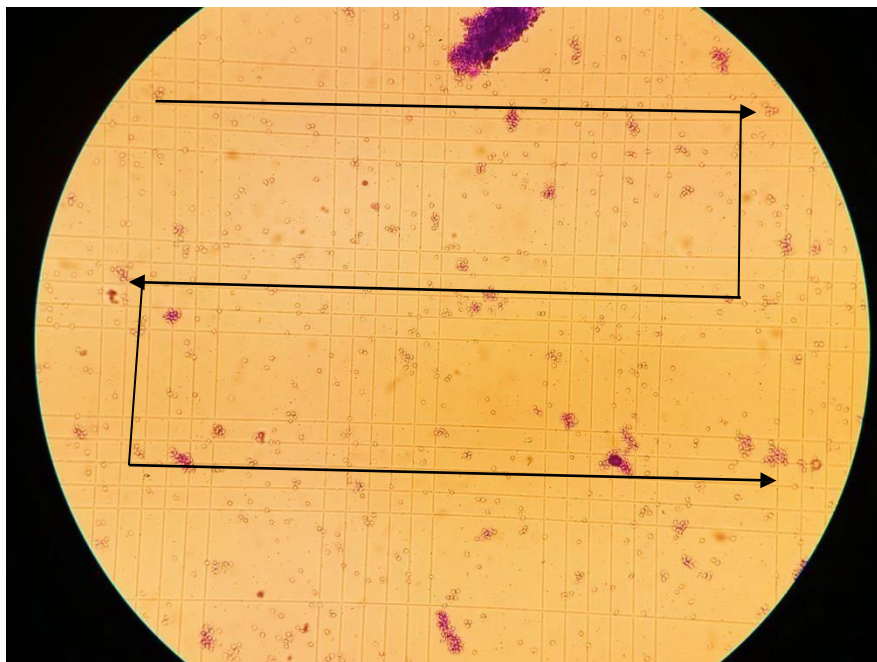


Figure 8 : Photo originale du dénombrement des neutrophiles sous microscope optique.

c. Traitement des PN avec des métaux lourds et vérification de certaines caractéristiques du neutrophile

Préparation d'une solution mère de Pb et Hg à 5 mg dilués dans 5 ml de NaCl 0.9 %.

1. Test d'adhérence

Un volume de PN soit 1×10^6 de cellules est suspendu dans 1 ml de PBS, puis traité avec le Pb et Hg séparément, à des concentrations différentes soit 0 μg , 10 μg , 25 μg , 50 μg , 80 μg et 100 μg . L'ensemble est transféré dans des boîtes de pétri et incubé à 37 °C pendant 30 min.

Un volume est récupéré et dilué dans du cristal violet et observé sous microscope photonique sur cellule Malassez pour le dénombrement. Le volume restant dans les boîtes est éliminé et remplacé par le cristal violet pour l'observation des cellules adhérentes sous microscope inversé.

2. Test de dégranulation

Dans ce test une concentration de 2×10^6 de PN est incubée à 37 °C pendant 10 min. Ces cellules sont traitées avec le Hg à différentes concentrations (10, 25, 50, 80 et 100 μg) dans un volume de PBS et ensuite incubé pendant 60 min à 37 °C.

Dans les mêmes conditions des contrôles sont préparés : un contrôle négatif (cellule au repos sans métaux), deux contrôles positifs, dans l'un les cellules sont stimulées avec le PMA et dans l'autre avec la cytochalasine B pendant 5 min et ensuite le fMLP pendant 2 min.

La réaction est arrêtée en centrifugeant les cellules et le surnageant est récupéré et conservé au frais pour le dosage de la myéloperoxydase et l'ADN.

d. Dosage des protéines sécrétoires des neutrophiles

Le dosage des protéines libérées dans le milieu est souvent nécessaire afin de mieux étudier la dégranulation des PN. Il est réalisé en utilisant la méthode de Lowry, en réalisant une courbe d'étalonnage utilisant la BSA, solution C « 50 ml de la solution A (Na₂CO₃ anhydre 2 % dans NaOH, 0.1 M) et 1 ml de la solution B (CuSO₄ 5H₂O, 0.5 %, tartrate de Na et K, 1 %) » et le Folin comme réactif pour la gamme et les différentes dilutions des surnageants récupérés.

Après 30 min d'incubation dans l'obscurité, la densité optique est mesurée par spectrophotométrie à 750 nm.

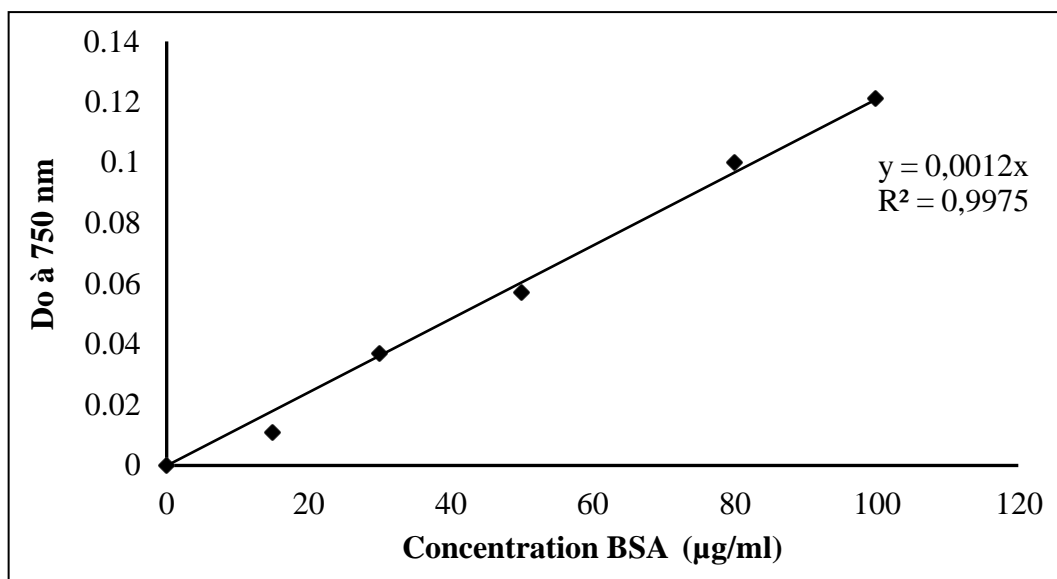


Figure 9 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines.

e. Dosage de la Myéloperoxydase

La myéloperoxydase est l'enzyme clé, contenu dans les premiers granules libérés par le neutrophile humain, en réponse à une stimulation soit *in vitro* par le fMLP ou PMA, *in vivo* par une infection bactérienne, virale...etc. Le dosage se repose sur la méthode spectrophotométrique décrite par BRADELY *et al* (1984), modifiée.

La réaction consiste à mélanger 100 µl du surnageant contenant la MPO additionné à 100 µl de TMB dans 700 µl de PBS et ajouter enfin 100 µl H₂O₂ (0.03 %), formant ainsi une coloration orange avec une intensité qui varie selon la concentration de la MPO dans le milieu. La lecture des densités optiques est réalisée par spectrophotométrie à 460 nm.

Une autre réaction a été utilisée qui consiste à mélanger 10 µl du surnageant avec 80 µl d'H₂O₂ et 110 µl de TMB sur une microplaque. Le mélange est ensuite incubé pendant 5 min à 37 °C. La réaction est arrêtée en ajoutant 52 µl d'H₂SO₄ et la densité optique est lue sur lecteur ELISA.

f. Dosage de l'ADN des NET

Récemment découvert, l'ADN est libéré suite à la stimulation des PN afin d'éliminer le pathogène. Il est dosé par spectrophotométrie (260 et 280 nm) dans un volume du surnageant récupéré après incubation et centrifugation.

Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

1. Observation du sang total

Un frottis sanguin a été réalisé sur un sang total frais d'un donneur sain, afin de visualiser l'ensemble des composants du sang, coloré au cristal violet (figure 10) pour observer la morphologie des cellules sous microscope photonique.

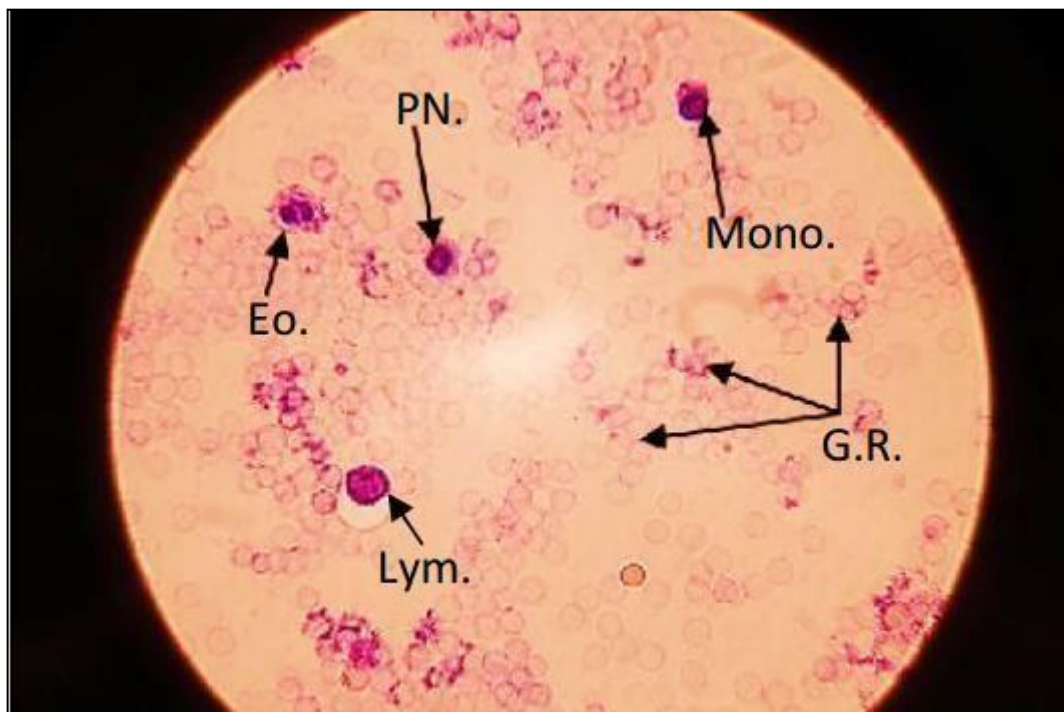


Figure 10 : Photo originale de la morphologie des cellules sanguines sous microscope photonique. Eo : Eosinophile ; Mono : Monocyte ; Lym : Lymphocyte ; PN : Polynucléaire neutrophile ; GR :Globule rouge.

2. Isolement et purification des PN

Suivant le protocole utilisé, les neutrophiles purifiés sont récupérés ensuite colorés au cristal violet et observés sous microscope photonique.

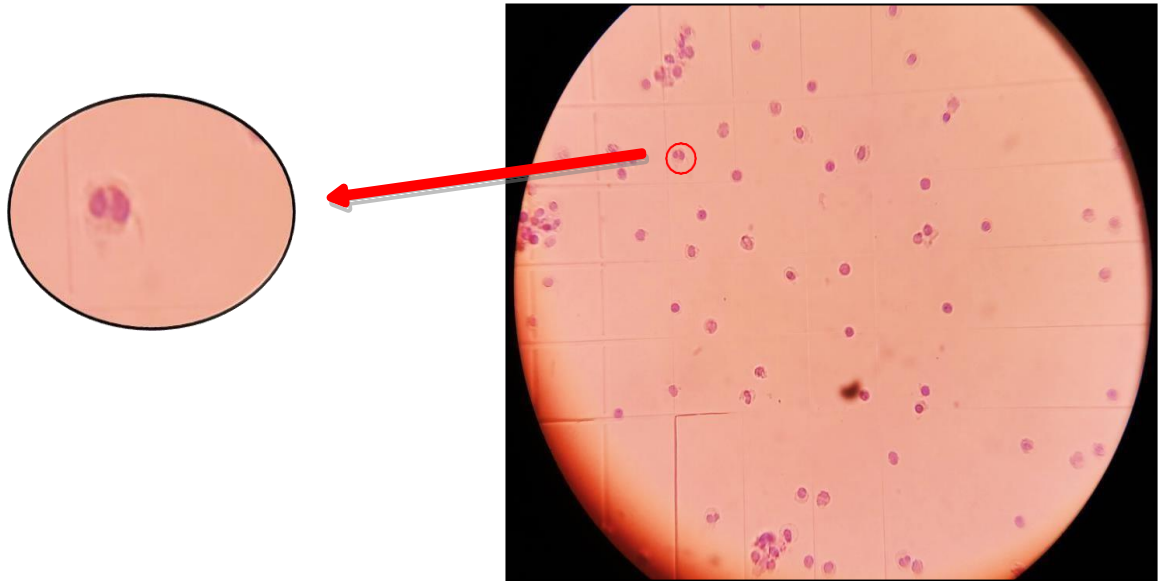


Figure 11 : Mise en évidence du noyau polylobé du neutrophile sous microscope photonique.

3. Effet des métaux lourds « Plomb et Mercure » sur l'adhérence et la dégranulation des neutrophiles

a. Test d'adhérence

Suite au traitement des cellules avec les différentes concentrations des deux métaux utilisés, le nombre de cellules non adhérentes est quantifié sur cellule de Malassez sous microscope photonique, comme représenté dans les figures suivantes :

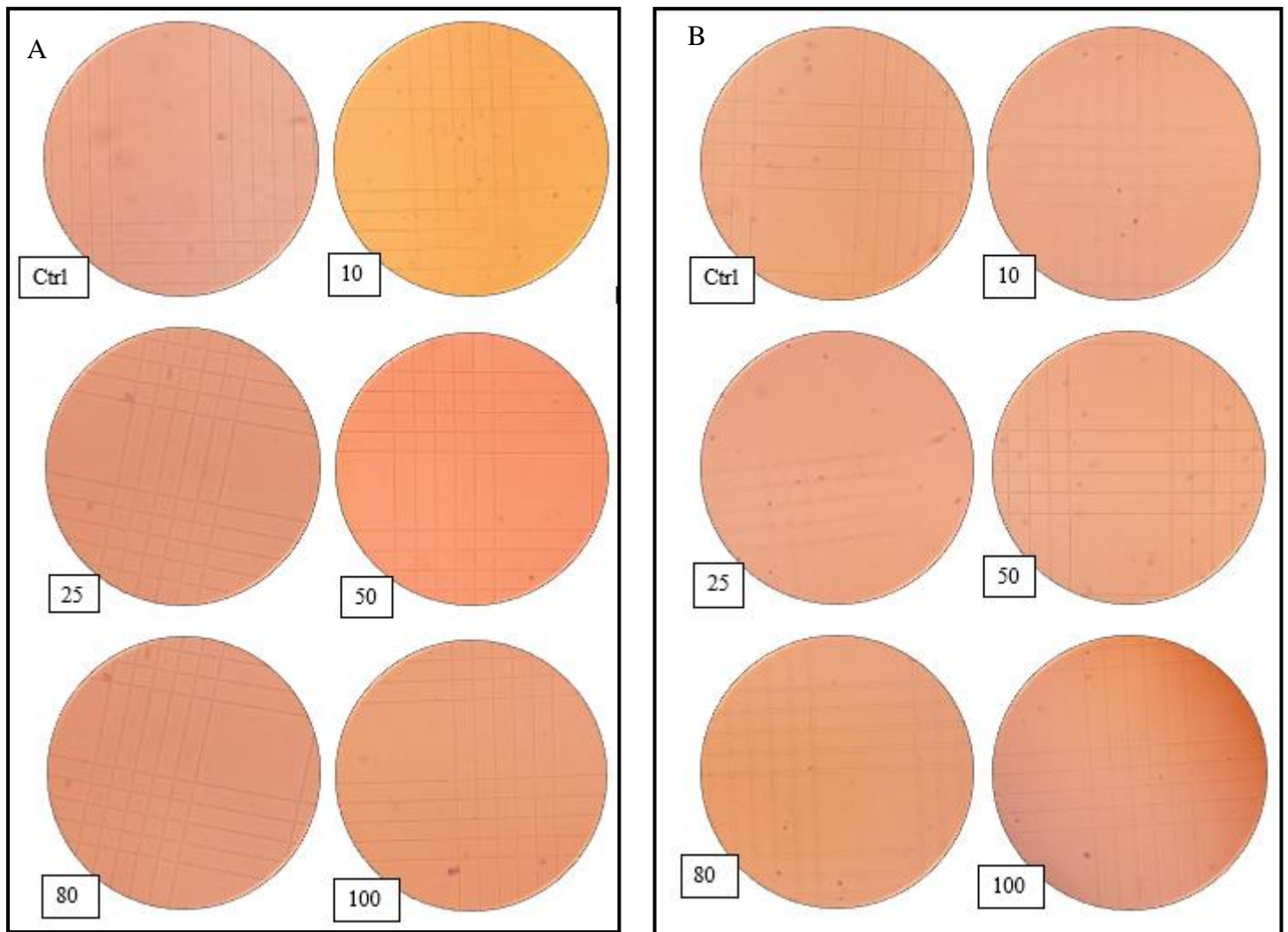


Figure 12 : observation des cellules non adhérentes traitées avec les métaux sous microscope. (A) : cellules traitées avec le Mercure. (B) : cellules traitées avec le Plomb.

Après dénombrement, les résultats sont représentés ci-dessous :

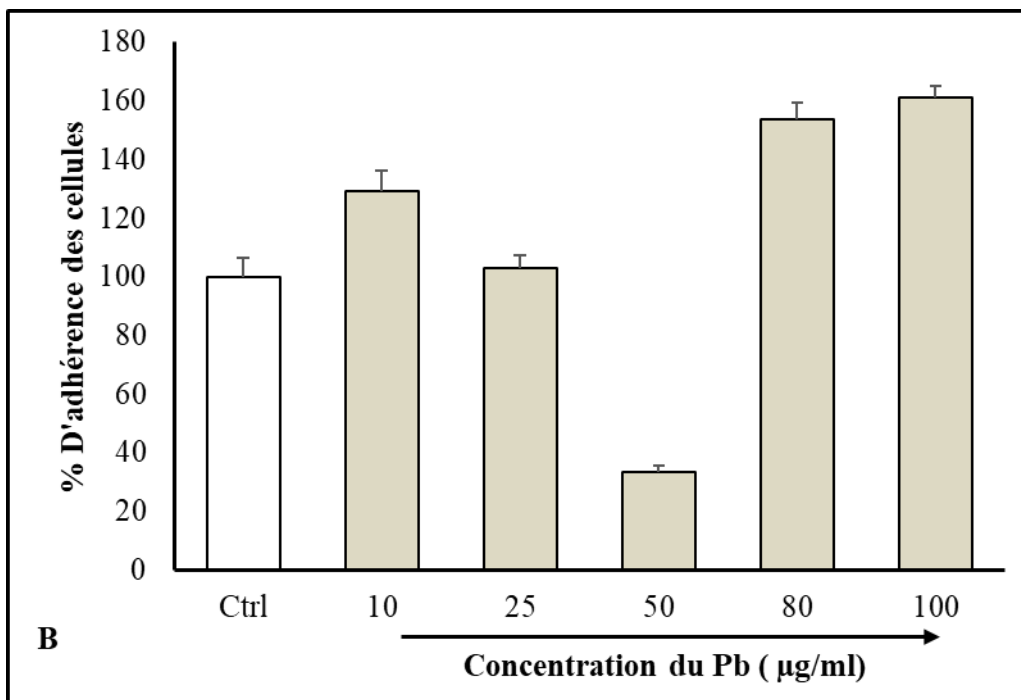
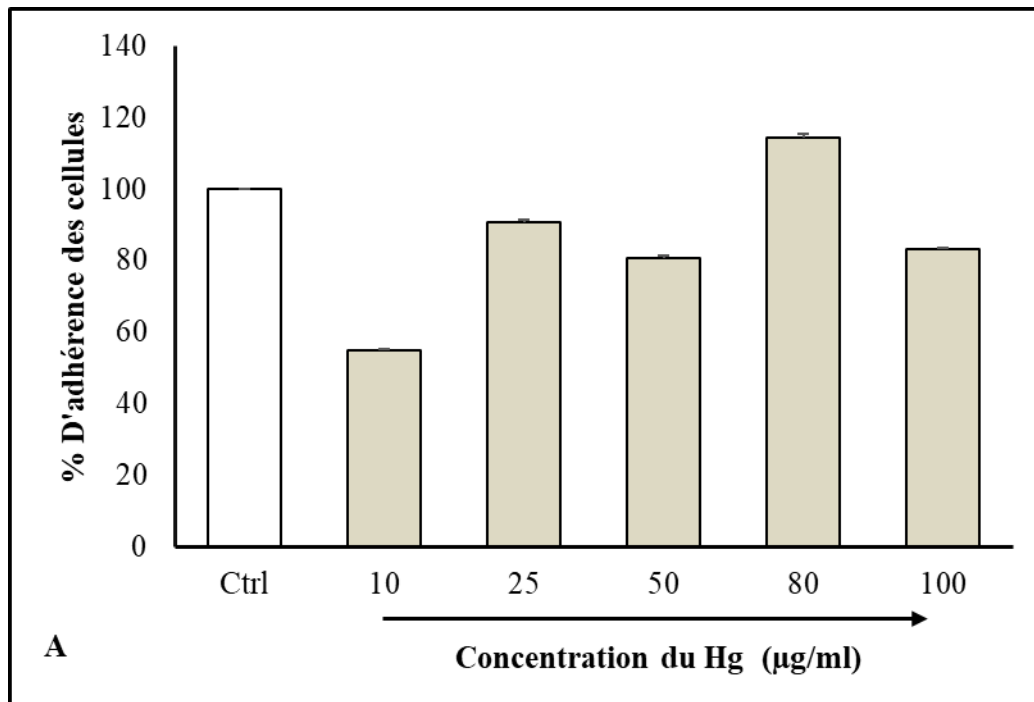


Figure 13 : Pourcentage d'adhérence des neutrophiles traités avec les métaux lourds. (A) : Pourcentage des cellules adhérentes traitées avec le Mercure. (B) : Pourcentage des cellules adhérentes traitées avec le Plomb.

Pour étudier l'effet des métaux lourds sur l'adhérence des neutrophiles, ces derniers ont été traités avec des concentrations différentes de Pb et Hg. La figure 13 (A et B) montre les résultats obtenus.

En comparant les cellules traitées au contrôle dans le cas du Mercure, nous observons dans la figure 13 (A) une légère diminution du pourcentage des cellules adhérees à 25, 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$ et une diminution plus importante à 10 $\mu\text{g/ml}$, en parallèle nous remarquons dans la figure 12 (A) une légère augmentation du nombre de cellules non adhérees à 25, 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$, et une augmentation plus importante à 10 $\mu\text{g/ml}$.

En revanche, nous remarquons dans la figure 13 (A) une augmentation importante du pourcentage des cellules adhérees à 80 $\mu\text{g/ml}$, alors que dans la figure 12 (A), il y a une diminution très importante du nombre de cellules non adhérees à 80 $\mu\text{g/ml}$.

Worth *et al.* (2001) ont testé l'effet des diverses concentrations du chlorure mercurique (HgCl_2) sur la polarisation spontanée des neutrophiles. Ils ont remarqué que plus la dose du Mercure augmente, l'adhérence est inversement proportionnelle, ce qui est contradictoire aux résultats que nous avons obtenus.

Dans le cas du Plomb, nous observons dans la figure 13 (B) une diminution très importante du pourcentage des cellules adhérees à 50 $\mu\text{g/ml}$, en parallèle dans la figure 12 (B) une importante augmentation du nombre de cellules non adhérees est observée.

En revanche, nous remarquons dans la figure 13 (B) une augmentation du pourcentage de cellules adhérees à 10, 25, 80 et 100 $\mu\text{g/ml}$, tandis que dans la figure 12 (B), nous remarquons une légère diminution du nombre de cellules non adhérees à 10 et 25 $\mu\text{g/ml}$, et une diminution très importante à 80 et 100 $\mu\text{g/ml}$.

Selon les études antérieures et les résultats obtenus, nous constatons que le Mercure et le Plomb, en fonction de leurs concentrations, modifient l'une des propriétés importantes du neutrophile qui est l'adhérence.

b. Dégranulation des neutrophiles stimulés avec les différents agonistes

Pour le choix des contrôles positifs qui conviennent à notre étude, cinq différents contrôles ont été testés afin de vérifier leur efficacité dans la dégranulation des PN. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure suivante :

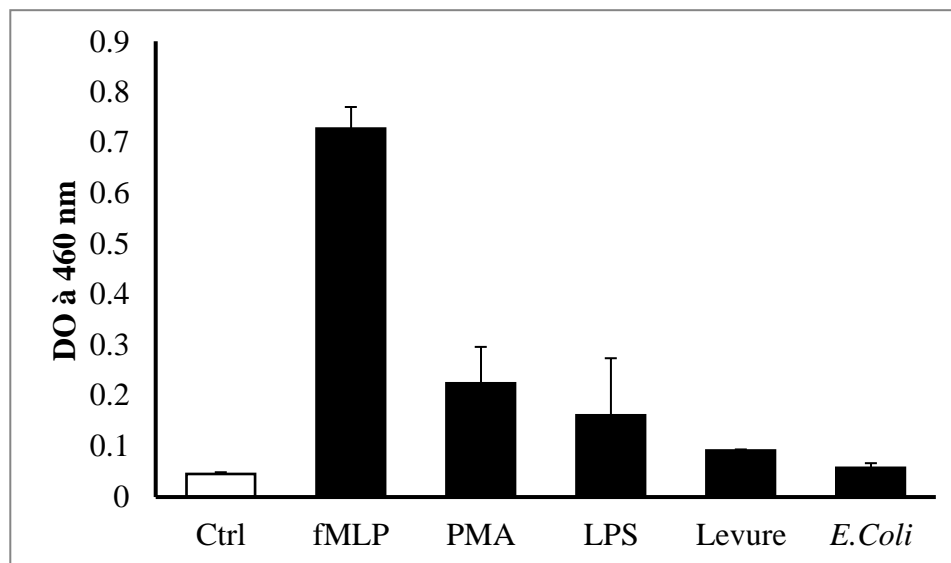


Figure 14 : L'effet des différents agonistes sur la dégranulation des neutrophiles

La mesure de la densité optique à 460 nm montre que pour le même temps d'incubation, les différents agonistes présentent un taux de dégranulation différent.

En ce qui concerne le LPS, les levures et *E.Coli*, nous remarquons une faible activité (avec $DO_{LPS} > DO_{levures} > DO_{E.Coli} \approx DO_{contrôle}$), contrairement au fMLP et PMA qui présentent une activité importante.

Les neutrophiles reconnaissent plusieurs stimuli *in vivo*, qu'ils soient endogènes ou exogènes et *in vitro* par le fMLP et PMA. Dans le cas du fMLP, en se liant aux récepteurs FRP (Formyl Peptides Receptors), il active les protéines G, ce qui engendre une cascade de signalisation qui finit par l'activation de la PKC, une enzyme qui a un rôle important dans la phosphorylation, menant à une réponse rapide et une exocytose presque complète des granules. Contrairement au fMLP, le PMA est caractérisé par une phase de latence et une faible exocytose des granules azurophiles en activant directement les PKC. La figure 15 résume les différentes voies de signalisation.

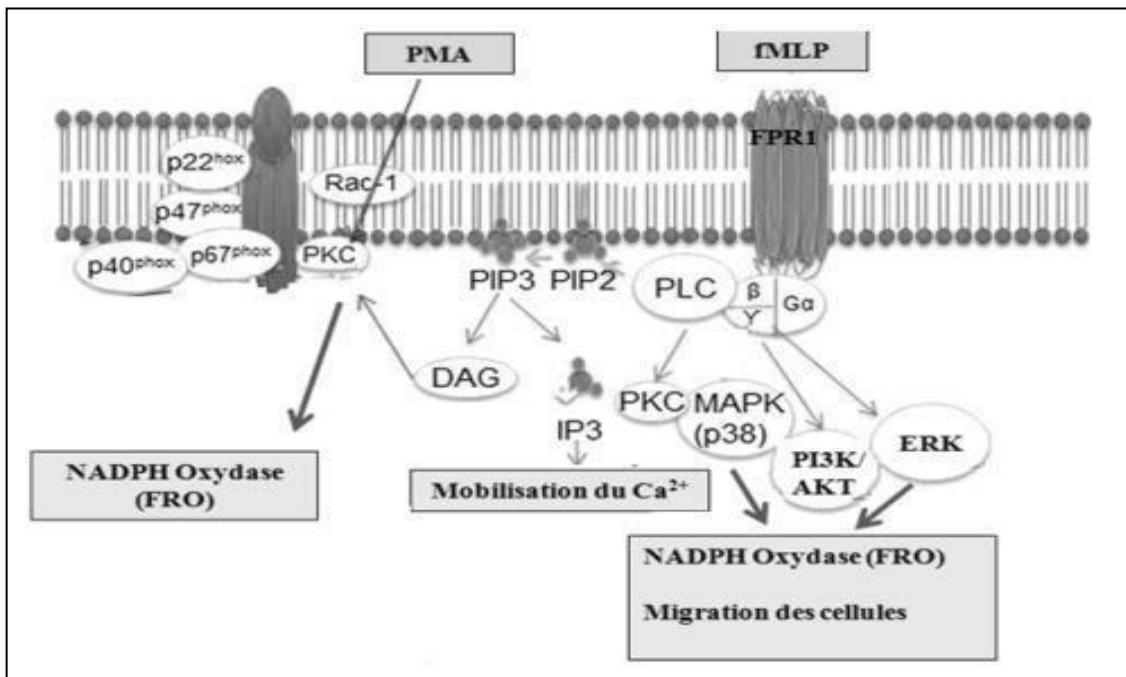


Figure 15 : Les voies de signalisation mobilisées suite à l'activation du neutrophile par le fMLP et PMA (adaptée de Shimada *et al.*, 2015).

Etant donné que fMLP et PMA sont deux agonistes qui induisent diverses réponses dans le neutrophile, ils ont été choisis comme contrôle positif pour la suite de notre travail, pour ce fait, la cinétique de dégranulation des témoins a été réalisée pendant 10 min et les résultats sont présentés dans la figure 16.

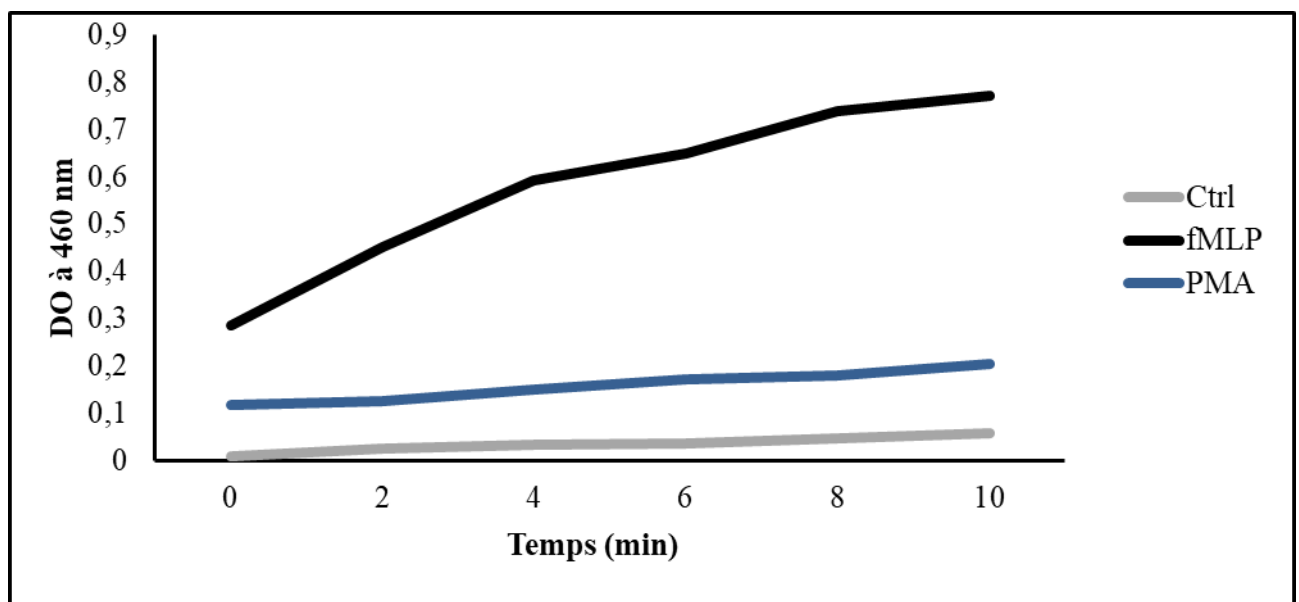


Figure 16 : Cinétique de la dégranulation des neutrophiles stimulées par le fMLP et PMA

c. La dégranulation des neutrophiles en présence du Mercure

Lors de la dégranulation, les neutrophiles libèrent un ensemble de protéines et d'enzymes qui présentent des propriétés anti microbiennes, qui peuvent être dosé en utilisant des méthodes dont le western blot pour le suivit de cette dégranulation.

Dans notre cas la myéloperoxydase a été choisie comme une protéine de référence pour cette fonction, car elle fait partie des bio marqueurs les plus abondants, elle constitue 5 % du poids sec des PN et 25 % des protéines granulaires azurophiles. La MPO a acquis une importance particulière en raison de son rôle dans un certain nombre de maladies inflammatoires, dont les maladies cardiovasculaires, les maladies neuro dégénératives, les maladies du foie, le cancer et le rejet de greffe.

Afin d'étudier l'effet du Mercure sur la dégranulation des neutrophiles, ces derniers ont été traités avec des concentrations différentes soit 10, 25, 50, 80 et 100 µg/ml. Après incubation d'une heure à 37 °C, les cellules sont centrifugées à 13 000 tr pendant une minute, le surnageant est récolté et conservé dans la glace (4 °C). L'activité de la MPO est quantifiée dans chaque surnageant par spectrophotométrie. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous

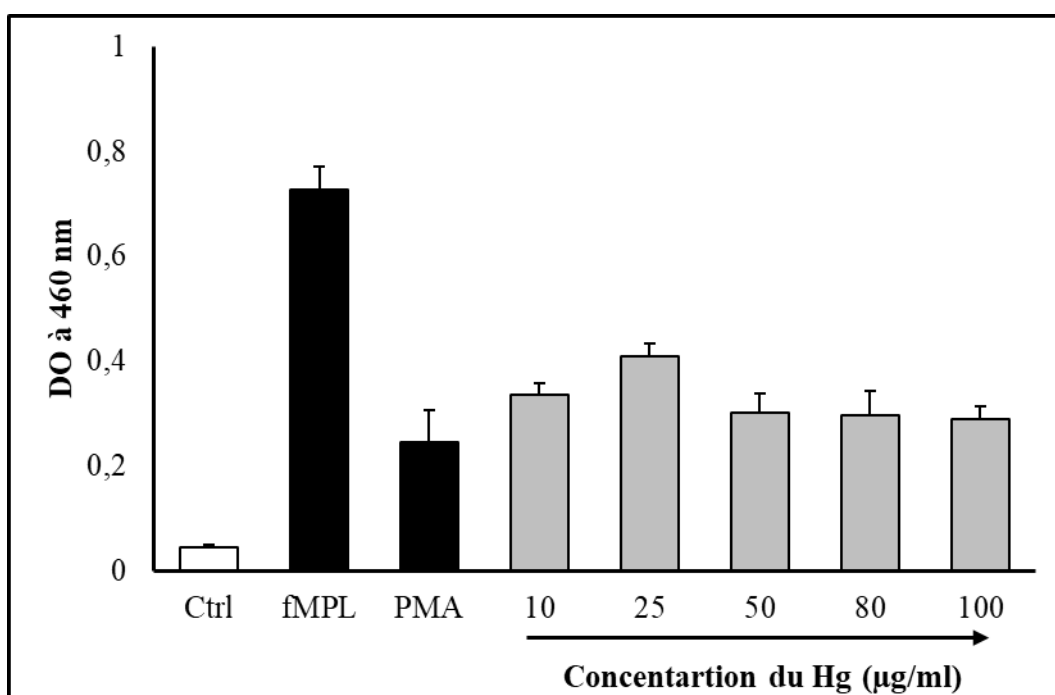


Figure 17 : L'effet du Mercure sur la dégranulation des neutrophiles.

Nous distinguons la présence de dégranulation au niveau des cellules traitées comparant aux cellules au repos (Ctrl). Cette dégranulation est équivalente à 50 % de celle obtenue avec le fMLP et elle est supérieure à celle obtenue avec le PMA. Un taux croissant est observé jusqu'à atteindre le maximum à 25 µg/ml puis devient décroissant jusqu'à atteindre un minimum à 100 µg/ml.

D'après Ayansina *et al.* (2017), la grande partie des métaux lourds sont toxiques à des concentrations faibles et sont capables d'induire des dommages à la santé humaine, contrairement à Moisan *et al.* (2002), qui démontrent clairement que des concentrations faibles et non toxiques (1-7,5 µM) de MgHgCl et de HgCl₂ protègent le PMN de l'apoptose spontanée, ce qui entraîne une amélioration du taux de survie, mais cause en parallèle une accumulation excessive de PMN sénescents, ce qui pourrait contribuer à l'auto-immunité induite par le Hg.

Selon l'étude effectuée par Yue Zhang *et al.* (2020), l'exposition au Mercure peut induire la libération des ROS, parallèlement, les enzymes anti oxydantes soit SOD et CAT diminuent suite au traitement au mercure.

Worth *et al.* (2001), suggèrent d'après leur étude, que le HgCl₂ perturbe les voies de signalisation des intégrines dans les neutrophiles. A de faibles concentrations, le Mercure déclenche une ligature inappropriée des récepteurs qui peut altérer le métabolisme.

Des études récentes proposent l'utilisation de molécule naturelle à activité anti inflammatoire, afin de réduire et réguler la stimulation des neutrophiles tel que l'acide caféique, la Thymoquinone qui selon l'étude de Boudiaf *et al.* (2016) réduit à concentration croissante la production de la MPO au niveau des cellules stimulées avec le fMLP.

Aussi, d'autres études portant sur la réduction des métaux dans l'environnement, comme celle de Ayansina *et al.* (2017) qui proposent les biosorbants microbiens, comme moyens pour réduire la pollution de l'environnement en métaux lourds, en utilisant des biomasses vivantes, mortes ou leurs composants.

d. Dosage des protéines sécrétoires

Pour confirmer les résultats précédents, un dosage de protéine a été réalisé suivant la méthode de Lowry. Le taux de protéines contenu dans les surnageants a été dosé par spectrophométrie à 750 nm. Les résultats sont énoncés dans le tableau suivant.

Tableau II : Taux des protéines sécrétoires des neutrophiles en (µg/ml)

	Ctrl (0 µg/ml)	fMLP (10 ⁻⁶ M)	PMA (100 nM)	10 (µg/ml)	25 (µg/ml)	50 (µg/ml)	80 (µg/ml)	100 (µg/ml)
Taux de protéines (µg/ml)	28.33	121.66	50	60	113.33	49.16	32.5	30

Après comparaison du taux de protéines entre les contrôles et les cellules stimulées avec le Mercure, nous remarquons un taux croissant jusqu'à atteindre la valeur maximale à 25 µg/ml puis décroissant jusqu'à atteindre un minimum à 100 µg/ml. Ceci démontre une concordance avec les résultats obtenus lors du dosage de la MPO et donc confirme leur justesse.

e. Dosage de l'ADN

Pour vérifier si parmi les protéines libérées lors de la dégranulation y a présence d'ADN, un dosage spectrophotométrique a été effectué à 280 et 260 nm. Les résultats obtenus sont les suivants.

Tableau III : Taux d'ADN libéré par les neutrophiles.

	Ctrl (0µg/ml)	fMLP (10 ⁻⁶ M)	10 (µg/ml)	25(µg/ml)	50(µg/ml)	80(µg/ml)	100(µg/ml)
DO 260/280 nm	0.019	0.384	-0.122	-0.172	-0.046	0.052	0.082

Après le dosage spectrophotométrique, le rapport 260/280 nm est calculé pour les contrôles et les cellules traitées par les différentes concentrations de Mercure, sachant que dans le cas où :

Si le rapport 260/280 nm = [0-1.8[, présence de protéines.

Si le rapport 260/280 nm = [1.8-2], présence d'ADN.

Si le rapport 260/280 nm > 2, présence d'ARN.

Après comparaison, nous constatons des valeurs inférieures à 1.8, nous déduisons la présence de protéines uniquement donc absence d'ADN.

Sanne Mol *et al.* (2021) ont réalisé une étude sur l'effet d'une double stimulation des neutrophiles sur ses différentes fonctions effectrices (phagocytose, NETosis, dégranulation ...), montrant que la libération de l'ADN (NETosis) requiert une seule stimulation avec un temps d'incubation d'au moins 4h, ceci explique les faibles valeurs obtenues lors de notre étude où le temps d'incubation était d'une heure.

Conclusion

Conclusion

Le neutrophile (PN) est l'un des composés importants de l'immunité innée, il est le premier à se rendre dans le foyer inflammatoire, où il libère des molécules à propriétés antimicrobiennes dans le but d'éliminer les agents étrangers, tels que les formes réactives de l'oxygène (FRO) et l'enzyme protéolytique contenue dans les différents granules du PN. Malgré le recul sur la toxicité des métaux lourds « Plomb et Mercure » sur la santé, très peu est connu sur leurs actions sur les fonctions immunitaires, en particulier sur celles du PN (l'adhérence et la dégranulation). D'où notre thématique dans laquelle nous nous sommes intéressés à l'effet du Plomb et du Mercure au niveau du PN. Dans ce travail, nous avons soumis les PN à des concentrations croissantes de Plomb et Mercure allant de 0 à 100 µg/ml et nous avons évalué l'effet de ces métaux sur l'adhérence et la libération des granules du PN, via le dosage de la myéloperoxydase (MPO).

Les résultats obtenus montrent que le Plomb ainsi que le Mercure ont un effet sur l'adhérence des neutrophiles, dans le cas du Plomb la concentration qui représente le pourcentage d'adhérence le plus élevé est 100 µg/ml, tandis le Mercure c'est à 80 µg/ml que l'adhérence atteint son maximum.

Concernant la dégranulation, elle est mise en évidence par le dosage de la MPO, une enzyme qui fait partie des composants granulaires des PN. Suite aux résultats obtenus des PN traités avec l'Hg, on déduit que ce métal induit la libération de la MPO, et atteint son maximum à 25 µg/ml. Cette dégranulation des PN suite à leur exposition aux métaux lourds particulièrement le mercure veut dire que ce métal est un élément pro-inflammatoire et une exposition à ces métaux à long terme sera un terrain favorable à l'inflammation.

Ainsi, notre étude démontre que le Plomb et Mercure peuvent perturber les fonctions des PN. En revanche, une activation inadéquate des neutrophiles par les différents agents peut induire la destruction des cellules et des tissus environnants, et avec l'inflammation plusieurs pathologies graves et chroniques vont s'installer.

En conclusion, nos résultats ont permis de mieux connaître un aspect moléculaire et cellulaire de l'action du Plomb et le Mercure sur les neutrophiles, ceci est encourageant à faire plus de recherches ultérieures sur leur importance dans le domaine de l'immuno-toxicologie.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

AMJAD A. KHAN., MOHAMMED A. ALSAHLI. et ARSHAD H. RAHMANI. (2018).

Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. *Med. Sci*, 6, 33, 1-21.

AYANSINA SEGUN AYANGBENRO. et OLURANTI BABALOLA. (2017).

A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 14(94), 1-16.

BLIEFERT C. et PERRAUD R. (2004). Chimie de l'Environnement : Air, eau, sols, déchets.

Boeck Université. 373-374.

BM FOURNIER. et CA PARKOS. (2012). The role of neutrophils during intestinal

inflammation. *Mucosal Immunology*, 5, 4, 354-366.

BORREGAARD N., LOLLIKE K., KJELDEN L., SENGELOW H., BASTHOLM L.,

NIELSEN MH. et BAINTON DF. (1993). Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol*, 51, 187-198.

CHAHRA BOUDOUKHA., HAMAMA BOURICHE., EDUARDO ORTEGA. et

ABDERRAHMANE SENATOR. (2015). Immunomodulatory effects of Santolina chamaecyparissus leaf extracts on human neutrophil functions. *Pharm Biol*, 54(4), 667-673.

CHRISTOPHER M. L. S. BOUTON., LAURENCE P. FRELIN., CAMERON E.

FORDE., HILARY ARNOLDGODWIN. et JONATHAN PEVSNER. (2001).

Synaptotagmin I is a molecular target for lead. *Journal of Neurochemistry*, 76, 1724-1735.

CONSTANTIN F. URBAN., DAVID ERMERT., MONIKA SCHMID., ULRIKE ABU-

ABED., CHRISTIAN GOOSMANN., WOLFGANG NACKEN., VOLKER BRINKMANN., PETER R. JUNGBLUT. et ARTURO ZYCHLINSKY. (2009).

Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 5(10), 1-18.

- D. RAICHVARG., M. GUENOUNOU. et M. ZENOU. (1981).** Phagocytose et mécanismes bactéricides du polynucléaire neutrophile. *Médecine et Maladies Infectieuses*, N ° 11, 581- 587.
- DEMOOR JM.et KOROPATNICK DJ. (2000).** Metals and cellular signaling in mammalian cells. *Cell MolBiol*, 46(2), 367-381.
- DORWARD DA, LUCAS CD, CHAPMAN GB, HASLETT C, DHALIWAL K, 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.
- ELIANE MOISAN., SYLVIE ARBOUR., NHI NGUYEN., MARIE-JOSEE HEBERT., DENIS GIRARD., JACQUES BERNIER., MICHEL FOURNIER. et EDOUARD KOUASSI. (2002).** Prolongation of human neutrophil survival by low-level mercury via inhibition of spontaneous apoptosis, *Journal of Toxicology and Environmental Health. Current Issues*, 65:2, 183-203.
- ELZBIETA KOLACZKOWSKAL.et PAUL KUBES. (2013).** Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews Immunology*, 13, 159-175.
- FALKO APEL., ARTURO ZYCHLINSKY. et ELAINE F. KENNY. (2018).** The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. *Nature reviews Rheumatology*, 14, 467-475.
- FRIBERG L. et VOSTAL J. (1972).** Mercury in environment. *Nature*, 243, 309.
- G. ROESIJADI. (1994).** Metallothionein Induction as a Measure of Response to Metal Exposure in Aquatic Animals. *Environnement Health Perspect*, 102(12), 91-96.
- GOUGEROT-POCIDALO M.A. ET HURTADO-NEDELEC M. (2011).** Déficit primitif de la fonction des polynucléaires neutrophiles. *Hématologie*, 1984(11),56403-9.
- HANS-CHRISTIAN SCHUPPE., ANDREA C. RZJNNAU., SHERKO VON SCHMIEDEBERG., THOMAS RUZICKA., ERNST GLEICHMANN. et PETER GRIEM. (1998).** Immuno modulation by Heavy Metal Compounds. *Clinics in Dermatology*, 16, 149-157.

JESSICA DEREÉ., ROHAN LALL., HEIDI MELBOSTAD., MICHAEL GRANT., DAVID B. HOYT. et RAUL COIMBRA. (2006). Neutrophil Degranulation and the Effects of Phosphodiesterase Inhibition. *Journal of Surgical Research*, 133, 22-28.

JUDITH T. ZELIKOFF., RALPH SMIALOWICZ., PIERLUIGI E. BIGAZZI., ROBERT A. GOYER., DAVID A. LAWRENCE., HOWARD I. MAIBACH. et DONALD GARDNER. (1994). Immunomodulation by metals. *Fundamental and applied toxicology*, 22, 1-7.

JUDY A. OWEN., JENNI PUNT. et SHARON A. STRANFORD. (2014). Immunologie. W. H. Freeman and company, 7^{ème} édition., *DUNOD*, Paris.

KANG HK., INFANTE PR. et CARRA JS. (1980). Occupational lead exposure and cancer. *Science*, 20, 935-936.

KAOUTHAR BOUDIAF., MARGARITA HURTADO-NEDELEC., SAHRA AMEL BELAMBRI., JEANCLAUDE MARIE., YACINE DERRADJI., MUSTAPHA BENBOUBETRA., JAMEL EL-BENNA. et PHAM MY-CHAN DANG. (2016).

Thymoquinone strongly inhibits fMLF-induced neutrophil functions and exhibits anti-inflammatory properties in vivo. *Biochemical Pharmacology*, 1-31.

KOUASSI E., REVILLARD J-P., FOURNIER M., AYOTTE P., ROY R., BROUSSEAU P. et HADJI L. (2003). Système immunitaire. Environnement et santé publique- fondements et pratiques, edisem, *Tec &Doc*, p 687-698, Paris.

LAURA E. KERPER., NAZZARENO BALLATORI. et THOMAS W. CLARKSON. (1992). Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. Regulatory Integrative Camp. *Physiol*, 31, R761-R765.

LI G. MONGILLO M, CHIN K-T., HARDING H., D. RON., MARKS A. R. et TABAS I. (2009). Role of ERO1- α -mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 186(6), 783-792.

LUCKEY. THOMAS D. et VENUGOPAL. B. (1977). METAL TOXICITY IN MAMMALS. Physiologic and Chemical Basis for Metal Toxicity. *PLENUM PRESS*, 1^{ère} édition, New York and LONDON.

M. SUJIYAMA. (1993). Role of cellular antioxidants in metal-induced damage. *Cell Biology and Toxicology*, 10, 1-22.

MARIE-CHRISTINE BENE., YVON LEBRANCHU., FRANCOIS LEMOINE. et ESTELLE SEILLES. (2013). Immunologie fondamentale et immunopathologie. *Elsevier Masson SAS*, Paris.

MARK T. QUINN, FRANK R. DELEO, GARY M. BOKOCH. (2007). Neutrophil Methods and Protocols. *Methods in molecular biology*, 138., *Humana Press*, New Jersey.

MIQUEL M. G et REVOL H. (2001). Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé : Rapport d'information n° 261, SENAT Session Ordinaire (2000-2001). [Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques](#). Commission des affaires européennes du Sénat. https://www.senat.fr/rap/100-261/100-261_mono.html.

PAIGE LACY. (2006). Mechanism of Degranulation in Neutrophils. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 2, 3, 98-108.

R. G. WORTH., R. M. ESPER., N. S. WARRA., A. L. KINDZELSKII., A. J. ROSENSPIRE., R. F. TODD. et H. R. PETTY. (2001). Mercury Inhibition of Neutrophil Activity: Evidence of Aberrant Cellular Signaling and Incoherent Cellular Metabolism. *Scand. J. Immunol*, 53, 49–55.

ROBERT A. GOYER. et THOMAS W. CLARKSON. (2001). Toxic effects of metals. In C. D. Klaassen et al. *Casarett and Doull's toxicology*, 5^{ème} édition, 811-867.

SANNE MOL., FLORIANNE M. J. HAFKAMP., LAURA VARELA., NEENA SIMKHADA., ESTHER W. TAANMAN-KUETER., SANDER W. TAS., MARCA H. M. WAUBEN., TOM GROOT KORMELINK. ET ESTHER C. DE JONG. (2021). Efficient Neutrophil Activation Requires Two Simultaneous Activating Stimuli. *International journal of molecular sciences*. *Int. J. Mol. Sci*, 22, 10106.

SARA NAJMEH., JONATHAN COOLS-LARTIGUE., BETTY GIANNIAS., JONATHAN SPICER. et LORENZO E. FERRI. (2015). Simplified Human Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Isolation and Handling. *J. Vis. Exp*, (98), e52687, 1-6.

**SEBASTIAN LORENZ KNACKSTEDT., ATHINA GEORGIADOU., FALKO APEL.,
ULRIKE ABU-ABED., CHRISTOPHER A. MOXON., AUBREY J. CUNNINGTON.,
BÄRBEL RAUPACH., DEIRDRE CUNNINGHAM., JEAN LANGHORNE., RENATE
KRÜGER., VALENTINA BARRERA., SIMON P. HARDING., AASE BERG., SAM
PATEL., KARI OTTERDAL., BENJAMIN MORDMÜLLER., EVELIN
SCHWARZER., VOLKER BRINKMANN., ARTURO ZYCHLINSKY. et BORKO
AMULIC. (2019).** Neutrophil extracellular traps drive inflammatory pathogenesis in malaria.
Sci Immunol. 4(40), 1-36.

SENGELOV H. KJELDSSEN. et BORREGAARD N. (1993). Control of Exocytosis in Early
Neutrophil Activation. *J Immunol*, 150(4), 1535-1543.

SERGIO D. CATZ. et KENNETH R. MCLEICH. (2020). Therapeutic Targeting of
Neutrophil Exocytosis. *J LeukocBiol*, 107(3), 393-408.

**SHANNAN CAO., PENG LIU., HAIYAN GONG., JIANFENG YAO., YAWEI SUN.,
GUANGFENG GENG., TONG WANG, SIZHOU FENG., MINGZHE HAN., JIAXI
ZHOU. et YUANFU XU. (2015).** Extracellular Acidification Acts as a Key Modulator of
Neutrophil Apoptosis and Functions. *PLoS ONE*, 10(9), 1-15.

SHECHTER EMANUEL. (2004). SCIENCES SUP. 2^{ème} édition, Dunod.

**SHIMADA A.L.B., CRUZ W.S, LOIOLA R A., DREWES C. C. , DÖRR F. ,
FIGUEIREDO N. G. , PINTO E. & FARSKY S.H. P. (2015).** Absorption of PCB126 by
upper airways impair G protein-coupled receptor-mediated immune response. *Scientific
Reports*, 5, 14917.

**SOFIA DE OLIVERAL., EMILY E. ROSOWSKIL. et ANNA HUTTENLOCHER.
(2016).** Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in
reverse. *NATURE REVIEWS. IMMUNOLOGY*, 16, 378-391.

ST-ONGE M. (2005). Le neutrophile humain. Mémoire de maîtrise. Université Laval, Québec.

STEVEN W. EDWARDS. (1994). Biochemistry and Physiology of the Neutrophil.
Cambridge University Press, 320p, New York.

VIEIRA O.V., BOTELHO R.J. ET GRINSTEIN S. (2002). Phagosom maturation: aging gracefully. *Biochem J*, 366,689-704.

VIJAY K. SINGH., KAMLA P. MISHRA., REENA RANI., VIRENDRA S. YADAV., SUDHIR K. AWASTHI. et SATYENDRA K. GARG. (2003). Immunomodulation by lead. *Immunologie Research*, 28(2), 151-165.

WARREN L. LEE. et SERGIO GRINSTEIN. (2004). The Tangled Webs That Neutrophils Weave. *SCIENCE*, 303, 1477-1478.

WARREN L. LEE., RENE E. HARRISON. et SERGIO GRINSTEIN. (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection*, 5, 1299–1306.

WITKO-SARSAT V., RIEU P., DESCAMPS-LATSCHA B., LESAVRE P. et HALBWACHS-MECARELLI L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*, 80(5), 617-653.

YUE ZHANG., PEIJUN ZHANG., PENG YU., XINCHI SHANG., YUTING LU. et YUEHONG LI. (2020). Mercury exposure induces the release of neutrophil extracellular traps and apoptosis in carp neutrophils. *Aquaculture*, 1-16.