



HAL
open science

Study of neutrophils, neutrophil cellular traps, and the complement protein C1q in inflammatory responses : physiopathological consequences in rheumatoid arthritis and an experimental model

Matthieu Ribon

► **To cite this version:**

Matthieu Ribon. Study of neutrophils, neutrophil cellular traps, and the complement protein C1q in inflammatory responses : physiopathological consequences in rheumatoid arthritis and an experimental model. Molecular biology. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. English. NNT : 2015USPCD020 . tel-01519358

HAL Id: tel-01519358

<https://theses.hal.science/tel-01519358>

Submitted on 6 May 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2015

THESE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13

Discipline : Biologie, Mention Biologie Moléculaire et Cellulaire

Etude des neutrophiles, des « neutrophil extracellular traps » et de la protéine C1q du complément dans les réponses inflammatoires : conséquences physiopathologiques dans la polyarthrite rhumatoïde et un modèle expérimental.

Présentée par

Matthieu Ribon

Soutenue publiquement le 19 juin 2015

Jury

Pr Sylvie Chollet Martin (Université Paris-Sud)	Rapporteur
Pr Jean Roudier (Université Aix-Marseille)	Rapporteur
Pr Guy Serre (Université de Toulouse)	Examineur
Pr Gérard Perret (Université Paris 13)	Examineur
Pr Marie-Christophe Boissier (Université Paris 13)	Co-encadrant
Dr Patrice Decker (Université Paris 13)	Directeur de thèse

« Vingt fois sur le métier remettez votre ouvrage... »

Nicolas Boileau

A mes parents avec toute ma reconnaissance....

REMERCIEMENTS

Je remercie respectueusement mon jury de thèse. Mes rapporteurs Sylvie Chollet-Martin et Jean Roudier, mes examinateurs Guy Serre, Gérard Perret, et Marie-Christophe Boissier d'avoir évalué mon travail.

Je tiens à remercier Marie-Christophe Boissier de m'avoir accueilli (une seconde fois) dans son laboratoire Li2P devenu entre temps Inserm U1125. Il m'a officiellement encadré pendant mes premières années de thèse. Marie-Christophe a, par l'organisation de son laboratoire, contribué à ma formation parascientifique. J'ai pu aussi grâce à lui et Patrice Decker présenter mes résultats en congrès internationaux.

Merci à Patrice Decker, mon directeur de thèse, de m'avoir fait confiance et sélectionné sur dossier. J'ai pu, au laboratoire, débiter un tout nouveau projet aux côtés de Patrice. Patrice m'a encadré rigoureusement et a permis la poursuite de ma formation scientifique et le développement de ma rigueur scientifique. Je me suis en retour beaucoup investi dans ce projet et j'espère avoir contribué à son développement.

Je remercie Julie Mussard, ma collègue la plus proche, qui m'a épaulé dans ce projet. Nous avons fait à nous deux, ensemble, bien plus que si nous avions travaillé chacun de notre côté. Cette complicité a souvent été mal comprise, voire mal interprétée mais je pense que nous avons fait correctement « le job ». Julie m'a aussi soutenu dans les moments (très) difficiles, liés au travail ou non. Je pense que sa présence m'a permis de tenir le rythme, et j'espère avoir été en retour un bon collègue et un bon ami (même si tu as essayé seule mes colères et mes angoisses).

Je remercie Eric Assier et Natacha Bessis qui, les premiers, m'ont fait confiance pour intégrer le laboratoire en Master 1, Allan Thiolat qui a soutenu ma candidature auprès de Patrice.

Merci à Allan qui a aussi été un bon collègue devenu un ami malgré nos quelques divergences. J'avoue qu'après son départ l'émulation nécessaire pour trouver la motivation a été bien diminuée. Allan m'a aussi beaucoup fait rire ce qui facilite grandement le labeur.

Je remercie les autres membres du laboratoire, en particulier les ingénieures, Delphine Lemeiter et Roxane Hervé pour l'aide et les bons moments apportés, Mylène pour l'organisation des prélèvements avec l'hôpital et les bons moments aussi et les chercheurs pour les discussions scientifiques, Luca Semerano, Anne Denys, Natacha Bessis, Eric Assier, Frédéric Caux et François pour la correction (hazardieuse) de l'orthographe. Je remercie, les animalisés : Stéphane, Sonia, Samira, Marine, pour avoir pris soin de nos souris.

Merci à Jérôme de m'avoir initié à la cytométrie en flux, ce qui a grandement facilité ma formation. Merci aussi pour l'émulation et les discussions avec Allan.

Je tiens aussi à remercier mes anciens collègues du CTSA ou j'ai effectué mon stage de M2, en particulier Juliette Peltzer mon encadrant, Cédric Thépenier qui m'ont formé techniquement et scientifiquement. Je remercie aussi Didier Lutomski qui m'a donné un petit coup de pouce au bon moment.

Je remercie Olivier Oudar, Dominique Ledoux, Dominique Briane, Jean Liquier, Jany Vassy, Michel Crépin, les professeurs emblématiques de l'UFR SMBH (pour certains partis en

retraite) qui je pense, m'ont donné l'envie de poursuivre mes études bien que je ne sois pas un rat de bibliothèque ni un étudiant brillant.

Je tiens à remercier les personnes qui ont cru en moi dès l'enfance, parce que je n'étais pas non plus un élève brillant. Je pense à certains professeurs et conseillers qui « œuvrent » en banlieue et qui sont (trop) souvent mal considérés.

Je remercie aussi les personnes qui n'y ont pas cru, qui ont piqué mon amour propre et qui ont fait de moi ce que je suis maintenant. A bon entendeur...

Je remercie Delphine Sabatier, qui, lorsqu'elle était auprès de moi m'a soutenu dans mes études et encouragé à faire cette thèse. Je lui dois beaucoup.

Enfin je remercie avant tout mes parents, Catherine et Alain, qui m'ont, par leur éducation, permis de devenir ce que je suis devenu et croire en la possibilité de faire une thèse ou bien même des études. Briques après briques mes parents m'ont construit et inculqué des valeurs que j'essaye à mon tour de partager. Je pense que générosité, intégrité et abnégation sont des valeurs qui manquent de nos jours. Je suis bien déçu qu'ils ne soient plus là pour voir l'aboutissement de mon travail, j'aurais été fier de leur présenter et il a souvent été très dur de poursuivre la route seul.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	5
SOMMAIRE	11
SOMMAIRE DES TABLEAUX ET FIGURES	17
ABREVIATIONS	23
INTRODUCTION	29
I. Les Neutrophiles.	31
A. Description et caractérisation des polynucléaires neutrophiles matures.	33
B. Récepteurs de l'immunité innée.	34
1. Les TLR.	35
2. Les Nod-Like-Récepteurs (NLR)	37
3. Les Rig-Like-Récepteurs (RLR)	37
4. Les Récepteurs aux lectines de type C (CLR)	37
5. FcR	37
6. Récepteurs aux cytokines et facteurs du complément.	38
C. Activation des neutrophiles.	38
1. La dégranulation.	39
2. La phagocytose.	39
3. Les NET (Neutrophils extracellular Traps).	40
4. Explosion oxydative.	40
5. Communication inter-cellulaire.	41
6. Résolution de l'inflammation.	42
D. Pathologies liées aux neutrophiles.	43
II. Les Neutrophil Extracellular Traps (NET).	45
A. Généralités.	45
B. Molécules associées aux NET.	46
C. Stimuli impliqués dans la formation de NET.	48
D. Mécanismes impliqués dans la formation de NET.	48
E. Fonctions des NET	50
F. Effets non inflammatoires des NET.	51
G. Etosis.	52
III. Le système du complément.	55
A. Généralités sur les voies du complément.	55
B. C1q	57
1. Structure de C1q	57
2. Fonctions de C1q et description de ses ligands.	58

3.	Autres fonctions de C1q et interactions cellulaires.	59
4.	Récepteurs à C1q	59
C.	Maladies liées au complément.	60
IV.	La polyarthrite rhumatoïde et ses modèles animaux.	61
A.	Etiologie de la PR.	61
B.	Aspects cliniques et diagnostic.	62
C.	Immunopathologie de la PR.	65
1.	Dérégulation lymphocytaire de la PR.	66
2.	Dérégulation cytokinique de la PR	67
3.	Auto-anticorps	69
4.	Implication des cellules ostéo-articulaires.	70
5.	Immunité innée dans la PR.	72
a)	Neutrophiles et PR.	73
b)	Complément et PR.	74
c)	Implication du TLR9 dans la PR et les modèles.	75
D.	Traitements de la PR.	77
1.	Les anti-TNF.	77
2.	Les anti-IL-6.	78
3.	L'anti-IL-1	78
4.	L'anti-CD20	78
5.	Inhibiteur de la costimulation des LT	78
E.	PR et modèles animaux	78
1.	La souris transgénique pour le TNF humain.	79
2.	Transfert de sérum K/BxN	79
3.	Le modèle CAIA (Collagen antibody-induced arthritis)	79
4.	Arthrite expérimentale au collagène.	79
	OBJECTIFS	83
	RESULTATS	89
I.	Article 1	91
	Neutrophil extracellular traps are not only passive targets for autoantibodies but also directly trigger pro- and anti-inflammatory effects partly mediated by the C1q complement protein.	91
II.	Article 2	131
	C1q is Mandatory for disease development in experimental arthritis and expression of its receptors correlates with disease activity in patients.	131

III. Article 3	145
Inflammation Develops in a Toll-like Receptor 9-Independent Manner in Experimental Arthritis and Rheumatoid Arthritis.	145
IV. Article 4	157
Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9.	157
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	173
I. Les NET sont reconnus par les ACPA et sont immunogènes.	175
A. Les immunoglobulines purifiées contenant des ACPA lient les NET.	175
1. Définition morphologique et moléculaire des NET.	175
2. Les IgG ACPA+ lient les NET	176
B. Les NET sont immunogènes.	176
1. Les NET solubles	177
2. Les NET ont un effet pro et anti-inflammatoire à la fois.	177
3. C1q module l'effet immunogène des NET.	178
II. C1q est nécessaire à l'(auto-) immunisation et l'expression de ses récepteurs reflète l'activité de la PR chez les patients.	179
A. C1q est indispensable au développement de l'AEC.	179
B. La fréquence des PNN et des monocytes exprimant les récepteurs à C1q est corrélée à l'activité de la maladie chez l'homme.	181
III. Les PNN murins et humains expriment un TLR9 de surface fonctionnel.	182
A. Un TLR9 de surface est exprimé sur les PNN et lie ses ligands.	182
B. Le TLR9 de surface exprimé par les PNN est fonctionnel.	182
C. Les anticorps utilisés sont spécifiques.	183
IV. L'arthrite et l'inflammation se développent indépendamment du TLR9.	184
A. Le TLR9 n'est pas nécessaire au développement de l'arthrite expérimentale au collagène.	184
B. Il n'y a pas de modification d'expression du TLR9 chez les patients PR.	185
CONCLUSION	187
BIBLIOGRAPHIE	191
ANNEXES	217
I. Annexe 1 : Figures et informations supplémentaires relatives à l'article 4 : Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9	219
II. Annexe 2 :TLR9 independent interferon α production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen.	233
III. Annexe 3 : Sécrétion de CEACAM8 soluble par les neutrophiles activés.	265

SOMMAIRE DES TABLEAUX ET FIGURES

Figure 1: Recrutement des PNN sur le site de l'inflammation et mécanismes d'élimination des pathogènes. _____	39
Figure 2: Phagocytose et action antimicrobienne par les neutrophiles. _____	40
Figure 3: Neutrophil Extracellular Traps (NET) _____	46
Figure 4: Mécanismes impliqués dans la libération de NET. _____	49
Figure 5: Schéma résumant les effets pathogènes des NET dans le LES. _____	51
Figure 6: Neutrophile : sa vie, son œuvre. _____	53
Figure 7: Activation des voies du complément. _____	56
Figure 8: Structure de C1q. _____	57
Figure 9: Représentation d'articulations arthritiques. _____	63
Figure 10: Interactions cellulaires dans l'articulation arthritique. _____	65
Figure 11: Différenciation des lymphocytes T CD4 et leur réponse immune. _____	67
Figure 12: Régulation de la différenciation des ostéoclastes. _____	72
Figure 13: Résumé de l'immunopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. _____	76
Figure 14: Les souris C1q ^{-/-} ne développent pas de signe d'arthrite. _____	137
Figure 15 : Production d'anticorps anti-CII. _____	138
Figure 16: Isotypes anti-CII. _____	139
Figure 17: Fréquence et activation des leucocytes du sang. _____	140
Figure 18: Cytokines produites dans le plasma. _____	140
Figure 19: Capacité d'ostéoclastogénèse et de résorption osseuse des cellules de moelle osseuse des souris après un protocole d'AEC. _____	141
Figure 20: C3a est produit au cours de l'AEC, même dans les souris C1q ^{-/-} . _____	141
Figure 21: La fréquence des neutrophiles et macrophages capables de lier C1q est corrélée à l'activité de la maladie et à l'inflammation. _____	142
Figure 22: Le TLR9 n'est pas nécessaire au développement de l'AEC. _____	149
Figure 23: L'inflammation et la destruction articulaires sont similaires chez les souris TLR9-KO et sauvages. _____	149
Figure 24: La production d'anticorps anti-collagène est similaire chez les souris n'exprimant pas le TLR9 comparées aux souris sauvages. _____	150
Figure 25: Les cellules de souris TLR9-KO et sauvages ont les mêmes capacités d'ostéoclastogénèse. _____	151
Figure 26: Cytokines produites in vivo au cours de l'AEC. _____	152
Figure 27: Les souris TLR9-KO expriment le TLR7 à un taux similaire comparé aux souris sauvages dans l'AEC. _____	152
Figure 28: Les souris TLR9-KO répondent plus fortement à un ligand TLR7 _____	153

Figure 29: Le TLR9 n'est pas surexprimé dans les cellules de patients PR. _____	154
Figure 30: Le TLR9 endosomal est surexprimé après stimulation un agoniste. _____	155
Figure 31: Les neutrophiles activés de donneur sain sécrètent CEACAM8 soluble. _____	266
Tableau 1: Contenu des granules des PNN (homme). _____	33
Tableau 2: Principaux récepteurs exprimés par les polynucléaires neutrophiles. _____	35
Tableau 3: Description des TLR exprimés chez l'homme. _____	36
Tableau 4: Implication et rôle des neutrophiles humains dans les maladies auto-immunes. _____	44
Tableau 5: Tableau récapitulatif des stimuli et des mécanismes impliqués dans la formation de NET et protéines associées à ceux-ci. _____	47
Tableau 6: Ligands classiques et non classiques de C1q. _____	59
Tableau 7: Critères ACR/EULAR 2010 pour le diagnostic d'une polyarthrite rhumatoïde. _____	64
Tableau 8: Cytokines impliquées dans l'immunopathologie de la PR. _____	68

ABREVIATIONS

ACPA:	« Anti-citrullinated protein antibody », anticorps anti-protéine citrullinée
ADCC:	« antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity », cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps
ADN:	Acide désoxyribonucléique
AEC :	Arthrite expérimentale au collagène
AFA :	« Anti-filagrin antibody »
AKA :	« Anti-keratine antibody »
ANCA :	« Anti-neutrophil cytoplasmic antibody, anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles »
APF :	« Anti-perinuclear factor »
APRIL:	« A proliferation-inducing ligand »
ARN:	Acide ribonucléique
ATP:	Adénosine triphosphate
BAFF:	« B-cell activating factor »
BCL-2:	« B cell lymphoma 2 »
BCR :	« B cell receptor », récepteur des cellules (lymphocytes) B
Blys:	« B Lymphocyte Stimulator »
BPI :	« Bactericidal/permeability-increasing protein »
CAIA:	« Collagen antibody induced arthritis »
CCL :	« Chemokine (C-C motif) ligand »
CCR:	« Chemokine (C-C motif) receptor »
CD:	« Cluster » de différenciation
CEACAM:	« Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule »
CFA :	« complete Freund adjuvant », adjuvant complet de Freund
CI :	« Complexe immunitaire »
CII:	Collagène de type II, Cx collagène de type x
CLR:	« C-type lectine receptor », récepteur lectines de type C
CLR:	« Collagen like region » (C1q)
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité
COMP :	« Cartilage oligomeric matrix protein »
CPA :	Cellule présentatrice d'antigène
CR:	« Complement receptor »
CRP:	« C-reactive protein », protéine C-réactive
CTLA-4:	« Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 »
CXCL:	« Chemokine (C-X-C motif) ligand »
CXCR :	« Chemokine (C-X-C motif) receptor »
DAMP :	« Damage associated molecular pattern », motif moléculaire associé à un dommage.
DNase :	désoxyribo-nucléase.
DAS28:	« Disease activity score 28 », score d'activité de la maladie
DC :	« Dendritic cell », cellule dendritique
DMARD:	« Disease modifying anti-rheumatic drug »
DPI:	diphénylèneiodonium
EBV:	Virus Epstein-Barr
EDTA:	« Ethylenediaminetetraacetic acid »
ET:	« Extracellular traps »

FcR :	« Fragment crystallizable receptor », Récepteur de la fraction constante
fMLP:	N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine
FPR:	« Formyl-peptide receptors »
FR :	Facteur rhumatoïde
G6PI:	Glucose-6-phosphate isomérase
G-CSF :	« Granulocyte colony-stimulating factor »
GM-CSF:	« Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor »
H:	Histone
HIV :	« human immunodeficiency virus »
HLA-DR :	« Human leukocyte antigens-DR »
HMGB1:	« High mobility group box 1 »
IA:	Intra-articulaire
ICAM :	« intercellular adhesion molecule »
IFN:	Interféron
IFN-I:	Interféron de type I
Ig :	Immunoglobuline
IL:	Interleukine
IRAK :	« Interleukin-1 receptor-associated kinase »
IRF :	« Interferon regulatory factor »
KO :	« Knock out »
LB :	Lymphocyte B
LDG:	« Low density granulocyte »
LES :	Lupus érythémateux systémique
LPS :	Lipopolysaccharide
LT :	Lymphocyte T
LTB4:	Leucotriène B4
MAC:	« Membrane attack complex », complexe d'attaque membranaire
MAL :	« MyD88-adaptor-like »
MASP:	« MBL-associated serine protease »
MBL:	« Mannose-binding lectin” ou “Mannan-binding lectin »
MCP:	« monocyte chemotactic protein 1 »
M-CSF :	« macrophage colony-stimulating factor »
Med :	« Medium », milieu
MFI :	« Mean fluorescence intensity », moyenne d'intensité de fluorescence
MIP:	« Macrophage inflammatory protein »
MMP :	« Matrix metalloproteinase », métalloprotéinase matricielle
MNDA:	« Myeloid cell nuclear differentiation antigen »
moDC:	« Monocyte derived dendritic cell »
MPO :	Myéloperoxydase
MTX:	Méthotrexate
MyD88:	« Myeloid differentiation primary response gene 88 »
NAC:	N-acetylcystéine
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène
Nb:	Nombre
NE:	« Neutrophil elastase »
NET :	« Neutrophil extracellular traps »

NK:	« Natural Killers »
NLR :	« nucleotide-binding oligomerization domain ou Nod like receptor, récepteur de type Nod »
NLRP3 :	« NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 »
NO:	Monoxyde d'azote
NOX:	NADPH Oxydase
PAD:	« peptidyl arginine deiminase »
PAF:	« Platelet-activating factor »
PAFR:	« Platelet-activating factor receptor »
PAMP:	« Pathogen associated molecular pattern », motif moléculaire associé à un pathogène
PBMC:	Cellules mononucléées du sang périphérique.
pDC :	Cellule dendritique plasmacytoïde
PMA:	« Phorbol myristate acetate »
PNN :	Polynucléaire neutrophiles
PR :	Polyarthrite rhumatoïde
PRR :	« Pattern recognition receptors », Récepteur de reconnaissance de motifs
PSGL-1 :	« P-selectin glycoprotein ligand-1 »
PTPN22:	« Tyrosine phosphatase non-receptor type 22 »
R :	Récepteur
RANKL:	« Receptor activator of nuclear factor kappa-B (NFκB) ligand »
RE:	Reticulum endoplasmique
RIG-I:	« Retinoic acid-inducible gene 1 »
RLR :	« RIG-I like receptor », récepteur de type RIG
ROS:	« Reactive oxygen species », formes réactives de l'oxygène
SCAMP :	« Secretary membrane carrier protein »
SDF-1:	« Stromal cell-derived factor 1 »
SNP:	« Single-nucleotide polymorphism », polymorphisme nucléotidique
STAT4:	« Signal transducer and activator of transcription 4 »
SOD:	« Superoxyde dismutases »
TCR :	« T cell receptor », récepteur des cellules (lymphocytes) T
TGF :	« Transforming growth factor »
Th :	Lymphocyte T « helper », lymphocyte T auxiliaire
TIR:	« Toll/Interleukin receptor »
TLR :	« Toll like receptor », récepteur de type Toll
TNF :	« Tumor necrosis factor »
TRAF-C5:	« Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 », complement component 5
TRAP :	« Tartrate resistant alkaline phosphatase »
Treg :	Lymphocyte T régulateur
VAMP:	« Vesicle associated membrane protein »
VEGF:	« Vascular endothelial growth factor »
VLA-4 :	« Very Late Antigen-4 »
VS :	Vitesse de sédimentation

INTRODUCTION

L'immunité innée constitue la première ligne de défense contre les pathogènes. Elle est rapide et suffisante dans la plupart des cas pour juguler les infections. Elle est aussi nécessaire pour initier l'immunité adaptative qui prend le relais en cas de débordement de l'immunité innée. L'immunité innée est constituée d'acteurs mécaniques (la peau, les muqueuses, le mucus), d'acteurs solubles (les protéines du complément et les cytokines) et cellulaires (granulocytes, macrophages, natural killers (NK), cellules dendritiques (DC)). On dit souvent que l'immunité innée n'est pas spécifique au sens immunologique du terme (pas de répertoire T et B, mémoire immunologique), pourtant les acteurs cellulaires et solubles reconnaissent et répondent à des motifs spécifiques présents sur les pathogènes (les PAMP pour pathogen associated molecular pattern). L'immunité innée n'a pas besoin d'éducation et répond immédiatement aux stimuli d'une façon prédéfinie par sa nature.

I. Les Neutrophiles.

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) composent en grande partie (95%) la famille des granulocytes avec les polynucléaires éosinophiles et basophiles (4% et 1% respectivement). Ce sont les leucocytes les plus présents dans le sang. Ils représentent 50 à 70% des leucocytes du sang de l'homme.

Les PNN sont dans la majorité des cas les premières cellules à arriver sur le site d'inflammation. Ce sont principalement des cellules phagocytaires mais possèdent un arsenal anti-pathogène large, via par exemple le contenu antimicrobien de leurs granules ou la formation de NET (Neutrophil Extracellular Traps). A eux seuls ils sont capables d'éliminer les pathogènes mais sécrètent aussi un large éventail de cytokines et de chimiokines. Ils peuvent ainsi recruter d'autres cellules immunitaires mais aussi créer une boucle d'amplification de recrutement et d'activation d'autres PNN.

Les granulocytes neutrophiles sont formés au cours de la myélopoïèse dans la moelle des os plats. Succinctement, les neutrophiles sont issus de la différenciation des myéloblastes, et vont acquérir au cours des différents stades de leur différenciation (schématisé en Figure 6) leurs granules et leur noyau plurilobé caractéristique (1). Ils acquerront aussi leurs autres caractéristiques morphologiques et fonctionnelles décrites plus bas (voir caractérisation des PNN). La différenciation des neutrophiles est séquentielle et régulée par l'expression de facteurs de transcription (2) (Figure 6). Une fois arrivés à maturation, les PNN sont libérés dans la circulation mais un grand nombre restera stocké dans la moelle afin d'être libérés au fur et à mesure des besoins. La balance entre libération et retenue des PNN dans la moelle est régie par deux couples chimiokines/récepteurs, Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL) 12 (ou SDF-1)/Chemokine (C-X-C motif) receptor (CXCR) 4 et CXCL1 et 2/CXCR2. La stimulation de CXCR4 induit la rétention des PNN dans la moelle tandis que la stimulation CXCR2 entraîne la libération des PNN dans la circulation. Le Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) quant à lui fera pencher la balance en faveur de la libération des PNN matures dans la circulation en limitant la production de CXCL12 et en accentuant la sécrétion de CXCL1 et 2(2).

Comme évoqué précédemment, il existe quatre différents types de granules caractérisés par leur contenu et la précocité de leur formation au cours de la différenciation des neutrophiles mais aussi par la facilité de leur mobilisation. Les granules sont formés en même temps que les neutrophiles se différencient. On a longtemps pensé que la formation des granules était due à la fusion des vésicules issues du réseau transgolgien (1,3), mais aujourd'hui il est rapporté que certaines protéines des granules sont adressées directement aux granules sans passer par des vésicules(4). Les mécanismes d'adressage restent encore largement méconnus. Les granules permettent de contenir les molécules cytotoxiques produites par les PNN et ainsi protéger ces cellules d'elles-mêmes.

Les granules azurophiles apparaissent tôt au cours de la formation des neutrophiles, au stade promyélocytes (1). Ils sont dits granules primaires et contiennent les peptides et protéines anti-microbiens qui seront libérés dans le phagolysosome, en particulier la myéloperoxydase (MPO) (Tableau 1). Les granules azurophiles sont difficilement mobilisables et ne seront libérés qu'à la fin du cycle bactéricide du neutrophile.

Les granules spécifiques ou secondaires apparaissent plus tard au cours du développement, au stade myélocyte(1) et contiennent principalement la lactoferrine, la cathélicidine (LL-37) et des gélatinases en faible concentration mais pas de peroxydase (5) (Tableau 1). Ces granules contiennent en revanche certains composants de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène (NADPH) oxydase comme le flavocytochrome b558. En fusionnant avec la membrane cellulaire, les granules spécifiques apporteront les éléments manquants pour la construction d'une NADPH oxydase fonctionnelle. Ces granules sont plus facilement mobilisables que les granules primaires mais sont libérés relativement tard dans le processus cytotoxique des PNN. La libération de ces granules représente le début de la phase bactéricide du neutrophile activé.

Les granules gélatinases (ou tertiaires) sont synthétisés à partir du stade métamyélocyte. Ils contiennent des gélatinases et autres métalloprotéinases utiles aux granulocytes pour faciliter leur passage à travers l'endothélium. Ces granules sont facilement mobilisables et interviennent précocement dans la phase bactéricide.

Enfin il existe une quatrième catégorie de granules, les vésicules sécrétoires, très facilement mobilisables, ils sont formés à la fin de la différenciation des PNN (Figure 6). Leur rôle est de faciliter l'adhérence du PNN après son amorçage.

Granules Azurophiles	Granules Spécifiques	Granules Gélatinases	Vésicules Sécrétoires
Membrane	Membrane	Membrane	Membrane
CD63	CD11b	CD11b	phosphatase alcaline
CD68	CD15	Cytochrome b ₅₅₈	CD35 (récepteur C3b/C4b)
V-type H ⁺ ATPase	CD66a	“Diacylglycerol-deacylating enzyme”	Cytochrome b558
	CD66b	fMLP-R	CD11b
Matrice	Cytochrome b558	SCAMP ou “secretary membrane carrier protein”	CD14
Acide β-glycérophosphatase	fMLP-R	Urokinase	CD16
Acide mucopolysaccharide	Fibronectine-R	VAMP-2 ou « vesicle associated membrane protein »	fMLP-R
α ₁ -Antitrypsine	Sous unité α protéine G	V-type H-ATPase	SCAMP
α -Mannosidase	Laminine-R		Urokinase
Azurocidine/CAP37	antigène NB 1	Matrice	V-type H –ATPase
BPI	19-kD protéine	Acetyltransferase	VAMP-2
β-Glycérophosphatase	155-kD protéine	β ₂ -Microglobuline	CD10
β-Glucuronidase	Rap1,Rap2	Lysozyme	CD13
Cathepsine G	SCAMP	Gélatinase (MMP-2,-8,-9)	CD45
Défensines	Thrombospondine-R		récepteur au C1q
Elastase	TNF-R		CD55 (DAF)
Lysozyme	Urokinase		
Myéloperoxidase	VAMP-2		Matrice
N-Acétyle-β-glucosaminidase	Vitronectine-R		Protéines plasmatiques
Protéinase-3			
Sialidase ou Neuraminidase	Matrice		
Proteines Ubiquitinylées	β ₂ -Microglobuline		
	Collagénase		
	Gélatinase		
	hCAP-18 ou cathélicidine ou LL-37		
	Histaminase		
	Héparanase		
	Lactoferrine		
	Lysozyme NGAL		
	Urokinase		
	Sialidase ou Neuraminidase		
	SGP28		
	“Vitamine B ₁₂ -binding protein”		

Tableau 1: Contenu des granules des PNN (homme).

Adapté de Borregaard et Cowland(5).

A. Description et caractérisation des polynucléaires neutrophiles matures.

Initialement les polynucléaires neutrophiles ont été différenciés des autres granulocytes grâce à la coloration May-Grünwald Giemsa. En effet les dénommés neutrophiles sont colorés par les colorants neutres tandis que les éosinophiles ou les basophiles sont colorés par l'éosine et les colorants basiques, respectivement. Les granulocytes sont d'abord caractérisés par un cytoplasme « granuleux » : comme vu précédemment, ils contiennent une panoplie hétérogène de granules mais aussi un noyau plurilobé. Ils sont aussi caractérisés par une hétérogénéité de leur taille, taille souvent dépendante du degré d'activation. Ces caractéristiques morphologiques permettent de repérer assez facilement les granulocytes parmi les leucocytes du sang, lors des analyses par cytométrie en flux, sans même utiliser de marqueurs spécifiques.

Il est néanmoins nécessaire d'étudier des marqueurs plus précis pour caractériser plus en détails les granulocytes. Il n'existe pas à ce jour de marqueurs réellement spécifiques des neutrophiles. Les granulocytes expriment différentes molécules d'adhérence de la famille des intégrines (famille $\beta 2$) et sélectines comme CD11a, CD11b, CD11c, CD18, VLA-4 et L-sélectine et P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)(6). Il est courant que ces marqueurs soient surexprimés après l'activation (excepter pour CD62L) et que ces molécules soient apportées par la fusion des granules avec la membrane plasmique. Néanmoins, CD66b (« Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8 ou CEACAM 8 ») est le marqueur principal des neutrophiles humains. Il est largement utilisé en cytométrie en flux pour distinguer précisément les granulocytes des autres leucocytes. CD66b est aussi surexprimé lors de l'activation des granulocytes. D'autre part comme les monocytes et macrophages ou cellules dendritiques, les granulocytes expriment CD14, un co-récepteur du LPS (LipoPolySaccharide) constituant de la membrane des bactéries. D'ailleurs les PNN expriment une grande variété de récepteurs aux PAMP.

B. Récepteurs de l'immunité innée.

Les PNN expriment une grande variété de récepteurs aux PAMP leur permettant de reconnaître un large éventail de pathogènes. Ceux-ci sont appelés PRR (Pathogen Recognition Receptor). Ces récepteurs sont aussi capables de reconnaître les signaux de dommages (DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern). Il existe différents types de PRR aux fonctions variées (Tableau 2). Les Toll Like Receptors (TLR) représentent une part non négligeable de ces PRR bien que ce ne soit pas les seuls PRR exprimés par les PNN, néanmoins les autres PRR ne seront pas détaillés. Les PNN expriment aussi d'autres récepteurs comme par exemple les récepteurs aux chemoattractants ou aux cytokines et les récepteurs aux fractions cristallisables des immunoglobulines (récepteurs Fc ou FcR) (Tableau 2).

Récepteurs couplés aux protéines G	Récepteurs Fc	Récepteurs d'adhérence	Récepteurs aux cytokines	Récepteurs de l'immunité innée (PRR)
<i>Formyl-peptide receptors</i> • FPR1 (FPR) • FPR2 (FPRL1) • FPR3 (FPRL2) <i>Classical chemoattractant receptors</i> • BLT1 (LTB ₄ -rec.) • BLT2 (LTB ₄ -rec.) • PAFR • C5aR <i>Chemokine receptors</i> • CXCR1 (human) • CXCR2 • CCR1 • CCR2	<i>Fcγ-receptors</i> • FcγRI • FcγRIIA (human) • FcγRIIB (inhibitory) • FcγRIII (mouse) • FcγRIIIB (human) • FcγRIV (mouse) <i>Fcα-receptors</i> • FcαRI (human) <i>Fcε-receptors</i> • FcεRI • FcεRII	<i>Selectins and selectin ligands</i> • L-selectin • PSGL-1 <i>Integrins</i> • LFA-1 (α _L β ₂) • CD11b Mac-1 (α _M β ₂) • VLA-4 (α ₄ β ₁)	<i>Type I cytokine receptors</i> • IL-4R • IL-6R • IL-12R • IL-15R • G-CSFR • GM-CSFR <i>Type II cytokine receptors</i> • IFNAR (IFNα/β-rec.) • IFNGR • IL-10R <i>IL-1R family</i> • IL-1RI • IL1RII (decoy) • IL-18R <i>TNFR family</i> • TNFR1 (p55) • TNFR2 (p75) • Fas • LTβR • RANK • TRAIL-R2 • TRAIL-R3	<i>Toll-like receptors</i> • TLR1 • TLR2 • TLR4 • TLR5 • TLR6 • TLR7 • TLR8 • TLR9 • TLR10 <i>C-type lectins</i> • Dectin-1 • Mincle • MDL-1 • Mcl • CLEC-2 <i>NOD-like receptors</i> • NOD2 • NLRP3 <i>RIG-like receptors</i> • RIG-I • MDA5 <i>Récepteur au complément</i> • Récepteurs à C1q

Tableau 2: Principaux récepteurs exprimés par les polynucléaires neutrophiles.

Adapté de Futosi et Al(6).

1. Les TLR.

Les PNN expriment les TLR 1-10 (7), excepté le TLR3 (8). Les PNN reconnaissent ainsi un large panel de motifs associés aux pathogènes (Tableau 3). Les TLR 1, 2, 4, 5, 6, sont présents sur la membrane cellulaire, tandis que les TLR 3, 7, 8, 9, qui reconnaissent essentiellement les acides nucléiques, sont exprimés dans les endosomes, cependant les TLR9 et 10 sont exprimés à la fois dans les endosomes et à la membrane plasmique. Les TLR sont des récepteurs transmembranaires, la transduction du signal des TLR exprimés par les PNN dépend de la formation du Myddosome et du Trifosome dans le cas du TLR3. Le Myddosome est l'assemblage de MyD88, une protéine adaptatrice, au domaine TIR (Toll/Interleukin receptor) des TLR dimérisés, entraînant le recrutement des kinases Interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) 1, 2 et 4. Le Trifosome représente un mécanisme analogue à la formation du Mydosome mais ne s'assemble que dans le cas d'une stimulation du TLR3. L'activation des TLR et de leurs voies de signalisation conduisent à l'activation de NF-κB et donc à la production et sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de molécules d'adhérence. Les TLR 7 au 9 via IRF7 conduisent à la production d'interféron de type 1 (IFN-I) (9).

Nom	Compartiment cellulaire	PAMP	DAMP et ligands endogènes	ligand synthétique	Production cytokinique
TLR1 + TLR2	membrane plasmique	Triacyl lipopeptides bactériens et certaines protéines parasitaires		Pam3CSK4	cytokines pro-inflammatoires
TLR2 + TLR6	membrane plasmique	Diacyl lipopeptides bactériens, acide lipotectoïque (Gram+), Zymosan (paroi des levures)	HSP60/70, HMGB1 (complexée ou non au nucléosome), anticops anti-phospholipides, serum amyloïde A	FSL-1	cytokines pro-inflammatoires
TLR3	endosome	ARN double brin	ARN messenger, ARN de transfert	Poly(I:C)	cytokines pro-inflammatoires et IFN β
TLR4	membrane plasmique	LPS	HMGB1, Fibrinogen, élastase de neutrophiles, anticorps anti phospholipides, fragments d'héparane sulfate		cytokines pro-inflammatoires et IFN de type I
TLR5	membrane plasmique	Flagelline			cytokines pro-inflammatoires
TLR7	endosome	ARN simple brin	ARN simple brin endogène	ARN synthétique, resiquimod (R848), imiquimod	cytokines pro-inflammatoires et IFN de type I
TLR8	endosome	ARN simple brin	ARN simple brin endogène	ARN synthétique, resiquimod (R848)	cytokines pro-inflammatoires et IFN de type I
TLR9	endosome et membrane plasmique	ADN riche en motifs CpG hypométhylés (bactérie, virus)	CI contenant de la chromatine, ADN à la surface de cellules apoptotiques, ADN mitochondrial génomique ADN tumoral	oligonucléotides riches en motifs CpG (CpG-ODN)	cytokines pro-inflammatoires et IFN de type I
TLR10 + TLR2	endosome et membrane plasmique		Inconnu	Pam3CSK4	inhibe l'action du TLR2, inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires, production d'IL1-Ra

Tableau 3: Description des TLR exprimés chez l'homme.

CI : complexes immuns ; IFN : interféron.

Concernant l'expression endosomale des TLR, il existe une théorie admise par un grand nombre et qui décrit cette expression intracellulaire comme un moyen d'éviter que les TLR, en particulier le TLR9, ne reconnaissent des ligands « inappropriés » comme l'ADN du soi(10). Cette reconnaissance de ligands endogènes pourrait participer à l'émergence de maladies auto-immunes.

◆ *TLR9*

Le TLR9 est donc un des TLR exprimé dans les neutrophiles mais son expression n'est pas restreinte à ces cellules. La majorité des cellules de l'immunité (innée ou adaptative) expriment le TLR9 ainsi que certaines cellules non immunitaires comme les cellules épithéliales pulmonaires ou les cellules intestinales. Il est décrit que l'expression du TLR9 est restreinte dans l'endosome mais une étude de 2004 a montré que certaines sous-populations de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) des amygdales expriment le TLR9 à leur surface(11). D'autres équipes ont confirmé l'expression d'un TLR9 à la surface des

lymphocytes B(12) (LB). Guerrier et al. démontrent aussi l'expression d'un TLR9 de surface sur les LB des amygdales mais découvrent aussi un rôle de ce TLR9 répresseur du TLR9 endosomal(13). Ces résultats s'opposent à la démonstration initiale de Barton, qui avec des cellules transfectées, avait forcé l'expression du TLR9 à la surface de monocytes. En effet, Barton avait alors rapporté que l'expression d'un tel TLR engendrait la reconnaissance de ligands endogènes comme l'ADN du soi(10). Enfin, Lee et al. ont montré une expression du TLR9 à la surface apicale et basale des cellules épithéliales de l'intestin. De façon intéressante, la polarisation des cellules entraîne une différence de réponse à la stimulation des TLR9 de surface, la stimulation du TLR9 apical entrainerait une tolérance contrairement à la stimulation du TLR9 basal(14). La réponse différentielle du TLR9 ne serait donc pas due uniquement à sa répartition à la surface ou dans l'endosome mais à un ensemble de mécanismes non encore élucidés. De la même façon, il semblerait que tous les ligands du TLR9 ne soient pas encore connus. Classiquement, les ligands reconnus par le TLR9 sont les motifs CpG hypométhylés des ADN bactériens et viraux ; cependant le TLR9 reconnaît aussi des DAMP notamment la chromatine du soi sous forme de complexes immuns(15,16), de l'ADN mitochondrial(17), les histones(18) mais pas la chromatine libre(19). D'après Haas, ce serait principalement la structure du squelette sucre-phosphate qui serait reconnue par le TLR9(20).

2. Les Nod-Like-Récepteurs (NLR)

Les NLR sont des récepteurs cytoplasmiques. Les PNN expriment NOD2 et NLRP3. NOD2 recense les protéoglycanes des bactéries Gram- et active les voies de NFκB et de MAPK conduisant à la production d'interleukine (IL)-8. NLRP3 est sensible à certains DAMP, son activation conduit à la formation de l'inflammasome et à la sécrétion d'IL-1β.

3. Les Rig-Like-Récepteurs (RLR)

Les RLR sont sensibles aux ARN dérivés de virus. Leur activation conduit à la production d'interféron de type I (21). Les PNN expriment RIG-I et MDA5.

4. Les Récepteurs aux lectines de type C (CLR)

Les CLR reconnaissent certains carbohydrates comme le mannose, fucose, et polymères de glucose. Les CLR présents dans les PNN permettent de recenser certaines bactéries comme *M. Tuberculosis* ou virus comme HIV1 (human immunodeficiency virus 1).

5. FcR

Les FcR présents sur les PNN leur permettent de reconnaître les IgG via les FcγR, IgA via FcαR(22) et IgE via FcεRI. Les FcγR présents sur les PNN leur permettent d'initier la phagocytose de particules opsonisées d'IgG, de promouvoir la lyse cellulaire ou bactérienne par un phénomène d'ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps). L'ADCC par les PNN et les cellules NK est modulée par différentes glycosylations des IgG(23).

6. Récepteurs aux cytokines et facteurs du complément.

Les PNN expriment plusieurs récepteurs aux cytokines, par exemple IL-6R et IL-1R1, mais ne seront pas détaillés ici. Ils sont néanmoins présentés dans le Tableau 2. Par contre, les récepteurs au C1q sont décrits page 59.

C. Activation des neutrophiles.

Tout au long de leur courte vie circulatoire, les PNN sondent aléatoirement la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins à la recherche de signes d'agressions. Les PNN expriment à leur surface des L-sélectines, intégrines et PSGL-1 leur permettant d'effectuer cette tâche. Les premiers signes d'infection sont relayés par les cellules endothéliales sensibles au LPS et fMLP (Formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine) issus de bactéries. Les cellules endothéliales s'activent aussi en réponse aux cytokines inflammatoires sécrétées dans les premiers temps de l'infection par les macrophages tissulaires (IL-1 β , TNF pour tumor necrosis factor). L'activation des cellules endothéliales se reflète par l'expression à leur surface de P et E sélectines. La rencontre des L-sélectines et PSGL-1 exprimées sur les neutrophiles et des P-sélectines et E-sélectine exprimées sur les cellules endothéliales entraîne une adhérence faible des PNN à la paroi du vaisseau (Figure 1). S'en suit le roulement du neutrophile le long de la paroi endothéliale et l'initiation de son activation. Les PNN se dirigent selon le gradient de chimiokines et d'autre médiateurs émis par les cellules endothéliales activées (PAF, LTB₄, IL-8) (Figure 1). Ces mêmes chimio-attractants entraînent l'engagement des intégrines β 2 (CD11a, b, c, CD18) des PNN conduisant à une adhérence ferme sur la paroi via ICAM (Intercellular adhesion molecule). La surexpression rapide des molécules d'adhérence est permise par la fusion des vésicules sécrétoires avec la membrane des PNN. L'adhérence ferme est immédiatement suivie de la transmigration à travers l'endothélium. Ce mécanisme serait facilité par la mise en œuvre des gélatinases ou métalloprotéinases matricielles (MMP-8 et -9) contenues dans les granules tertiaires. Une fois la barrière endothéliale traversée, les PNN se trouvent dans un milieu inflammatoire. Ils poursuivent leur migration vers la source d'infection grâce au gradient de chimiokines produites par l'hôte mais aussi grâce aux chemoattractants dérivés des pathogènes (fMLP). Ces derniers activent la voie MAP kinase qui conduit d'une part à la mise en place de la machinerie oxydative et d'autre part à libération d'ATP contribuant à l'autoactivation des PNN. De la même façon, l'activation des PRR (par exemple les TLR) par leurs ligands entraîne cette mise en place de la machinerie oxydative et une activation plus intense des PNN. L'activation est totale lorsque les PNN atteignent « l'épicentre » du gradient de chimiokines. Ils entament alors la phase finale de destruction du pathogène selon trois phénomènes : la dégranulation dans le milieu, la phagocytose du pathogène ou la formation de NET. L'activation des neutrophiles engendre aussi la sécrétion de chimiokines par les PNN eux-mêmes, en particulier l'IL-8, afin d'entretenir ou d'amplifier la réaction inflammatoire (24)(25).

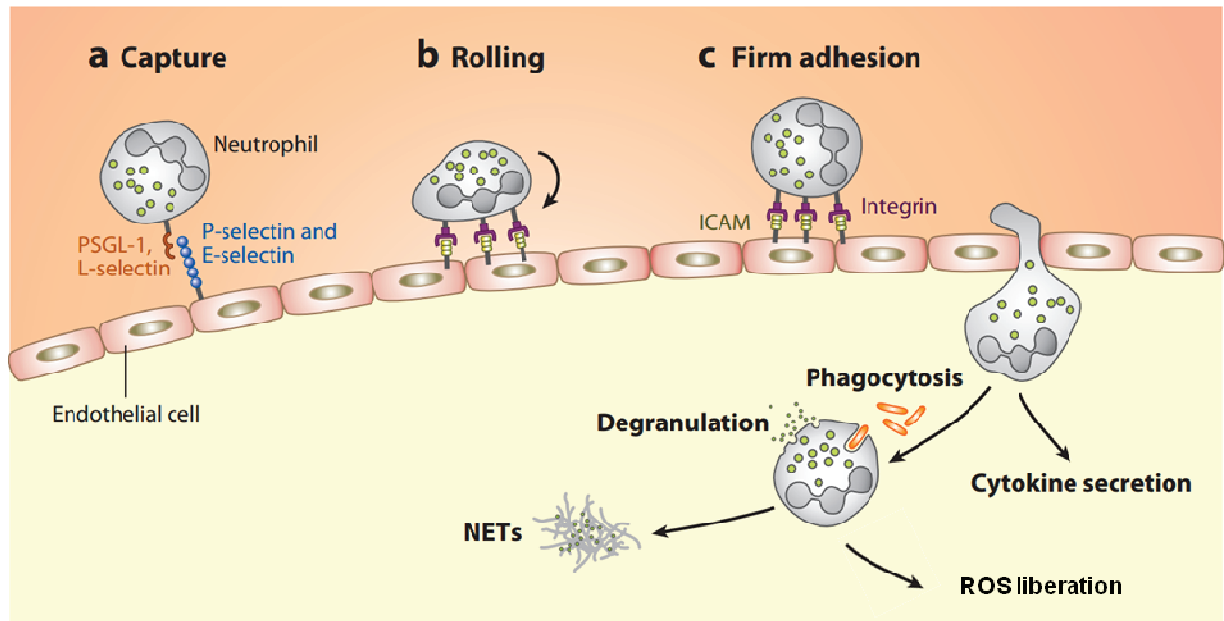


Figure 1: Recrutement des PNN sur le site de l'inflammation et mécanismes d'élimination des pathogènes.

a. les cellules endothéliales activées présentent des sélectines qui permettent un arrimage (capture) des PNN (neutrophil) à la surface de l'endothélium. b. les PNN roulent (rolling) le long de l'endothélium en direction d'un gradient chimiotactique. c. le roulement est suivi d'une adhérence ferme (firm adhesion) des PNN sur l'endothélium et d'extravasation. Les PNN commencent leur action anti-microbienne suivant quatre phénomènes ; phagocytose, dégranulation, libération de NET, et libération de ROS ou explosion oxydative. Les PNN sécrètent aussi des cytokines pour recruter d'avantage de cellules sur le site. Adapté de Amulic et al. 2012 (24).

1. La dégranulation.

La libération dans le milieu extracellulaire des granules spécifiques et azurophiles entraîne la formation d'un milieu inhospitalier et même toxique pour les pathogènes. Ces deux types de granules contiennent les molécules bactéricides comme les défensines, cathélicidines (en particulier LL-37) et BPI (bactericidal permeability increasing protein) mais aussi des composants de la NADPH oxydase (NOX), qui associés à ceux fournis par les membranes et le cytosol(26), forment un complexe oxydatif fournissant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) au fort pouvoir bactéricide, qu'on nomme l'explosion oxydative. Ce point sera plus détaillé dans un chapitre dédié. La dégranulation peut également avoir lieu dans le phagosome afin d'éliminer le pathogène internalisé lors de la phagocytose. La dégranulation a lieu de façon séquentielle, les vésicules sécrétoires sont mobilisées en premier, puis les granules gélatineses, granules spécifiques et enfin granules azurophiles.

2. La phagocytose.

La phagocytose consiste en l'internalisation de micro-organismes ou de particules. Elle peut être déclenchée directement par la reconnaissance des PAMP par les PRR ou par la reconnaissance par les FcR de particules opsonisées d'IgG ou bien même peut être médiée

par le système du complément. La fusion des granules avec le phagosome participe à sa maturation. On retrouve aussi les mêmes phénomènes bactéricides évoqués ci dessus (Figure 2).

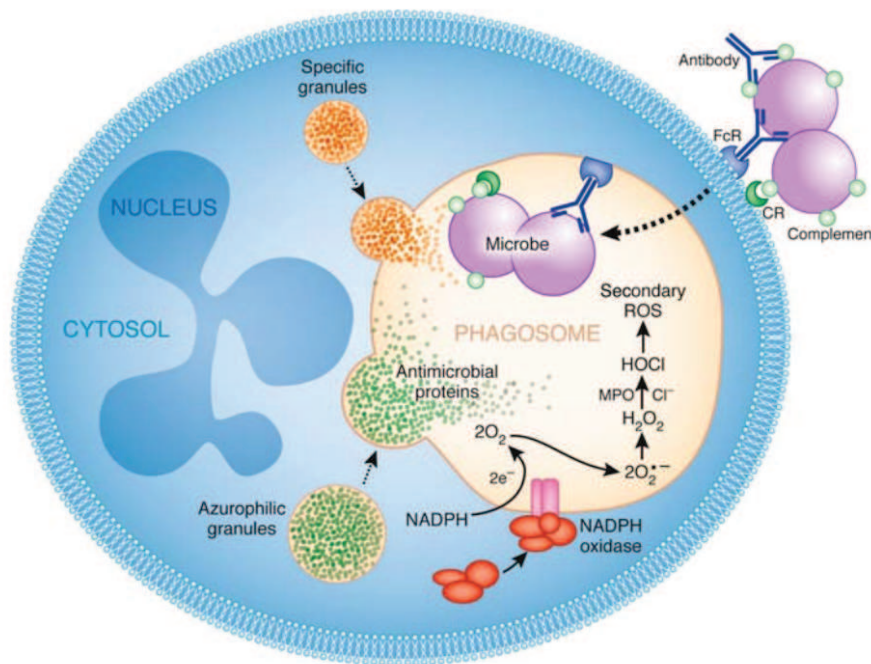


Figure 2: Phagocytose et action anti-microbienne par les neutrophiles.

La phagocytose est facilitée par l'opsonisation des pathogènes par des immunoglobulines (Ig) ou des protéines du complément qui seront reconnues par les FcR et les récepteurs du complément (CR) respectivement. Une fois internalisés, les pathogènes sont détruits par les ROS issus de la NADPH oxydase et par les protéines antimicrobiennes contenues dans les granules qui fusionnent avec le phagosome. Tiré de Kennedy, 2009 (27).

3. Les NET (Neutrophils extracellular Traps).

Les NET seront détaillés dans un chapitre dédié (NETose page 45). Les Nets sont des fibres de chromatine expulsées par les PNN(28). Les NET permettent de limiter la dissémination des bactéries mais aussi de directement les détruire grâce aux molécules associées aux NET comme les histones, la MPO, et neutrophile élastase (NE).

4. Explosion oxydative.

La formation de NOX2, spécifique des cellules phagocytaires, nécessite l'assemblage de plusieurs protéines issues du cytosol et de la membrane. p47phox, p67phox, p40phox, issues du cytosol s'associent d'abord puis rejoignent le groupe formé de p22phox et gp91phox (ou flavocytochrome b558) déjà associés à la membrane. Une fois complète, l'enzyme est active et permet la génération de superoxyde O_2^- à partir d' O_2 . La superoxyde dismutase (SOD) permet la formation de peroxyde d'hydrogène à partir de O_2^- (29). Les ROS sont produits par transfert d'un électron du NADPH à l'oxygène entraînant sa réduction (Figure 2). La myéloperoxydase (granules azurophiles), quant à elle, est capable de modifier H_2O_2 en HOCl (entre autres). Il a été rapporté que les produits issus de la MPO n'ont pas seulement un rôle

dans la réponse anti-bactérienne mais aussi dans un certain nombre de maladies inflammatoires (30,31). Les ROS oxydent les protéines exogènes mais aussi endogènes et conduisent à la destruction des pathogènes et l'altération des tissus de l'hôte.

5. Communication inter-cellulaire.

Au cours de la réaction qui vise à détruire les pathogènes, les PNN vont d'une part exécuter leur programme de destruction mais aussi sécréter des chimiokines et cytokines afin d'organiser le recrutement d'autres cellules de l'immunité. Ils vont ainsi orchestrer la réponse immune en général. Dans cette partie seront aussi décrites de nouvelles fonctions des neutrophiles leur permettant d'accomplir ce rôle.

Tout d'abord les PNN sécrètent un grand nombre de cytokines (32) (répertoriées en Figure 6), la plus caractéristique d'entre elles est l'IL-8 ou CXCL8. Ce médiateur joue à la fois le rôle de chimiokine et d'interleukine, permettant le recrutement des PNN eux mêmes, des macrophages et des mastocytes. Les monocytes sont aussi guidés par les cytokines Macrophage Inflammatory Proteins (MIP) -1,-2,-3 et CCL2 (CC chemokine ligands2 ou MCP-1). Les protéines des granules LL-37, azurocidine et cathepsine G constituent un signal d'extravasation pour les monocytes. Les PNN promeuvent la maturation des cellules dendritiques(DC) afin de moduler la présentation de l'antigène. Ils communiquent aussi avec les NK via ICAM3 par exemple (33). Les PNN peuvent donc faire le pont entre immunité innée et adaptative, d'une part parce que les PNN influencent le recrutement et la maturation des DC via des médiateurs solubles (34) et d'autre part car ils peuvent directement communiquer avec les lymphocytes T et B. Les PNN sécrétant l'IL-12, ils peuvent théoriquement favoriser la différenciation des lymphocytes T vers un profil Th1. De plus l'équipe de Cassatella a montré que les PNN activés par LPS et IFN γ étaient capables de recruter les lymphocytes Th1 et Th17 via la sécrétion de CCL2(MCP-1) et CCL20(MIP-3 α)(35). Enfin, les PNN sécrètent l'IL-17 (36,37), cytokine clé dans l'orientation de la réponse adaptative. Ils peuvent également agir sur la maturation des lymphocytes B via la sécrétion de BAFF(B-cell activating factor ou Blys), APRIL (a proliferation-inducing ligand) et IL-21 chez la souris et l'homme (38–41).

S'ajoute à ces médiateurs un autre médiateur soluble découvert par Bernard Singer récemment avec qui nous collaborons. Singer a mis en évidence CEACAM8 soluble. Les CEACAM pour « carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule » sont un groupe de molécules mieux connues sous le nom d'intégrines β 2 (CD66). CEACAM8 ou CD66b, est hautement spécifique des granulocytes et peut être sécrété par ceux-ci(42). CEACAM8 soluble pourrait jouer le rôle de co-stimulateur des lymphocytes B et T (résultats non publiés). En plus de sécréter de nombreuses cytokines, les PNN peuvent aussi faciliter leur propre maturation. C'est le cas de l'IL-33, sécrété sous forme précurseur par de nombreuses cellules immunitaires dont les neutrophiles. L'élastase (NE) et la cathepsine G des PNN clivent la pro-IL-33 inactive en IL-33 fonctionnelle(43).

Les PNN ne communiquent pas que par des médiateurs solubles. Plusieurs groupes ont montré que les PNN pouvaient exprimer le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II et ainsi remplir les fonctions de cellules présentatrices d'antigènes(44–47). Il a aussi

été rapporté que les PNN pouvaient procéder à une présentation croisée d'antigène par le CMH de classe I aux lymphocytes T CD8⁺ chez la souris, amorçant ainsi la réponse des T CD8⁺(48). Scapini et Cassatella ont rapporté dans une revue publiée dans *Blood* que les PNN étaient capables d'interagir avec une multitude de cellules de l'immunité innée ou adaptative, par des cytokines ou par contact direct montrant ainsi la versatilité des PNN et l'importance du rôle qu'ils jouent au cœur de l'immunité(49).

6. Résolution de l'inflammation.

La résolution de l'inflammation est indispensable au retour à l'homéostasie tissulaire et pour éviter les dommages tissulaires liés à une inflammation incontrôlable. Cette résolution nécessite l'élimination des PNN mais aussi des médiateurs inflammatoires et surtout l'arrêt du recrutement de nouvelles cellules inflammatoires. Le retour à l'homéostasie met en jeu différents mécanismes comme l'apoptose des PNN et leur phagocytose par les macrophages mais aussi la sécrétion de médiateurs anti-inflammatoires comme les médiateurs lipidiques.

L'apoptose est un mécanisme physiologique qui conduit à la mort des cellules sans entraîner d'inflammation contrairement à la nécrose et à la NETose. Concernant les neutrophiles, l'apoptose survient spontanément après l'exécution des mécanismes bactéricides. Cette apoptose est dépendante de la famille BCL-2 et des caspases(27). Il existe aussi une apoptose induite du neutrophile, dépendante de Fas/Fas ligand. Cette apoptose est induite par la sécrétion de FAS ligand (FASL) soluble par les macrophages mais aussi de façon autocrine. Les macrophages expriment aussi FASL à leur surface induisant l'apoptose des PNN. D'autres mécanismes d'apoptose des PNN, impliquant le TNF, ont été décrits puis rapportés dans une revue de Kennedy et DeLeo(27). Les cellules apoptotiques sont ingérées par les macrophages après avoir reçu des signaux « trouvez moi, mangez moi ». La phagocytose des PNN peut être facilitée par l'opsonisation des cellules et corps apoptotiques par les facteurs du complément, en particulier C3b reconnus par les récepteurs CD11b/CD18 (ou CR3) et CD11c/CD18 (ou CR4) exprimés par les macrophages. La phagocytose des neutrophiles par les macrophages entraîne la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF- β (24), contribuant à l'apaisement général de la situation. Les médiateurs lipidiques sécrétés en fin de vie par les PNN jouent aussi un rôle anti-inflammatoire. Ces médiateurs lipidiques anti-inflammatoires sont principalement la lipoxine(50), la résolvine et la protectine. Ils limitent le recrutement de nouveaux neutrophiles sur le site inflammatoire. La lipoxine inhibe l'exposition des selectines à la surface de l'endothélium mais aussi inhibe la surexpression des intégrines β 2 des PNN. D'autre part, ces médiateurs lipidiques pro-résolutifs induisent la surexpression de CCR5 sur les neutrophiles en apoptose tardive, ce qui conduit à la séquestration puis à l'élimination des chimiokines MIP-1 α (CCL3) et CCL5. Enfin, la lipoxine réduit l'expression de ROS et d'IL-8 par les PNN. Toutes ces actions conduisent à la résolution de l'inflammation et au retour à l'homéostasie tissulaire une fois l'infection résorbée, mais parfois la machinerie s'emballa et il n'est plus possible de contenir l'inflammation. Il y a alors la survenue de maladies liées à une inflammation non résolue. La polyarthrite rhumatoïde en fait partie.

D. Pathologies liées aux neutrophiles.

Les pathologies liées aux neutrophiles sont souvent rapportées comme étant la conséquence d'un déficit quantitatif ou fonctionnel entraînant la survenue d'infections fongiques et bactériennes (51). Le manque de PNN (ou neutropénie) peut être la conséquence de diverses mutations génétiques comme dans le syndrome de Kostmann (mutation du gène HAX1) ou bien dû à une prise médicamenteuse. Il se peut aussi qu'un déficit fonctionnel soit à l'origine d'une inactivité ou inefficacité des PNN. Par exemple un déficit en NOX des granulocytes conduit au développement d'une granulomatose septique chronique. D'autre part, une mutation qui entraîne un défaut d'expression de molécules d'adhésion par les PNN conduit à un manque d'efficacité de ceux-ci mais associée à une hyperleucocytose. Enfin il a été décrit des mutations dans les voies de signalisation des TLR, de l'IL-1R et IL-18R conduisant à un déficit immunitaire. A l'opposé, les neutrophiles activés (ou suractivés) sont aussi responsables de dégâts majeurs des tissus au cours de la réponse inflammatoire antimicrobienne. C'est par exemple le cas du syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS) qui survient après une pneumonie ou au cours d'un sepsis et est dû à l'affluence de neutrophiles activés dans les capillaires pulmonaires ce qui entraîne une inflammation de la paroi des capillaires (52). Les PNN ont été montrés comme aggravant un grand nombre de pathologies comme l'ischémie cérébrale ou la glomérulonéphrite par exemple (52). Les PNN sont aussi impliqués dans les maladies respiratoires chroniques comme l'asthme ou la broncho-pneumopathie chronique obstructive dans lesquelles on retrouve des PNN activés dans les voies aériennes (53,54). Pourtant les PNN n'ont pas seulement un rôle d'élimination des pathogènes, ils sont de plus en plus décrits comme leaders de l'inflammation. Les PNN ont d'ailleurs été rapportés comme impliqués dans de nombreuses pathologies auto-immunes ou non (Tableau 4). Tout d'abord les neutrophiles ont été décrits comme « pro-tumoraux », favorisant l'angiogénèse de la tumeur, réduisant la réponse anti-tumorale mais aussi favorisant l'implantation de métastases via les NET. Ces caractéristiques pro-tumorales sont rapportées dans une revue de Amulic (24). Néanmoins, il a aussi été décrit que les PNN avaient un rôle anti-tumoral via la mort induite par les anticorps (mais pas seulement) (55). En outre, les NET produits par les neutrophiles sont impliqués dans la thrombose au cours de l'inflammation des vaisseaux (voir chapitre NETose page 45). On retrouve aussi des PNN dans les plaques d'athérome. On soupçonne ces cellules de contribuer à l'activation des cellules dendritiques et au recrutement des monocytes au cours de l'athérosclérose (56). Enfin les PNN sont grandement impliqués dans la goutte, maladie inflammatoire induite par la présence d'acide urique dans les tissus. Les PNN sont activés par les cristaux d'urate et sécrètent alors un grand nombre de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Les PNN sont retrouvés en grand nombre et colocalisés avec les cristaux d'urate.

On sait maintenant que les PNN sont impliqués dans les maladies auto-immunes bien qu'elles soient largement dépendantes de l'immunité spécifique. Dans le Tableau 4 ont été répertoriées les maladies auto-immunes dans lesquelles l'implication des PNN a été mise en évidence. Parmi elles, la polyarthrite rhumatoïde, qui sera détaillée dans un chapitre consacré. Le psoriasis est lui aussi une maladie auto-immune, cependant l'implication des neutrophiles dans cette pathologie est encore peu étudiée et les informations sont rares. Toutefois, certaines équipes ont pu retrouver des PNN dans les lésions psoriasiques de patients sans

savoir quels stimuli les auraient attirés (57). Sur le site de l'inflammation, les PNN pourraient, avec les mastocytes, sécréter de l'IL-17, cytokine clé du psoriasis (avec l'IL-23).

Enfin et non des moindres, le lupus érythémateux systémique ou LES, dans lequel la présence d'auto-anticorps ne laisse pas de doute sur l'implication de l'immunité adaptative, les polynucléaires neutrophiles jouent un rôle central avec les DC. L'auto-antigène majeur du LES est la chromatine. Les complexes immuns formés d'ADN et d'anticorps anti-ADN activent les DC et les PNN via le TLR9. Les DC activées produisent de l'IFN α (58), cytokine caractéristique du lupus. D'autre part les NET produits par les PNN pourraient représenter une source non négligeable d'auto-antigènes (59) (Voir paragraphe NET). En outre, l'équipe de Patrice Decker a précédemment montré que les nucléosomes, unité de base de la chromatine, étaient capables d'activer les DC (60) et les PNN sans être sous forme de complexes immuns (61), et ce mécanisme est indépendant du TLR9 (19). Au laboratoire, sous l'influence de Patrice Decker, mon directeur de thèse, nous avons aussi montré que les PNN produisaient de l'IFN α en réponse au nucléosome (entre autres) et peuvent représenter une source non négligeable de cette cytokine dans le contexte du LES (62). Ces arguments montrent bien l'implication des PNN dans certaines maladies auto-immunes.

Pathologie	Localisation des neutrophiles	Stimuli activant les neutrophiles	Possible rôle des neutrophiles	Modèles souris	Références
Polyarthrite rhumatoïde	Liquide synovial	cytokines complexes immuns, médiateurs des cellules T	destruction des articulations et cartilage, libération d'antigènes (NET)	transfert de sérum KBxN, arthrite transfert de sérum et anticoprs	(63)
Lupus érythémateux disséminé	Tissus affectés (ex: reins)	Chromatine, Complexes immuns, IFN α	libération d'antigènes (NET), boucle IFN α	NZB/NZW F1, MRL/lpr, lupus induit par pristane	(63)
Psoriasis	Lésion psoriasiques		Production d'IL-17		(57)
Pemphigoïde bulleuse	Jonction derme/épiderme	Complexes immuns	séparation derme/épiderme	Transfert d'anticorps anti-BP180 dans des souris néo-natales	(63)
Epidermolysis bullosa acquisita	Jonction derme/épiderme	Complexes immuns et complément	séparation derme/épiderme	Immunisation contre collagène type VII ou transfert d'anticorps anti-collagène VII	(63)
Vascularite associée aux ANCA	paroi vasculaire nécrosante	ANCA	dommages de l'endothélium	Immunisation par des lymphocytes spécifiques de la MPO ou par anticorps anti-MPO	(63)

Tableau 4: Implication et rôle des neutrophiles humains dans les maladies auto-immunes.

Adaptée de Németh et Mócsai (63).

II. Les Neutrophil Extracellular Traps (NET).

A. Généralités.

Le phénomène de NETose a d'abord été décrit par Takei et collègues en 1996(64). Ils décrivent alors une forme de mort rapide des neutrophiles, différente de la nécrose et de l'apoptose, après stimulation par le Phorbol-Myristate Acetate (PMA). Ce phénomène n'engendrait pas le clivage typique de l'ADN observé durant l'apoptose mais la quantité d'ADN nucléaire était quand même fortement diminuée dans les PNN traités par du PMA. A l'époque, Takei et al. avaient déjà remarqué l'implication probable de la NADPH oxydase dans ce phénomène. Par la suite, Brinkmann et al. baptisèrent les fibres d'ADN expulsées par les PNN, Neutrophil Extracellular Trap ou NET(28). Ils décrivent plus en détail le phénomène qu'avait vu Takei plusieurs années avant. Les NET sont des fibres d'ADN associées aux histones (chromatine) et d'autres protéines (Figure 3). Brinkmann et al. décrivent les NET comme pièges bactéricides ou favorisant l'élimination des bactéries extracellulaires (Figure 3). Ils rapportèrent aussi que le LPS ou l'IL-8 en plus du PMA induisaient la formation de NET. Par la suite de nombreux stimuli induisant la formation de NET ont été rapportés. En 2007, la même équipe (65) rapporta que la formation de NET était associée à une nouvelle forme de mort cellulaire (celle décrite par Takei). Celle-ci sera appelée NETose par la suite. Plus récemment il a été décrit que la formation de NET n'était pas forcément associée à la mort des PNN(66,67). Cette forme vitale de libération de NET serait due à l'expulsion de l'ADN mitochondrial(67) et non d'ADN nucléaire. Yipp et Kubes rapportent que les neutrophiles restent viables et fonctionnels après avoir produit des NET ; par exemple, les PNN sont toujours capables de chimiotactisme après avoir formé des NET (68). Dans ce travail je ferai donc la distinction entre NETose, qui est une forme de mort cellulaire associée à la libération de NET, et la libération ou formation de NET en elle-même indépendamment de la mort cellulaire. En effet, les recherches menées sur les NET ne prennent pas toujours en compte les phénomènes survenant après la libération des NET, c'est-à-dire la mort de la cellule (ou pas), le but étant en général de caractériser les NET et leurs effets immuno-physiologiques. La NETose n'est pas juste une nouvelle forme de mort cellulaire. De nombreuses équipes ont montré que la formation de NET était indispensable à la destruction de pathogènes. La libération de NET a aussi été montrée comme pathologique dans certaines maladies.

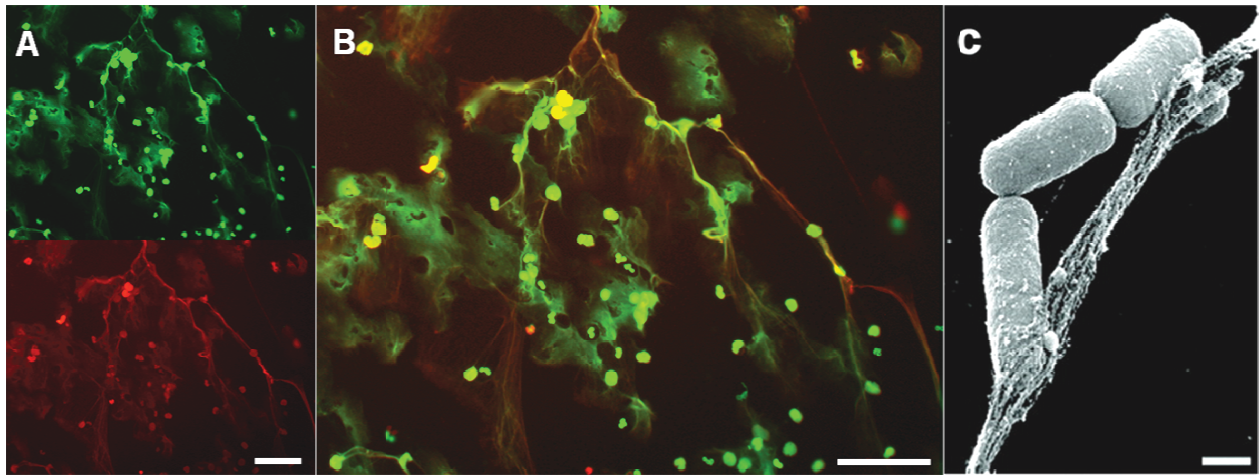


Figure 3: Neutrophil Extracellular Traps (NET)

Microscopie optique à fluorescence (A et B) et en microscopie électronique (C). A : en vert marquage de l'ADN, en rouge les histones. B : superposition des photos, les marquages de l'ADN et des histones sont colocalisés sur les NET (jaune). Barre 100µm. Travail réalisé au laboratoire. C : NET capturant *S.flexneri*. Barre : 500nm, tirée de Brinkman, 2004 (28).

B. Molécules associées aux NET.

D'une part les NET exercent leur activité antimicrobienne en limitant l'éparpillement des microorganismes car l'ADN agit comme une colle. D'autre part les NET présentent à leur surface des protéines antimicrobiennes comme les histones (28,69), ou des protéines issues des granules comme la MPO, la NE et LL-37 entre autres (70,71)(Tableau 5). Les molécules associées aux NET n'ont pas un rôle uniquement antimicrobien mais aussi un rôle pro-inflammatoire (HMGB1) notamment dans des maladies auto-immunes.

INTRODUCTION Les Neutrophil Extracellular Traps (NET).

Stimuli induisant la formation de NET	Références	Mécanisme associé à la formation de NET	Références	Protéines associées aux NET	Références
PMA	(28)	Calcium	(72)	Granules	
IgA + bactéries	(22)	Vitamine C	(73)	Neutrophile Elastase	(71)
LPS	(28)	Autophagie/IL-1 β	(74)	Lactoferrine	(71)
ACPA	(75)	NADPH oxidase/ROS	(76)	Azurocidine	(71)
Effort physique	(77)	Citrullination	(78)	Cathepsine G	(71)
HMGB1	(79)	LL-37	(80)	MPO	(71)
LL-37 (+PMA)	(80)	Neutrophile Elastase (NE)	(81)	Protéinase 3	(71)
Plaquettes activées	(82)	MPO	(81)	Lysosyme	(71)
GM-CSF+C5a ou LPS	(67)		(76)	Défensines 1 et 3	(71)
IFN + C5a	(83)			Gélatinases	(28)
NO	(84)			MMP8 et 9	
Cellules endothéliales activées	(84)			LL-37	(70)
Ionomycine	(85)			BPI	
ANCA	(86)			Noyaux	
IL-8	(28)			H2A	(71)
CXCL2	(76)			H2B	(71)
Complexes immuns	(87)			H3(citrullinée)	(71,78)
Nucléosome	(62)			H4(citrullinée)	(71,78)
ADN mitochondrial	(88)			MNDA (Myeloid cell nuclear differentiation antigen)	(71)
				HMGB1	(74)
				Cytoplasme	
				S100 calcium- binding protein A8, A9, A12	(71)
				Cytosquelette	
				Actine (β et/ou γ)	(71)
				Myosine 9	(71)
				α actinine (1 et /ou 4)	(71)
				Plastine 2	(71)
				Cytokérine 10	(71)
				Péroxyosome	
				Catalase	(71)
				Enzymes glycolitiques	
				α émolase	(71)
				Transcétolase	(71)
				Origine indéterminée	
				IL-17	(89)

Tableau 5: Tableau récapitulatif des stimuli et des mécanismes impliqués dans la formation de NET et protéines associées à ceux-ci.

ACPA: Anti citrullinated protein antibody; ANCA: Anti-neutrophil cytoplasmic antibody, anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles; GM-CSF: Granulocyte macrophage colony stimulating factor; IFN: interferon; H : Histone; HMGB1: High mobility group box 1; NO: monoxyde d'azote; PMA: phorbol myristate acetate.

C. Stimuli impliqués dans la formation de NET.

Bien que la formation de NET soit de plus en plus étudiée, les mécanismes qui conduisent à cette formation ne sont pas tous connus. Néanmoins, de nombreux stimuli, non issus de bactéries, ont été rapportés comme induisant la formation de NET. Le groupe de Kaplan décrit l'IL-17 et le TNF comme induisant la formation de NET(75). Cependant, le groupe de Cassatella a montré que les PNN n'expriment pas de récepteurs à l'IL-17 fonctionnel. D'autres rapportent que les IgA activeraient la NETose (22). Selon Yousefi et al. le traitement successif des PNN avec du GM-CSF et C5a ou LPS induirait la formation de NET issus de mitochondries (67). Le même groupe avait décrit plus tôt que les neutrophiles matures produisaient des NET après amorçage avec des IFN de type I ou II puis stimulation avec C5a (83). Néanmoins, les mêmes stimuli induisent des réactions différentes selon les équipes réalisant l'étude. Les stimuli inducteurs de NET décrits dans la littérature ont été reportés dans le Tableau 5. Il existe uniquement un consensus autour du PMA, les cristaux d'acide urique et de l'ionophore de calcium ainsi que les plaquettes activées (74,82,90,91). Cette divergence vient probablement du fait que chaque groupe décrit différemment les NET. Les uns décrivent les NET d'après des observations en immunofluorescence : les NET forment des fibres d'ADN associées à des protéines des granules (MPO et/ou LL-37)(89) y compris in vivo (92). D'autres détectent la modification de conformation du noyau avant même la formation des fibres d'ADN extracellulaire (93,94). Enfin, certains ne quantifient les NET que par la mesure de l'ADN rélargué par les PNN dans le milieu extracellulaire (90,95). Chaque méthode étant plus ou moins sensible, elles entraînent probablement des disparités dans la faculté à détecter la formation de NET suite à l'utilisation des différents stimuli.

D. Mécanismes impliqués dans la formation de NET.

Les mécanismes qui conduisent à la formation de NET sont encore peu connus mais de plus en plus d'études s'y intéressent. Déjà dans les premières publications concernant la NETose, il avait été rapporté que ce phénomène nécessitait la mise en œuvre de la NADPH oxydase (64,65), en particulier la NOX2 (96). L'implication de la NADPH oxydase a été confirmée par l'utilisation d'inhibiteur de sa formation, le diphenylène iodonium (DPI) (76). Cet inhibiteur empêche la formation de NET mais l'utilisation de cette molécule soulève certains écueils qui seront discutés plus tard (discussion page 177). La formation de ROS a son importance aussi puisque leur neutralisation grâce à la N-AcétylCystéine (NAC) empêche la formation de NET (76). D'autre part, il est connu que la libération de NET nécessite la décondensation de la chromatine nucléaire. La NE et la MPO sont impliquées dans ce phénomène (81). Récemment la citrullination des histones a été décrite comme un événement majeur dans la décondensation de la chromatine et la libération de NET. La PAD4 (peptidyl arginine deiminase 4) (78) notamment, serait d'une très grande importance dans ce phénomène, importance confirmée par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de PAD4 et 2, le Cl-Amidine, empêchant la formation de NET (78,97). De plus, l'inhibition de PAD par ce même inhibiteur régulerait l'autophagie(98), phénomène aussi impliqué dans la libération de NET (74) et la NETose (96). Notons aussi que les PNN de souris déficientes pour la PAD4 ne forment pas de NET (99) La mobilisation du calcium serait elle aussi nécessaire à la formation de NET, le calcium étant nécessaire à la citrullination des histones et à l'activation

de la PAD4 ainsi qu'à la libération de ROS(72). Récemment Neumann et al. ont rapporté que la cathélicidine LL-37 facilitait la libération de NET en provoquant la désintégration de la membrane nucléaire nécessaire à la libération de la chromatine(80). La Figure 4 résume les mécanismes décrits et impliqués dans la libération de NET. D'autre part, il a été rapporté qu'un exercice physique violent chez l'homme conduisait à la libération de NET (77). Cette étude suggère l'existence de nombreux stimuli de la NETose et encore inconnus.

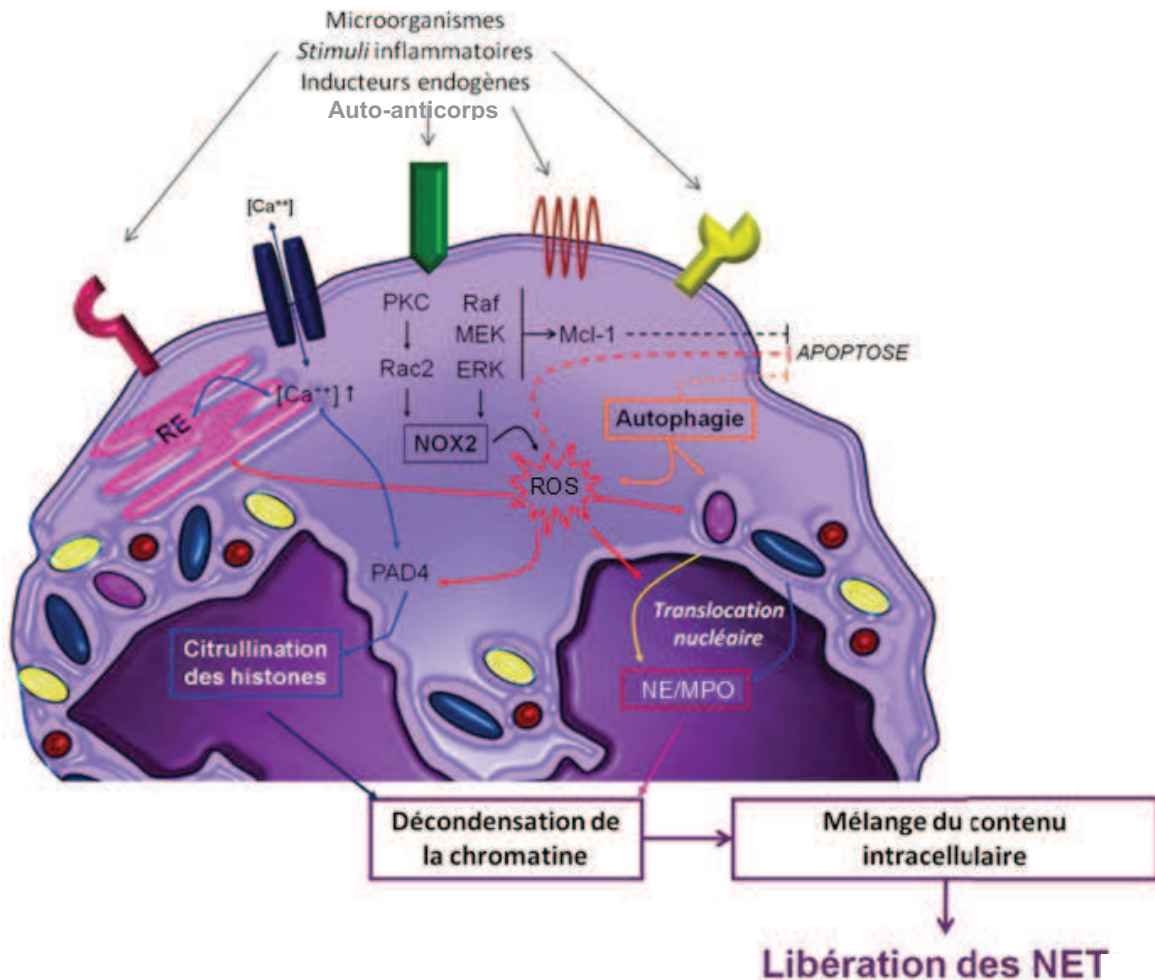


Figure 4: Mécanismes impliqués dans la libération de NET.

Focus sur les mécanismes classiques : NET formés de chromatine nucléaire. Schéma tiré de la thèse de Lorena Barrientos, 2013 (100).

L'équipe de Kubes propose une autre vision des choses puisqu'elle décrit un mécanisme de libération de NET sans NETose, nécessitant la mise en œuvre de vésicules qui transportent l'ADN(101). Ce phénomène est très rapide, il se déroule dans les dix minutes après stimulation et ne met pas en œuvre la NADPH oxydase ni l'ADN mitochondrial. Ces observations s'opposent donc à celle de Yousefi et al. qui affirme que la « NETose vitale » est due à l'expulsion d'ADN mitochondrial et aussi à celle d'Arturo Zychlinsky pour qui la formation de NET entraîne inexorablement la mort (par NETose) des PNN. Cette opposition de dogme est sûrement due à l'utilisation de stimuli plus ou moins physiologiques. Le PMA étant un activateur surpuissant des PNN, et du système immunitaire en général, il est tout à fait probable qu'il entraîne la mort des PNN. L'utilisation de stimuli plus doux comme l'IL-8 ou physiologiques comme S.aureus favoriserait l'observation de phénomènes moins radicaux.

E. Fonctions des NET

La fonction primaire ou physiologique des NET est donc l'élimination de micro-organismes comme *S.aureus* ou *S.typhimurium* entre autres, mais aussi le virus HIV1(102) et certains champignons. D'après Branzk, la formation de NET serait réservée à l'élimination de pathogènes de grande taille(103). Les NET peuvent à la fois piéger les pathogènes pour empêcher leur dissémination mais aussi grâce aux protéases présentes à la surface des NET, détruire ces pathogènes. L'effet antibiotique ne serait cependant pas uniquement dû à la présence de protéases sur les NET mais l'ADN(104) et la chromatine(105) auraient aussi un rôle anti-microbien. La formation de NET entraîne aussi des effets secondaires. De plus en plus d'effets délétères des NET sont rapportés. HMGB1 est depuis longtemps décrit comme associé aux NET et en tant que DAMP, il représente un agent pro-inflammatoire. LL-37, aussi associé au NET, a un rôle pro-inflammatoire (70). Entre autres, LL-37 se lie aux acides nucléiques et faciliterait l'internalisation des NET et leur rencontre avec les TLR7 et 9 engendrant la production d'IFN de type I (58,59). Il pourrait aussi exister des stimuli déclenchant la libération de NET de manière pathologique et délétère. Les NET favoriseraient la thrombose(106,107) via les histones et l'ADN. Les NET engendreraient, en association avec les plaquettes, des dommages sur les vaisseaux au cours du sepsis, détruisant les cellules endothéliales et provoquant aussi des occlusions vasculaires(82,92). D'autre part il a été rapporté que les NET pourraient favoriser l'implantation de métastases par captation de cellules malignes circulantes(108). Enfin il a été montré des effets néfastes des NET dans la pré-éclampsie(109), la mucoviscidose (pathologie dans laquelle on retrouve des NET dans les sécrétions pulmonaires et améliorée par un traitement à la DNase(110)) et d'autres maladies pulmonaires. Concernant l'athérosclérose, il pourrait exister un mécanisme d'activation des DC par les NET similaire à celui observé dans le lupus, les DC étant une des populations cellulaires retrouvées dans les plaques d'athérome(56).

Par ailleurs, et davantage en relation avec mon sujet d'étude, les NET ont été décrits comme source d'auto-antigènes dans diverses maladies auto-immunes comme les vascularites auto-immunes, le lupus, le psoriasis, et la polyarthrite rhumatoïde (PR) (ce point sera développé plus loin). Comme nous l'avons vu plus haut (Tableau 5) les NET exposent des protéines normalement restreintes aux granules, noyau ou cytoplasme. Cette exposition semblerait entraîner une immunisation contre des antigènes du soi, et créer des troubles auto-immuns. Par exemple dans la vascularite associée aux ANCA (Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies), la PR3 et la MPO sont les auto-antigènes ciblés par les auto-anticorps(63), or ces deux enzymes sont associées aux NET. D'autre part, la stimulation des PNN par les ANCA entraîne la formation de NET dans ce contexte(86).

Concernant le LES, il est établi que cette pathologie est associée à une (auto)-immunisation contre la chromatine (retrouvée libre dans la circulation des patients) et qu'il existe un défaut d'activité de la DNase1 chez la majorité des patients. Cette pathologie est aussi associée à une signature interféron de type I. Les études historiques relient ce phénotype à un défaut d'élimination des corps apoptotiques et à la libération de chromatine entraînant une auto-immunisation contre celle-ci(111). Les données récentes impliquent un défaut d'élimination des cellules nécrotique et NETotique(112). La description de ce mécanisme est confortée par le fait qu'une partie des patients atteints de lupus ont de faibles taux de C1q, premier

membre de la voie classique du complément, qui entraîne une baisse de l'efficacité de la prise en charge et de l'élimination des corps apoptotiques, C1q étant un facteur très important de l'opsonisation des cellules en apoptose(113). Pourtant de plus en plus d'études placent les NET au centre des mécanismes liés au déclenchement de la maladie. En effet, dans le LES il existerait un phénomène de « NETose aberrante », qui se manifeste par :

- la présence d'une nouvelle population de PNN, les « low density granulocytes (LDG) », décrits par l'équipe de Kaplan, (114) dont la capacité à libérer des NET est plus grande et produisant de l'IFN- α .
- Une quantité de NET libérés plus importante chez les patients lupiques comparés aux donneurs sains(58).
- Une faible capacité à dégrader les NET associée aux atteintes rénales.

D'autre part, il existe, dans cette pathologie, un défaut d'élimination ou de dégradation des NET. Ce phénomène est renforcé par la liaison de C1q aux NET ou aux complexes NET/auto-anticorps qui dans ce contexte ralentit l'élimination des NET par les DNases(115). Enfin, et comme décrit plus haut, la présence de protéines des granules comme LL-37 sur les NET favorise à la reconnaissance des NET via les TLR (le TLR9 notamment) et entraîne une réponse des pDC et la production d'IFN-I. Enfin il est rapporté la présence d'auto-anticorps anti-protéines de NET dans le lupus, confirmant que les NET sont une source d'auto-antigènes dans ce contexte. L'ensemble des mécanismes décrits concernant l'implication des NET dans le lupus est résumé dans la Figure 5.

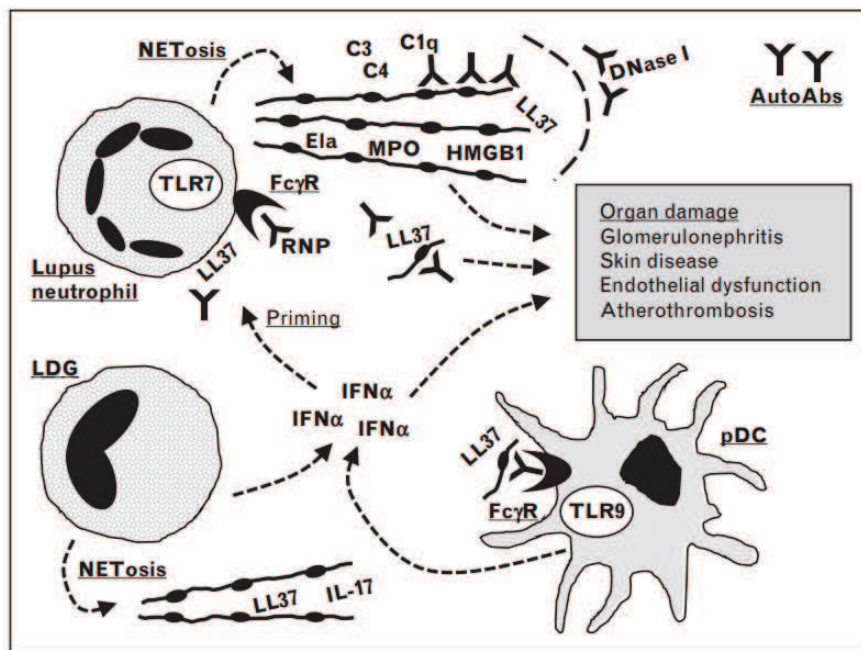


Figure 5: Schéma résumant les effets pathogènes des NET dans le LES.

Tiré de Knight, 2012(116). AutoAbs : auto-anticorps, Ela : Elastase, RNP : ribonucléoprotéine.

F. Effets non inflammatoires des NET.

Nous avons vu que les NET sont décrits comme inflammatoires et même immunogènes. Mais récemment plusieurs équipes ont rapporté un rôle non-inflammatoire voire anti-inflammatoire des NET. En effet, Farrera et Fadeel(117) rapportent que la clairance des NET

par les macrophages est, d'une part, améliorée par l'opsonisation des NET par C1q contrairement à ce que rapporte Knight(116) des travaux de Leffler(115), et d'autre part que ce mécanisme n'entraîne pas la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages. Farerra n'a pu détecter la sécrétion d'IL-1 β , de TNF ou d'IL-6 par les macrophages mis en présence de NET seuls et l'IL-8 n'a pas été testé. Par contre, les NET n'ont pas d'effets anti-inflammatoires dans cette étude puisque ils n'empêchent pas les macrophages d'être activés par le LPS. Au contraire, il y aurait même une potentialisation des macrophages par les NET puisque la réponse au LPS est plus forte après traitement des macrophages avec des NET.

De plus, l'équipe de Martin Herrmann a décrit récemment dans la souris que les NET agrégés, résultant d'une stimulation de PNN par des cristaux d'acide urique, captent et dégradent les cytokines, qu'elles soient pro- ou anti-inflammatoires. Schauer et al. arguent aussi que le manque de NET agrégés (NET traités par DNase) entrainerait une exacerbation de l'inflammation chronique(91).

Enfin, très récemment, Barrientos et al. ont rapporté que les NET avaient un rôle anti-inflammatoire(118). En effet, les NET empêchent la maturation complète des cellules dendritiques dérivées de monocytes (moDC) stimulées par le LPS. Ainsi, l'expression des molécules de co-stimulation et du CMH est diminuée sur les DC traitées avec LPS et des NET. De la même façon, les titres de cytokines pro-inflammatoires secrétées par les moDC traitées avec des NET et du LPS ou d'autres stimuli (tel que le PMA ou des ligands TLR7/8) sont plus faibles que ceux des moDC traitées avec le LPS seul. Les NET seuls n'auraient pas d'effet direct sur les moDC. Dans cette étude, bien que la capacité migratoire des moDC ne soit pas affectée par le traitement avec des NET, la capacité des moDC à orienter les lymphocytes T vers un profil Th1 ou Th17 est diminuée tandis que l'orientation Th2 est plutôt avantagée. Cela montre que les NET, via la maturation des moDC en DC tolérogènes, auraient un potentiel anti-inflammatoire.

Ces études montrent que les NET n'ont pas qu'une seule facette. Tout comme les neutrophiles eux-mêmes, ils peuvent avoir un rôle immuno-modulateur, tantôt pro-inflammatoire, tantôt anti-inflammatoire.

G. Etosis.

Après la découverte des NET, le même phénomène a été rapporté avec d'autres cellules de l'immunité. Ces fibres de chromatine expulsées des cellules ont été nommées Extracellular Traps (ET) en référence aux Neutrophil Extracellular Traps. Nous savons aujourd'hui que les autres granulocytes (eosinophiles(119) et basophiles(120)) sont capables de libérer des fibres d'ADN pour capturer des micro-organismes. Les mastocytes(121), et les monocytes(122) en sont aussi capables. Le phénomène « d'ETose » ne sera pas détaillé ici mais ce phénomène (y compris la NETose) a été décrit chez de nombreuses espèces comme la souris, le chat, le cheval(123).

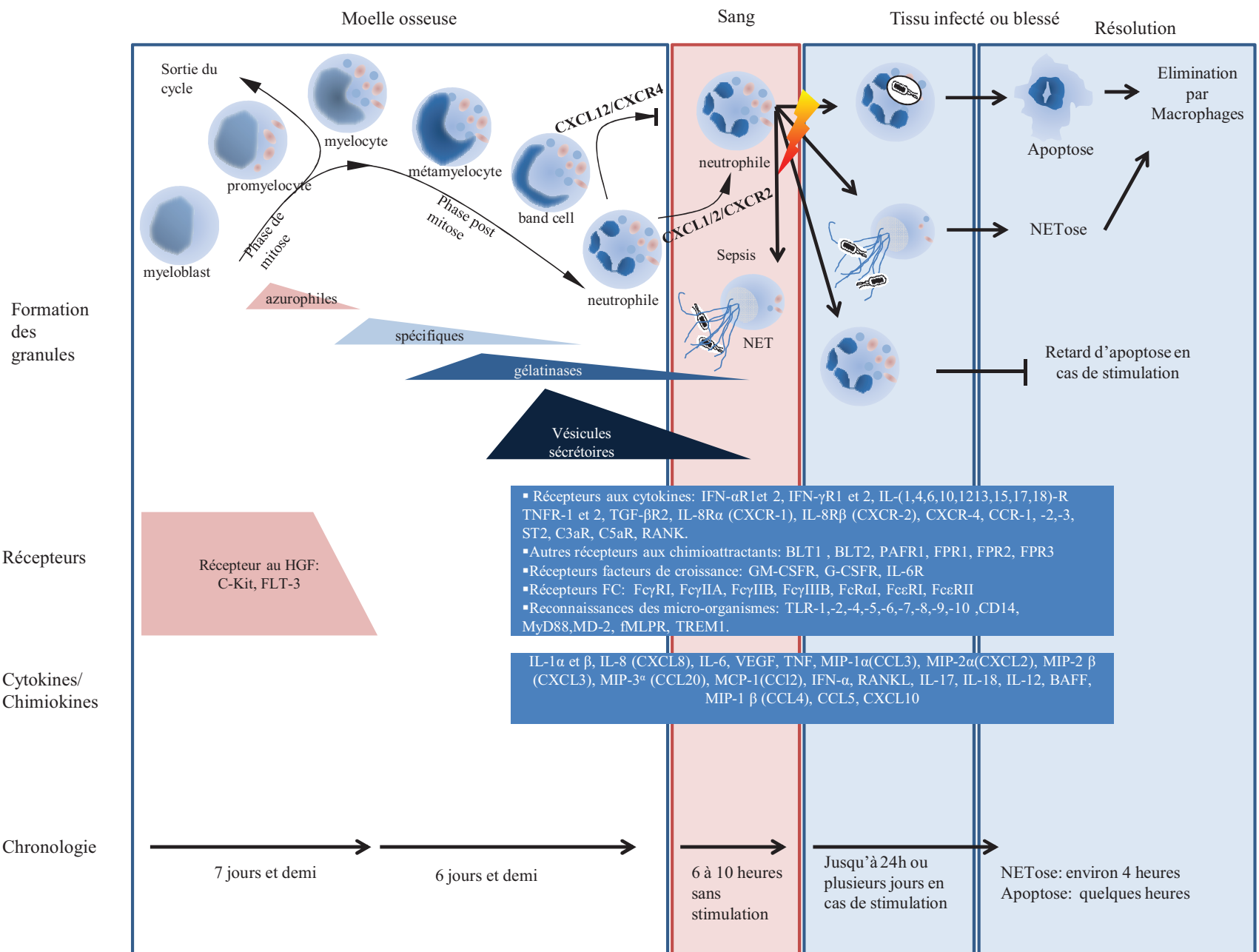


Figure 6: Neutrophile : sa vie, son œuvre.

Par M. Ribon adapté de Borregaard, 2007(124), Bainton, 1971(1) et Tecchio, 2014 (32).

INTRODUCTION Les Neutrophil Extracellular Traps (NET).

Le neutrophile naît et mûrit dans la moelle osseuse. Il acquiert ses différents granules au cours de ce développement. Une fois mûr, le PNN rejoint la circulation sanguine après la stimulation de CXCR2. Sa durée de vie est alors assez courte sauf s'il reçoit un signal d'activation (⚡). Le PNN exerce ensuite son action anti-microbienne dans le sang ou le tissu. Les PNN expriment un grand nombre de cytokines et de récepteurs (encadrés bleus). La restauration de l'homéostasie se fait par apoptose des neutrophiles.

BLT: leukotriene B receptor; FLT3: Fms-like tyrosine kinase 3; HGF: Hepatocyte growth factor; PAFR: Platelet activating factor receptor; TREM1: Triggering receptor expressed on myeloid cells 1

III. Le système du complément.

Le système du complément est un ensemble de protéines plasmatiques (au moins 30(125)) qui participe à l'élimination des pathogènes. Ce système est intégré dans l'immunité innée et outre sa capacité à faciliter la destruction des pathogènes, il régule les mécanismes inflammatoires. Le système du complément est apparu très tôt au cours de l'évolution et a été découvert en 1896 par Jules Bordet, puis nommé par Paul Ehrlich en raison de son rôle de soutien des cellules de l'immunité et des anticorps. Le système du complément possède trois voies d'activation différentes qui conduisent à trois mécanismes effecteurs communs : l'opsonisation, l'inflammation, la cytolyse.

A. Généralités sur les voies du complément.

L'activation des trois voies du complément entraîne une cascade de protéolyse qui conduisent toutes trois à la formation de C3b, une protéine centrale du système du complément. Parmi ces voies il y a la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne.

La voie classique est activée par la liaison de C1q, protéine initiatrice, à l'un de ses ligands principalement les IgG et IgM des complexes immuns. Il existe d'autres ligands de C1q détaillés dans le Tableau 6 et dans le chapitre suivant. La fixation à ses ligands de C1q, associée à ses partenaires du complexe C1 (C1r et C1s, deux sérines estérases) entraîne l'activation de C1r, le clivage et l'activation de C1s qui clive à son tour C4 en C4a et C4b(126) (Figure 7). C4b est une opsonine, elle se fixe à la surface de la cellule cible et clive C2 en C2a et C2b. C2a et C4b restent associés pour former C4b2a, la C3 convertase classique, qui a pour fonction de cliver C3 en C3a et C3b, déclenchant ainsi la suite de la cascade commune aux trois voies.

La voie des lectines est assez semblable à la voie classique, pourtant la protéine initiatrice n'est pas C1q mais MBL (Mannan Binding Lectin) qui se lie aux motifs carbohydrates des micro-organismes et au LPS. C1q et MBL ont néanmoins des structures proches. Intervient ensuite MASP (Mannan-Associated Serine Protease), une sérine estérase, qui clive C2 et C4 de la même façon que dans la voie classique et conduisant à la formation de la même C3 convertase, C4b2a.

La voie alterne est activée par la reconnaissance du LPS. C3b est formé spontanément et se fixe à la surface activatrice (contenant du LPS). Le facteur C3b s'associe alors au facteur B, qui est à son tour clivé en Bb et Ba par le facteur D circulant. Ba est libéré mais C3b et Bb restent associés et forment la C3 convertase alterne C3bBb. La C3 convertase alterne est stabilisée par la properdine. La cascade suit son cours, et rejoint la voie finale commune. Par la formation de grandes quantités de C3b, la voie alterne est capable de supporter et d'amplifier les deux autres voies du complément.

La voie finale commune fait intervenir une C5 convertase. Ce complexe est composé des fragments C3b et de la C3 convertase classique pour former (C4b2a)C3b ou alterne pour former (C3bBb)C3b. Les C5 convertases clivent le C5 en C5a et C5b. C5b se lie à la membrane de la cellule cible et s'associe alors à C6, C7, et C8 pour former le complexe

sublytique C5b8 puis à plusieurs protéines C9, formant ainsi le complexe d'attaque membranaire ou MAC qui forme un pore membranaire permettant la lyse cellulaire.

Nous l'avons vu, un des mécanismes effecteurs est la lyse des cellules, mais il existe d'autres mécanismes. En effet, C1q et C3b sont des opsonines, elles peuvent recouvrir des cellules afin d'en faciliter la phagocytose. C1q prend en charge les cellules apoptotiques tandis que C3b recouvre les bactéries. Pas ailleurs les petits fragments libérés C3a, C4a et C5a sont des anaphylatoxines. Les anaphylatoxines jouent le rôle de chimiokines attirant nombre de leucocytes et entretenant ainsi l'inflammation. C5a notamment, permet le recrutement séquentiel des cellules de l'immunité, d'abord les cellules de l'immunité innée puis les lymphocytes T(127).

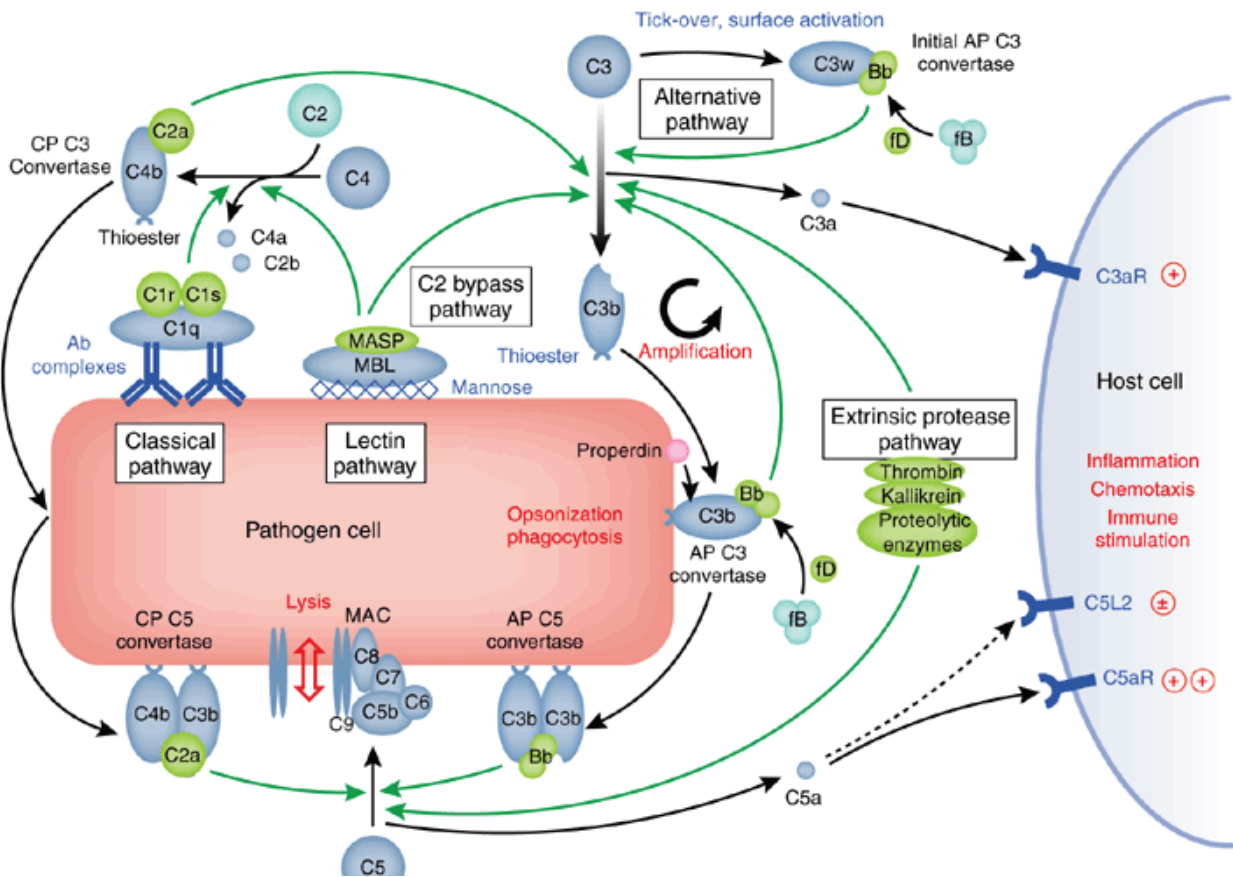


Figure 7: Activation des voies du complément.

Issu de Ricklin et Lambris (128)

Les cascades du complément sont étroitement régulées. Ce point ne sera pas détaillé, toutefois il faut savoir que l'initiation de la voie classique et des lectines peut être inhibées par C1-inhibiteur qui inhibe les sérines protéases. Il existe aussi le facteur I qui favorise la dégradation de C3b et C4b, régulant ainsi la voie classique et la voie alterne (en association avec d'autres facteurs de régulation). Enfin le facteur H permet une dissociation rapide de la C3 convertase alterne et permet la discrimination des surfaces activatrices du soi et du non soi.

B. C1q

C1q est la protéine qui, en se fixant aux complexes immuns (CI), active la cascade de la voie classique du complément. C1q peut fixer d'autres ligands et activer le complément mais on ne parle pas dans ce cas de la voie « classique ».

1. Structure de C1q

C1q, protéine de 460kDa, est composée de 18 chaînes polypeptidiques regroupées en triple hélice formant en région C-terminale six sous-unités surmontées de têtes globulaires. Les chaînes A, B et C forment chacune un brin de l'hélice(129)(Figure 8). Les têtes globulaires contiennent les sites de reconnaissance des ligands classiques (immunoglobulines) et non classiques (bactérie, virus), tandis que la queue en région N-terminale, homologue au collagène, se lie aux récepteurs au C1q, à l'ADN, à la myéline(130) et au LPS. L'activation du complexe C1 nécessite la fixation d'au moins deux têtes et entraîne un changement de conformation qui (auto-)active C1r et C1s. Il a été décrit aussi que les têtes globulaires possédaient une homologie fonctionnelle avec des molécules de la super famille du TNF. En réalité, la structure des régions globulaires de C1q est retrouvée dans de nombreuses protéines. Kishore et al ont donc nommée ces protéines la « famille C1q », elle comprend entre autres les collagènes VIII et X et des protéines plasmatiques (HP-20,-25,-27). Il existe des fonctions homologues entre les protéines de ces deux familles. Les membres, les fonctions et les ligands de la famille C1q ont été rapportés dans une revue de Kishore et al.(131).

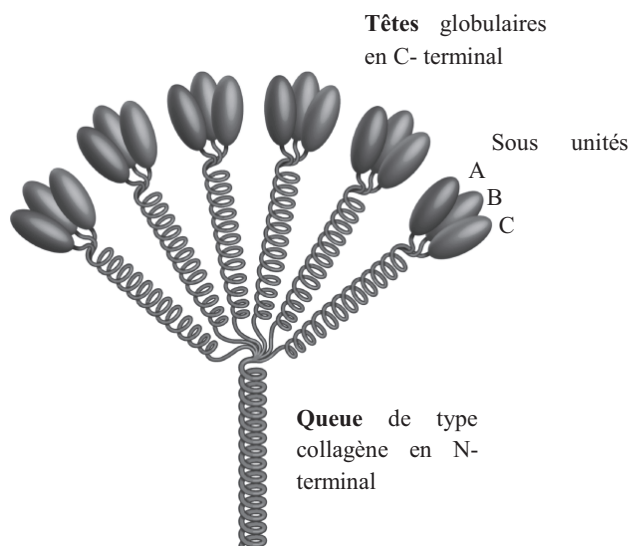


Figure 8: Structure de C1q.

Traduit et adapté de Sontheimer et al.(132)

2. Fonctions de C1q et description de ses ligands.

Nous l'avons vu, C1q possède des fonctions dites classiques qui conduisent à l'activation de la voie classique du complément. Ces fonctions sont la reconnaissance des complexes immuns contenant des IgG et IgM. C1q permet aussi l'opsonisation des cellules apoptotiques entraînant l'activation de la voie classique(133). C1q possède aussi une capacité de liaison à d'autres ligands dits non classiques. Les ligands connus de C1q ont été répertoriés dans le Tableau 6. Le LPS a été décrit comme étant un des ligands de C1q via sa région collagène(134) et sa région globulaire en particulier avec la chaîne B(135). Cette interaction active la cascade et conduit à l'élimination des bactéries via la voie classique du complément. De façon surprenante, il a été aussi démontré que la liaison de C1q pouvait avoir un rôle immuno-régulateur. Yamada rapporta en 2004 que C1q pouvait inhiber l'activation des cellules dendritiques par le LPS(136). Dans cet article, il n'est pas fait référence à la liaison de C1q au LPS mais à l'inhibition de l'activation des DC dépendante de MyD88. Les auteurs retrouvent aussi l'inhibition de l'activation des cellules en présence de C1q et de motifs CpG, agonistes du TLR9, et confirment l'inhibition de la voie MyD88. Or, il a été montré que C1q pouvait aussi lier les acides nucléiques(116,137). Un autre groupe, celui de Tenner a montré que C1q modulait la réponse au LPS des cellules dendritiques mais aussi des monocytes et des macrophages(138). Dans ces expériences, la sécrétion de TNF et d'IL-1 β est réduite en présence de C1q et de LPS dans ces trois populations cellulaires. La même équipe a montré que C1q fixé à des corps apoptotiques augmente la sécrétion d'IFN α , d'IL-10 et d'IL-27 par les macrophages stimulés par le LPS(139), et il est possible d'inhiber ce signal en incubant les macrophages avec juste la fraction collagène de C1q. L'idée de cette équipe est que la fixation des têtes aux corps apoptotiques oriente spatialement la queue de C1q vers les récepteurs situés sur les macrophages. C1q envoie alors un signal anti-inflammatoire aux macrophages. A l'inverse, il a été montré qu'il y avait une collaboration entre les TLR et le complément au moins pour les TLR2, 4 et 9. Les anaphylatoxines augmentent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induites par les TLR(140). De même, la fixation de C1q à un de ses récepteurs membranaires (C1qR-O2) induit la production de ROS par les PNN(141).

En outre, C1q lie la CRP (C-reactive protein), une protéine libérée lors de l'inflammation. La CRP fait partie des pentraxines. Ces protéines se fixent aux bactéries lors de l'inflammation et activent ainsi la voie classique du complément(142) en augmentant le recrutement de C1q à la surface des cellules. Il a aussi été montré que la pentraxine 3 se lie d'une part aux cellules apoptotiques et nécrotiques et d'autre part à C1q ce qui permet le recrutement des DC pour la phagocytose(143,144). Concernant la prise en charge des cellules nécrotiques, l'équipe de Herrmann a montré qu'il existait une coopération entre la DNase I et C1q, ce qui faciliterait la dégradation de l'ADN issu de cellules nécrotiques(145). Leffler et al. ont montré que les NET étaient protégés de la dégradation par la DNase lorsqu'ils étaient associés à C1q(115). Leffler a aussi démontré que les NET activaient le complément via C1q ce qui renforce l'idée que l'ADN est un ligand de C1q et qu'il existe une interaction entre les NET et C1q.

Fonction de C1q	Ligands impliqués	Références
Activation et modulation de la voie classique du complément	IgG IgM	(146)
Elimination et solubilisation des complexes immuns	Complexes immuns de glycoprotéines riches en histidine	(129)
Elimination des bactéries	Via Collagen like region(CLR): Protéines membranaires des bactéries Gram- Lipopolysaccharide Fibronectine Fibrine Fibrinogène	(135,147)
Liaison virale et inactivation virale	HTLV1 (human T-cell lymphotropic virus) HIV1 gp41 (human immunodeficiency virus1)	(129)
Induction de cytokines pro-inflammatoires	CD91 via CLR	(129)
Clairance des débris nucléaires, des cellules apoptotiques et nécrotiques	C-reactive protein (CRP) ADN Serum amyloid P Pentraxine 3	(148)
Clairance des cellules apoptotiques	Cellules apoptotiques	(133)(113)
Prolifération ou anti-prolifération	Récepteur C1q	(149)
Adhésion et coagulation	Intégrines α IIb/ β 3 des plaquettes	(150)

Tableau 6: Ligands classiques et non classiques de C1q.

Adapté de (144)

3. Autres fonctions de C1q et interactions cellulaires.

C1q peut aussi avoir des interactions directes avec certaines cellules via ses récepteurs et ainsi influencer la réponse immune. Tout d'abord il a été découvert une fonction de chimiotactisme à C1q(149). C1q pourrait influencer le chimiotactisme des fibroblastes des souris ainsi que les neutrophiles et éosinophiles humains via l'un de ses récepteurs, gC1qR(144). C1q serait aussi capable d'influer sur l'immunité adaptative puisque les lymphocytes T expriment des récepteurs à C1q(151). Grâce à des souris déficientes pour C1q, il a été montré que C1q augmente la présentation de l'antigène aux lymphocytes B(144). Il a aussi été montré chez les souris qui n'expriment pas C1q que les lymphocytes T spécifiques de l'antigène produisent moins d'IFN- γ (152). Enfin C1q pourrait jouer un rôle dans la sélection négative des lymphocytes B auto-réactifs. D'autre part, Teo a montré que C1q immobilisé augmentait la différenciation des monocytes en ostéoclastes(153). Enfin C1q pourrait influencer la maturation des DC, les récepteurs à C1q étant fortement exprimés à la surface des DC immatures et plus faiblement sur les DC matures(144). Ce raisonnement concorde avec le fait que les régions globulaires de C1q possèdent une homologie de fonction avec le TNF, cytokine indispensable à la maturation des DC.

4. Récepteurs à C1q

Lors de la liaison de C1q à l'un de ses ligands, le complexe C1 s'active puis se dissocie sous l'action de C1 inhibiteur pour éviter un emballement de la réaction. La queue de C1q se retrouve alors libérée de C1s et C1r et certains sites de fixation aux récepteurs de C1q sont ainsi démasqués. Plusieurs récepteurs à C1q ont été décrits à ce jour, certains ne

reconnaissent pas la queue de type collagène mais la partie globulaire de C1q. Néanmoins, les fonctions de récepteur de certaines de ces molécules ont été remises en cause. Les récepteurs à C1q devraient plutôt être appelés sites cellulaires de fixation à C1q car les voies de signalisations ne sont pas encore décrites. Aujourd'hui, il n'y aurait plus que deux « récepteurs » pouvant reconnaître formellement C1q : gC1qR(p33) et CR1(CD35). Un troisième, cC1qR ou calréticuline est considéré comme un récepteur fort probable de C1q dû à son affinité avec la région collagène de C1q. Bien que la calréticuline soit une protéine soluble(129), elle est retrouvée dans certaines conditions à la surface des cellules. En effet, la calréticuline peut s'associer au CD91 pour entraîner l'internalisation des cellules apoptotiques recouvertes de C1q(154). Toujours concernant la prise en charge des cellules grâce à l'opsonisation par C1q, il a longtemps été pensé que C1qRp (ou CD93) était un récepteur au C1q qui permettait d'engager la phagocytose des cellules apoptotiques. Il a été montré depuis qu'il n'y avait pas d'interaction entre C1q et C1qRp(155). Pourtant, C1qRp est indispensable à l'élimination des cellules apoptotiques indépendamment de la phagocytose(156). gC1qR reconnaît quant à lui la partie globulaire de C1q mais ce « récepteur » ne possède ni unité transmembranaire, ni ancre cellulaire. Les fonctions du récepteur C1qR-O2⁻ restent elles aussi controversées. Enfin, CR1, décrit comme récepteur de C3b et C4b, reconnaît aussi C1q. La difficulté à identifier formellement les récepteurs à C1q et à décrire leurs fonctions illustre le flou autour des rôles de C1q en dehors des fonctions classiques.

C. Maladies liées au complément.

Cette partie ne sera pas détaillée dans le manuscrit, toutefois il faut savoir que le complément est capable, en plus d'être activé par les pathogènes, de recenser et répondre à des signaux de danger ou de dommage tissulaire. Une réaction excessive ou inappropriée du complément à certains signaux peut favoriser la survenue de maladies variées (auto-immunes, inflammatoires, dégénératives, hémorragiques et ischémiques(157)). C'est, notamment, le cas dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge associée à un polymorphisme de C3 et la maladie d'Alzheimer dans laquelle la voie classique est activée par les dépôts d'amyloïde. La suractivation du complément peut aussi conduire à une interruption prématurée de la grossesse, ou à des naissances prématurées. Néanmoins, le manque d'activité du complément peut aussi conduire à la survenue de maladie notamment auto-immunes comme les LES. Dans cette maladie, les faibles concentrations en facteur C1q conduisent à l'accumulation de corps apoptotiques et débris cellulaires conduisant à une auto-immunisation. Il existe des patients déficients pour C1q, 90% d'entre eux développent une maladie de type lupus. Par ailleurs les souris qui n'expriment pas C1q développent spontanément un lupus(158). De plus, dans le lupus, les taux de C2, C3 et C4 sont diminués induit probablement par une consommation du complément. Mais cela fait ressortir le rôle du complément dans le lupus puisqu'il semble impliqué par exemple dans les atteintes rénales.

IV. La polyarthrite rhumatoïde et ses modèles animaux.

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire chronique et auto-immune. C'est le rhumatisme le plus fréquent dans le monde avec une prévalence de 0,3 à 1% selon les études. Cette maladie survient à tout âge mais touche plus fréquemment les femmes. La PR conduit à l'inflammation et à la destruction des articulations et, à terme, à une paralysie. La PR est aussi accompagnée de troubles extra-articulaires comme la survenue d'athérosclérose et d'infarctus réduisant l'espérance de vie de 10 ans en moyenne. La polyarthrite rhumatoïde en tant que maladie auto-immune, est caractérisée par la présence d'auto-anticorps chez les patients : ce sont les ACPA (pour anti-citrullinated protein antibodies) et les facteurs rhumatoïdes. Bien que l'origine de la rupture de la tolérance du soi ne soit pas encore connue on sait que les lymphocytes T sont fortement impliqués dans cette pathologie. Néanmoins le rôle de l'immunité innée dans cette maladie reste peu étudié et mérite d'être investigué.

A. Etiologie de la PR.

Comme évoqué précédemment l'étiologie de la PR n'est pas connue pourtant certains facteurs pourraient favoriser la survenue de la PR. Tout d'abord, il existe une prédisposition génétique à la PR bien que cette maladie ne soit pas héréditaire. Selon une étude épidémiologique de Frisell, un individu a trois fois plus de risques de développer une PR si un de ses parents est atteint et deux fois plus de risques si un parent du second degré est touché(159). Les jumeaux homozygotes ont un taux de concordance atteignant 15%, c'est-à-dire que 15% de paires de jumeaux ont tous les deux une PR. Réciproquement, ce taux de 15% indique que d'autres facteurs sont impliqués. Les jumeaux hétérozygotes ont eux un taux de concordance atteignant 3,6% (160). Dans la même étude, les auteurs définissent une héritabilité à 60%, c'est-à-dire que dans 60% de la population les facteurs génétiques ont été prépondérants dans le déclenchement de la maladie. D'autre part il a été découvert à la fin des années 1970 que 70% des patients atteints de PR partageaient le même sérotype HLA-DR4(161–163). Depuis, il a été découvert d'autres susceptibilités génétiques comme la présence d'un épitope partagé des allèles de HLA-DRB1(human leukocyte antigen)(164,165) associé à la présence d'ACPA et de facteurs rhumatoïdes(166). Récemment l'équipe de Jean Roudier a apporté des précisions à ces études, identifiant des génotypes de HLA-DRB1 à risque pour la production d'ACPA et la PR(167). Il a aussi été mis en évidence des polymorphismes nucléotidiques ou SNP (single nucleotide polymorphism) grâce à un criblage du génome des patients atteints de PR. Ainsi les polymorphismes de PTPN22 (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22), PAD4 (peptidylarginine deiminase 4), TRAF-C5 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 1, complement component 5), STAT4 (signal transducer and activator of transcription 4) et FCGR (Fcγ receptors) sont associés à la PR mais aussi à d'autres maladies auto-immunes comme le LES (c'est le cas pour PTPN22). L'équipe de Zhang a ainsi pu montrer au moins 26 SNP associés à la PR(168). De plus, Okada et al. ont récemment identifié l'existence de 42 nouveaux loci de susceptibilité à la PR(169). Cependant les différents polymorphismes ne suffisent pas et ne

sont pas nécessaires pour le développement de la PR. En effet il existe des facteurs environnementaux qui favorisent la PR. Le tabagisme en fait partie, puisqu'il augmente le risque de développer une PR et surtout de produire des ACPA (170). Le tabagisme et le développement d'un broncho-pneumopathie chronique obstructive augmenteraient aussi la citrullination des protéines dans les poumons, ce qui pourrait être une source d'auto-antigènes (171).

Par ailleurs, certaines infections semblent favoriser l'apparition d'une PR. D'une part, la présence d'infection des gencives par *Porphyromonas gingivalis* est associée à la PR (172) et d'autre part cette *P.gingivalis* exprime une PAD capable de citrulliner les protéines de l'hôte, notamment le fibrinogène (173). Par ailleurs, il existe une corrélation positive entre la production d'anticorps anti *P.gingivalis* et le taux d'ACPA (174). De manière très intéressante une étude a été menée sur un groupe d'individus non PR appartenant à une famille dont certains membres étaient touchés par cette pathologie. Dix-neuf pour cent des individus non-PR de la famille développent des ACPA et le taux d'anticorps anti *P.gingivalis* est plus élevé chez ces donneurs tout comme les PR (175). Enfin de l'ADN de *P.gingivalis* a été retrouvé chez les patients atteints de PR (176). Ainsi il existerait bien une relation entre *P.gingivalis* et PR. Le virus d'Epstein-Barr (EBV) a aussi été suggéré comme impliqué dans la PR. Quatre vingt pour cent des patients atteints de PR possèdent des anticorps anti-EBV (177) mais plus important, la fréquence des cellules B infectées par l'EBV est dix fois supérieure chez les patients PR que chez les donneurs sains(178). Selon Saal et al, les personnes touchées par EBV ont 5,47 fois plus de risques de développer une PR et ce risque est augmenté de 15 ou 41 fois si l'individu possède l'épitope partagé ou est HLR-DR4 positif respectivement (179). La mise en évidence de corrélations entre infection et polyarthrite rhumatoïde étaye mon hypothèse que l'immunité innée est impliquée dans la rupture de la tolérance du soi et le développement de la PR.

La PR touche préférentiellement les femmes, trois femmes pour un homme sont touchées. Pourtant cette pathologie ne semble pas être liée à l'X (180). Par contre la grossesse entraîne une amélioration de la PR voire une rémission (181). Ce phénomène serait dû à l'augmentation de lymphocytes T régulateurs au cours des trois premiers mois de grossesse(182). Le rôle des hormones féminines reste encore flou. Par exemple, le traitement de la PR avec des hormones stéroïdes sexuelles entraînant tantôt des améliorations, tantôt des aggravations(183).

B. Aspects cliniques et diagnostic.

La PR est donc une maladie plurifactorielle qui conduit à l'inflammation des articulations et à leur destruction. Cette pathologie est caractérisée par le gonflement de plusieurs articulations, ce qui entraîne douleurs et rigidité. Ce gonflement est dû à l'infiltration de cellules de l'immunité comme les lymphocytes, les monocytes et les neutrophiles. La membrane synoviale qui entoure l'articulation s'épaissit suite à la division des synoviocytes qui la composent, formant un pannus (Figure 9). L'inflammation est maintenue dans l'articulation, car de nouveaux vaisseaux sanguins se forment pour l'irriguer. Toutes ces cellules baignent dans un liquide abondant au cours de l'inflammation, le liquide synovial, dont le rôle physiologique est de lubrifier l'articulation. Lorsque l'inflammation est chronique, la synovie

constitue un milieu favorisant la différenciation des chondrocytes qui rongent le cartilage et des ostéoclastes qui détruisent l'os. La présence de cytokines pro-inflammatoires et de métalloprotéinases dans la synovie favorise la destruction irréversible de l'articulation. Cependant la PR n'atteint pas uniquement les articulations, c'est aussi une maladie systémique. Ainsi on peut retrouver chez 20% des patients atteints de PR des nodules rhumatoïdes. Ces nodules sont situés au niveau des zones de pression dans le tissu sous cutané. On en retrouve aussi dans les poumons, le myocarde ou au niveau des tendons. On retrouve ainsi chez les patients atteints de PR des signes d'inflammation systémique. Les examens biologiques montrent un fort taux de CRP et une vitesse de sédimentation élevée. De façon plus spécifique, les patients atteints de PR produisent dans leur grande majorité des auto-anticorps dirigés contre des protéines citrullinées, ce sont les ACPA. Ces ACPA représentent aussi bien un facteur diagnostique que pronostique et sont retrouvés chez 70% des patients. De la même façon, les facteurs rhumatoïdes sont des auto-anticorps dirigés contre le fragment Fc des immunoglobulines, ils sont retrouvés chez 80% des patients mais sont moins spécifiques de la PR que les ACPA.

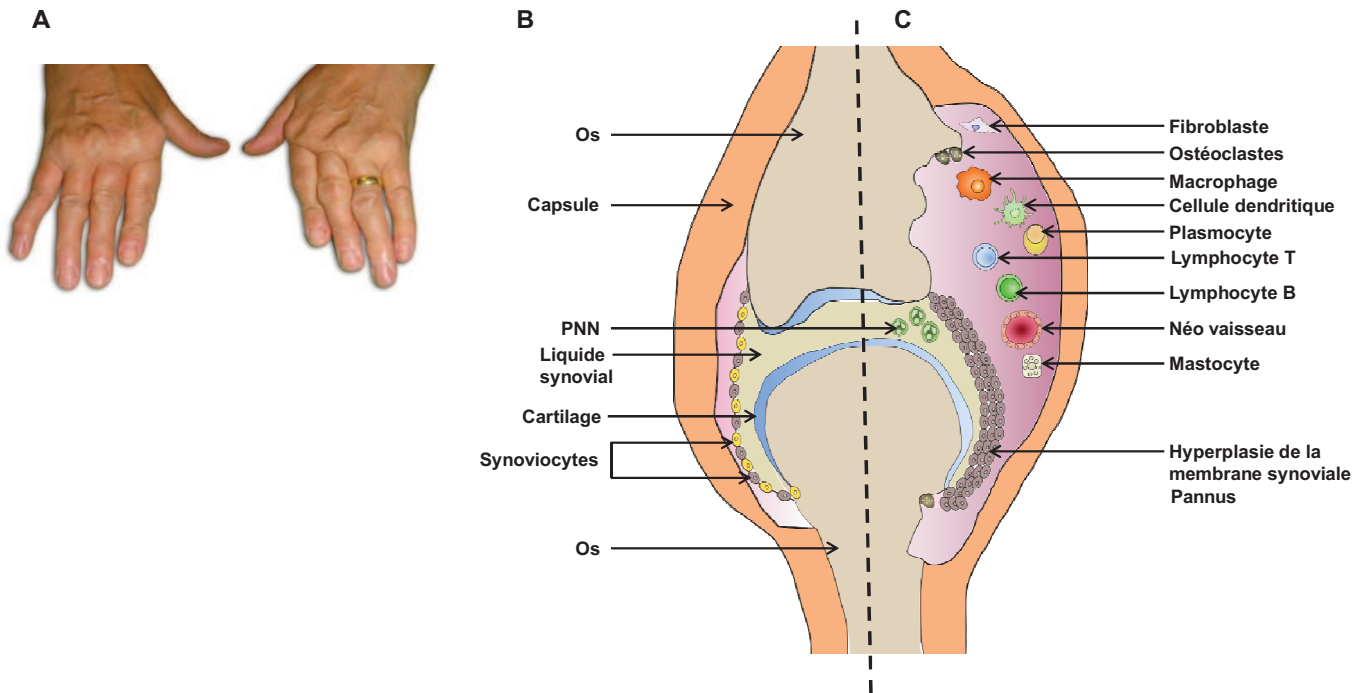


Figure 9: Représentation d'articulations arthritiques.

Mains d'un sujet atteint de PR (A). Vue schématique d'une articulation saine (B) comparée à une articulation atteinte (C). Adapté de Smolen et Steiner(184).

Afin de mieux prendre en charge les patients, le rhumatologue doit établir le plus tôt possible le diagnostic, avant la destruction des articulations. C'est pourquoi deux organisations qui regroupent des rhumatologues et des chercheurs ont mis en place des critères de diagnostic de la PR, l'American College of Rheumatology (ou ACR) et l'European League Against Rheumatism (ou EULAR). Ces groupes ont mis en place des critères de diagnostic dès 1987(185) mais ceux-ci ont été révisés en 2010 (186) (tableau 7).

Atteinte articulaire (0-5)	
1 articulation moyenne ou grosse	0
2-10 articulations moyennes ou grosses	1
1-3 petites articulations	2
4-10 petites articulations	3
>10 articulations (au moins 1 petite articulation)	5
Sérologie (0-3)	
Ni FR ni ACPA	0
FR ou ACPA faiblement positif	2
FR ou ACPA fortement positif	3
Marqueurs de l'inflammation (0-1)	
Ni CRP ni VS élevée	0
CRP ou VS élevée	1
Durée de la synovite (0-1)	
<6 semaines	0
>6 semaines	1

Tableau 7: Critères ACR/EULAR 2010 pour le diagnostic d'une polyarthrite rhumatoïde.

Le diagnostic de la PR est établi si la somme des scores est supérieure ou égale à 6.

Le médecin, une fois le diagnostic établi dispose d'un autre outil lui permettant d'évaluer la sévérité de la maladie, c'est le Disease Activity Score 28 ou DAS28. En fonction des analyses sanguines (taux de CRP, vitesse de sédimentation (VS)), du nombre d'articulations douloureuses et/ou gonflées ainsi que du ressenti du patient, le médecin établit un score DAS28 compris entre 2 et 10.

Le DAS28 est calculé tous les trois mois avec les formules suivantes en fonction des données biologiques choisies:

$$\begin{aligned}
 \text{DAS28} = & 0,56\sqrt{Nb} \text{ articulations douloureuse}(\text{max}28) \\
 & + 0,28\sqrt{Nb} \text{ articulations gonflées}(\text{max}28) + 0,70\text{Ln}(\text{VS}) \\
 & + 0,014(\text{ressenti max } 100)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{DAS28} = & 0,56\sqrt{Nb} \text{ articulations douloureuse}(\text{max}28) \\
 & + 0,28\sqrt{Nb} \text{ articulations gonflées}(\text{max}28) + 0,36\text{Ln}(\text{CRP} + 1) \\
 & + 0,014(\text{ressenti max } 100) + 0,96
 \end{aligned}$$

Le médecin peut ainsi suivre la sévérité et l'évolution de la maladie, sachant qu'un score inférieur ou égal à 3,2 reflète une PR inactive, entre 3,5 et 5,1 une PR modérée et une PR très active au dessus de 5,1. L'évolution du score de moins de 0,6 point montre que le traitement administré au patient est inefficace, une évolution inférieure à 1,2 montre une efficacité modérée du traitement (excepté sur une PR très active) et une baisse de plus de 1,2 montre une amélioration modérée ou bonne de la maladie.

C. Immunopathologie de la PR.

L'origine du déclenchement de la maladie et l'auto-antigène responsable de la production d'auto-anticorps restent inconnus, bien que de nouvelles pistes soient depuis peu investiguées (par exemple l'implication des NET dans la rupture de la tolérance). Dans la PR, l'implication de l'immunité adaptative est assez bien décrite mais l'implication de l'immunité innée beaucoup moins. On a souvent considéré les acteurs de l'immunité innée comme de simples effecteurs de la destruction articulaire, pourtant ils pourraient jouer un rôle important dans la rupture de la tolérance. C'est ainsi que dans le pannus synovial on considère les lymphocytes T comme chefs d'orchestre de l'inflammation chronique de la PR, contrôlant la production d'auto-anticorps par les lymphocytes B, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et l'activation des cellules qui vont remodeler l'articulation (Figure 10). La synoviale est alors considérée comme un organe lymphoïde secondaire dans lequel s'établit un dérèglement lymphocytaire et cytokinique.

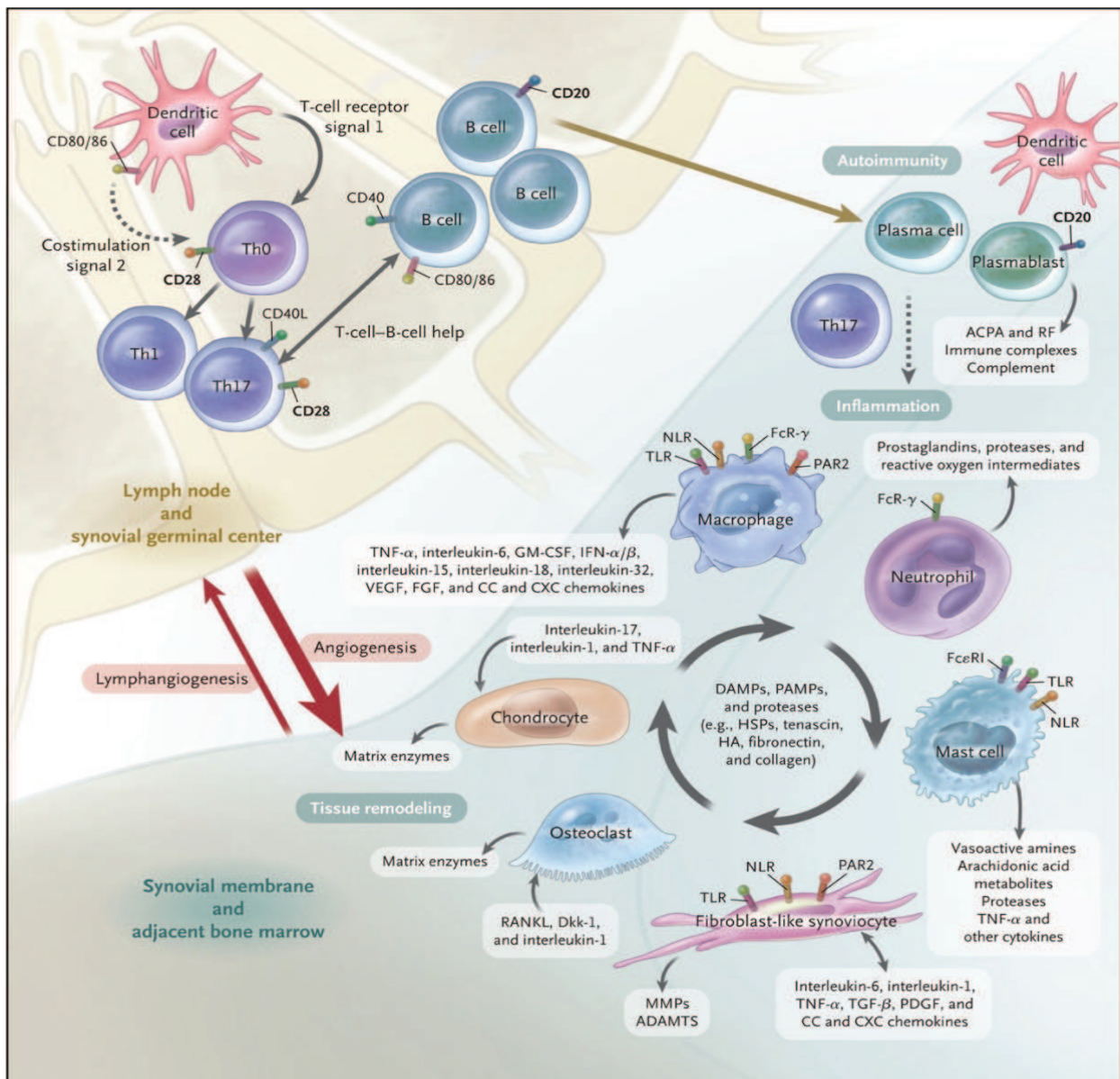


Figure 10: Interactions cellulaires dans l'articulation arthritique.
Issu de McInnes et Schett (187).

1. Dérégulation lymphocytaire de la PR.

Les lymphocytes T auxiliaires (Th) CD4⁺ sont nombreux dans l'articulation malade. De manière générale, il existe différentes sous populations de lymphocytes T auxiliaires, principalement les Th1, Th2, et Th17. Ces différents lymphocytes sont caractérisés par leur profil sécrétoire et leur réponse à différents pathogènes (Figure 11). Les Lymphocytes T régulateurs (Treg) quant à eux sont des lymphocytes qui régulent négativement les réponses des T auxiliaires et promeuvent la tolérance immunitaire. Il existe aussi dans la PR un déficit fonctionnel des Treg qui ne permettent donc pas un retour à l'homéostasie(188,189).

L'orientation de la différenciation des lymphocytes T auxiliaires se fait grâce aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles, les cellules dendritiques. Les DC présentent l'antigène via le CMH au TCR (T Cell Receptor) et secrètent les cytokines qui permettront la différenciation des Th. Dans la PR, la balance est clairement déséquilibrée vers un profil Th1 et Th17 pro-inflammatoire(190). Par exemple, les LT autoréactifs de patients reconnaissent des peptides citrullinés issus du collagène de type II ou de fibrinogène(191). Les lymphocytes T activés vont favoriser la mise en place de la réponse auto-immune et activer les lymphocytes B en coopération avec les macrophages, les DC, les synoviocytes et les fibroblastes, eux aussi activés par les LT. Les lymphocytes T auxiliaires interagissent avec les LB et leur délivrent les signaux nécessaires à leur activation et leur différenciation en plasmocytes. En retour les lymphocytes B peuvent présenter l'antigène aux lymphocytes T et les activer(192). Les plasmocytes synthétisent alors des auto-anticorps, favorisant ainsi la formation de CI. Les Th1 et les Th17 activés jouent également un rôle direct dans la différenciation des précurseurs ostéoclastiques, l'activation des ostéoclastes (cellules responsable de la destruction osseuse) par l'expression de RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) et la production d'IL-17 et de TNF. Le récepteur de l'IL-17A est présent à la surface des synoviocytes, des chondrocytes, des ostéoclastes et des ostéoblastes(193).

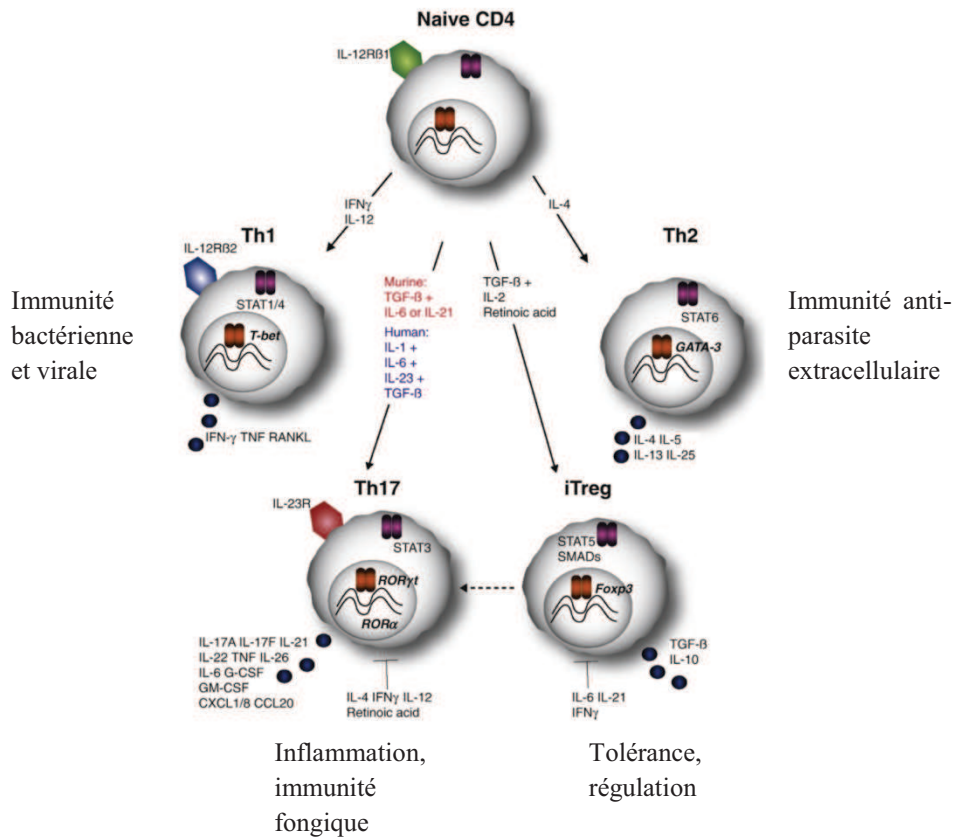


Figure 11: Différenciation des lymphocytes T CD4 et leur réponse immune.

Adaptée de Peck et Al (194) ; iTreg : Treg induit.

2. Dérégulation cytokinique de la PR

En relation avec la modification de la balance des lymphocytes T, il y a, au cours de la PR, un déséquilibre de la balance cytokinique en large faveur des cytokines pro-inflammatoires. De nombreuses cytokines sont impliquées dans l'immunopathologie de la PR (Tableau 88). Cependant, quatre cytokines ont un rôle prépondérant, le TNF, l'IL-1, l'IL-6, et l'IL-17(195).

Le TNF est une cytokine qui joue un rôle majeur dans la PR. Elle est produite principalement par les macrophages et permet l'activation d'une multitude de cellules comme les cellules endothéliales, les synoviocytes, les chondrocytes et les ostéoclastes responsables de la destruction de l'articulation(196). Le TNF active aussi les leucocytes (PNN, lymphocytes, macrophages) et entraîne ainsi la sécrétion d'autres cytokines inflammatoires, maintenant l'inflammation, et la production de CRP(197). L'implication du TNF dans la PR est confirmée par l'efficacité des thérapies visant cette cytokine et aux modèles animaux mais ces points seront développés plus tard.

INTRODUCTION La polyarthrite rhumatoïde et ses modèles animaux.

Cytokine	Cellules sécrétrices	Fonction dans la pathogénèse de la PR
IL-1	Mono, Syno, LB, Chon	Activation des ostéoclastes ; Induit la sécrétion par les synoviocytes de cytokines, MMP, PG et de formes réactives de l'azote ; Induit la sécrétion de cytokines par les macrophages ; différenciation des T naïfs en Th17.
IL-6	Mono, LB, LT, Syno	Activation des leucocytes et des ostéoclastes ; Différenciation des LB ; Régulation du métabolisme lipidique ; Rôle dans l'hématopoïèse; Néo-vascularisation. Différenciation des TH17. Inhibition des Treg.
IL-7	Mono, Syno	Activation des macrophages ; Prolifération et survie des LT ; Régulation thymique et hématopoïétique.
IL-8	PNN, Macro, Treg, DC	Activation et recrutement des PNN, macrophages.
IL-12	Macro, DC	Activation des LB ; Prolifération et maturation des Th1.
IL-15	Mono, PNN, Syno, CD, Masto, LB,	Activation des LT, macrophages, PNN et synoviocytes ; Différenciation des LB.
IL-17	Th17, Syno, PNN, Masto	Activation des synoviocytes, chondrocytes et ostéoclastes ; Induit la sécrétion par les leucocytes de cytokines ; Inhibe la synthèse des GAG par les chondrocytes.
IL-18	Mono, DC, PNN, Plaquettes, CEn	Activation des Th1, neutrophiles et NK; Inhibe la synthèse des GAG par les chondrocytes; Facteur pro-angiogénique pour les cellules endothéliales.
IL-21	NKT, Th17, LThF, Fibroblastes	Activation des LB et des NKT ; Différenciation des plasmocytes et des LThF; Favorise l'ostéoclastogénèse.
IL-22	NKT, Th17	Activation et prolifération des synoviocytes; Favorise l'ostéoclastogénèse.
IL-23	Macro, DC	Prolifération des Th17.
IL-32	CE, Mono, Syno	Différenciation des ostéoclastes ; Induit la sécrétion par les leucocytes de cytokines.
IL-33	CE, CEn	Alarmine, rôle ambivalent : induit la sécrétion de cytokines Th2 et active les mastocytes et basophiles
APRIL	Mono, LT, PNN	Prolifération des LB.
BAFF	Mono, LT, DC, PNN	Prolifération des LB ; Production d'anticorps ; Co-stimulation des LT.
BMP 2-15	CE, Syno	Régulation de la chondrogénèse et de l'ostéogénèse.
IFN type I	"large spectre"	Activation des lymphocytes et des macrophages ; Survie et différenciation des lymphocytes ; Augmente l'expression du CMH.
RANKL	CS, OsteoB, LT	Activation et maturation des ostéoclastes ; Régulation de l'interaction CD-LT ; Résorption osseuse.
TNF	Mono, Masto, Syno, PNN, OsteoB, LB, LT	Activation des leucocytes, cellules endothéliales, synoviocytes et ostéoclastes ; Inhibition de la capacité suppressive des Tregs ; Induit la sécrétion par les monocytes et neutrophiles de cytokines, de MMP et de chimiokines ; Dérégulation de l'apoptose des LT et des neutrophiles; Résorption osseuse et cartilagineuse.
VEGF	Mono, Syno, CEn	Néo-vascularisation.

Tableau 8: Cytokines impliquées dans l'immunopathologie de la PR.

BMP : Protéine osseuse morphogénétique; **DC**: Cellules dendritiques; **CE** : cellules épithéliales ; **CEn** : cellules endothéliales ; **Chon** : chondrocytes ; **CS** : cellules stromales ; **GAG** : Glycosaminoglycane; **LB** : Lymphocytes B; **LT** : Lymphocytes T; **Macro** : macrophages ; **Masto** : mastocytes ; **MMP** : Métalloprotéases matricielles ; **Mono** : monocytes; **NK** : Natural killer; **OsteoB** : ostéoblastes ; **PG** : Prostaglandine; **PNN** : Polynucléaires neutrophiles; **Syno** : synoviocytes; **LThF**: lymphocytes T auxiliaires folliculaires; **NKT**: natural killer T cell; **VEGF**: Vascular endothelial growth factor;

L'IL-1 β , membre de la super famille de l'IL-1, participe, dans l'articulation, à la différenciation des lymphocytes T auxiliaires naïfs en Th17 avec l'aide d'autres cytokines(198). Cette cytokine active les leucocytes et les cellules responsables de la dégradation de l'os. L'IL-1 semble jouer un rôle central dans la dégradation du cartilage, inhibant la synthèse de la matrice cartilagineuse et induisant la synthèse des MMP1, MMP3, MMP8, MMP13 et 14(196) accentuant ce phénomène.

L'IL-6 est produite par les lymphocytes T et B, par les cellules de l'immunité innée (monocytes, macrophages, granulocytes) et par des cellules non immunes comme les chondrocytes, les adipocytes, les fibroblastes et les cellules épithéliales. Elle agit sur la maturation et l'activation des lymphocytes T et B, des macrophages, des ostéoclastes et des chondrocytes(199). Elle favorise la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes ainsi que la production d'auto-anticorps dans le contexte de la PR. De plus, l'IL-6 induit un déséquilibre dans le processus du renouvellement de l'os, favorisant la résorption osseuse(200). L'IL-6 est retrouvée en forte quantité dans le liquide synovial. Surtout, l'IL-6 favorise le développement des Th17 et inhibe celui des Treg.

IL-17 est principalement décrite comme synthétisée par les lymphocytes Th17 mais d'autres cellules peuvent la produire, comme les mastocytes(57), les PNN(36) mais aussi les macrophages, NK et DC(201). Il existe plusieurs formes d'IL-17, les plus importantes sont l'IL-17A et F. Ces cytokines sont clairement pro-inflammatoires ; elles stimulent l'activation des monocytes, des DC (en collaboration avec le TNF) et des fibroblastes et accroissent la production de cytokines pro-inflammatoires et de MMP par ces cellules(202). L'ostéoclastogénèse est aussi influencée par l'IL-17 qui favorise l'expression de RANKL(203), un facteur majeur de la différenciation des ostéoclastes.

3. Auto-anticorps

La présence d'auto-anticorps dans la PR a été mise en évidence dès 1940 par Waaler(204). A l'époque, il avait découvert ce que l'on appelle aujourd'hui les facteurs rhumatoïdes (FR), des IgG ou IgM, plus rarement des IgA, dirigées contre les fragments Fc des IgG. Les ACPA eux, ont été découverts au fil du temps à partir de 1964. A l'époque, différents groupes ont d'abord découvert les « anti-perinuclear factor » ou APF puis plus tard les « anti-keratin antibodies » ou AKA, les « anti-filaggrin antibodies » ou AFA. Tous se sont révélés être des ACPA(205). Les FR et les ACPA sont le signe du dérèglement de l'immunité humorale et la présence d'un ou plusieurs auto-antigènes qui restent non identifiés. Ces auto-anticorps sont utilisés pour diagnostiquer et pronostiquer la maladie : plus le taux d'ACPA et/ou de FR est élevé plus sévère sera la maladie. Mais les auto-anticorps, en particulier les ACPA, ont un rôle effecteur dans la PR. Dans cette partie j'évoquerai l'effet délétère de la production d'auto-anticorps dans la PR, puis les hypothèses avancées par différents groupes concernant les auto-antigènes potentiellement immunogènes.

Les facteurs rhumatoïdes sont trouvés dans l'articulation des patients et forment des complexes immuns qui se déposent dans cette articulation. Le principal effet délétère des facteurs rhumatoïdes est l'activation de la voie classique du complément, via les complexes immuns. Cependant, les FR pourraient aussi directement activer les PNN (206). D'autre part,

les FR libres, en particulier les IgM, augmentent l'activation des macrophages en réponse aux CI contenant des ACPA via les FcR(207,208). Les ACPA sont pour la plupart dirigés contre la vimentine, le collagène, le fibrinogène et la kératine citrullinés mais il a été montré que les NET étaient aussi la cible des ACPA(75,209), en particulier l'histone H4 citrullinée. Cependant, un groupe décrit les ACPA, ou au moins une partie d'entre eux, comme n'ayant une spécificité que pour la citrulline ; les ACPA pourraient donc se lier à quoi que ce soit de citrulliné(210). La citrullination est une modification post-traductionnelle(211) conduisant à la modification d'une arginine en citrulline. Le rôle de la citrullination n'est pas vraiment connu mais rapporté comme impliqué dans de nombreux processus cellulaires et surtout associé à l'inflammation(212). La déimination, ou citrullination se fait grâce aux enzymes PAD (peptidylarginine deiminases), dont il existe plusieurs formes (PAD1, 2, 3, 4, 6). Un groupe a rapporté que les enzymes PAD pouvaient se trouver sous forme fonctionnelle et extracellulaire dans le liquide synovial(213). Ces PAD sont capables de citrulliner le fibrinogène (entre autres) et peuvent être à l'origine de la formation d'auto-antigènes citrullinés. Le groupe de Rosen a montré que des anticorps anti-PAD présents chez les patients PR abaissaient le seuil de calcium nécessaire à l'activation des PAD et par conséquent favoriseraient la citrullination des protéines(214). Le même groupe a montré qu'il existait un profil d'hyper-citrullination des cellules du liquide synovial(214,215). Comme évoqué plus haut, les ACPA ont un effet délétère, ils peuvent activer les macrophages. En effet, sous forme de complexes immuns, les ACPA activent les macrophages via le FcR γ II(216). Kaplan et son groupe ont montré que les ACPA activaient les PNN pour former des NET(75), et le groupe de Schett a montré que les ACPA activaient les ostéoclastes et favorisaient ainsi la résorption osseuse(217). Ces effets délétères ont été confirmés dans des modèles animaux(218–220). D'autre part, il a été montré que les ACPA sous forme liée activent la voie classique du complément, et plus surprenant, activent aussi la voie alterne(221). Les ACPA sont donc à la fois des activateurs cellulaires via les FcR mais aussi des initiateurs de l'inflammation. Il existe aussi dans la PR des anticorps anti-protéines carbamylées et ils représentent comme les ACPA un facteur diagnostique(222–224), mais ce point ne sera pas abordé. Pour finir, il a été retrouvé aussi des anticorps anti-G6PI (glucose - 6-phosphate isomérase) chez les patients atteints de PR(225).

Plusieurs axes d'investigation sont développés pour identifier l'origine de la citrullination dans la PR. Depuis peu on pense que les NET seraient une source d'auto-antigènes dans la PR. En effet, la citrullination est nécessaire à la formation de NET et des histones citrullinées sont présentes sur les NET(75,209,226,227)(Ce point sera développé dans la partie neutrophile et PR). D'autres sources de citrullination, déjà évoquées sont l'infection par *P.Gingivalis*, entraînant possiblement la citrullination des protéines de l'hôte et le tabagisme.

4. Implication des cellules ostéo-articulaires.

Le dérèglement des cellules ostéo-articulaires est à l'origine de la destruction du cartilage et de l'os dans la PR et ce sous l'action de quatre types cellulaires présents dans l'articulation : les synoviocytes, les chondrocytes, les ostéoclastes et les ostéoblastes.

Il existe deux types de synoviocytes qui composent la membrane synoviale. Les premiers sont les synoviocytes de type macrophagique (ou type A) ; leur rôle physiologique est celui

d'un macrophage : phagocytose et présentation de l'antigène. Sous l'effet des cytokines inflammatoires sus-citées, les synoviocytes se suractivent et prolifèrent. Les synoviocytes de type A activés entretiennent l'inflammation par la sécrétion d'IL-1 et de TNF. Les synoviocytes de type fibroblastique (ou type B) produisent physiologiquement l'acide hyaluronique qui lubrifie l'articulation. Sous l'effet des cytokines inflammatoires, les synoviocytes fibroblastiques subissent une transformation phénotypique et produisent des métallo-protéases (MMP) qui détruisent le cartilage. L'expression par les synoviocytes fibroblastiques de proto-oncogènes comme c-Myc serait à l'origine de l'hyperplasie(228). Les synoviocytes fibroblastiques activent par ailleurs l'angiogenèse grâce à la sécrétion de multiples cytokines dont le TGF β (tumor growth factor), l'IL-8 et le VEGF, et facilitent aussi l'ostéoclastogénèse par expression de RANKL(229).

Les chondrocytes produisent le cartilage. Dans la PR ce phénotype est inverse, ils deviennent destructeurs du cartilage(196), produisant des MMP. Ils produisent aussi des cytokines accélérant leur conversion en chondrocytes destructeurs. Enfin, la mort des chondrocytes forme des lacunes dans le cartilage.

Les ostéoclastes sont les effecteurs de la résorption osseuse. Physiologiquement ils travaillent de concert avec les ostéoblastes, qui génèrent l'os et maintiennent à eux deux l'homéostasie de l'os. Dans la PR les ostéoblastes sont « absents » selon Schett et McInnes, et le responsable serait le TNF, inhibant la différenciation de ces cellules(230). La différenciation en ostéoclastes nécessite l'arrivée sur le site de l'inflammation de précurseurs. La différenciation est induite par les cytokines RANKL et M-CSF (macrophage colony stimulating factor) indirectement générées par les Th17 et les synoviocytes fibroblastiques. Cette différenciation peut être inhibée par les cytokines Th2 (IL-4 et IL-10), réduites dans la PR, mais aussi par l'IFN γ et le GM-CSF. Enfin les cytokines IL-1, TNF et IL-17 favorisent la maturation des ostéoclastes(196)(Figure 12).

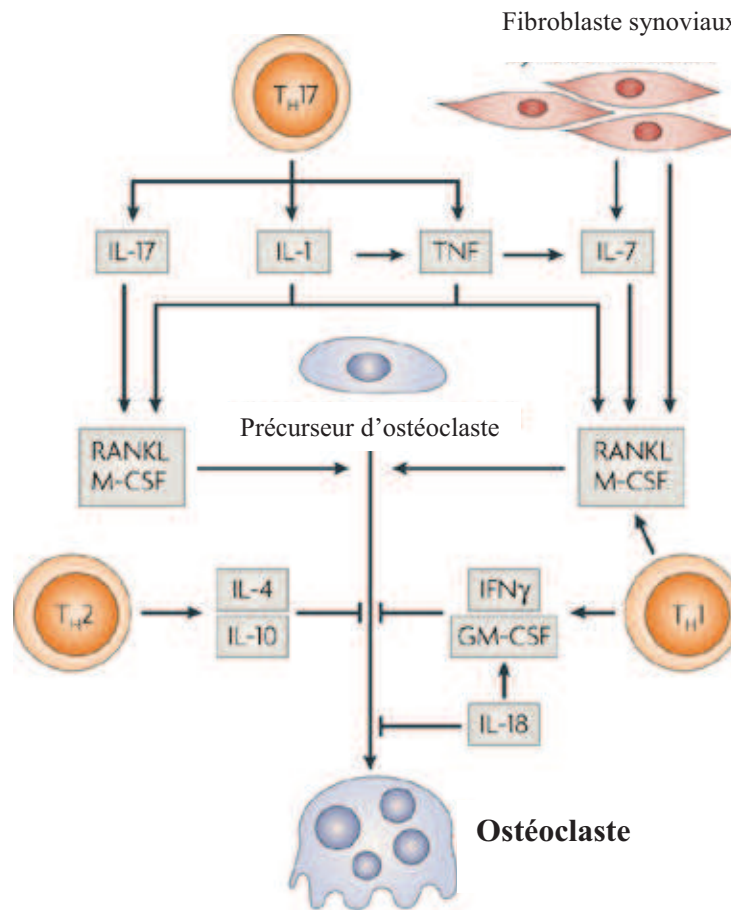


Figure 12: Régulation de la différenciation des ostéoclastes.

Traduit de McInnes et Schett(196).

5. Immunité innée dans la PR.

Il y a de nombreuses preuves montrant que l'immunité innée est activée continuellement dans la PR. D'une part, la présence de cytokines telles que IL-1, TNF et IL-6 montre l'implication de l'immunité innée, en particulier des monocytes/macrophages. En effet ces cellules sont responsables de la sécrétion de telles cytokines mais soutiennent aussi la dégradation de l'articulation et de l'os. Les cellules dendritiques font naturellement le lien entre immunité innée et adaptative. En effet ce sont les cellules qui possèdent la meilleure capacité à présenter l'antigène. Bien qu'ils soient non identifiés, un ou plusieurs auto-antigènes sont présents dans la PR. Les DC seraient donc à l'origine de l'orientation de la réponse immune des lymphocytes T vers une réponse Th1. Comme évoqué plus haut, une infection pourrait être à l'origine de l'activation de l'immunité innée. Les polynucléaires sont activés dans la PR, tout comme le système du complément. Bien que ces deux acteurs occupent une grande place dans l'immunité innée, ils en occupent beaucoup moins dans les recherches concernant la PR. Dans cette partie, nous nous focaliserons sur les rôles établis et potentiels des PNN et du complément dans la PR.

a) Neutrophiles et PR.

Les PNN sont très nombreux dans le liquide synovial des patients atteints de PR. Ils représentent 70% des cellules, ils sont activés et leur apoptose est retardée(231). Il apparaît que les neutrophiles ne sont pas uniquement des cellules recrutant des cellules de l'immunité innée mais pouvant aussi recruter des cellules de l'immunité adaptative comme les lymphocytes B et T, cellules clés de la PR. Les PNN sécrètent BAFF et entraînent une stimulation locale des lymphocytes B dans l'articulation(38). D'autre part il a été montré que les PNN peuvent recruter les Th17(35) CCL2/20. Il a aussi été montré que les PNN pouvaient directement sécréter l'IL-17(36,57). De plus, les PNN expriment RANKL(232,233) et favorisent ainsi potentiellement la différenciation des ostéoclastes et donc la résorption osseuse. En outre, les PNN activés libèrent des MMP et des ROS. Les ROS de l'articulation modifient certaines protéines comme C1q(234) et endommagent le tissu de l'articulation, si bien que le taux de ROS dans l'articulation est corrélé à l'activité de la maladie(235) et à une atteinte articulaire. Ces arguments replacent donc les PNN au cœur de l'atteinte articulaire au cours de la PR. Pour étayer ces propos, il a été rapporté que les PNN expriment un CMH de classe II dans le liquide synovial et peuvent présenter un antigène aux lymphocytes T(236), plaçant les PNN au centre de l'immunopathologie de la PR. Par ailleurs, de plus en plus d'études proposent une hypothèse que nous partageons: les PNN pourraient être une source d'auto-antigènes dans la PR. Plusieurs études suggèrent que les NET, filament de chromatine expulsés par les neutrophiles activés, seraient à l'origine de la rupture de la tolérance(75,226,227,237). La formation de NET nécessite la citrullination des histones(238) et les NET exposent des motifs citrullinés reconnus par les ACPA(209). Rappelons que les PNN dont les PAD sont invalidés ne forment pas de NET(99). La formation de NET est, augmentée chez les patients atteints de PR(75,239). Une étude de Romero rapporte qu'il existerait un profil d'hyper-citrullination des cellules qui composent le liquide synovial inflammé. Cette hyper-citrullination ne serait pas due à la formation de NET mais à un phénomène cytolitique, dépendant de deux acteurs, la perforine et la formation du MAC (complément). En fait, les neutrophiles seraient la cible de ces mécanismes qui forment des pores à travers la cellule, engendrant un influx calcique dans la cellule et activant les PAD(215).

Dans l'articulation, les PNN peuvent être activés par les complexes immuns. Cette activation pourrait se faire via la liaison des CI aux FcR mais aussi via les récepteurs à C1q présents sur les PNN. D'après Crockard, les neutrophiles du liquide synovial de patients PR surexpriment les récepteurs à C1q, augmentant potentiellement la réponse des PNN au CI(240). Il existe donc un lien entre PNN et système du complément dans la PR.

L'importance des PNN dans le développement de l'arthrite a été confirmée grâce aux modèles animaux. Dans le modèle de transfert de sérum de souris K/BxN, la déplétion des PNN avec un anticorps (anti-GR-1) entraîne une protection des souris contre l'arthrite et l'inflammation en général(241). Cependant l'anticorps anti-Gr1 ne cible pas uniquement les neutrophiles mais aussi les monocytes/macrophages, par conséquent il se peut que la conclusion de l'équipe soit erronée. Une autre étude qui utilise des souris n'ayant pas de neutrophiles matures (souris mutante pour Gfi-1, facteur de transcription spécifique du développement des PNN), montre que ces souris ne développent pas du tout d'arthrite(242).

b) Complément et PR.

Le rôle du complément n'est pas complètement élucidé dans la PR bien qu'il soit activé et que des dépôts soient retrouvés dans l'articulation des patients(243). En particulier, les voies activées et les stimuli impliqués restent mal définis. Au cours de la PR, il y aurait une suractivation ou une activation inappropriée de la voie classique du complément en réponse aux CI mais aussi par exemple aux microparticules générées par les cellules activées de l'articulation(244). De manière générale, l'activation du complément conduit à l'augmentation des réponses inflammatoires ainsi qu'à l'activation des LT CD4⁺ naïfs(245) par génération des anaphylatoxines C3a, C4a et C5a. Ballanti a montré qu'il y a d'avantage de C3 et de C4 circulant chez les patients mais leurs produits de clivage n'ont pas été retrouvés(246). Une autre étude a montré que C3a est présent en plus grande quantité dans le liquide synovial chez les patients PR que dans les articulations arthrosiques(247). De son côté, C3b active les PNN via ses récepteurs CR1 et CR3. Ces récepteurs sont surexprimés dans la PR. De la même façon C5a est retrouvé en grande quantité dans l'articulation et entraîne l'arrivée des PNN et la fuite de protéines dans le plasma, deux marqueurs d'inflammation(248). Un SNP de C5 a très récemment été décrit comme associé à la PR ; cette mutation entraîne une augmentation du taux de ce variant de C5a chez les donneurs possédant cette mutation(249). Au cours de la PR, l'expression de C5aR semble augmentée sur un certain nombre de cellules et reflète la gravité de la maladie(250,251). Il existerait des mécanismes liés au complément entraînant la destruction du cartilage(252). Par exemple, C3a se fixe au cartilage et pourrait conduire à la formation du MAC sur le cartilage et sur les synoviocytes, entraînant la libération de collagénases. De plus, certains facteurs relargués lors de la destruction du cartilage (comme la fibromoduline ou la protéine COMP pour cartilage oligomeric matrix protein) pourraient activer la voie classique et la voie des lectines du complément via leur fixation à C1q et à MBL(253,254). Habituellement c'est la voie classique dépendante de C1q qui est activée par les anticorps. Cependant les trois voies du complément sont activées par les auto-anticorps et les complexes immuns(221,255). La glycosylation des immunoglobulines dans la PR entraînerait une augmentation d'activation du complément via la fixation de MBL(256). Trouw a d'ailleurs confirmé l'implication de C1q dans la PR en mettant à jour un polymorphisme de C1q associé au développement de la PR(257). Enfin récemment il a été montré que C1q pouvait aussi être produit par les ostéoclastes et qu'il augmente leur capacité de différenciation(153). La présence de C1q dans les articulations de patients pourrait donc être délétère.

L'inhibition du complément à différents niveaux a été testée dans des modèles animaux, afin d'établir les rôles de chacun de ses composants dans le développement de l'arthrite. Aujourd'hui, il ne fait pas de doute que C5a est important dans cette pathologie. Tout d'abord, dans l'arthrite expérimentale au collagène (AEC), une immunisation contre C5a diminue le développement de la maladie mais une immunisation tardive ne permet pas d'améliorer la situation(258). D'autre part chez le rat, l'immunisation locale dans l'articulation contre C5a permet d'obtenir le même résultat(259). D'après l'équipe de Mathis et Benoist, c'est plutôt C3 qui régirait le développement de l'arthrite. En utilisant différents modèles animaux nécessitant des transferts d'auto-anticorps, il a été montré d'une part que C3 circulant et non local était indispensable et suffisant au développement de l'arthrite (260,261) et d'autre part que la voie alterne du complément est la voie nécessaire au

développement d'une arthrite (262). Ceci est surprenant étant donné que c'est la voie classique qui est activable par les complexes immuns. Benoist et Mathis ont de surcroît, dans ces études, montré que C1q et à fortiori la voie classique du complément n'étaient pas nécessaires dans leur modèle d'arthrite.

c) Implication du TLR9 dans la PR et les modèles.

Rappelons tout d'abord que les PNN expriment les TLR1-10, sauf le TLR3(8). Concernant l'implication du TLR9 dans la PR, un polymorphisme de ce récepteur est associé à un risque accru de développer cette pathologie dans une population de patients PR turcs(263). D'autre part, depuis les années 1950, des antipaludéens sont utilisés dans la PR pour leurs propriétés anti-inflammatoires, en association avec d'autres traitements de fond. L'effet de ces médicaments passerait par l'inhibition des TLR endosomaux, comme la chloroquine qui inhibe l'acidification des endosomes et interagit avec les acides nucléiques rendant impossible leur liaison avec les TLR endosomaux(264,265). Or, de l'ADN extracellulaire présent dans les articulations de patients(266) et de l'ADN riche en motifs CpG retrouvés dans le sang pourraient être des ligands du TLR9(267). D'autres molécules comme la LL-37 sont retrouvées en grandes quantités dans les articulations et pourraient amplifier ou induire l'activation cellulaire via le TLR9(265). De plus, le TLR9 pourrait reconnaître des DAMP, comme les hitones(269).

L'environnement est important pour développement de l'arthrite y compris dans les modèles animaux. Par exemple les souris n'exprimant pas l'IL-1Ra (récepteur inhibiteur de l'IL-1) développent des arthrites spontanées sauf si elles sont débarrassées de leur flore intestinale (souris « germ-free »), suggérant l'implication de la flore dans le développement de la maladie(270). Concernant le TLR9, plusieurs études ont suggéré que ce récepteur pourrait être impliqué dans le développement de la maladie. Par exemple, l'injection intra-articulaire (IA) d'ADN bactériens riches en motifs CpG chez la souris C57BL/6 induit des arthrites(271) et l'injection d'antagonistes du TLR9 durant la phase d'initiation de l'AEC entraîne une baisse de sévérité de la maladie(272). Cependant, Mathis et Benoist ont démontré que l'injection d'oligonucléotides contenant des motifs CpG (CpG-ODN) dans le péritoine (IP) avant un protocole de transfert de sérum de souris K/BxN diminuait la sévérité des arthrites(273). Le rôle du TLR9 n'est donc pas clairement établi, ni dans la PR, ni dans ses modèles animaux. De plus, on sait maintenant que le TLR9 est activé par les ligands autres que les acides nucléiques et réciproquement que ces derniers sont reconnus par des récepteurs autres que le TLR9.

La Figure 13 reprend et résume schématiquement les mécanismes immunopathologiques décrits au cours de ce chapitre.

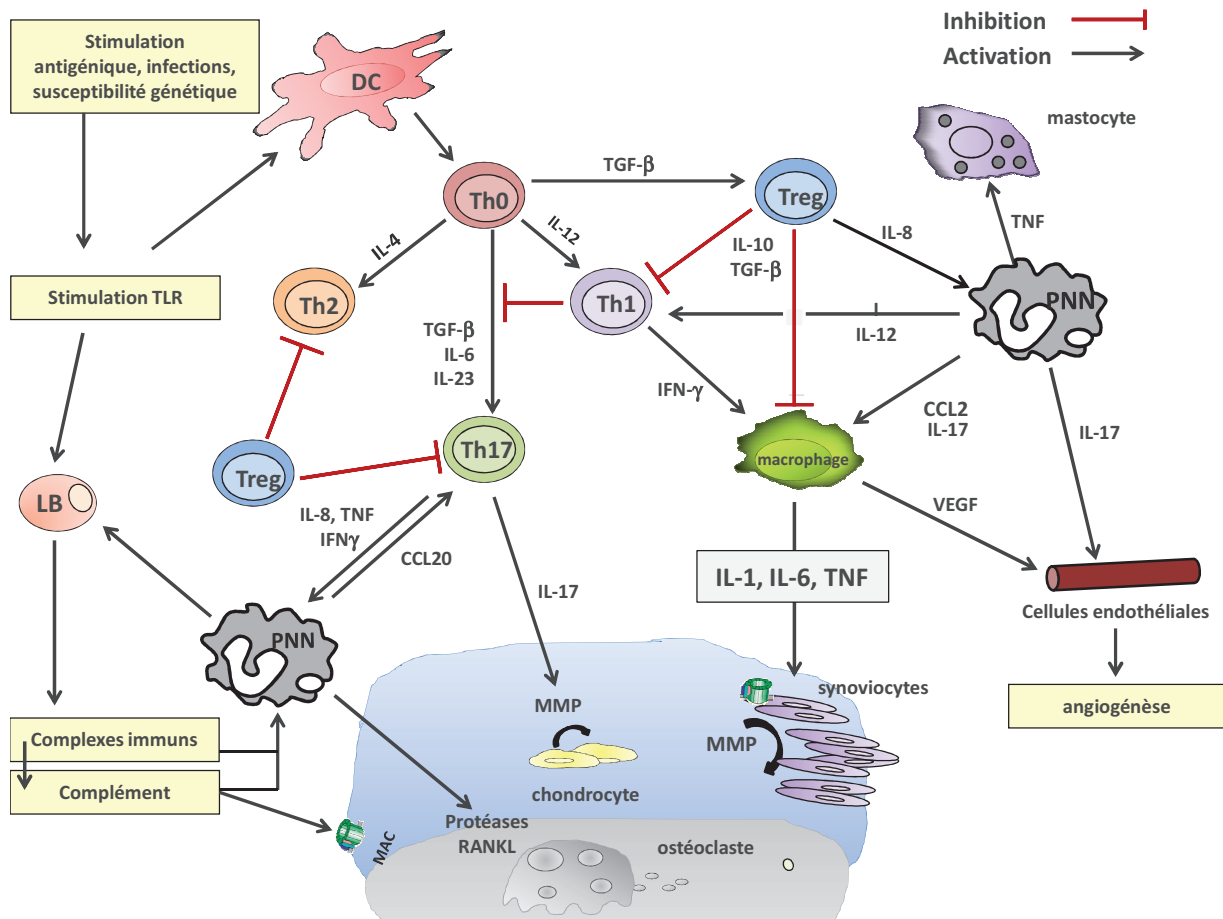


Figure 13: Résumé de l'immunopathologie de la polyarthrite rhumatoïde.

Dans la PR, il existe une stimulation antigénique d'origine inconnue qui conduit à l'activation des CPA notamment les DC. Des pathogènes entraînant la stimulation des PRR, comme les TLR, peuvent favoriser l'activation des DC. Les DC activées dans le contexte de PR orientent la réponse T vers une réponse Th1 et Th17, cellules largement impliquées dans cette pathologie. Les cytokines produites par ces deux types cellulaires entraînent l'activation des macrophages et des cellules de l'articulation conduisant à la destruction de celle-ci. Les PNN jouent aussi un rôle important dans la pathologie : ils sécrètent l'IL-17 activant les macrophages et les cellules articulaires. Les PNN activent les Th17, les Th1 et les lymphocytes B. Les PNN dans l'articulation peuvent potentiellement être activés par des complexes immuns, de la chromatine libre ou sous forme de complexe immun, et des protéines du complément via des récepteurs présents sur les PNN. Le complément activé dans l'articulation contribue aussi directement à la pathologie en détruisant les synoviocytes et le cartilage. L'inflammation est maintenue dans l'articulation grâce à la formation de nouveaux vaisseaux et à la sécrétion de cytokines ou chimiokines telles que le TNF, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, le C5a et le VEGF.

D. Traitements de la PR.

La polyarthrite rhumatoïde est traitée classiquement avec des traitements dits « de fond » ou DMARD pour « disease modifying anti rheumatic drug ». Le traitement de fond est principalement le méthotrexate (ou MTX) mais il existe aussi le leflunomide et la sulfasalazine. Des antipaludéens de synthèse sont parfois utilisés en association avec des traitements de fond. Ces traitements de fond ont des mécanismes d'action différents et sont souvent associés à des antalgiques et anti-inflammatoires type glucocorticoïdes. Le méthotrexate est un cytostatique souvent utilisé dans le cancer pour inhiber la division des cellules malignes. Dans la PR, il pourrait inhiber la prolifération des cellules à division rapide dans le liquide synovial. C'est un antagoniste de l'acide folique qui inhibe la dihydrofolate réductase empêchant ainsi la synthèse d'ADN. Il a été suggéré que le MTX engendre aussi la libération d'adénosine au fort potentiel anti-inflammatoire. Les effets du MTX se font sentir après 4 ou 6 semaines de traitement. La poussée inflammatoire peut aussi être soulagée rapidement par la ponction du liquide synovial lorsque l'articulation est enflammée et volumineuse. Cette intervention permet d'ôter les cellules qui ont infiltré l'articulation et l'excédent de liquide et ainsi diminuer mécaniquement l'inflammation et la douleur du patient. Les traitements de fond classiques sont toujours prescrits en première intention mais, en cas d'inefficacité du MTX par exemple, le médecin prescrit un traitement dit ciblé, aussi appelé biothérapie en France. Ces biothérapies existent depuis une vingtaine d'années et sont souvent des anticorps ou des récepteurs solubles inhibiteurs. Ils ciblent les cytokines ou les cellules impliquées dans la maladie. La biothérapie la plus utilisée est celle qui vise le TNF ; elle est particulièrement efficace et confirme incontestablement le rôle majeur du TNF dans la PR. Les biothérapies, bien que très efficace, ne sont pas prescrites chez tous les patients car leur coût est important et, dans le cas du TNF, permettent les résurgences de maladies opportunistes. De plus le MTX est souvent suffisant. Après plusieurs mois d'utilisation de biothérapie chez les patients, une résistance au médicament peut se développer et donc une baisse d'efficacité survenir. Le médecin dispose alors des thérapies ciblant d'autres cytokines ou cellules. Les biothérapies sont très souvent associées au MTX pour une meilleure efficacité(274).

1. Les anti-TNF.

Les anti-TNF ont d'abord été utilisés dans un modèle murin d'arthrite, notamment celui induit par le collagène(275). L'équipe de Feldman a ensuite été la première à tester un anticorps monoclonal anti-TNF chez l'homme et à obtenir de très bons résultats(276). Il existe aujourd'hui cinq molécules qui ciblent le TNF : l'infliximab (anticorps chimérique monoclonal, celui utilisé par Feldman), trois autres anticorps monoclonaux (adalimumab, certolizumab, golimumab), et un récepteur soluble modifié (etanercept). Trente pour cent des patients traités avec un premier anti-TNF sont réfractaires d'emblée. Il faut alors prescrire une autre biothérapie (anti-TNF ou non).

2. Les anti-IL-6.

Le tocilizumab est un anticorps anti-récepteur de l'IL-6, une autre cytokine clé de la PR. Ce traitement est aussi efficace que celui qui inhibe le TNF mais prescrit souvent en deuxième intention en cas d'échec des anti-TNF et/ou MTX. Le tocilizumab provoque en outre de nombreux effets secondaires. Un autre anticorps anti-IL-6 récepteur est en cours de développement : le Sarilumab. Le blocage du récepteur à l'IL-6 induit le développement de Treg CD39⁺ chez les patients et dans l'AEC(277).

3. L'anti-IL-1

L'anakinra est un récepteur antagoniste de l'IL-1 (IL-1Ra). Son efficacité est plus faible que les anti-TNF et IL-6 et de ce fait est moins utilisé en clinique.

4. L'anti-CD20

Le rituximab est un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre le CD20, une molécule exprimée à la surface des lymphocytes B. Il entraîne une destruction sélective des lymphocytes B, mais n'affecte pas les précurseurs. La délétion des LB dans la PR permet une diminution de l'activation des LT. Le rituximab n'est jamais utilisé en première intention dans la PR mais toujours après l'échec d'au moins un anti-TNF. L'atacept ciblant BAFF, une cytokine activant les LB, se montre beaucoup moins efficace dans la PR(278).

5. Inhibiteur de la costimulation des LT

L'abatacept ou CTLA4-Ig inhibe l'interaction entre CD80 ou CD86 et CD28. Cette interaction est nécessaire aux LT et aux CPA pour que le signal d'activation soit total. Après activation des LT, CTLA-4 est surexprimé par ces cellules. CTLA-4 se fixant à CD80 ou CD86, engendre un signal répresser de l'activation des LT, l'anergie et leur apoptose. L'abatacept se fixe à CD80 ou CD86 empêchant la costimulation et donc l'activation des LT(279). CTLA-4 inhibe indirectement l'activation des LB, des CPA et des synoviocytes. Comme le rituximab, l'abatacept n'est pas utilisé en première intention.

Du fait du coût élevé des biothérapies, une stratégie de vaccination contre des cytokines endogènes, par exemple le TNF, est à l'étude, notamment dans notre laboratoire. Les résultats chez la souris sont remarquables(280,281). Les essais cliniques utilisant une telle stratégie sont en cours(282).

E. PR et modèles animaux

Il existe plusieurs modèles animaux de la PR aux caractéristiques diverses. Ils permettent comme leur nom l'indique de modéliser la maladie à différentes étapes. Il existe des modèles où l'on peut étudier les mécanismes inflammatoires tardifs, les mécanismes précoces, ou le phénomène de rupture de la tolérance.

1. La souris transgénique pour le TNF humain.

Les souris exprimant le transgène du TNF α humain développent spontanément, dès la 3^{ème} semaine de vie, des arthrites progressives et chroniques qui touchent toutes les articulations. Ces souris présentent une hyperplasie de la membrane synoviale, un pannus, une dégradation du cartilage ainsi qu'une infiltration de neutrophiles et de lymphocytes dans l'articulation(283), ressemblant fortement à la pathologie humaine. Ce modèle a confirmé durablement le rôle du TNF dans la PR et est intéressant pour l'étude de nouveaux traitements dans la pathologie humaine.

2. Transfert de sérum K/BxN

La souris K/BxN est le fruit d'un croisement entre une souris KRN possédant un TCR transgénique spécifique de la ribonucléase bovine, avec des souris NOD (Non-obese diabetic). Ces souris développent des arthrites spontanées, chroniques, sévères et destructrices(284). Ce TCR transgénique reconnaît un peptide dérivé de la G6PI, enzyme cytosolique ubiquitaire. La réactivité des LT à la G6PI induit l'activation des LB qui vont produire de larges quantités d'auto-anticorps anti-G6PI et déclencher ainsi une arthrite sévère(285). La pathologie articulaire dans ce modèle est chronique et symétrique, et se rapproche plus des caractéristiques de la PR que le modèle d'AEC. Le transfert de sérum de ces souris entraîne l'apparition d'une arthrite rapide et sévère chez les souris receveuses. Ce modèle est largement dépendant des anticorps mais aussi des neutrophiles(242) et de la voie alterne du complément(260).

3. Le modèle CAIA (Collagen antibody-induced arthritis)

Ce modèle d'arthrite est induit par deux injections d'un cocktail d'anticorps monoclonaux anti-collagène de type II (CII) à des souris naïves, suivies d'une injection de LPS. Ces anticorps reconnaissent un éventail d'épitopes du CII et permettent la formation de CI au niveau du cartilage. Ce modèle ne nécessite pas d'immunisation active. De ce fait, la phase de production d'anticorps n'est pas présente, ce qui permet l'apparition des signes cliniques d'arthrite seulement 48h après l'injection de LPS. Ce modèle mime la phase aiguë de la maladie et les signes cliniques ne persistent que pendant 10 jours environ. Le développement de l'arthrite dans ce modèle n'est pas dépendant du CMH mais est clairement dépendant des cytokines(286), de la voie alterne du complément(287) et des PNN(288).

4. Arthrite expérimentale au collagène.

L'arthrite expérimentale au collagène (AEC) a d'abord été décrite chez le rat(289) et est toujours très utilisée dans cette espèce pour identifier des molécules thérapeutiques dans la PR. Il a été ensuite établi que certaines souches de souris étaient sensibles à l'AEC, ainsi que les primates(290). L'immunisation est réalisée avec du collagène de type II hétérologue ou parfois homologue(291) émulsifié dans de l'adjuvant complet de Freund (CFA, contenant des bactéries *M. tuberculosis* inactivées). Un rappel est réalisé 21 jours plus tard dans du CFA ou

de l'IFA (adjuvant incomplet de Freund, sans bactéries) selon le fond génétique des souris. Dans certains cas, une injection de LPS est effectuée afin de « booster » le développement des arthrites. Suite à cette immunisation, les animaux développent une polyarthrite auto-immune caractérisée par une érosion sévère du cartilage et de l'os. Ces souris immunisées partagent différents traits cliniques, immunologiques et histopathologiques avec la maladie humaine : érythème et œdème ; production de FR et d'anticorps anti-CII ; synovite, formation de pannus, infiltration cellulaire articulaire et érosion du cartilage et de l'os(292). L'induction de la maladie par le CII initie une réponse immune humorale et cellulaire, ciblée au niveau du tissu articulaire, où l'antigène est localisé de manière prépondérante. L'induction de la pathologie est fortement dépendante du CMH et les souris d'haplotypes H-2^a, comme les souris de la lignée DBA/1, sont les plus sensibles. Néanmoins, les souris C57BL/6, plus réfractaires au développement des arthrites (car d'haplotype H-2^b), sont désormais de plus en plus utilisées dans l'AEC car de nombreux « knock-out » (KO) et transgènes ont été créés à partir de cette lignée. L'étude d'un gène unique dans une maladie multifactorielle est essentielle, même si l'utilisation de souris KO dans un modèle induit pose certaines questions (nécessité du gène pour le développement fœtal, modification génétique pouvant modifier d'autres fonctions...)(293).

Les LT et les LB ont une place importante dans le développement de l'AEC. Les LB ont comme principal rôle la production d'anticorps arthritogéniques anti-CII. La place centrale de ces anticorps dans l'AEC est soulignée par le fait qu'ils sont capables d'induire une arthrite par immunisation passive lorsqu'ils sont injectés à des souris naïves (modèle CAIA)(294). De plus, l'intensité des signes articulaires de la maladie est corrélée aux taux d'anticorps dirigés contre certains épitopes du CII(295). Rappelons aussi que la neutralisation des LB s'est révélée être un traitement efficace dans la PR. Les LT jouent un rôle plus complexe dans l'AEC : s'ils agissent en synergie avec les LB, ils induisent également l'activation d'autres types cellulaires (PNN, macrophages, synoviocytes, chondrocytes). Leur transfert ne permet pas d'induire de manière franche une arthrite, par contre leur blocage inhibe le développement de la maladie(296). Comme chez l'homme, les cytokines pro-inflammatoires ont été décrites comme jouant un rôle prépondérant dans ce modèle (TNF α , IL-1, IL-6, IL-17). Par exemple, de récents travaux effectués dans notre laboratoire ont montré que le blocage du récepteur à l'IL-6 dans l'AEC diminuait les arthrites(277). Ce phénomène est accompagné de l'expansion d'une sous-population de Treg aux activités très suppressives. L'utilisation d'adjuvant dans ce modèle et l'injection (parfois nécessaire) de LPS mettent en lumière le rôle probable de l'immunité innée, notamment les TLR, dans le processus d'immunisation. Pourtant le fonctionnement du modèle AEC n'est pas encore complètement compris. On a pu constater de manière expérimentale que la présence d'anticorps anti-collagène dans une souris immunisée n'est pas gage du développement de l'arthrite. Il est fréquent que des souris produisent des anticorps anti-collagène sans développer d'arthrites. Il existerait donc des mécanismes silencieux indispensables au développement des arthrites indépendants de la production d'anticorps.

Les modèles animaux permettent de mieux comprendre les mécanismes liés au développement d'une maladie mais chaque modèle a ses imperfections. La première source de biais est le choix de l'espèce dans laquelle on modélise la maladie. Bien qu'il existe de forte homologies entre l'homme et la souris, il existe aussi des divergences. D'abord, chez la

souris la proportion de leucocytes du sang n'est pas la même que chez l'homme. Les neutrophiles, cellules qui nous intéressent particulièrement, ne représentent que 20% des leucocytes circulants de la souris (50 à 70% chez l'homme). Il existe aussi des différences dans les cytokines produites puisque toutes les cytokines ne sont pas partagées par les deux espèces. Toujours concernant les PNN, les souris ne produisent pas d'IL-8, cytokine clé des PNN humains. De la même façon, certains récepteurs sont différents chez la souris, comme les FcR. Les souris n'expriment pas les FcγRII A et C, ni les mêmes isotypes d'immunoglobulines que les hommes. Par exemple, l'homme produit des IgG1, 2, 3, 4 tandis que la souris exprime leurs homologues IgG1, 2a, 2b, 3(297). Ces exemples montrent bien la différence entre les deux espèces ; il faut donc lors de l'étude de la maladie dans nos modèles prendre en considération ces différences et homologies.

OBJECTIFS

L'objectif général de ce travail était de mieux caractériser certains mécanismes de l'immunité innée impliqués dans la polyarthrite rhumatoïde surtout dans les phases précoces de la maladie.

Un de nos postulats de départ était qu'il existe des mécanismes communs dans la rupture de la tolérance entre certaines maladies auto-immunes. Par exemple, les NET ont déjà montré leur rôle pathogène dans le lupus (58,59,89). Nous pensons qu'ils peuvent aussi avoir un rôle pathogène dans la PR. C'est pourquoi dans ce travail de thèse, nous nous sommes focalisés sur les neutrophiles et en particulier la formation de NET. D'ailleurs, quelques équipes qui travaillent sur le lupus ont elles aussi tenté d'établir le rôle des NET dans la PR. Les NET pourraient être une source d'autoantigènes impliqués dans le déclenchement de la production d'ACPA.

Nous avons aussi étudié un autre aspect de l'immunité innée dans la PR : la voie classique du complément. Cette voie est régie par C1q, et d'après notre postulat, cette molécule pourrait aussi jouer un rôle dans la rupture de la tolérance. Notre hypothèse se heurtait aux études qui montrent que C1q n'a pas de rôle dans l'arthrite. Cependant, ces études sont effectuées dans des modèles ne nécessitant pas d'immunisation active (K/BxN, CAIA) et relatent le rôle effecteur (mais pas initiateur) des voies du complément. Or, nous nous intéressons dans ces travaux au rôle du complément dans la rupture de la tolérance et les phases précoces de la maladie. C'est pourquoi nous avons utilisé un modèle différent des autres équipes : l'arthrite expérimentale au collagène. Une autre hypothèse était que C1q amplifie le développement de la maladie par la reconnaissance de DAMP. L'objectif final de cette étude est, en plus de la volonté de montrer un rôle capital de C1q dans l'arthrite, de découvrir des fonctions encore non décrites de C1q.

Dans des travaux parallèles et complémentaires auxquels j'ai participé, nous avons étudié dans la même optique le rôle du TLR9 dans l'arthrite. Les facteurs environnementaux semblent importants dans le déclenchement et le maintien de la polyarthrite rhumatoïde, notamment les infections. Le TLR9 est l'un des récepteurs de l'immunité innée qui permet de recenser et d'engendrer une réponse aux agents infectieux par la reconnaissance d'ADN issu de pathogènes. Le TLR9 permet aussi la reconnaissance de DAMP issus de la destruction des tissus lors de l'inflammation (histones). L'implication du TLR9 a été suggérée dans la PR et dans d'autres maladies auto-immunes. Pourtant, aucune étude n'a démontré clairement et directement le rôle de ce récepteur. Nous avons donc, grâce au modèle animal, et à des prélèvements de patients, étudié le rôle du TLR9 dans cette pathologie et essentiellement son rôle dans la réponse aux DAMP. Nous avons aussi découvert une expression atypique du TLR9 à la surface des neutrophiles dans un contexte non pathologique ainsi que chez les patients atteints de PR. D'autres équipes avaient rapporté dans des modèles artificiels qu'une telle expression pourrait engendrer la reconnaissance de motifs inappropriés, ce qui nous conforte dans l'idée que le TLR9 pourrait jouer un rôle dans la rupture de la tolérance.

Enfin, toujours en nous focalisant sur le rôle des neutrophiles dans les maladies auto-immunes nous avons cherché à encore mieux définir le rôle de ces cellules dans ce type de maladie. A

cette fin, nous avons cherché et découvert que les neutrophiles sécrètent de l'interféron-alpha, cytokine principalement produite par les cellules dendritiques plasmacytoïdes.

En remplissant nos objectifs, nous cherchons à replacer les neutrophiles et leurs fonctions (nouvellement découvertes ou non), avec l'implication de la voie classique du complément, au cœur du développement de la polyarthrite rhumatoïde.

RESULTATS

I. Article 1

Neutrophil extracellular traps are not only passive targets for autoantibodies but also directly trigger pro- and anti-inflammatory effects partly mediated by the C1q complement protein.

Matthieu Ribon, Sarra Seninet*, Katarzyna Matyja*, Mireille Sebbag, Cyril Clavel, Julie Mussard, Guy Serre, Marie-Christophe Boissier and Patrice Decker.

Soumis

Travaux présentés oralement à: - Premier colloque du Club Neutrophile de la Société Française d'Immunologie, Paris 2015

Travaux présentés par affiche à: - European Workshop for Rheumatology Research, Budapest, 2015
- 2015 Henry Kunkel Society meeting, Annecy 2015

Les « neutrophil extracellular traps » sont une cible pour les ACPA et engendrent une réponse pro et anti-inflammatoire médiée en partie par C1q.

Ce travail a été initié au laboratoire en 2012. Nous savions que les PNN activés formaient des NET. Il y avait à l'époque de nombreuses études relatant le rôle physiologique des NET, c'est-à-dire leur rôle dans l'élimination de pathogènes. De nombreuses molécules issues des granules avaient déjà été décrites comme associées aux NET mais le rôle délétère des NET était encore peu rapporté et, essentiellement dans le contexte du lupus. Le groupe Kaplan venait de rapporter que les PNN de patients lupiques avaient un plus fort potentiel à former des NET, elle décrivit aussi une nouvelle sous population de PNN particulièrement prédisposée à la formation de NET : les low density granulocytes(89).

Partant de notre hypothèse sur le partage de mécanismes entre différentes pathologies auto-immunes, nous nous sommes intéressés aux NET dans un contexte de polyarthrite rhumatoïde, encore peu étudié. L'idée était que la citrullination nécessaire à la Nétose générait des autoantigènes.

Les objectifs étaient, dans un premier temps, de montrer que les NET représentaient une cible spécifique pour les ACPA et donc que les NET seraient une source d'auto-antigènes. Il a fallu pour cela développer le protocole d'induction et de marquage des NET au laboratoire. Nous avons aussi mis en place une collaboration avec l'équipe de Guy Serre à Toulouse pour tester des immunoglobulines purifiées de patients atteints de maladies rhumatologiques contenant ou non des ACPA.

Nos autres objectifs étaient de démontrer un rôle délétère des NET dans la PR suite à l'observation de l'affinité des ACPA pour les NET. Au même moment, le groupe de Kaplan publia ses résultats dans lesquels elle montrait que les patients PR avaient une NETose augmentée et que les NET pouvaient représenter une source d'auto-antigène dans la PR(75).

Nous avons montré que les NET solubles, c'est-à-dire détachés de leur PNN, issus de donneurs sains ou de patients PR étaient capables d'induire une réponse à la fois chez les neutrophiles et les macrophages de donneurs sains et de patients PR. Cette activation est directe et ne nécessite pas la présence d'ACPA. D'autre part, nous avons montré que C1q peut moduler la réponse des macrophages aux NET.

Neutrophil extracellular traps are not only passive targets for autoantibodies but also directly trigger pro- and anti-inflammatory effects partly mediated by the C1q complement protein

Matthieu Ribon^{*}, Sarra Seninet^{*,1}, Katarzyna Matyja^{*,1}, Mireille Sebbag[†], Cyril Clavel[†], Julie Mussard^{*}, Guy Serre[†], Marie-Christophe Boissier^{*,‡} and Patrice Decker^{*}

^{*}University of Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Inserm UMR 1125, Li2P, Bobigny, France,

[†]University of Toulouse, UMR 5165 CNRS-1056 Inserm, Toulouse, France, [‡]Avicenne Hospital, Rheumatology Department, AP-HP, Bobigny, France.

Corresponding author: Dr. Patrice Decker, University of Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Inserm UMR 1125, Li2P, 74 rue Marcel Cachin, 93000 Bobigny, France. Phone: +33 1 48 38 77 91; Fax: +33 1 48 38 88 93; e-mail: patrice.decker@univ-paris13.fr

Running title: pro- and anti-inflammatory activities of NET partly depend on C1q

¹S.S. and K.M. contributed equally to this work.

Abstract

Upon activation, polymorphonuclear neutrophils (PMN) form neutrophil extracellular traps (NET). Those structures are expelled chromatin fibers composed of DNA and associated proteins. The process, NETosis, has been suggested to be pathogenic in certain autoimmune diseases, particularly in rheumatoid arthritis (RA). Indeed, NETosis is dependent on citrullination, a post-translational modification of proteins, and RA is characterized by the production of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA). Although RA PMN show enhanced NETosis and RA autoantibodies recognize NET, the potential pathogenic mechanisms triggered by NET are not elucidated. Therefore, we have analyzed the antigenic and immunogenic properties of NET in RA. No binding of IgG was observed on untreated freshly isolated human PMN. Upon NETosis, a strong recognition by IgG purified from ACPA-positive RA patients was observed, specifically on the NET structures. NET directly activated both macrophages and PMN, leading to IL-8 secretion and CD11b up-regulation, independently of ACPA or endosomal acidification. The stimulatory activity of NET was increased in the presence of C1q. NET from both healthy donors and RA patients induced cell activation. Likewise, both PMN and macrophages from healthy donors and RA patients responded to NET. On the contrary, NET specifically inhibited LPS-induced IL-6 secretion by macrophages. Thus, ACPA from RA patients strongly and specifically recognize NET but not untreated PMN. NET are immunogenic and possess both pro- and anti-inflammatory properties depending on the cell type, the activation level of the target cells and C1q, but do not require ACPA. An excess of NETosis rather than altered NETosis may be pathogenic.

Introduction

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) belong to the first line of defense against pathogens. They are the first cells recruited to inflammatory sites and sustain inflammation by chemoattracting the pro-inflammatory Th17 lymphocytes (1). However, excessive PMN activation or impaired resolution of inflammation may be deleterious. Moreover, PMN can be activated by endogenous factors such as danger-associated molecular patterns and therefore PMN activity requires a tight regulation. Among the different mechanisms triggered, neutrophil extracellular traps (NET) are chromatin fragments expelled by activated PMN and this process, NETosis, was initially described as an innate immunity mechanism involved in the defense against bacteria (2).

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory and autoimmune disease leading to joint destruction whose etiology is still unknown. RA is characterized by the production of the disease-specific anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) which are useful for both diagnosis and prognosis. For example, a subset of those autoantibodies recognizes citrullinated vimentin and may be pathogenic by inducing osteoclastogenesis (3). Moreover, immune complexes made of ACPA and citrullinated fibrinogen, which is present in the synovial tissue of RA patients, induce macrophage activation (4), especially in the presence of IgM rheumatoid factor (5), another autoantibody produced in RA. However, the stimuli and the mechanisms leading to ACPA production are still unknown. Because NETosis is a citrullination-dependent process (6) and ACPA recognize citrullinated proteins, NET might play a crucial role in RA pathogenesis. Indeed, NET might be a source of citrullinated autoantigens and might be either targets for ACPA or at the origin of ACPA induction by favoring the breach of immune tolerance. Both situations might be deleterious, leading directly or indirectly to downstream pathogenic mechanisms, respectively. Recently, spontaneous and LPS-induced NETosis have been shown to be stronger in vitro with PMN

from RA patients in comparison to osteoarthritis patients (7). Moreover, RA IgG stimulate NETosis of RA and normal PMN (7). Particularly, RA antibodies recognize citrullinated histone H4 contained in NET (8).

PMN are activated in RA and depletion of PMN in RA mouse models impairs disease development (9). PMN have particular functions in RA, like differentiation in dendritic cell-like cells (10), secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-17A (11) or expression of the ligand of receptor activator of nuclear factor κ B or RANKL (12), suggesting a role in osteoclast activation and joint destruction. Likewise, we have shown that activated RA PMN secrete IFN- α (13). Interestingly, both numerous PMN and soluble chromatin are present in the synovial fluid of RA patients (14). Moreover, chromatin-containing immune complexes are deposited in affected joints of RA patients (15). It is tempting to speculate that part of the chromatin might come from NET from locally present and activated PMN and that those NET, free or in immune complexes, might be involved in the inflammatory process.

Although the first function of NET is to neutralize bacteria, NET or an excess of NET may be pathogenic in some cases. In systemic lupus erythematosus (SLE), impaired clearance of NET is associated with the production of anti-NET antibodies and nephritis development (16). Moreover, free NET and especially NET in immune complexes trigger IFN- α production by plasmacytoid dendritic cells in SLE (17, 18), a key cytokine in lupus. However, it was recently shown that clearance of NET from healthy donors by normal macrophages does not lead to the secretion of pro-inflammatory cytokines (19) and even that such NET impair the LPS-mediated activation of normal dendritic cells (20). On the other hand, NET are able to prime T lymphocytes (21). Therefore, in addition to the pathogenic activity of NET-containing immune complexes, we hypothesized that NET might directly activate leukocytes in some pathological situations and particularly in RA. We have thus tested and compared the antigenic, immunogenic and inflammatory properties of NET from healthy donors and RA

patients on target cells from healthy donors and RA patients. Moreover, we describe complement C1q-dependent but ACPA-independent and endosomal acidification-independent mechanisms triggering either pro- or anti-inflammatory responses. Our results suggest that abnormal clearance of NET strongly influences innate immune responses.

Materials and Methods

Human samples. A total number of 115 donors (48 RA patients and 67 healthy donors) have been tested in the present study. EDTA-blood from random, healthy individuals (blood bank of Bobigny) and RA patients (Rheumatology Department, Avicenne Hospital, Bobigny) was used. RA patients fulfilled the EULAR/American College of Rheumatology criteria. Experiments with human cells were approved by the local ethics committee (20101203_16052011) and informed consents of the donors were collected.

IgG were purified from ACPA-positive RA patients and from ACPA-negative patients with rheumatic diseases by affinity chromatography on protein G columns as previously described (4). Commercial IgG purified from healthy donors were used as controls.

Cell isolation and culture. PMN and PBMC were freshly isolated by dextran sedimentation from peripheral blood of healthy donors and RA patients (22). Contaminating RBC were lysed using ACK buffer. Monocytes were purified from PBMC by positive selection using CD14 magnetic beads. Cell purities were estimated by flow cytometry. Monocytes were differentiated into macrophages by culturing in X-vivo 15 medium in the presence of 100 ng/ml M-CSF for 7 days in perfluoroalkoxy polymer culture inserts. PMN (defined as CD3⁻, CD19⁻, CD56⁻, CD11b⁺, CD66b⁺ cells, purity > 95 % of living cells, 1.5 x 10⁶ cells/ml) and macrophages (0.75 x 10⁶ cells/ml) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % heat-inactivated FCS or X-vivo 15 medium, respectively, with soluble NET (50 % v/v, i.e. 9-20 µg/ml final) or the NET buffer (see below) in the presence/absence of LPS from *S. typhimurium* (5 or 250 ng/ml for PMN or macrophages, respectively), 0.25 µg/ml R848, 100 µg/ml purified human IgG or 50 µg/ml purified human C1q. To allow interaction, soluble NET and IgG were preincubated for 1 hour at 37° C before addition of cells. In some cases, cells were pre-incubated for 30 minutes at 37° C with ammonium chloride to inhibit

endosomal acidification. Cell activation was estimated after 4-14 hours by flow cytometry (PMN only, as macrophages are adherent) and by measuring cytokine secretion by ELISA.

NETosis induction, immunostaining and analysis by fluorescence microscopy. Freshly isolated PMN were seeded on poly-L-Lysine-coated chamber slides (0.001 %), settled for 30 minutes and activated by 50 nM PMA in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % heat-inactivated FCS. After 2 hours, supernatants were discarded, NET were fixed with 4 % paraformaldehyde and washed. The chamber slides were blocked with 2 % BSA, 2 % heat-inactivated goat serum, 0.2 % Triton X-100 and NET were stained with 100 µg/ml purified IgG (from either ACPA-positive RA patients or ACPA-negative rheumatic patients or healthy donors) followed by an AlexaFluor568-conjugated anti-human IgG antibody. Alternatively, NET were stained with an anti-histones mAb followed by an AlexaFluor568-conjugated goat anti-mouse secondary antibody. After washing, NET were also stained with the Sytox green DNA dye and analyzed on a Zeiss Axioskop fluorescence microscope.

Soluble NET preparation. NETosis was induced in vitro by PMA on poly-L-lysine-adherent PMN as described above except that PMN were cultured without FCS. To produce soluble NET, supernatants were discarded after 4 hours, chambers were washed twice with PBS and NET were detached from plastic by mild DNase 1 digestion (5 U/ml, 15 min) in PBS. The reaction was stopped by 3 mM EDTA and supernatants containing soluble NET were harvested and centrifuged at 300 g for 10 min. The upper phase was collected and NET were enriched by a second centrifugation step (16,000 g, 10 min) and again the upper phase was harvested and frozen. As a control, the same procedure was followed but without PMN in order to prepare the corresponding NET buffer. NET were quantified by fluorescence in a microplate reader (using PicoGreen, a dye for the quantification of soluble dsDNA) and by

spectrophotometry (NanoDrop technology) and characterized by SDS-PAGE and agarose gel. In some cases, NETosis was induced in the presence of 100 μ M diphenylene iodonium.

Flow cytometry. Phenotype and purity of PMN and monocytes was determined by staining with mAb specific for CD66b (FITC-conjugated) or CD14 (PE-conjugated), respectively, or the corresponding isotype control, at 4° C in staining buffer (PBS containing 5 % heat-inactivated FCS, 100 μ g/ml human γ -globulin, 0.02 % sodium azide) and according to classical protocols. All antibodies were purchased from BD Biosciences. Cell viability was estimated by propidium iodide staining. PMN activation was analyzed by staining with mAb specific for CD66b (FITC-conjugated) and CD11b (PE-conjugated). CD11b expression was estimated on CD66b-positive cells.

To estimate IgG/ACPA binding on untreated PMN and PBMC, cells were stained *ex vivo* with the different purified IgG (0 or 300 μ g/ml in staining buffer at 4° C), washed and incubated with a PE-conjugated anti-human IgG.

The total expression of C1q receptors was quantified on primary monocytes and PMN by measuring the capacity to bind C1q. EDTA whole blood was used to minimize manipulations and was stained *ex vivo* directly after lysis of erythrocytes. Whole blood cells were saturated in staining buffer for 20 minutes at 4° C, washed and incubated in staining buffer containing 0 or 25 μ g/ml purified C1q for 30 minutes at 4° C to avoid uptake. After washing, cells were stained with a FITC-conjugated anti-human C1q Ab and analyzed by flow cytometry for the FITC fluorescence on gated PMN or monocytes. Cell identity was confirmed by CD66b or CD14 staining, respectively. Dead cells were excluded by propidium iodide staining. The capacity to bind C1q is defined as: (% of FITC-positive cells incubated with C1q) - (% of FITC-positive cells incubated without C1q).

Cells were analyzed on a **four-color FACSCalibur apparatus** (Becton Dickinson). Data were evaluated with CellQuest Pro software (Becton Dickinson).

ELISA. Detection of IL-8, IL-6 and TNF secretion by human PMN and macrophages was analyzed by sandwich ELISA using OptEIA set or mAb pairs and streptavidin-peroxidase conjugate from BD Biosciences or eBioscience and according to the manufacturer's instructions. Cytokine concentrations in cell culture supernatants are depicted as mean \pm standard deviation of triplicates.

Statistical analyses. The proportions of positive NET stainings with ACPA from RA patients versus ACPA-negative IgG were compared by one-side chi-square. The percentages of C1q-binding PMN and monocytes were compared using a Mann-Whitney test. P values below 0.05 were considered significant.

Results

Both NET from RA patients and healthy donors are antigenic and strongly recognized by ACPA

To determine whether NET are preferentially recognized by ACPA from RA patients, NETosis was induced in vitro by PMA. We first verified that we induced typical NET structures. We indeed observed chromatin fibers with activated PMN, as evidenced by the merged signal upon co-staining of DNA and histones (Fig. 1A). NET were then stained with IgG purified from either ACPA-positive RA patients or ACPA-negative patients suffering from other rheumatic diseases and analyzed by fluorescence microscopy. In contrast to ACPA-negative IgG (Fig. 1C), ACPA-positive IgG strongly recognize NET structures (Fig. 1B), i.e. the chromatin filaments, as demonstrated by the merged signal upon DNA staining. As a control, we observed no binding of IgG purified from healthy donors on NET (Fig. 1D). NET staining was reproduced with 19 donors in 17 experiments and the staining with ACPA from RA patients was stronger than with ACPA-negative IgG in 15 out of 19 cases (79 %; $p = 0.033$), suggesting that NET expose antigenic and citrullinated structures at the surface recognized by RA autoantibodies. By comparing NET induced using PMN isolated from RA patients and healthy donors, we observed that ACPA-positive IgG from RA patients recognize both RA NET (in 8 out of 10 patients) and normal NET (7/9 healthy donors), indicating that normal NET are as antigenic as RA NET and suggesting that the key antigenic event is the induction of NETosis. On the contrary, ACPA-positive IgG do not bind to non-activated PMN as demonstrated by flow cytometry (Fig. 1E), indicating that they specifically recognize NET. Gated monocytes preincubated with IgG were used as positive control (Fig. 1F).

NET from both RA patients and healthy donors activate normal and RA PMN as well as macrophages

To test whether NET are immunostimulatory, we first established a protocol allowing the isolation of enriched and concentrated NET. Indeed, several protocols and approaches have been described but we consider that some of them are not optimal to analyze the effects of NET on cells in co-culture. For example, some studies use the supernatants which actually contain some PMN-derived DNA but also cytokines induced by PMA. Others use a protocol similar to ours but did not verify the cytokine content in NET preparations. Some groups directly co-culture target cells with activated PMN to induce NETosis and used NETosis inhibitors to prove the observed effects are NET-dependent; however, we observed that some of those inhibitors not only inhibit NETosis but also PMN activation and cytokine release (data not shown). In addition, we observed that co-cultures obtained by adding target cells on plastic-adherent NET are also not optimal because part of the PMA or the cytokines secreted by activated PMN bind to plastic (data not shown). We therefore optimized the protocol and included controls to obtain better defined NET, which we call soluble NET, as opposed to NET attached to plastic for microscopy analysis. Figure 2 summarizes the protocol (Fig. 2A) and depicts a typical biochemical analysis of soluble NET. This protocol was highly reproducible, giving soluble NET composed of DNA from ~ 100 bp to ~ 400 bp (Fig. 2B) with individual bands and not a smear and a characteristic protein content (Fig. 2C). No DNA was detected in supernatants, but only after DNase 1 digestion of plastic-adherent NET, and NET induction was blocked by the NADPH oxidase inhibitor diphenylene iodonium (Fig. 2D), in agreement with a role of reactive oxygen species in NETosis (23). Similar results were obtained with normal and RA PMN. Preparations ranging from 18 to 40 $\mu\text{g/ml}$ (as determined by spectrophotometry) were used in cell cultures.

We then tested the stimulatory activity of soluble NET on human inflammatory cells. NET activate both macrophages (Fig. 3, top panels) and PMN (Fig. 3, middle and bottom panels), as evidenced by the secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-8 (macrophages and PMN, Fig. 3A-D) and CD11b up-regulation (PMN, Fig. 3E), indicating that NET are immunogenic in the context of innate immunity. No IL-6 or TNF was induced by NET. Interestingly, both soluble NET prepared with PMN from either healthy donors and RA patients induce cell activation suggesting that normal and RA NET have similar stimulatory properties. In addition, we show that target cells from both healthy donors and RA patients respond to the stimulation by normal or RA NET. When RA PMN are used as target cells, activation may appear lower because cells are pre-activated (as shown by the spontaneous IL-8 release) and therefore probably partly exhausted and less responsive to stimulation. Those results suggest that a key pathogenic event in RA patients is the triggering of NETosis rather than the response to NET. As controls, we first verified that the buffers used to enrich soluble NET do not alter the response of target cells (which is the true negative control for estimating NET-induced cell activation) and second that the cytokine detected after PMN and macrophage activation is not simply due to the passive transfer of the cytokine present in NET preparations but is really secreted by target cells (see also Figure 6 below). For example, the IL-8 concentrations measured in the NET buffer or in normal and RA NET cultured without target cells are 0, 0.26 and 0.43 ng/ml respectively in the cultures with normal macrophage (Fig. 3A) or PMN (Fig. 3C). By using the NET buffer control, we thus also verified that PMA is not transferred in soluble NET after washes. Those controls are often missing in other studies.

ACPA are not required for strong NET-induced cell activation

Because NET are antigenic (Fig. 1) and because PMN as well as macrophages express FcR, we next investigated whether immune complex formation with ACPA modulates NET activity. Soluble NET (or the NET buffer) were thus pre-incubated with ACPA-positive IgG (or the IgG purification buffer) for 1 hour at 37° C and then macrophages or PMN were added to the cell culture plate. As described above, both PMN (Fig. 4A) and macrophages (Fig. 4B) were activated by NET, as shown by IL-8 detection, but in both cases cell activation was not significantly enhanced in the presence of ACPA. Similar results were obtained with normal and RA NET. Therefore, soluble NET directly activate macrophages or PMN and recognition by ACPA is not required for a strong stimulatory activity of NET.

C1q enhances the NET-induced IL-8 secretion by macrophages

C1q has been shown to bind DNA (24, 25) and to deposit onto NET (26). Moreover, we observed that C1q also interacts with chromatin (manuscript in preparation). Because, PMN and macrophages express cell surface C1q receptors, we thus tested whether C1q favors NET-induced cell activation. Interestingly, whereas C1q did not influence PMN activation by NET (Fig. 5A), macrophage activation was much stronger in the presence of C1q (Fig. 5B). Anew, similar results were obtained with normal and RA NET.

To explain the different modulatory activity of C1q on NET-mediated activation of PMN and macrophages, we measured the C1q-binding capacity, which reflects the global expression of all C1q receptors. Interestingly, C1q binding was observed with both PMN and monocytes which were used as precursors to prepare macrophages but the percentage of monocytes expressing C1q receptors was higher than in PMN (Fig. 5C, 45.1 % vs 23.3 %, n = 59 donors, $p < 0.0001$). Similar results were obtained when comparing monocytes and PMN from

healthy donors or RA patients. Thus, our results suggest that C1q facilitates NET-induced activation of cells expressing high levels of C1q receptors by bridging NET to the target cells.

NET-induced cell activation occurs independently of endosomal acidification

Because the response to NET may require endocytosis and degradation of NET, we analyzed the influence of endolysosomal acidification. Moreover, NET are composed of DNA and may therefore trigger cell activation through endosomal TLR9, which requires endosomal acidification. We therefore tested whether endosomal acidification is necessary for NET-induced cell activation and we focused on PMN. Indeed, PMN are typical phagocytic cells which express most TLR (except TLR3, (27)) and strongly respond to TLR agonists. PMN were activated by NET in the presence or absence of ammonium chloride (NH₄Cl), an inhibitor of endosomal acidification (Fig. 6). As a control, activation through endosomal TLR7/8 by the R848 agonist was completely inhibited whereas triggering of cell surface TLR4 by LPS was not influenced by ammonium chloride. Similar results were obtained with normal and RA PMN. Thus, NET-induced cell activation occurs independently of endosomal acidification. This result suggests that endosomal TLR7/8/9 are not involved in triggering PMN activation in response to NET. The incubation of NET without PMN confirms that IL-8 is not transferred with NET but is really produced by activated PMN.

NET are also anti-inflammatory

Finally, we tested whether NET may modulate the LPS-induced cell activation and the secretion of other cytokines. Interestingly, NET inhibit the IL-6 secretion of LPS-activated macrophages (Fig. 7) and are therefore anti-inflammatory. This was observed with both normal and RA NET on both normal and RA macrophages. Only IL-6 and not IL-8 was

down-regulated and this effect was not influenced by the presence of C1q. LPS-mediated activation of PMN was not inhibited by NET (data not shown).

Discussion

Accumulating evidences describe the functions of NETosis in the defense against bacteria. However, the consequences of uncontrolled NETosis or the potential pathogenic effects of NET in other pathological situations, particularly in autoimmune diseases, are less understood. Recently, NET have been suggested to be involved in fibrosis (28), gout (29), as well as in SLE (16-18, 30) and in RA (7), i.e. mostly in inflammation. Nevertheless, at high concentration, NET may participate in the resolution of inflammation (31). Therefore, the immunoregulatory properties of NET need to be further investigated.

In RA, NET might be a source of citrullinated autoantigens and thus involved in the triggering of ACPA production. If recognized by ACPA, NET might also be involved in downstream pathogenic mechanisms like complement activation by NET-ACPA immune complexes. Importantly, PMN from RA patients exhibit an enhanced capacity to spontaneous NETosis (32). In the present study, we first demonstrated that NET are strongly and specifically recognized by ACPA-positive IgG from RA patients. The staining was particularly observed on NET fibers (and not on non-activated PMN) and was much lower with ACPA-negative IgG from other rheumatic patients, whereas IgG from healthy individuals gave no signal. The low signal observed with ACPA-negative IgG is probably due to other antibody specificities present in the serum pool, such as anti-chromatin autoantibodies from lupus patients. Interestingly, we have shown that NET from both healthy donors and RA patients are recognized by ACPA, indicating that once NETosis is triggered, normal NET are as antigenic as RA NET.

We next demonstrated that NET are not only recognized by autoantibodies but are also directly immunogenic, if the definition is adapted to cells of innate immunity, and clearly pro-inflammatory. They indeed activate PMN and macrophages, leading to the secretion of IL-8. Anew, normal and RA NET have similar inflammatory properties and cells from healthy

donors and RA patients respond at a similar extent to NET, excluding an intrinsic difference in RA cell response to NET. We therefore suggest that the NETosis process is not altered in RA but rather that increased levels of NETosis may be pathogenic in RA patients. This is probably the largest analysis comparing RA and normal NET on RA and normal target cells reported so far.

We report also that NET-ACPA immune complex formation is not required to trigger a strong activation of PMN or macrophages. However, it is possible that the density of immune complexes reached in vitro is not optimal to enhance cell activation. In addition, we have excluded that endosomal acidification is important for the NET-mediated cell activation, suggesting that activation do not occur through recognition of the DNA moiety of NET by endosomal TLR9. On the contrary, we have demonstrated that the C1q complement protein enhances the NET-induced activation of macrophages, which were derived from cells highly expressing C1q receptors, suggesting that C1q connects both partners.

Nevertheless, we also show that in some cases NET are anti-inflammatory, as recently suggested (31). This property was only observed with LPS-activated macrophages. IL-6, but not IL-8, was partly inhibited and independently of C1q. Likewise, NET from healthy donors have been reported to inhibit the LPS-induced activation of dendritic cells (20). Thus, a fine control is probably required in vivo to determine whether NET should trigger pro- or anti-inflammatory responses and this control might rely on a balance between the stimuli, the cell types, the activation level of the target cells and the presence of co-factors like C1q that might bind NET.

In contrast to recent studies (19, 20), we show that immune cells are activated by NET. But we have analyzed different cytokines, different target cells, with different protocols to produce NET, we analyzed other pathways, we studied the antigenicity of NET and we compared normal and RA samples.

In conclusion, NET are antigenic, immunogenic, pro-inflammatory and therefore potentially pathogenic, even if they may control activation of strongly-stimulated cells. Further experiments will be required to determine whether NET induce ACPA production and what are the consequences of ACPA binding to NET, such as complement activation, as observed in RA patients.

Acknowledgments

We thank Natacha Bessis (University of Paris 13, Inserm UMR 1125, Bobigny, France) for critical reading of the manuscript, Luca Semerano (University of Paris 13, Inserm UMR 1125, Bobigny, France) for his help during statistical analyses, Mylène Petit (Avicenne Hospital, Rheumatology Department, Bobigny, France) for organizing collection of clinical data and Dennis Lindau (Radboud University, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Nijmegen, The Netherlands) for technical advices.

The authors have no conflicting financial of personal interests.

References

1. Pelletier, M., L. Maggi, A. Micheletti, E. Lazzeri, N. Tamassia, C. Costantini, L. Cosmi, C. Lunardi, F. Annunziato, S. Romagnani, and M. A. Cassatella. 2010. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 115:335-343.
2. Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532-1535.
3. Harre, U., D. Georgess, H. Bang, A. Bozec, R. Axmann, E. Ossipova, P. J. Jakobsson, W. Baum, F. Nimmerjahn, E. Szarka, G. Sarmay, G. Krumbholz, E. Neumann, R. Toes, H. U. Scherer, A. I. Catrina, L. Klareskog, P. Jurdic, and G. Schett. 2012. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J.Clin.Invest* 122:1791-1802.
4. Clavel, C., L. Nogueira, L. Laurent, C. Iobagiu, C. Vincent, M. Sebbag, and G. Serre. 2008. Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fc gamma receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum.* 58:678-688.
5. Laurent, L., F. Anquetil, C. Clavel, N. Ndongo-Thiam, G. Offer, P. Miossec, J. L. Pasquali, M. Sebbag, and G. Serre. 2014. IgM rheumatoid factor amplifies the inflammatory response of macrophages induced by the rheumatoid arthritis-specific immune complexes containing anticitrullinated protein antibodies. *Ann.Rheum.Dis.*
6. Li, P., M. Li, M. R. Lindberg, M. J. Kennett, N. Xiong, and Y. Wang. 2010. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J.Exp.Med.* 207:1853-1862.
7. Khandpur, R., C. Carmona-Rivera, A. Vivekanandan-Giri, A. Gizinski, S. Yalavarthi, J. S. Knight, S. Friday, S. Li, R. M. Patel, V. Subramanian, P. Thompson, P. Chen, D. A. Fox,

- S. Pennathur, and M. J. Kaplan. 2013. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci.Transl.Med.* 5:178ra40.
8. Pratesi, F., I. Dioni, C. Tommasi, M. C. Alcaro, I. Paolini, F. Barbetti, F. Boscaro, F. Panza, I. Puxeddu, P. Rovero, and P. Migliorini. 2014. Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann.Rheum.Dis.* 73:1414-1422.
9. Wang, J. X., A. M. Bair, S. L. King, R. Shnayder, Y. F. Huang, C. C. Shieh, R. J. Soberman, R. C. Fuhlbrigge, and P. A. Nigrovic. 2012. Ly6G ligation blocks recruitment of neutrophils via a beta2-integrin-dependent mechanism. *Blood* 120:1489-1498.
10. Iking-Konert, C., B. Ostendorf, O. Sander, M. Jost, C. Wagner, L. Joosten, M. Schneider, and G. M. Hansch. 2005. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cells. *Ann.Rheum.Dis.* 64:1436-1442.
11. Moran, E. M., R. Heydrich, C. T. Ng, T. P. Saber, J. McCormick, J. Sieper, H. Appel, U. Fearon, and D. J. Veale. 2011. IL-17A expression is localised to both mononuclear and polymorphonuclear synovial cell infiltrates. *PLoS.One.* 6:e24048.
12. Poubelle, P. E., A. Chakravarti, M. J. Fernandes, K. Doiron, and A. A. Marceau. 2007. Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. *Arthritis Res.Ther.* 9:R25.
13. Lindau, D., J. Mussard, A. Rabsteyn, M. Ribon, I. Kotter, A. Igney, G. J. Adema, M. C. Boissier, H. G. Rammensee, and P. Decker. 2014. TLR9 independent interferon alpha production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen. *Ann.Rheum.Dis.* 73:2199-2207.

14. Yu, D., P. M. Rumore, Q. Liu, and C. R. Steinman. 1997. Soluble oligonucleosomal complexes in synovial fluid from inflamed joints. *Arthritis Rheum.* 40:648-654.
15. Monach, P. A., W. Hueber, B. Kessler, B. H. Tomooka, M. BenBarak, B. P. Simmons, J. Wright, T. S. Thornhill, M. Monestier, H. Ploegh, W. H. Robinson, D. Mathis, and C. Benoist. 2009. A broad screen for targets of immune complexes decorating arthritic joints highlights deposition of nucleosomes in rheumatoid arthritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106:15867-15872.
16. Hakkim, A., B. G. Furnrohr, K. Amann, B. Laube, U. A. Abed, V. Brinkmann, M. Herrmann, R. E. Voll, and A. Zychlinsky. 2010. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 107:9813-9818.
17. Garcia-Romo, G. S., S. Caielli, B. Vega, J. Connolly, F. Allantaz, Z. Xu, M. Punaro, J. Baisch, C. Guiducci, R. L. Coffman, F. J. Barrat, J. Banchereau, and V. Pascual. 2011. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci.Transl.Med.* 3:73ra20.
18. Lande, R., D. Ganguly, V. Facchinetti, L. Frasca, C. Conrad, J. Gregorio, S. Meller, G. Chamilos, R. Sebasigari, V. Riccieri, R. Bassett, H. Amuro, S. Fukuhara, T. Ito, Y. J. Liu, and M. Gilliet. 2011. Neutrophils Activate Plasmacytoid Dendritic Cells by Releasing Self-DNA-Peptide Complexes in Systemic Lupus Erythematosus. *Sci.Transl.Med.* 3:73ra19.
19. Farrera, C. and B. Fadeel. 2013. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J.Immunol.* 191:2647-2656.
20. Barrientos, L., A. Bignon, C. Gueguen, L. de Chaisemartin, R. Gorges, C. Sandre, L. Mascarell, K. Balabanian, S. Kerdine-Romer, M. Pallardy, V. Marin-Esteban, and S. Chollet-Martin. 2014. Neutrophil extracellular traps downregulate lipopolysaccharide-induced activation of monocyte-derived dendritic cells. *J.Immunol.* 193:5689-5698.

21. Tillack, K., P. Breiden, R. Martin, and M. Sospedra. 2012. T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J.Immunol.* 188:3150-3159.
22. Rönnefarth, V. M., A. I. Erbacher, T. Lamkemeyer, J. Madlung, A. Nordheim, H. G. Rammensee, and P. Decker. 2006. TLR2/TLR4-independent neutrophil activation and recruitment upon endocytosis of nucleosomes reveals a new pathway of innate immunity in systemic lupus erythematosus. *J.Immunol.* 177:7740-7749.
23. Fuchs, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J.Cell Biol.* 176:231-241.
24. Van Schravendijk, M. R. and R. A. Dwek. 1982. Interaction of C1q with DNA. *Mol.Immunol.* 19:1179-1187.
25. Jiang, H., B. Cooper, F. A. Robey, and H. Gewurz. 1992. DNA binds and activates complement via residues 14-26 of the human C1q A chain. *J.Biol.Chem.* 267:25597-25601.
26. Leffler, J., M. Martin, B. Gullstrand, H. Tyden, C. Lood, L. Truedsson, A. A. Bengtsson, and A. M. Blom. 2012. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J.Immunol.* 188:3522-3531.
27. Hayashi, F., T. K. Means, and A. D. Luster. 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102:2660-2669.
28. Chrysanthopoulou, A., I. Mitroulis, E. Apostolidou, S. Arelaki, D. Mikroulis, T. Konstantinidis, E. Sivridis, M. Koffa, A. Giatromanolaki, D. T. Boumpas, K. Ritis, and K. Kambas. 2014. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *J.Pathol.* 233:294-307.

29. Mitroulis, I., K. Kambas, A. Chrysanthopoulou, P. Skendros, E. Apostolidou, I. Kourtzelis, G. I. Drosos, D. T. Boumpas, and K. Ritis. 2011. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1beta and autophagy-related signaling in gout. *PLoS.One.* 6:e29318.
30. Villanueva, E., S. Yalavarthi, C. C. Berthier, J. B. Hodgins, R. Khandpur, A. M. Lin, C. J. Rubin, W. Zhao, S. H. Olsen, M. Klinker, D. Shealy, M. F. Denny, J. Plumas, L. Chaperot, M. Kretzler, A. T. Bruce, and M. J. Kaplan. 2011. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J.Immunol.* 187:538-552.
31. Schauer, C., C. Janko, L. E. Munoz, Y. Zhao, D. Kienhofer, B. Frey, M. Lell, B. Manger, J. Rech, E. Naschberger, R. Holmdahl, V. Krenn, T. Harrer, I. Jeremic, R. Bilyy, G. Schett, M. Hoffmann, and M. Herrmann. 2014. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat.Med.* 20:511-517.
32. Sur Chowdhury C., S. Giaglis, U. A. Walker, A. Buser, S. Hahn, and P. Hasler. 2014. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res.Ther.* 16:R122.

Footnotes

This work was supported by Inserm and the University of Paris 13 and by a grant from the Fritz Thyssen Foundation (Az. 10.10.2.128) to Dr. Patrice Decker. M.R. was partly supported by a fellowship from Arthritis Courtin Foundation.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Patrice Decker, University of Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Inserm UMR 1125, Li2P, 74 rue Marcel Cachin, 93000 Bobigny, France. Phone: +33 1 48 38 77 91; Fax: +33 1 48 38 88 93; e-mail: patrice.decker@univ-paris13.fr

Abbreviations used: ACPA, anti-citrullinated protein antibodies; NET, neutrophil extracellular traps; NETosis, process of NET formation; PMN, polymorphonuclear neutrophils; RA, rheumatoid arthritis; SLE, systemic lupus erythematosus.

Figure legends

Figure 1. IgG from ACPA-positive RA patients strongly and specifically recognize NET.

(A) Typical chromatin fibers observed upon NETosis. PMN were freshly isolated from a healthy donor, seeded on poly-L-Lysine-coated chamber slides and activated by PMA to induce NETosis. After 2 hours, NET were stained with a DNA dye (green) and an anti-histones mAb followed by an AlexaFluor568-conjugated anti-mouse secondary antibody (red) and analyzed by fluorescence microscopy. The individual fluorescence channels (right) and the merged signals (left) are depicted. (B-D) PMN were freshly isolated from a healthy donor and NETosis was induced as in (A). After 2 hours, NET were stained with a DNA dye (green) and with IgG purified from ACPA-positive RA patients (B) or from ACPA-negative patients with rheumatic diseases (C) or from healthy donors (D) followed by an AlexaFluor568-conjugated anti-human IgG antibody (red) and analyzed by fluorescence microscopy. NET are the green chromatin filaments. The individual fluorescence channels (right) and the merged signals (left) are depicted. Shown is one representative result from 19 independent donors for whom NET have been induced and stained in 17 independent experiments. (E, F) Freshly isolated PMN (E) and PBMC (F) were untreated and stained *ex vivo* with a PE-conjugated anti-human IgG alone (purple) or together with ACPA-positive IgG (green), ACPA-negative IgG (blue) or normal IgG (red) and analyzed by flow cytometry. In (F), cells were preincubated with human normal IgG and monocytes were CD14-gated. Black histograms represent unstained cells.

Figure 2. Characterization of soluble NET. (A) Normal PMN were seeded on poly-L-Lysine-coated chamber slides and activated by PMA for 4 hours to induce NETosis in the presence or not of diphenylene iodonium (DPI, 100 μ M), an inhibitor of the NADPH oxidase. Culture supernatants (sup.) were collected and chambers were washed. PMN were then

treated with DNase 1, the reaction was stopped by 3 mM EDTA and detached soluble NET were collected and centrifuged at 300 g and 16,000 g. NET were analyzed on 1.5 % agarose gel (B), 16 % SDS-PAGE (C) and quantified on a fluorometer (D) using PicoGreen (RFU, relative fluorescence units) and by spectrophotometry. As a negative control, the same procedure was done without PMN. Shown is one representative experiment of 30 independent experiments (except (D), 15 independent experiments) using cells from independent donors (controls or RA patients). Mean and SD are shown.

Figure 3. Soluble NET activate PMN and macrophages. Monocyte-derived macrophages (top panels) and primary PMN (middle and bottom panels) were prepared from healthy donors (A, C, E) or RA patients (B, D, E) and cultured with soluble NET from healthy donors or RA patients, the NET purification buffer, or LPS. Cell activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA (A-D) and CD11b up-regulation by flow cytometry (E). Shown is one representative experiment of at least 3 independent experiments for each panel. Mean and SD are shown. MFI, mean fluorescence intensity. HD, healthy donor; RA, rheumatoid arthritis patient.

Figure 4. Immune complex formation with ACPA do not increase NET-induced cell activation. Primary PMN (A) and monocyte-derived macrophages (B) were prepared from healthy donors and cultured with soluble NET, the NET purification buffer, or LPS in the presence/absence of ACPA-positive IgG (black bars) or the IgG purification buffer (hatched bars). To favor immune complex formation, soluble NET and ACPA were pre-incubated before addition of cells. Cell activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. Shown is one representative experiment of at least 3 independent experiments for each panel. Mean and SD are shown. ACPA, anti-citrullinated protein antibodies.

Figure 5. C1q enhances the NET-induced activation of cells expressing high levels of cell surface C1q receptors. Primary PMN (A) and monocyte-derived macrophages (B) were prepared from healthy donors and cultured with soluble NET, the NET purification buffer, or LPS in the presence (black bars) or absence (hatched bars) of C1q. Cell activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. Shown is one representative experiment of at least 3 independent experiments for each panel. Results are presented as fold increases. (C) The C1q-binding capacity of PMN and monocytes was determined in 59 human blood donors (controls and RA patients). In each donor, PMN and monocytes were compared. Mean and SEM are shown. HD, healthy donor; RA, rheumatoid arthritis patient.

Figure 6. NET activate PMN independently of endosomal acidification. Primary PMN were prepared from healthy donors and cultured with soluble NET, the NET purification buffer, TLR7/8 (R848) or TLR4 (LPS) agonists in the presence (black bars) or absence (hatched bars) of NH₄Cl (inhibitor of endosomal acidification). Cell activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. As a control, NET were incubated without (w/o) PMN. Shown is one representative experiment of 5 independent experiments. Mean and SD are shown.

Figure 7. NET possess an anti-inflammatory activity. Monocyte-derived macrophages were prepared from healthy donors and cultured in medium only or with soluble NET, or the NET purification buffer in the presence of LPS. Cell activation was estimated by measuring IL-6 secretion by ELISA. Shown is one representative experiment of 6 independent experiments. Mean and SD are shown. HD, healthy donor; RA, rheumatoid arthritis patient.

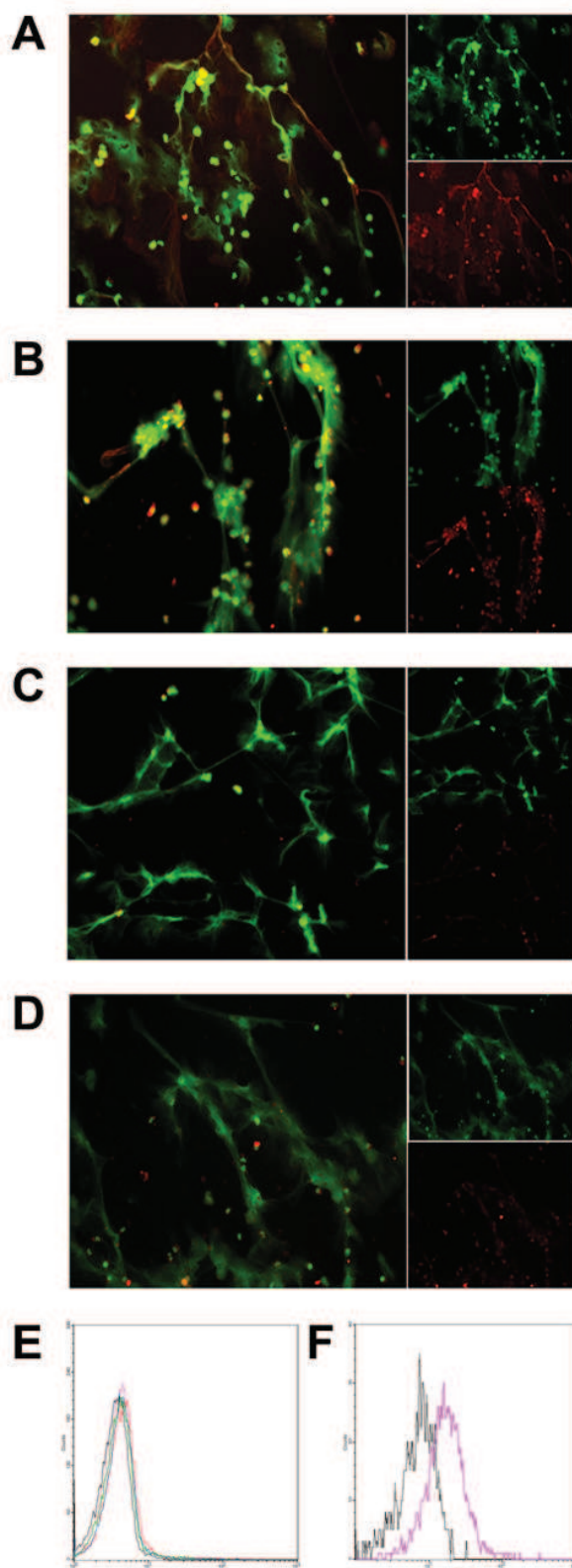


Figure 1.

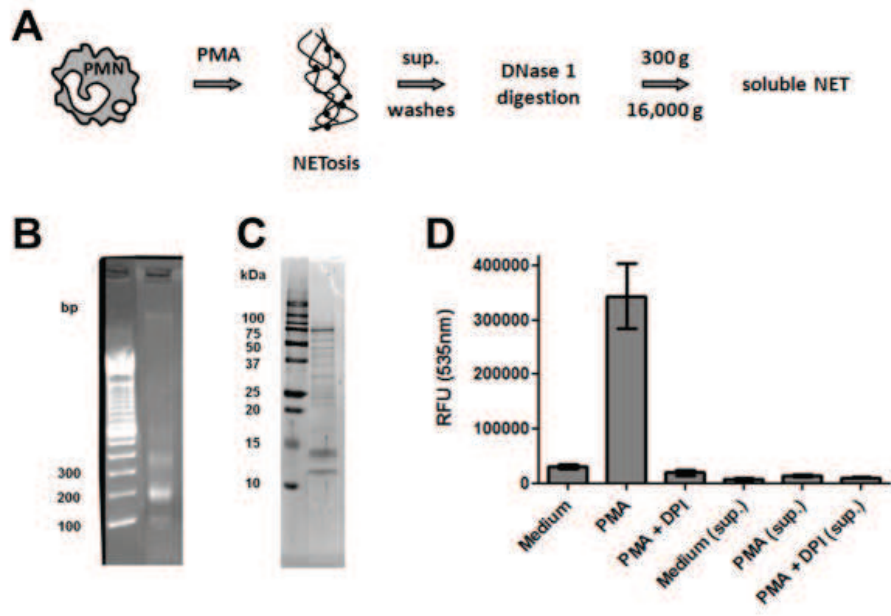


Figure 2.

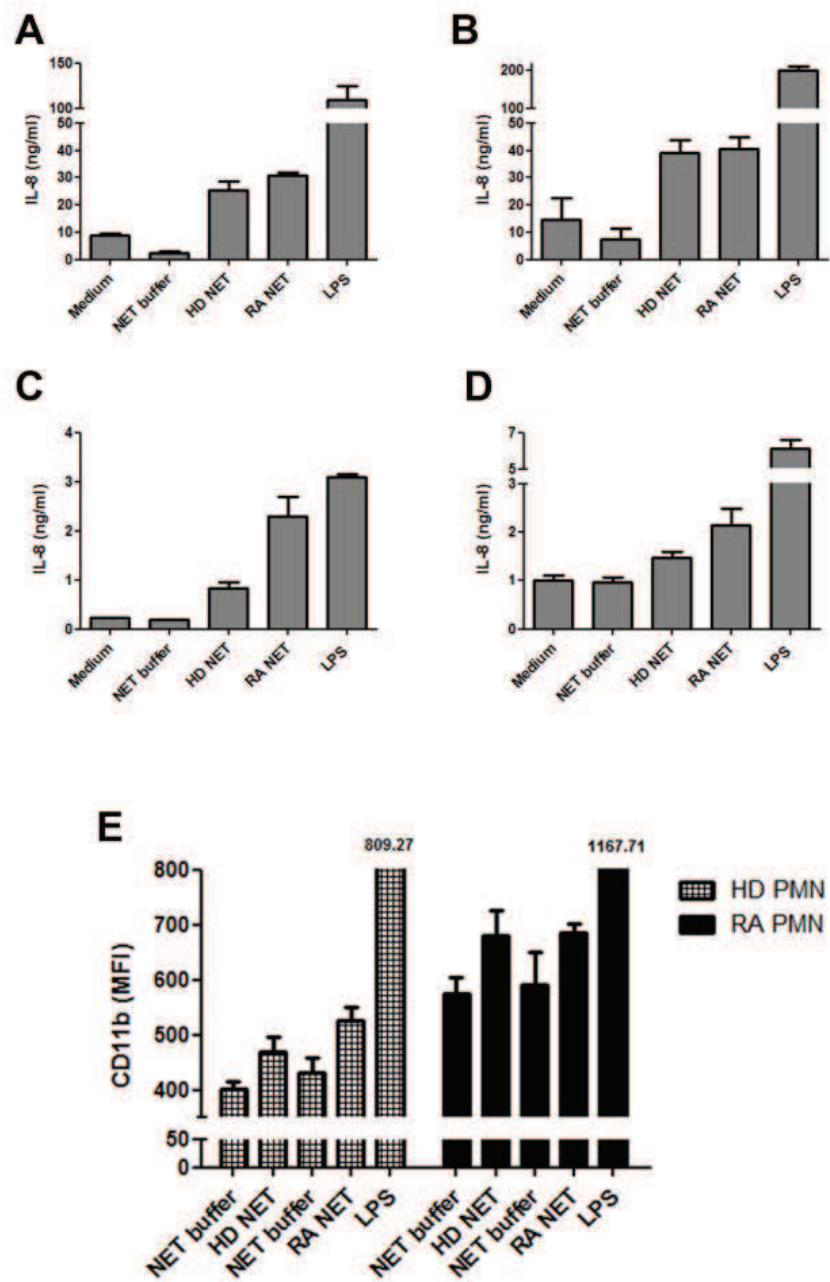


Figure 3.

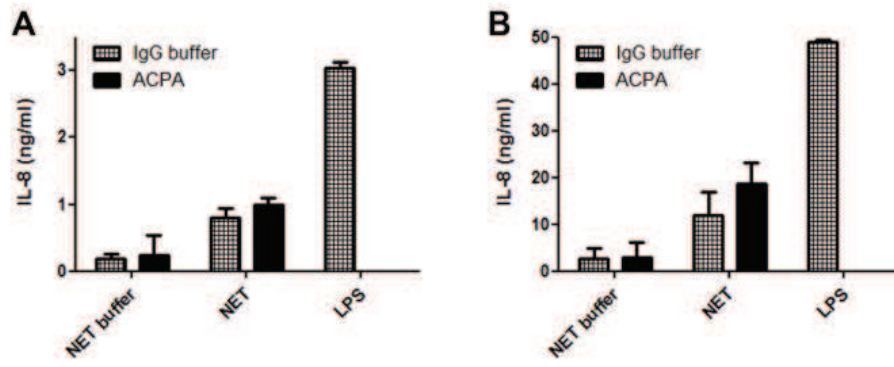


Figure 4.

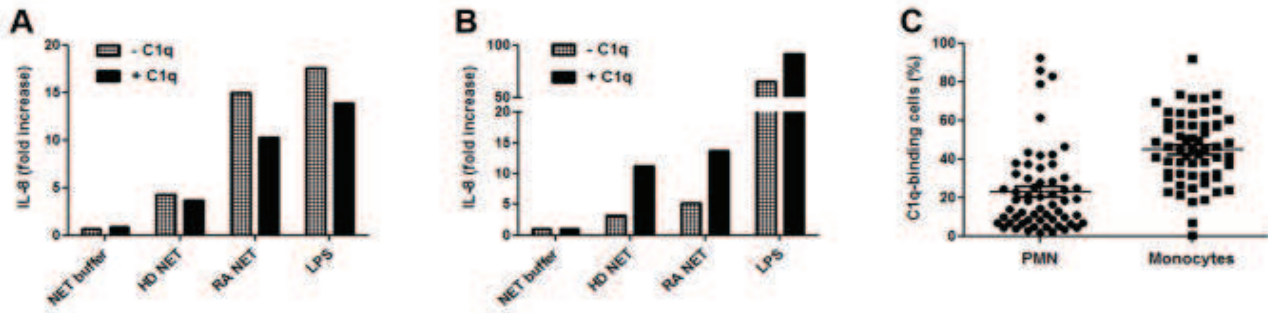


Figure 5.

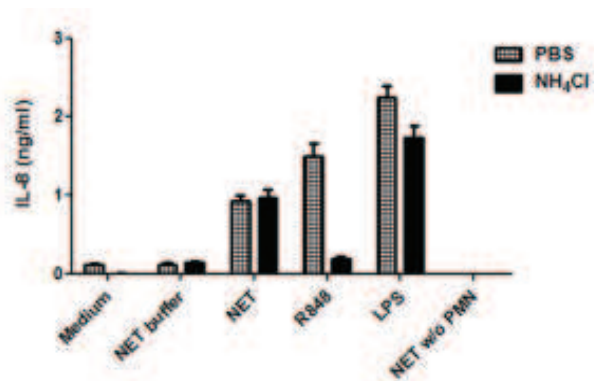


Figure 6.

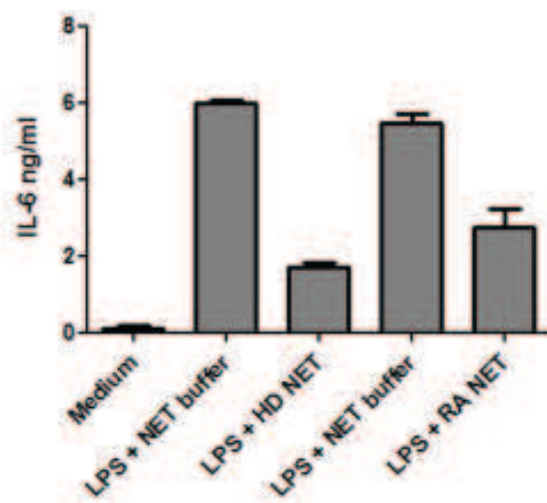


Figure 7.

II. Article 2

C1q is Mandatory for disease development in experimental arthritis and expression of its receptors correlates with disease activity in patients.

Matthieu Ribon, Julie Mussard, Roxane Hervé, Marina Botto, Marie-Christophe Boissier and Patrice Decker

Article en préparation

Travaux présentés oralement à:

- International Congress of Autoimmunity, Nice, 2014
- American College of Rheumatology, Boston, 2014
- 8^{ème} Journée Jacques Courtin. Fondation Arthritis, Paris, 2014.

Travaux présentés par affiche à:

- European Workshop for Rheumatology Research, Lisbonne, 2014

C1q est indispensable pour le développement de l'arthrite expérimentale au collagène et l'expression de ses récepteurs est positivement corrélée à l'activité de la maladie chez les patients atteints de PR.

Ce travail a été initié au laboratoire en 2011. Le rôle du complément dans l'arthrite n'était défini que lors des phases effectrices et plutôt tardives. D'ailleurs, les études montrent que dans ces phases effectrices la voie classique du complément n'est pas requise. Au contraire, dans le lupus, C1q joue un grand rôle puisque de faibles concentrations de cette protéine conduisent à la rupture de la tolérance, en effet C1q facilite l'élimination des auto-antigènes.

Notre hypothèse est que C1q pouvait contribuer au développement de l'arthrite contrairement à ce qui avait été rapporté dans d'autres modèles.

Mon objectif était donc de montrer le rôle de C1q dans les phases précoces du développement de l'arthrite, ce qui n'avait jamais été étudié. Pour cela, nous avons utilisé le modèle d'arthrite expérimentale au collagène qui a pour avantage de nécessiter une immunisation active. Ainsi, le modèle permet d'étudier les phases précoces mais aussi effectrices de la maladie.

J'avais aussi pour objectif l'étude de l'implication de C1q dans la pathologie chez l'homme. Pour cela j'ai mesuré la capacité des leucocytes à fixer C1q ce qui reflète un certain degré d'activation cellulaire. De plus, C1q par sa capacité à reconnaître les complexes immuns pourrait être essentiel à la PR largement dépendante des ACPA via l'activation de la voie classique.

Dans cette étude, nous avons montré que C1q était indispensable au développement de l'arthrite expérimentale au collagène. Il pourrait jouer un rôle dans la prise en charge de l'antigène ce qui est tout à fait nouveau. D'autre part nous avons montré qu'il existait une corrélation significativement positive entre la capacité des PNN à fixer C1q et l'activité de la maladie chez l'homme.

C1q est indispensable pour le développement de l'arthrite expérimentale et l'expression de ses récepteurs reflète l'activité de la maladie chez l'homme.

Introduction

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune caractérisée par la présence d'anticorps anti-protéines citrullinées (ACPA). L'auto-antigène dans cette pathologie reste inconnu. Toutefois, les ACPA ont pour cible, entre autres, le collagène et le fibrinogène citrullinés. L'implication de l'immunité adaptative ne fait pas de doute dans la PR. Les lymphocytes B (LB) auto-réactifs et les lymphocytes T auxiliaires (Th) 17 jouent un grand rôle dans la pathologie. L'arthrite expérimentale au collagène (AEC), un modèle de PR, n'est pas caractérisée par la présence d'ACPA mais est largement dépendante de la production d'anticorps anti-collagène. Ce modèle permet d'étudier le développement de la maladie à des phases précoces, avant la rupture de la tolérance, jusqu'aux phases effectrices et destructives de la maladie. De par la présence d'auto-anticorps dans la PR et l'AEC, ces pathologies impliquent sûrement la formation de complexes immuns (CI). Le système du complément comprend un ensemble de protéines appartenant à l'immunité innée. Le complément comporte trois voies dont la première d'entre elle est la voie classique. Celle-ci est activée par la fixation de C1q aux complexes immuns ou aux cellules apoptotiques(111) mais d'autres ligands ont été rapportés. L'activation de cette voie conduit à la libération, suite à une série de réactions protéolytiques, de deux anaphylatoxines, C3a et C5a, communes aux trois voies du complément. C3a et C5a permettent le recrutement de macrophages et de polynucléaires neutrophiles (PNN) sur le site d'inflammation et favorisent la costimulation des lymphocytes T (LT). La fixation de C1q ou l'activation de la voie classique du complément conduisent à l'élimination des cibles de C1q par phagocytose ou grâce à la formation du « membrane attack complex » ou MAC. C1q et ses cibles sont internalisés par les phagocytes après la reconnaissance de C1q par ses récepteurs spécifiques exprimés par les PNN et les macrophages. Le niveau d'expression des récepteurs à C1q sur les cellules phagocytaires reflète le degré d'activation de ces cellules. De plus, certains récepteurs au C1q permettent l'activation des cellules les exprimant. C1q a été retrouvé dans le tissu synovial de patients atteints de PR(298). D'autre part, un polymorphisme nucléotidique (SNP) de C1q a été découvert et serait associé au développement de la PR(257). Il semblerait donc que C1q joue un rôle important dans la PR. Cependant, et de manière étonnante, les études publiées à ce propos montrent que C1q n'est pas nécessaire au développement de l'arthrite expérimentale(260). L'implication de C1q a été étudiée dans des modèles dépendant d'un transfert de sérum ou d'anticorps arthritogènes, modèles différents de l'AEC. En dépit de ces démonstrations nous avons étudié l'implication de C1q dans l'AEC et la PR. Notre hypothèse est que C1q possède un rôle complexe et reconnaît des ligands endogènes encore inconnus comme des DAMPS (damage associated molecular pattern). Dans cette étude, nous avons montré que C1q est indispensable au développement de l'AEC et que l'expression de ses récepteurs sur les PNN et les macrophages est corrélée à l'activité de la maladie chez l'homme.

Matériel et Méthodes

Souris. Les souris C57BL/6 C1q^{-/-} ont été fournies initialement par Marina Botto (Londres, UK). Les souris ont été élevées dans notre animalerie. Les souris C1q^{+/+} ont été obtenues à partir de croisement de souris C1q^{+/-}.

AEC. L'arthrite expérimentale au collagène a été induite dans des souris C57BL/6 C1q^{-/-} ou C1q^{+/+} mâles âgées de 10 semaines. La maladie est induite par une injection en sous cutané de 50µg de collagène II de poulet (MD Biosciences) et d'adjuvant complet de Freund (CFA) (MD Biosciences) à jour (J) 0 puis une seconde à J21. L'évolution des arthrites a été évaluée en assignant un score compris entre 0 et 4 pour chaque articulation évaluée (10 en tout, score maximum 40). Le score de 0 correspond à une articulation normale, 1 à une articulation enflammée, 2 à une articulation gonflée, 3 à une articulation très gonflée, 4 à une articulation nécrotique ou non fonctionnelle. Cinq jours (J-5) avant l'immunisation et 27 jours après l'immunisation (J27), du sang périphérique est collecté pour effectuer les dosages ELISA, multiplex, et analyse des leucocytes en cytométrie. A l'euthanasie, le sang, la rate, les ganglions inguinaux et poplités sont prélevés pour effectuer les analyses en cytométrie et les dosages (Sang). Les pattes postérieures sont prélevées, incluses en paraffine, coupées, et colorées par hématoxyline/éosine afin d'étudier l'inflammation et la destruction des genoux et chevilles par microscopie. Un score de destruction et d'inflammation (infiltration cellulaire, hyperplasie synoviale) compris entre 0 (normal) et 3 (sévère) est donné pour le genou et la cheville. La moyenne des scores des 4 articulations d'une souris donne le score de la souris. Les pattes antérieures sont prélevées pour en extraire la moelle pour procéder aux expériences d'ostéoclastogénèse.

Sang des souris. Le sang est collecté dans des tubes héparinés puis centrifugé à 300g pendant 10 minutes afin de séparer les cellules et le plasma. Le plasma est centrifugé de nouveau à 1000g 10 minutes pour éliminer toutes les cellules, aliquoté et stocké à -80°C. Les globules rouges du culot cellulaire sont éliminés par lyse hypotonique. Les leucocytes sont comptés et traités pour les analyses en cytométrie.

Organes lymphoïdes : Les ganglions sont dilacérés sur tamis de 70µm, les leucocytes sont comptés et traités pour les analyses en cytométrie. Les rates sont broyées sur tamis de 70µm puis les globules rouges sont lysés par un tampon hypotonique. Les leucocytes sont comptés et traités pour les analyses en cytométrie.

Cytométrie en flux : Les anticorps utilisés pour la cytométrie en flux sont : anti-Ly6G-PE, anti-CD19-FITC, anti-CD86-PE, anti-CD11b-PerCpCy5.5 de BD Biosciences et leurs isotypes correspondants. Les marquages sont réalisés à 4°C après saturation selon les protocoles classiques. Les échantillons ont été acquis sur un FACSCalibur et analysés avec le logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences)

Anticorps anti-CII : Les anticorps IgG totaux anti-CII et les isotypes IgG1 et IgG2a sont titrés à chaque prélèvement sanguin par ELISA. Le collagène de poulet est adsorbé sur plaque, puis les sérums sont déposés au 1/4000. Les IgG (ou isotypes) sont détectés par un anticorps de chèvre anti-IgG de souris (ou anti-IgG1 ou IgG2a) couplé à la phosphatase alcaline puis

révélés par le substrat PNP. Les densités optiques sont normalisées par rapport au contrôle positif.

Multiplex : Les cytokines IL-6, IL-12p70, TNF, IL1 β , VEGF, IL-5, IL-10, IFN γ , IL-33, MIP-2, IL-4, IL-17A, IL-23p19 ont été titrées dans le sérum par la technologie Luminex en utilisant un kit R&D Systems.

Complément : Le dosage de C3a a été réalisé par ELISA. Chaque point de cinétique de chaque souris a été testé en duplicate. Les anticorps de rat anti-C3a de souris (BD biosciences) ont été adsorbés sur une plaque de microtitration. Les serum de souris dilués au 1000^{ème} sont ensuite incubé dans la plaque. C3a est détecté par un anticoprs de rat anti-C3a de souris (BD biosciences) conjugué à la biotine. La peroxidase conjuguée à la streptavidine est ensuite incubée sur la plaque puis révélée par le substrat TMB (Sigma). Les concentrations sont déterminées grâce à une gamme étalon.

La moelle est extraite des os des membres antérieurs après AEC. Les hématies sont lysées et les leucocytes comptés pour êtreensemencés à 10⁶ cellules par puits dans une plaque contenant ou non un disque d'os. La différenciation des ostéoclastes est induite pendant 7 jours avec du M-CSF à 30ng/ml et RANKL à 100ng/ml. Les ostéoclastes sont ensuite fixés et l'activité TRAP est révélée. Les ostéoclastes sont comptés lorsqu'une cellule possède au moins trois noyaux et a une activité TRAP positive. Pour estimer l'activité des ostéoclastes, la surface de résorption est mesurée au microscope.

Sang homme : Le sang est fourni par l'EFS de Bobigny (donneurs sains) ou le Service de Rhumatologie de l'hôpital Avicenne à Bobigny. Une convention a été établie avec l'EFS, et le consentement éclairé des patients obtenu. Les globules rouges sont lysés par un tampon hypotonique. Les leucocytes sont comptés et traités pour les analyses en cytométrie. Les données cliniques ont été collectées

Liaison de C1q: Les leucocytes du sang sont incubés avec 25 μ g/ml de C1q humain purifié, 30 minutes à 5°C. Les cellules sont ensuite immuno-marquées avec un anticorps anti-C1q humain conjugué au FITC pendant 25 minutes à 5°C. Des cellules non incubées avec du C1q humain libre sont marquées de la même façon et représentent le contrôle négatif. Le pourcentage de cellules positives obtenues avec ce contrôle est soustrait au marquage avec C1q afin de mesurer la capacité des leucocytes à fixer le C1q exogène.

Résultats

Les souris déficientes pour C1q sont protégées de l'AEC.

Nous avons tout d'abord étudié la nécessité de C1q dans le développement de l'AEC. Pour cela, l'arthrite a été induite dans des souris C57BL/6 C1q^{-/-} ou C1q^{+/+} (true littermates). L'évolution de la maladie a été suivie à partir du développement des arthrites jusqu'à l'euthanasie des souris. Nous avons montré que les souris qui n'expriment pas C1q (C1q^{-/-}) sont totalement protégées de l'AEC alors que les « true littermates » développent des signes cliniques d'arthrite relativement sévères (Figure 14A). Cette observation a été confirmée au niveau histologique. Les souris C1q^{-/-} ne présentent pas ou peu d'infiltration cellulaire dans l'articulation ni de destruction du cartilage ou de l'os contrairement aux souris C1q^{+/+}. (Figure 14B, C, D). C1q est donc indispensable au développement des arthrites.

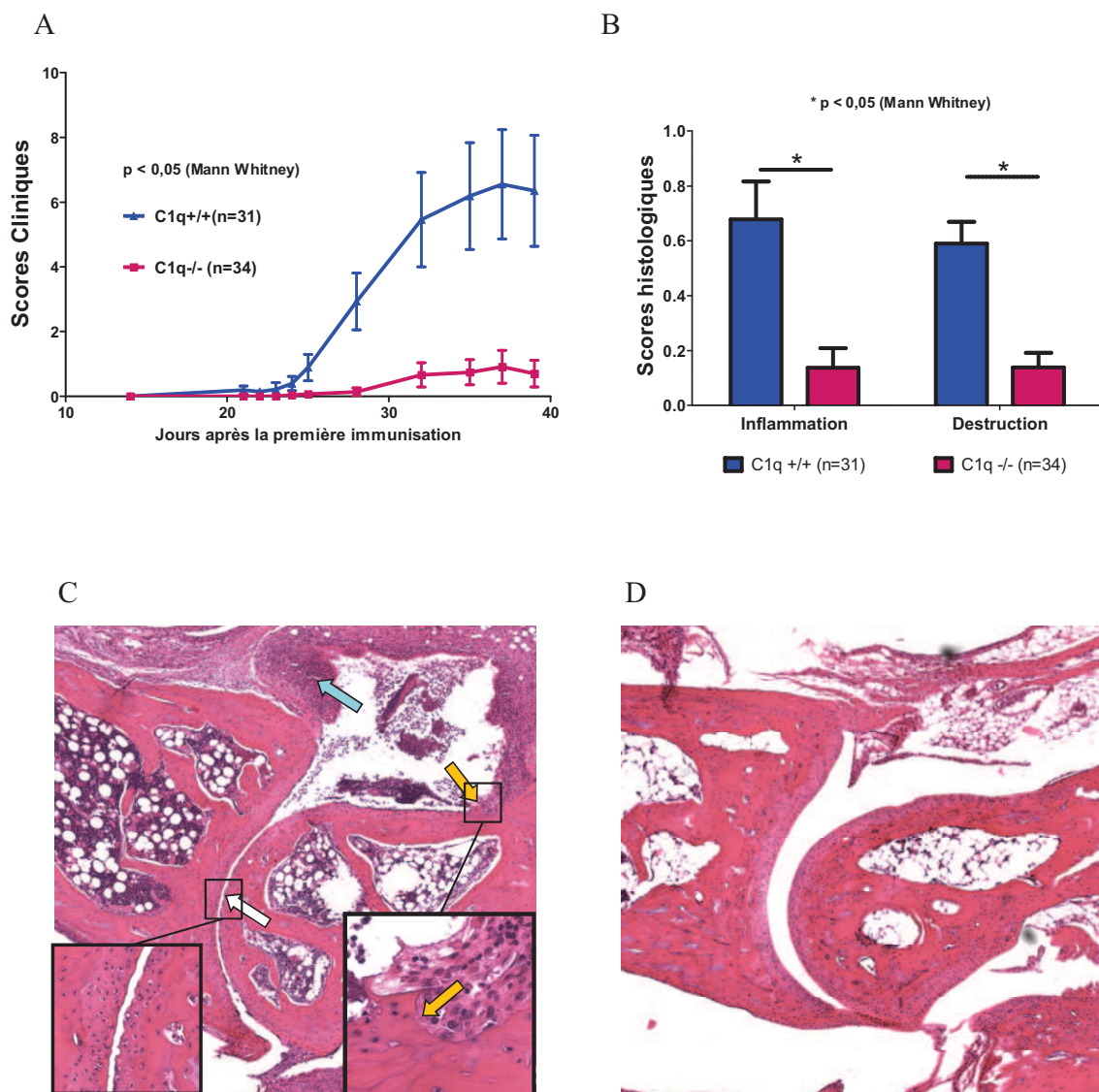


Figure 14: Les souris C1q^{-/-} ne développent pas de signe d'arthrite.

34 souris C1q^{-/-} et 31 souris C1q^{+/+} ont été immunisées deux fois avec 50µg de CII de poulet dans du CFA. Les résultats proviennent de trois expériences indépendantes. (A) Le développement des arthrites a été évalué par observation des pattes. (B) L'inflammation et la destruction articulaires ont été déterminées par observation des lames histologiques colorées par hématoxyline/éosine (0 : pas d'atteinte, 3 : atteinte sévère) (C, D). Photos d'une cheville (X200) de souris C1q^{+/+} (C) versus C1q^{-/-} (D). La flèche bleue montre une forte infiltration cellulaire (inflammation), la flèche blanche désigne l'irregularité du cartilage (destruction), flèche jaune montre l'érosion du tissu par les cellules infiltrées (inflammation/destruction). Les moyennes et les erreurs types sont représentées. Test statistique : Mann-Whitney (en A, sur les aires sous la courbe).

Les souris C1q^{-/-} produisent de forts taux d'anticorps mais néanmoins plus faibles que les C1q^{+/+}.

Nous avons cherché à savoir par quels mécanismes les souris C1q^{-/-} étaient protégées des arthrites. Pour cela, nous avons mesuré les taux d'anticorps anti-collagène produits par les souris immunisées. Les deux groupes de souris C1q^{-/-} et C1q^{+/+} produisent un fort taux d'anticorps totaux anti-collagène II (CII). Néanmoins les souris C1q^{-/-} produisent deux fois moins d'anticorps que les souris C1q^{+/+} (Figure 15A). Nous avons établi une cinétique afin de vérifier si la production d'anticorps était retardée dans les souris C1q^{-/-} ou diminuée généralement. Il apparaît que les souris qui n'expriment pas C1q produisent des anticorps anti-CII selon la même cinétique que les souris C1q^{+/+} ; la quantité d'anticorps est en revanche diminuée de moitié à chaque temps (Figure 15B).

Anticorps anti-collagène (IgG totales)

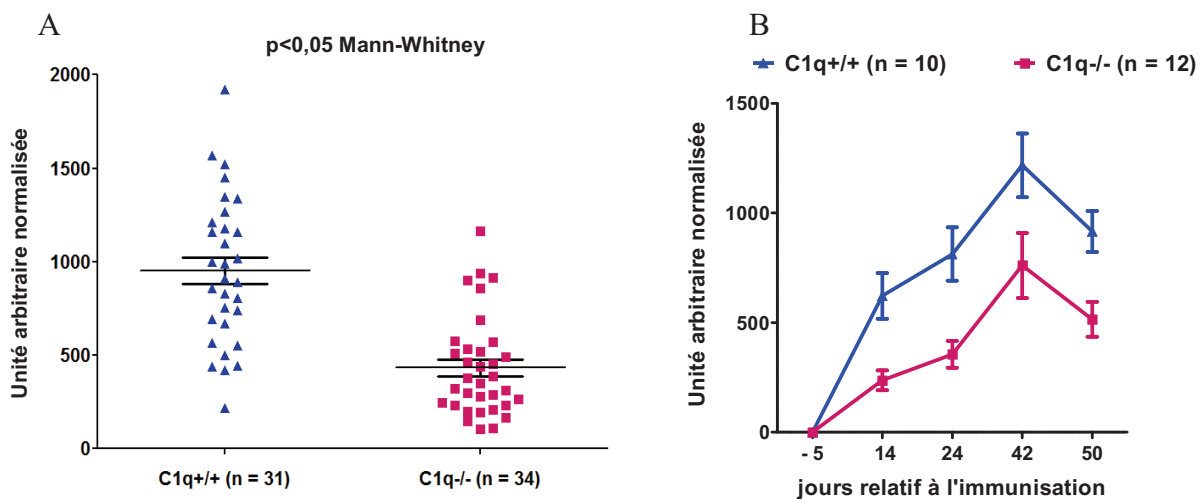


Figure 15 : Production d'anticorps anti-CII.

Les IgG anti-CII de poulet ont été titrés dans le plasma de 31 souris C1q^{+/+} et 34 souris C1q^{-/-} 29 jours après la première immunisation. Les résultats proviennent de trois expériences indépendantes (A). Les IgG anti-CII de poulet ont été titrés dans le plasma de 10 souris C1q^{+/+} et 12 souris C1q^{-/-} 5 jours avant la première immunisation et 14, 24, 42, 50 jours après la première immunisation, (B). Les moyennes et les erreurs types sont représentées. Test statistique : Mann-Whitney.

La balance IgG1/IgG2a n'est pas modifiée dans les souris C1q^{-/-}.

Les isotypes IgG1 et IgG2a ont été titrés parmi les anticorps IgG anti-collagène totaux pour déterminer si la balance Th1/Th2 était modifiée dans les souris C1q^{-/-}. Dans l'AEC et dans la PR en général, la réponse Th1 est délétère et majoritaire. Les IgG2a sont produits suite à l'orientation vers une réponse Th1 et sont pathogènes dans l'AEC. Les souris C1q^{-/-} produisent moins d'anticorps anti-CII et d'isotypes IgG1 et IgG2a (Figure 16). Mais le même ratio IgG1/IgG2a est retrouvé dans les souris C1q^{-/-} et C1q^{+/+}, ce qui indique que la balance Th1/Th2 n'est pas modifiée dans les souris C1q^{-/-}.

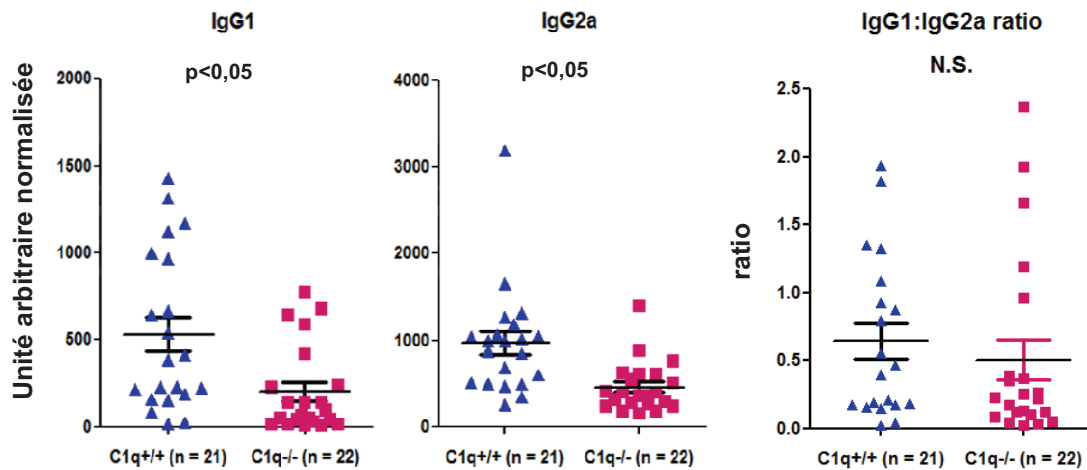


Figure 16: Isotypes anti-CII.

Les isotypes IgG1 et IgG2a ont été titrés parmi les IgG anti-CII de 21 souris C1q^{+/+} et 22 souris C1q^{-/-} 29 jours après la première immunisation. Les résultats proviennent de deux expériences indépendantes. Les moyennes et les erreurs types sont représentées. Test statistique : Mann-Whitney. N.S : non significatif

La fréquence et l'activation des leucocytes ne sont pas modifiées dans les souris C1q^{-/-} au cours de l'AEC.

Afin d'expliquer la protection des souris C1q^{-/-}, nous avons cherché à déterminer si une sous-population leucocytaire pouvait être à l'origine de ce phénomène. C'est pourquoi nous avons étudié la fréquence des lymphocytes T et B ainsi que les PNN et leur activation au cours de l'arthrite, dans le sang et les organes lymphoïdes. Nous n'avons pas décelé de différence entre les deux groupes de souris dans le sang 27 jours après l'immunisation (Figure 17) ou dans le sang, la rate et les ganglions lymphatiques, 40 jours après immunisation (données non montrées). Nous n'observons pas non plus de différence d'expression du CD11b ou du CD86.

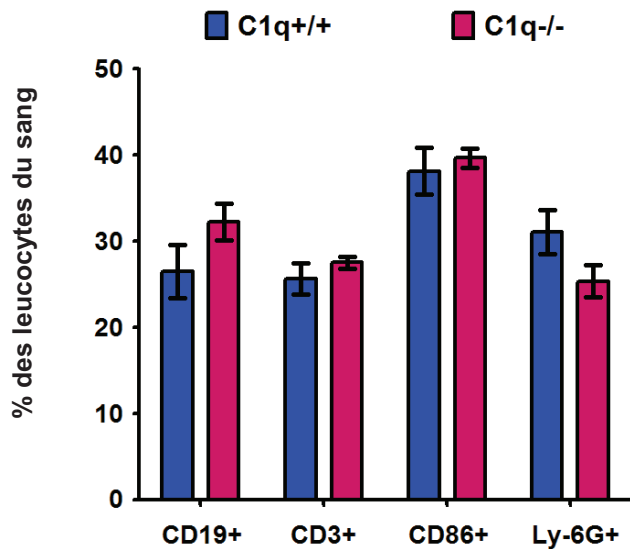


Figure 17: Fréquence et activation des leucocytes du sang.

Le sang des souris ayant subi l'AEC a été prélevé 29 jours après la première immunisation. Les lymphocytes B (CD19⁺), les lymphocytes T (CD3⁺), les PNN (Ly-6G⁺) ainsi que les CPA (CD86⁺) ont été analysés par cytométrie en flux. Les moyennes et les erreurs types sont représentées pour une expérience représentative.

Les souris C1q^{-/-} produisent moins d'IL-6 au cours de l'AEC.

Nous avons aussi titré différentes cytokines ayant un rôle avéré dans la PR et l'AEC comme le TNF, l'IL-6 ou l'IL-12 afin de déterminer si ces cytokines pouvaient avoir un rôle dans la protection des souris. Nous avons mis en évidence une plus faible concentration d'IL-6 dans le plasma des souris C1q^{-/-} comparé au C1q^{+/+} (Figure 18). Par contre il n'y a pas de modification de balance cytokinique Th1/Th2.

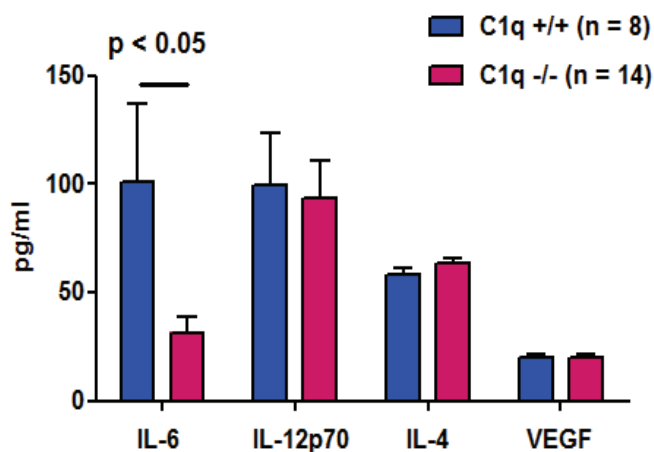


Figure 18: Cytokines produites dans le plasma.

Les cytokines ont été mesurées dans le plasma 29 et 42 jours après immunisation par multiplex dans 8 souris C1q^{+/+} et 14 souris C1q^{-/-}. Test *t*, les moyennes et les erreurs types sont représentées. Les résultats montrés sont ceux de J29.

La capacité d'ostéoclastogénèse et de résorption osseuse est identique entre les souris C1q^{-/-} et C1q^{+/+}.

Il a été rapporté que C1q pouvait influencer la différenciation des ostéoclastes, cellules responsables de la résorption osseuse. C'est pourquoi nous avons recherché si des différences existaient, entre les deux groupes de souris, dans la capacité des précurseurs de la moelle osseuse à se différencier en ostéoclastes fonctionnels au cours de l'AEC. Une différence de capacité d'ostéoclastogénèse ou de fonctionnalité des ostéoclastes pourrait être à l'origine des différences cliniques observées. Nous avons donc induit la différenciation des cellules de la moelle des souris ayant subi l'AEC en ostéoclastes *in vitro* et testé leurs capacités

fonctionnelles. Nous n'avons pas observé de différence entre les deux groupes, ni dans la capacité à se différencier ni à résorber l'os (Figure 19).

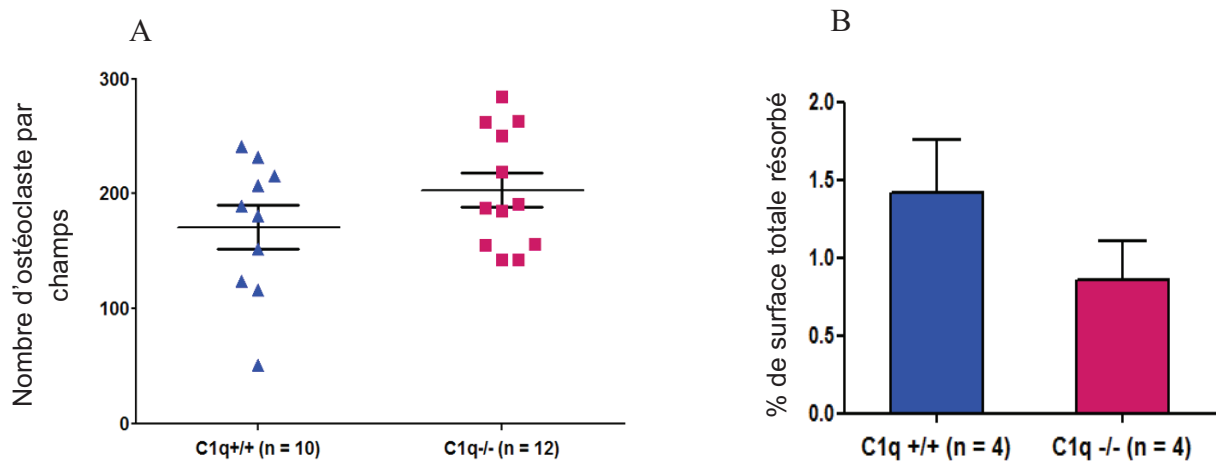


Figure 19: Capacité d'ostéoclastogénèse et de résorption osseuse des cellules de moelle osseuse des souris après un protocole d'AEC.

La différenciation en ostéoclastes a été induite *in vitro* sur des cellules de moelle osseuse de souris C1q-/- et C1q+/+ après un protocole d'AEC. Les cellules considérées comme des ostéoclastes possèdent plus de 3 noyaux et ont une activité TRAP positive. Les ostéoclastes ont été comptés. Chaque point correspond à la moyenne de 4 puits de culture pour chaque souris (A). La surface résorbée d'une matrice d'os par les ostéoclastes différenciés *in vitro* a été mesurée sur 3 puits par souris (B)

Les voies alterne et/ou des lectines sont activées dans les souris C1q-/-.

Nous avons cherché à savoir si la protection des souris était due à un défaut d'activation du complément au cours de l'AEC. Pour cela, nous avons titré C3a dans le plasma au cours de l'AEC. C3a étant commun aux trois voies du complément, sa production reflète l'activation d'au moins une des trois voies. C3a est produit dans les souris C1q-/- aussi bien que dans les souris C1q+/+ au cours de l'arthrite, signifiant que bien que la voie classique soit inactivable dans les souris C1q-/- les voies alterne et/ou des lectines le sont (Figure 20).

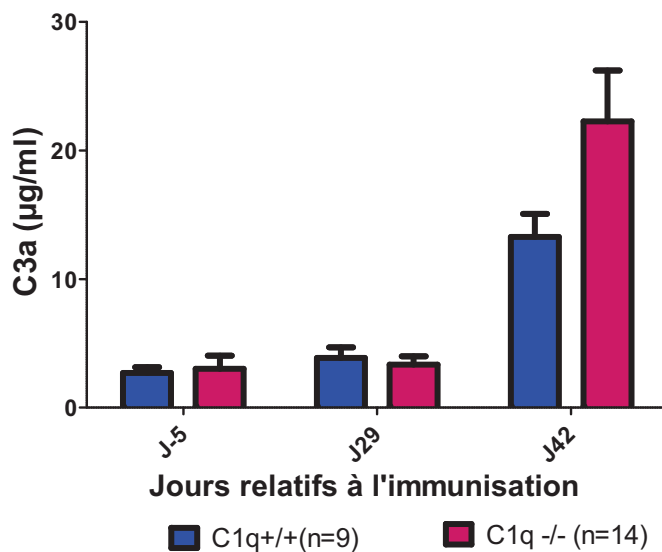


Figure 20: C3a est produit au cours de l'AEC, même dans les souris C1q-/-.

Les taux de C3a ont été mesurés par ELISA dans les plasmas des souris 5 jours avant, 29 et 42 jours après la première immunisation. Les moyennes et les erreurs types sont représentées.

L'expression des récepteurs à C1q est corrélée à l'activité de la maladie chez l'homme.

En parallèle, afin de comprendre l'influence de C1q dans la maladie chez l'homme, nous avons mesuré la capacité des leucocytes du sang de 27 patients PR à lier C1q soluble. Ceci a été réalisé par cytométrie en flux *ex vivo* sur sang total et reflète le niveau d'expression de tous les récepteurs à C1q. Nous avons observé une corrélation positive et statistiquement significative entre la capacité des PNN (Figure 21 A, B) et des monocytes (Figure 21 C, D) à fixer C1q et l'activité de la maladie estimée par le DAS28 (A, C) ou la concentration en CRP (Figure 21 B, D), suggérant un lien entre C1q et inflammation dans la PR. Des résultats similaires ont été retrouvés en sélectionnant uniquement les patients sans traitement par biothérapie (données non présentées).

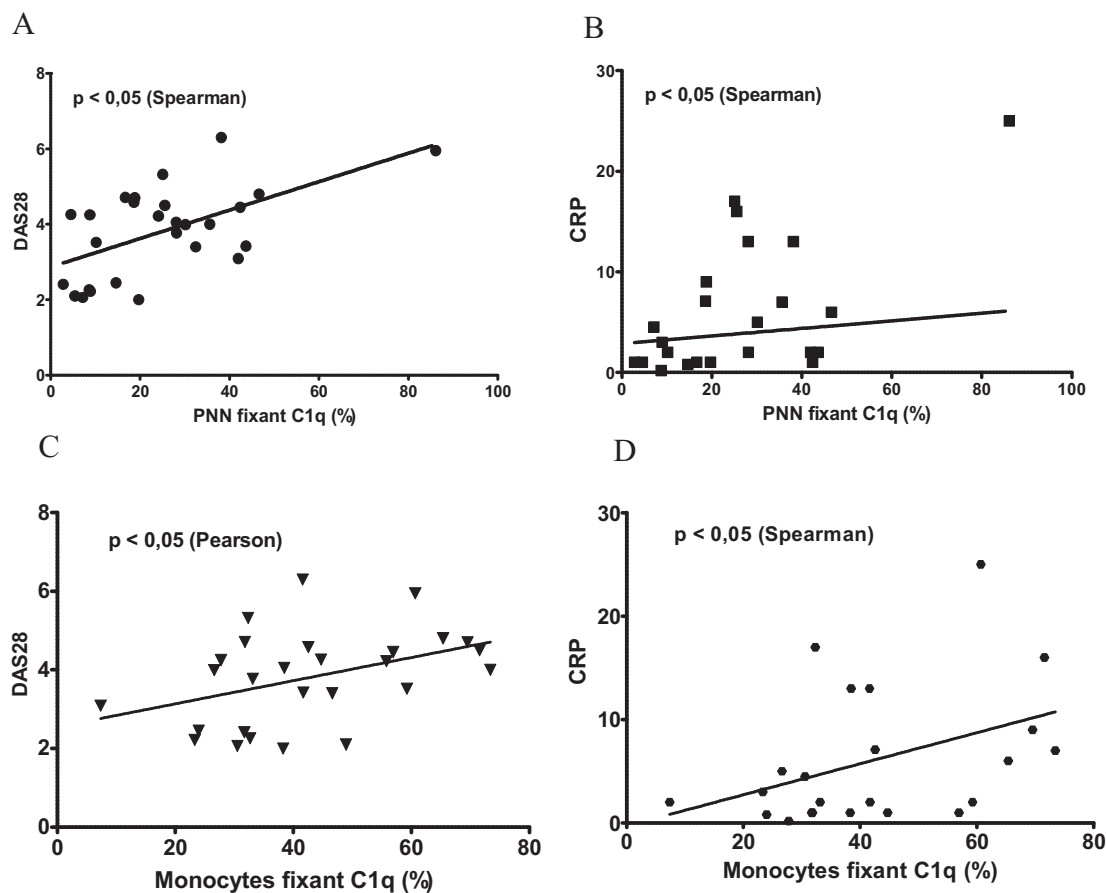


Figure 21: La fréquence des neutrophiles et macrophages capables de lier C1q est corrélée à l'activité de la maladie et à l'inflammation.

Les leucocytes totaux de 27 patients PR ont été obtenus après lyse des érythrocytes puis ont été incubés ou non avec 25 μ g/ml de protéine C1q recombinante. Les cellules ont ensuite été marquées avec un anticorps anti-C1q puis analysées par cytométrie en flux en sélectionnant les PNN ou les monocytes à l'analyse. Les résultats obtenus ont été corrélés avec le DAS28 ou la CRP pour chaque patient.

Discussion

Dans cet article nous avons montré pour la première fois que C1q est indispensable au développement de l'arthrite expérimentale au collagène et que l'expression de ses récepteurs par les PNN et les monocytes est corrélée à l'activité de la maladie et à l'inflammation chez les patients PR.

Pour comprendre les mécanismes liés à la protection des souris C1q^{-/-} nous avons étudié différents paramètres comme la production d'anticorps anti-collagène et leurs isotypes, les cytokines présentes dans le plasma, les fréquences des leucocytes dans les organes lymphoïdes et le sang, l'ostéoclastogenèse et l'activité des ostéoclastes et enfin l'activation générale du complément. Nous avons pu noter que les souris C1q^{-/-} produisent moins d'anticorps IgG anti-collagène que les souris C1q^{+/+} sans modification de la proportion des isotypes. La protection des souris C1q^{-/-} ne semble pas être due à cette plus faible quantité d'IgG, les titres étant élevés dans les deux groupes. Toutefois cette hypothèse ne peut pas être exclue. La plus faible quantité d'IL-6 dans le plasma pourrait être la cause ou la conséquence d'une inflammation générale diminuée dans les souris C1q^{-/-}. Les autres taux de cytokines ne présentent pas de différence entre les deux groupes, indiquant qu'il n'y a pas de grande modification des profils sécrétoires des leucocytes du sang. D'ailleurs, les fréquences et activation des leucocytes sont identiques dans le sang et les organes lymphatiques.

De façon intéressante C3a, une protéine commune au trois voies du complément, a pu être détectée dans les deux groupes de souris au cours de l'AEC. Cela signifie que les voies alterne et/ou des lectines peuvent être activées dans les souris C1q^{-/-} au cours de l'AEC. Cela exclu l'hypothèse qu'un défaut total du complément est à l'origine de la protection des souris. Cette protection que nous avons observée est donc due à des fonctions de la voie classique du complément qui ne sont pas compensées par les autres voies. Il se pourrait aussi que C1q joue un rôle dans l'AEC indépendant de la fonction classique du complément et en particulier pourrait favoriser la prise en charge de l'auto-antigène dans l'AEC au vu des taux d'anticorps anti-CII. Cette hypothèse est en cours d'investigation.

Notre étude chez l'homme montre que d'avantage de PNN et de monocytes expriment les récepteurs à C1q (ou au moins fixent C1q) lorsque la maladie est sévère. Le marquage étant réalisé *ex-vivo* sur sang total, on peut exclure que C1q se soit fixé sur les cellules apoptotiques. L'expression des récepteurs à C1q sur les PNN et les monocytes reflète l'activité de la maladie et le degré d'inflammation. A l'inverse, cette forte expression de récepteurs à C1q pourrait favoriser leur activation.

Nos résultats diffèrent des autres études réalisées dans des modèles de PR puisque nous rapportons pour la première fois que le C1q est nécessaire au développement des arthrites. C1q pourrait donc être impliqué lors des phases précoces, notamment dans l'internalisation et l'apprêtement de l'antigène mais pourrait aussi reconnaître des DAMP libérés au cours de l'arthrite. L'importance du C1q dans le développement des arthrites est confortée par nos données chez les patients.

III. Article 3

Inflammation Develops in a Toll-like Receptor 9-Independent Manner in Experimental Arthritis and Rheumatoid Arthritis.

Julie Mussard, Matthieu Ribon, Gaëlle Clavel, Marie-Christophe Boissier and Patrice Decker

Article en préparation

Travaux présentés oralement à : - International Congress of Autoimmunity, Nice, 2014

Travaux présentés par affiche: - American College of Rheumatology, Boston, 2014
- European Workshop for Rheumatology Research, (Lisbonne, 2014)

L'inflammation se développe indépendamment du TLR9 dans l'arthrite expérimentale et la polyarthrite rhumatoïde.

Cette étude a débuté parallèlement à celle sur le rôle de C1q dans l'arthrite. Tout comme pour C1q, le rôle du TLR9 n'avait pas été étudié dans le modèle d'arthrite expérimentale au collagène (AEC) en utilisant des souris déficientes. De plus nous savions que les neutrophiles humains et de souris exprimaient un TLR9 de surface fonctionnel et qui pouvait éventuellement reconnaître des ligands atypiques (Article 4). Il a été rapporté que le déclenchement de la PR pouvait être favorisé par des facteurs environnementaux comme des infections. Or, le TLR9 est l'un des senseurs des pathogènes et pourrait contribuer au développement de la PR. Nous souhaitons donc évaluer l'implication du TLR9 dans la PR et ses modèles animaux.

Notre hypothèse était que le TLR9 pouvait contribuer au déclenchement de la maladie via la reconnaissance de ligands endogènes (les DAMP) ou exogènes (issus de pathogènes) et favoriser l'activation du système immunitaire et le développement de l'inflammation.

Nos objectifs étaient de déterminer le rôle du TLR9 dans l'arthrite expérimentale au collagène ainsi que dans la pathologie de l'homme, et surtout d'étudier la contribution du TLR9 de surface dans la PR.

Pour atteindre nos objectifs, nous avons induit l'AEC dans des souris qui n'expriment pas le TLR9 et des souris sauvages. D'autre part nous avons étudié l'expression ou la sur-expression des TLR9 endosomal et de surface par les leucocytes de patients atteints de PR et de donneurs sains. La sur-expression du TLR9 par les leucocytes reflète souvent le fait qu'il ait rencontré ses ligands.

Dans cette étude, nous avons montré que le TLR9 n'est pas nécessaire au développement de l'arthrite dans un modèle animal. D'autre part, l'expression de TLR9 endosomale ou de surface est similaire entre les patients atteints de PR et les donneurs sains. Ces résultats montrent que le TLR9 ne joue pas un rôle crucial dans la polyarthrite rhumatoïde et son modèle expérimental.

Le rôle du TLR9 dans le développement et/ou le maintien de l'inflammation chronique chez les patients PR n'est pas clairement défini. Or, des facteurs environnementaux comme les infections peuvent participer au développement de la maladie chez l'homme. De plus, le relargage de ligands endogènes au cours de l'arthrite pourrait participer à la chronicité de l'inflammation. Néanmoins, aucune association claire entre les polymorphismes nucléotidiques du TLR9 et la présence d'ACPA, de FR ou d'érosions n'a été rapportée chez les patients. Plusieurs études réalisées chez la souris et le rat suggèrent que le TLR9 peut jouer un rôle dans le développement de l'arthrite. Toutes ces études montrent que l'injection de ligands du TLR9 au niveau local (dans l'articulation) ou en systémique induit ou amplifie les arthrites. Nous savons que le TLR9 peut reconnaître des ligands atypiques et que les ADN ne sont pas reconnus uniquement par le TLR9. D'autre part, l'activation par certains ligands TLR9 peut induire une réponse immunorégulatrice. Ainsi, les études utilisant des ligands ne démontrent pas l'implication directe du TLR9 dans les modèles animaux de la PR.

Un bon moyen d'étudier le rôle direct du TLR9 dans le développement des arthrites est d'utiliser un modèle où le TLR9 n'est pas exprimé, à condition d'utiliser les bonnes souris témoins même si cela demande un effort conséquent. Dans ce but, nous avons induit l'AEC chez des souris déficientes (KO) pour le gène du TLR9, que nous avons comparées à des souris « true littermate » sauvages. L'arthrite est induite chez ces souris mâles C57BL/6 par deux injections intradermiques de 50µg de CII de poulet (CIIp) au jour 0 (J0) et à J21 émulsionné dans du CFA. Nous avons reproduit cette expérience par 3 fois, de manière indépendante. Le développement des arthrites est suivi par observation des pattes en attribuant un score clinique allant de 0 à 4 (dix articulations évaluées par souris). Nous montrons ici pour la première fois que le TLR9 n'est pas nécessaire au développement de l'AEC. En effet, les souris TLR9-KO développent des arthrites aussi sévères que les souris sauvages (Figure 22). De plus, les incidences sont similaires (non montré). Ce résultat a été confirmé par une analyse histologique des pattes. Brièvement, les pattes ont été fixées, décalcifiées, incluses en paraffine puis coupées. Les coupes ont été marquées par hématoxyline/éosine. L'inflammation et la destruction ont été analysées et un score histologique a été attribué en fonction de la sévérité de l'atteinte (0 : normal, à 3 : sévère). Les souris TLR9-KO ont une synovite et une destruction osseuse aussi sévères que les souris sauvages, corroborant les observations cliniques (Figure 23).

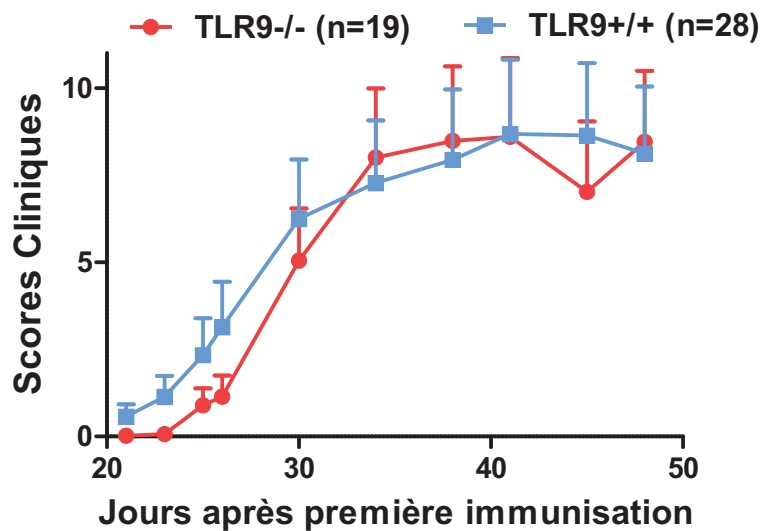


Figure 22: Le TLR9 n'est pas nécessaire au développement de l'AEC.

19 souris TLR9-KO et 28 souris sauvages mâles ont été immunisées avec 50µg de CIIp dans du CFA à J0 et J21. Les résultats proviennent de trois expériences indépendantes. Les moyennes et les erreurs types sont représentées.

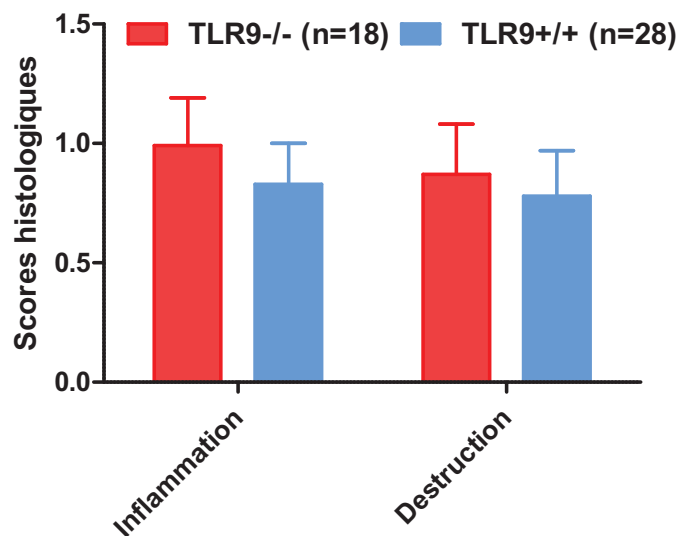


Figure 23: L'inflammation et la destruction articulaires sont similaires chez les souris TLR9-KO et sauvages.

L'inflammation et la destruction articulaires ont été évaluées par histologie (score de 0 : normal ; à 3 : sévère). Les résultats proviennent de trois expériences indépendantes. Les moyennes et les erreurs types sont représentées.

Afin de mieux caractériser les phénomènes observés, nous avons dosé par ELISA les anticorps anti-CIIp dans les plasmas de ces souris, 58 jours après l'induction des arthrites (Figure 24). En accord avec les résultats précédents, les deux groupes de souris produisent des taux similaires d'anticorps anti-CII totaux (A), d'isotypes IgG1 (B) ou IgG2a (décrits comme pathogènes) (C). Les ratios IgG1/IgG2a (D) sont comparables, suggérant que la

balance Th1/Th2 n'est pas altérée chez les souris TLR9-KO. Des résultats similaires ont été obtenus à J27.

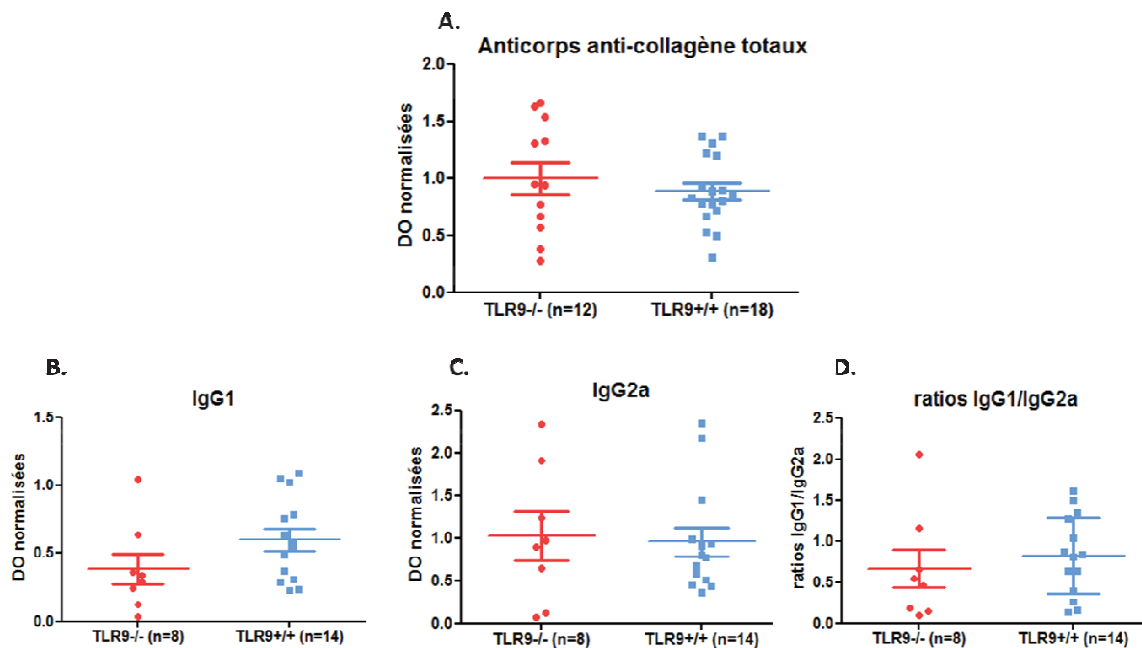


Figure 24: La production d'anticorps anti-collagène est similaire chez les souris n'exprimant pas le TLR9 comparées aux souris sauvages.

Les anticorps anti-CII totaux (A), les isotopes IgG1 (B) ou IgG2a (C) parmi les anti-CII ont été mesurés par ELISA. (D) Les ratios IgG1/IgG2a ont été calculés pour chaque souris. Les densités optiques (DO) normalisées par rapport à un contrôle positif sont représentées ainsi que les moyennes et les erreurs types.

L'ostéoclastogenèse est un phénomène important dans la physiopathologie de la PR. Nous avons voulu connaître l'influence du TLR9 sur la différenciation de cellules souches en ostéoclastes dans notre protocole d'arthrite. Nous avons isolé les cellules de moelle osseuse de souris TLR9-KO et sauvages après un protocole d'AEC. Nous les avons cultivées avec du M-CSF et du RANKL durant 5 jours afin d'induire leur différenciation en ostéoclastes. Les ostéoclastes sont caractérisés par leur nombre de noyaux (au moins 3) et par l'activité de leur enzyme TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*) qui est résistante au tartrate, permettant la coloration de ces cellules en marron-violacé. Ainsi, le TLR9 n'influence pas l'ostéoclastogenèse dans notre modèle car le nombre d'ostéoclastes compté est identique dans les deux groupes de souris (Figure 25).

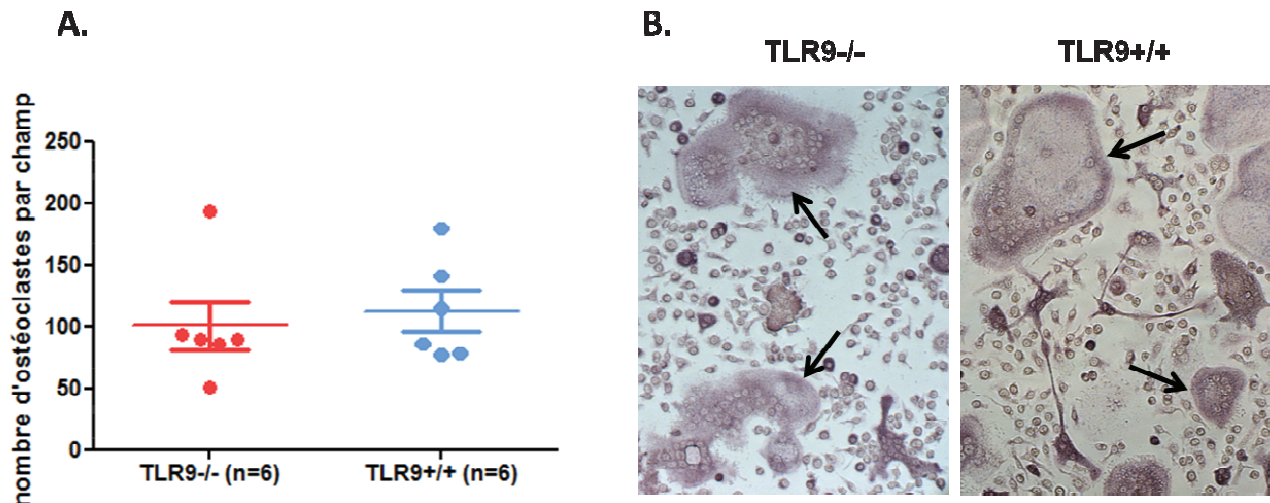


Figure 25: Les cellules de souris TLR9-KO et sauvages ont les mêmes capacités d'ostéoclastogénèse.

Les cellules de moelle osseuse de souris TLR9-KO et sauvages après un protocole d'AEC ont été différenciées en ostéoclastes *in vitro*. Les cellules considérées comme des ostéoclastes possèdent plus de 3 noyaux et ont une activité TRAP positive. (A) Les ostéoclastes ont été comptés. Chaque point correspond à la moyenne de 4 puits de culture pour chaque souris. (B) Image représentative de la culture (grossissement X200). Les flèches montrent des ostéoclastes caractérisés par leur nombre de noyaux (plus de trois). Le marquage marron-violacé est caractéristique de l'activité TRAP de ces cellules.

Les cytokines plasmatiques ont été mesurées par Multiplex, 27 jours après l'induction des arthrites (Figure 26). Bien que les souris TLR9-KO et sauvages développent des arthrites aussi sévères, les souris sauvages sécrètent plus d'IL-12p70 comparées aux TLR9-KO. Concernant les autres cytokines testées (IL-6, VEGF, IL-5, IL-4, TNF α , IL1 β , IL-10, IFN- γ , IL-33, MIP-2, IL-17A, IL-23p19), les taux sont similaires entre les souris TLR9-KO et sauvages. En particulier, les taux d'IL-6, cytokine connue pour être impliquée dans le développement de l'AEC, sont élevés dans les deux groupes de souris.

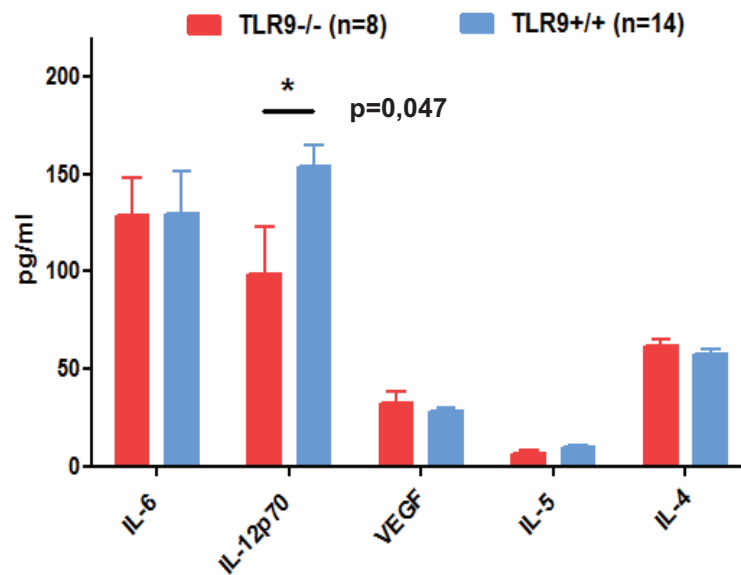


Figure 26: Cytokines produites in vivo au cours de l'AEC.

Les taux de cytokines plasmatiques ont été mesurés par Multiplex 27 jours après l'induction des arthrites chez 8 souris TLR9-KO et 14 sauvages. Les moyennes et les erreurs types sont représentées. * indique une différence significative (Mann Whitney)

De récentes études suggèrent que le TLR9 régule négativement le TLR7(299). Nous avons voulu tester cette hypothèse dans notre modèle. En effet, en absence de TLR9, une plus forte activité du TLR7 pourrait expliquer le développement des arthrites. Nous avons tout d'abord mesuré l'expression du TLR7 par cytométrie en flux dans les leucocytes du sang de nos souris, 62 jours après l'induction des arthrites (Figure 27). Les leucocytes du sang des deux groupes de souris expriment le TLR7 dans des taux similaires.

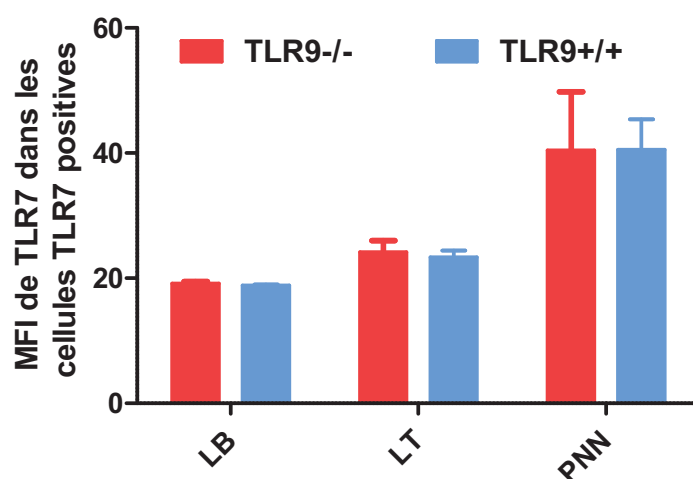


Figure 27: Les souris TLR9-KO expriment le TLR7 à un taux similaire comparé aux souris sauvages dans l'AEC.

L'expression du TLR7 intracellulaire a été évaluée *ex vivo* par cytométrie en flux dans les LB (CD19⁺), LT (CD3⁺) et PNN (Ly6G⁺) du sang des souris TLR9-KO et sauvages à J62. L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de TLR7 dans les cellules TLR7 positives a été représentée. Les moyennes et les erreurs types sont montrées.

Dans le but déterminer si l'absence du TLR9 pouvait amplifier les réponses du TLR7 dans l'arthrite, nous avons mesuré le taux de certaines cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les cellules de souris TLR9-KO et sauvages après l'AEC en réponse à différents ligands TLR (4/7/9) (Figure 28). Pour cette expérience, différents organes ont été récupérés (sang, rate et ganglions lymphatiques) sur des souris TLR9-KO et sauvages 49 jours après la première immunisation. Les cellules totales ont été préparées et cultivées avec différents ligands TLR. Après 24 heures de culture, nous avons mesuré les taux de TNF α , d'IL-12p40/p70 et d'IL-6 par ELISA. Il s'avère que les cellules de souris TLR9-KO sécrètent significativement plus de TNF α , d'IL-12p40/p70 et d'IL-6 après stimulation par le ligand TLR7 (imiquimod) dans le sang et les ganglions, comparé aux souris sauvages. La même tendance est retrouvée pour des ligands TLR4 dans le sang mais de manière non significative. Nous n'avons pas observé de telles différences dans la rate. Ce résultat n'est pas retrouvé chez des souris n'ayant pas subi de protocole d'AEC. Les souris n'exprimant pas le TLR9 répondent donc plus fortement à la stimulation du TLR7 suggérant un phénomène de compensation *in vivo* dans notre modèle d'arthrite.

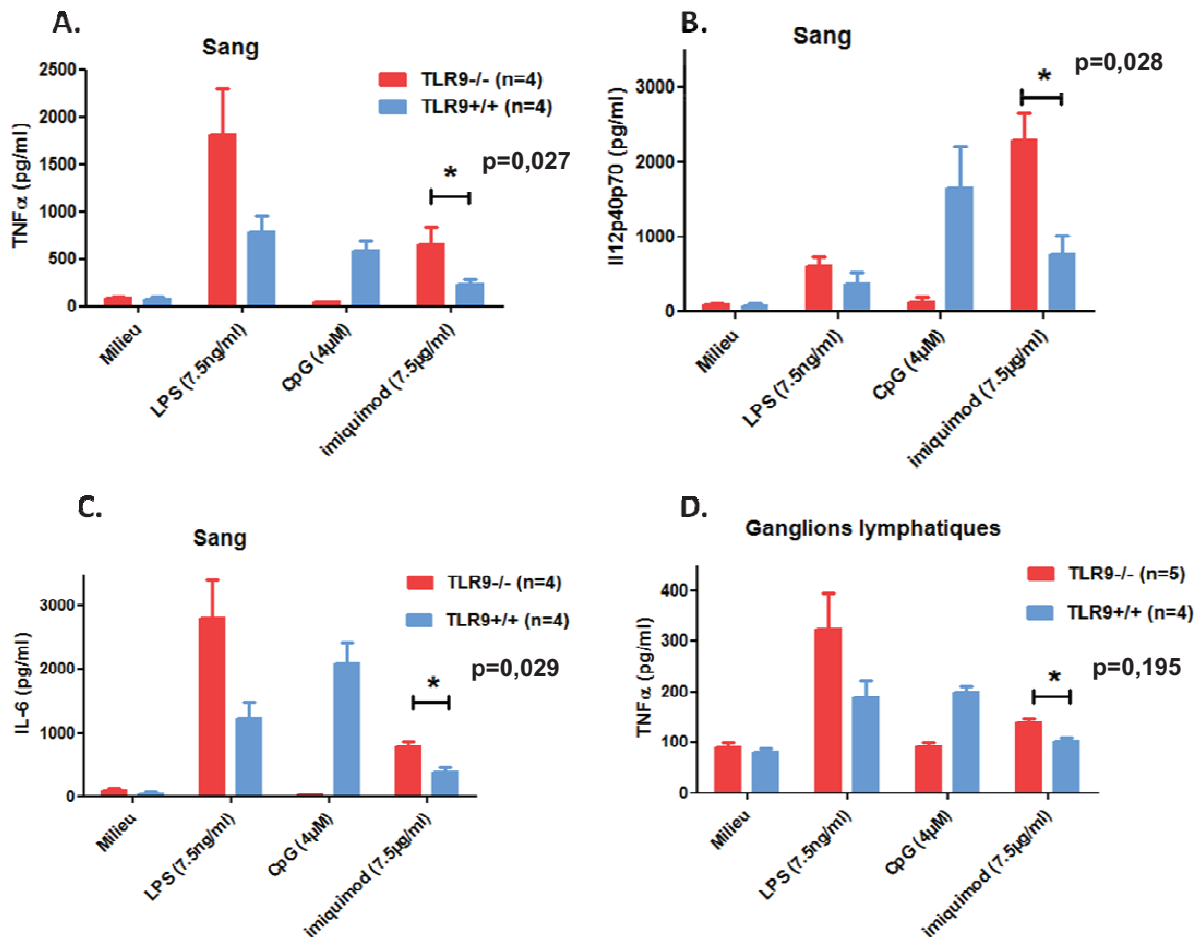


Figure 28: Les souris TLR9-KO répondent plus fortement à un ligand TLR7

Les cellules de sang et de ganglions de souris TLR9-KO et sauvages après l'AEC ont été isolées et cultivées avec différents ligands TLR (LPS pour TLR4 ; CpG pour TLR9 ; imiquimod pour TLR7). Les surnageants ont été récoltés et la présence de TNF α (A, D), d'IL-12p40/p70 (B) et d'IL-6 (C) a été dosée par ELISA. Les moyennes et les erreurs types sont représentées. Test statistique : Mann-Whitney, * différence significative.

Notons qu'au cours de l'AEC, les souris TLR9-KO ne présentent pas d'anomalies d'activation du complément ni de la composition leucocytaire.

En parallèle, nous avons effectué une étude chez l'homme dans le but de comparer l'expression du TLR9 chez les patients PR et chez des donneurs sains ex vivo. Les leucocytes totaux du sang périphérique ont été obtenus par lyse des globules rouges. Les cellules ont été marquées par un anticorps anti-TLR9 (clone 5G5) avec ou sans perméabilisation préalable afin d'évaluer l'expression du TLR9 intracellulaire ou à la surface des cellules. Les cellules marquées ont été analysées par cytométrie en flux et les sous-populations cellulaires ont été distinguées par l'utilisation de « gates ». Les cellules de patients PR ont une expression du TLR9 similaire à celle des cellules de donneurs sains (Figure 29). Ceci est vrai pour l'expression intracellulaire de ce récepteur sur les monocytes, les PNN et les lymphocytes (non montré). Nous n'avons de plus pas noté de surexpression du TLR9 à la surface des PNN de patients, expression jamais évaluée auparavant mais qui aurait pu être associée à la reconnaissance de ligands non classiques (Article 4). Par ailleurs, l'expression du TLR9 n'est pas corrélée à l'activité de la maladie estimée par le DAS28, la protéine C-réactive (CRP) ou la vitesse de sédimentation (non montré).

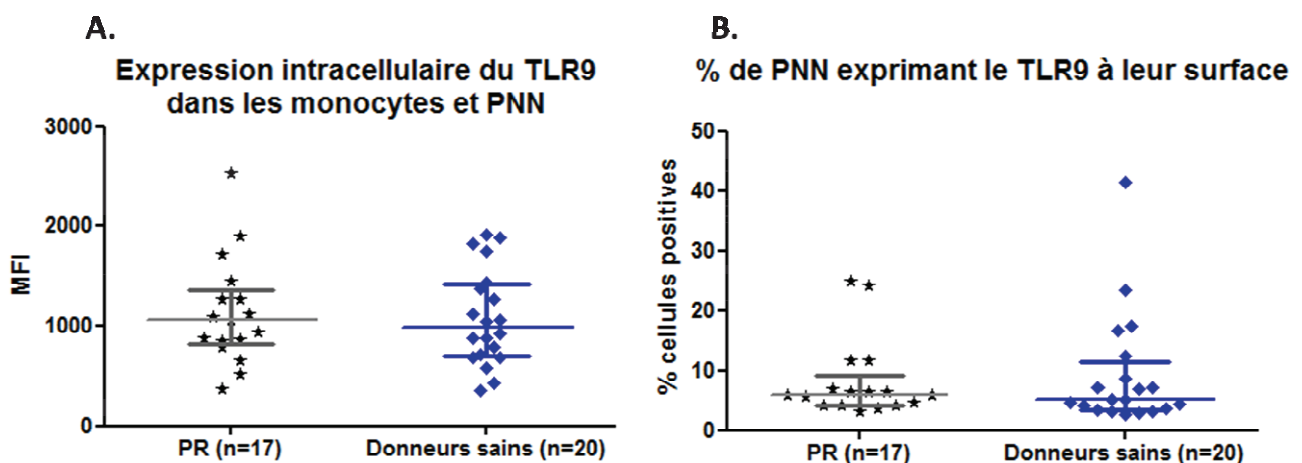


Figure 29: Le TLR9 n'est pas surexprimé dans les cellules de patients PR.

Les leucocytes totaux de 17 patients PR et de 20 donneurs sains ont été obtenus après lyse des érythrocytes. Les cellules ont été marquées par un anticorps anti-TLR9-FITC puis par un anticorps anti-FITC AlexaFluor 488 et analysées par cytométrie en flux en utilisant différentes gates. (A) Marquage intracellulaire du TLR9 dans les monocytes et les PNN. L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) est représentée. Le pourcentage de PNN exprimant le TLR9 de surface est représenté en (B). Pour (A) et (B), les médianes et interquartiles sont montrés.

Le but de notre travail était de déterminer si oui ou non le TLR9 participait au développement des arthrites. L'ensemble de nos résultats montre clairement que le TLR9 ne joue pas un rôle crucial dans le développement de l'AEC et suggère que les ligands TLR9 potentiels retrouvés in vivo chez les patients PR n'induisent pas de surexpression du TLR9, comme cela pourrait être le cas suite à une stimulation répétée du TLR9 in vivo et en accord avec nos observations in vitro (Figure 30). Il s'agit de la première étude d'AEC utilisant des souris TLR9-KO.

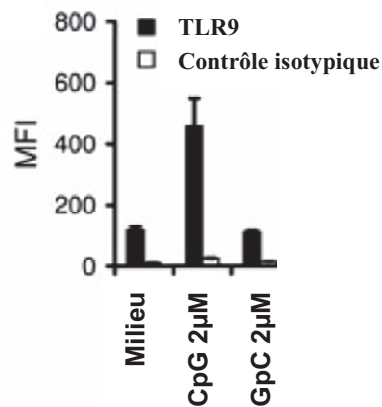


Figure 30: Le TLR9 endosomal est surexprimé après stimulation un agoniste.

Les neutrophiles d'un donneur sain ont été isolés par gradient de densité puis cultivés durant 16 heures avec 2µM de CpG-ODN (ligand TLR9 activateur) ou 2µM de GpC-ODN (oligonucléotide de synthèse) (ligand TLR9 non activateur). Un marquage intracellulaire du TLR9 a été effectué sur ces cellules (comparé à son contrôle isotypique) puis analysé par cytométrie en flux. La moyenne des intensités de fluorescence (MFI) des trois puits de culture et les écarts types sont représentés.

IV. Article 4

Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9.

Dennis Lindau*, Julie Mussard*, Britta J.Wagner, Matthieu Ribon, Viktoria M. Rönnefarth, Maude Quettier, Ivan Jelcic, Marie-Christophe Boissier, Hans-Georg Rammensee, Patrice Decker.

Eur. J. Immunol, 2013. 43 :2101-2113

*contribution égale

Les neutrophiles primaires expriment un TLR9 de surface fonctionnel.

Cette étude avait déjà été initiée avant que j'intègre l'équipe. A l'époque, l'expression du TLR9 était considérée comme restreinte au réticulum endoplasmique et à l'endosome. Pourtant, quelques études avaient rapporté que le TLR9 était exprimé à la membrane plasmique sur les lymphocytes B et les DC dans les amygdales. De plus, une étude avait rapporté que l'expression artificielle du TLR9 à la surface de cellules transfectées pouvait entraîner la reconnaissance d'ADN de mammifère normalement non reconnu par le TLR9 endosomal. Étonnamment, aucune étude n'avait été effectuée sur les neutrophiles, une population non négligeable de leucocytes, et répondant fortement aux agonistes du TLR9. De plus, la fonctionnalité du TLR9 de surface sur les cellules primaires n'avait jamais été démontrée.

L'objectif de cette étude était de déterminer si les neutrophiles exprimaient naturellement un TLR9 de surface. Nous avons cherché à savoir, en plus, si un tel TLR9 était fonctionnel et capable d'induire une activation des neutrophiles.

Avec ce travail, nous avons montré pour la première fois, que les neutrophiles primaires expriment un TLR9 de surface naturel et fonctionnel aussi bien chez la souris que chez l'homme. Cette expression pourrait entraîner la reconnaissance de ligands atypiques ou de DAMP par le TLR9, comme suggéré par Barton et al. (300), ce qui pourrait révéler un rôle délétère du TLR9.

L'idée que le TLR9 puisse être exprimé à la surface des neutrophiles a été difficile à faire accepter. C'est pourquoi nous avons dû prouver l'existence et la fonctionnalité d'un tel TLR9 par de nombreuses approches.

Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9

Dennis Lindau*¹, Julie Mussard*², Britta J. Wagner¹, Matthieu Ribon², Viktoria M. Rönnefarth¹, Maude Quettier³, Ivan Jelcic¹, Marie-Christophe Boissier^{2,4}, Hans-Georg Rammensee¹ and Patrice Decker^{1,2}

¹ Department of Immunology, Institute for Cell Biology, University of Tübingen, Tübingen, Germany

² University of Paris 13, Sorbonne Paris City, Bobigny, France

³ University of Paris 13, Sorbonne Paris City, INSERM U978, Bobigny, France

⁴ Rheumatology Department, Avicenne Hospital, AP-HP, Bobigny, France

Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) represent one of the first lines of defense against pathogens. TLR9 is normally expressed in endosomes/lysosomes where it is activated by pathogen-derived DNA. Here we show that freshly isolated human and mouse primary PMNs express TLR9 at the cell surface *ex vivo*. Moreover, surface TLR9 expression is upregulated upon activation of PMNs with different stimuli and not only TLR9 agonists. Importantly, surface TLR9 is processed, active, and functional. TLR9 ligands, oligonucleotides containing unmethylated CpG motifs, indeed bind to surface TLR9 and binding was strongly observed at the cell surface of human cells expressing surface TLR9 and at the surface of WT but not TLR9-deficient mouse PMNs. Finally, CpG oligonucleotides cross-linked onto a solid phase and having no access to intracellular TLR9 are able to trigger cell surface TLR9 and induce neutrophil activation, even when endosomal acidification is inhibited. This is the first demonstration of a functional TLR9 expressed at the cell surface of human primary cells. This pathway may be triggered when pathogen-derived TLR9 ligands cannot reach the endosome, offering a rescue mechanism for neutrophil activation.

Keywords: Activation · Cell-surface expression · Functionality · Neutrophils · TLR9



See accompanying Commentary by Miyake



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Introduction

Polymorphonuclear cells (PMNs) are the first cells recruited at inflammation sites. They play a central role in host defense and their accumulation at sites of acute infection or tissue injury is a critical component of inflammation [1]. PMNs have recently been

reported to induce chemotaxis of the pro-inflammatory Th17 lymphocytes [2] and to stimulate plasmacytoid dendritic cells (DCs) to produce IFN- α [3, 4]. Importantly, PMNs have been suggested to link innate and adaptive immunity [5–7] by influencing, e.g. DCs. PMN activation may thus favor adaptive immunity but may also represent a double-edged sword in promoting responses that may lead to tissue injury or autoimmunity.

Correspondence: Dr. Patrice Decker
e-mail: patrice.decker@univ-paris13.fr

*These authors contributed equally to this work.

TLR9 is activated in endosomal/lysosomal compartments by unmethylated CpG motifs present in pathogen-derived DNA [8] as well as in synthetic oligonucleotides (ODNs). Nevertheless, vertebrate DNA can also trigger TLR9 under certain circumstances although TLR9-independent pathways are triggered in addition [9]. For instance, mammalian DNA activates innate immunity in a TLR-independent manner [10]. Moreover, natural phosphodiester ODNs lacking CpG motifs activate TLR9 upon enforced endosomal translocation [11]. Actually, the sugar backbone of natural phosphodiester DNA has been shown to determine recognition by TLR9 [12]; the rules governing TLR9 activation are therefore complicated. Furthermore, all the aforementioned results refer to intracellular TLR9. An emerging paradigm in innate immunity is thus the intracellular expression of TLR9 [13] because nucleic acids have to be released from microbial particles, concentrated or modified in acidified endosomal–lysosomal compartments [14, 15], before receptor–ligand interactions can take place with ectodomain-cleaved activated TLR9 [16, 17]. ODNs containing CpG motifs (CpG-ODN) are transported upon receptor-mediated endocytosis [18]. TLR9 signals upon UNC93B1-aided and physical association-mediated translocation from the ER to endolysosomes where it interacts with TLR9 agonists [19, 20]. It has been suggested that TLR9 is sequestered intracellularly to exclude recognition of extracellular host-derived nucleic acids, thus preventing autoimmune responses [21]. The recruitment of CpG-ODNs to endosomal TLR9 is enhanced by the soluble cofactor granulin [22], although granulin is not absolutely required for cell activation by CpG-ODNs. Endosomal compartmentalization of TLR9 may thus reflect an evolutionary strategy to avoid TLR9 activation by self-DNA and localization of the nucleic acid sensing TLRs is critical in discriminating between self and nonself nucleic acids.

PMNs recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) on foreign organisms by expressing TLRs 1–10, except TLR3 [23]. Particularly, PMNs express TLR9 and respond to TLR9 ligands, leading to cytokine secretion and CD11b upregulation, although the subcellular localization of TLR9 in PMNs has not been investigated. A few studies have demonstrated that specialized human primary immune cells such as B lymphocytes [24–27], tonsil cells [28], and monocytes [29], as well as intestinal epithelial cells [30], might express TLR9 at the cell surface, although the functionality of TLR9 expressed on the surface of human cells has not been demonstrated and its significance is unclear. Antigen-presenting cells (APCs) represent therefore major cell populations expressing cell surface TLR9. Nevertheless, human primary PMNs have not been studied so far. Moreover, only studies using engineered cell lines and expressing a chimeric cell surface TLR9 could clearly show that surface TLR9 responds to some of its ligands and even to mammalian DNA [21]. Such a demonstration is not available for primary cells expressing a natural TLR9. We therefore investigated whether human and mouse primary PMNs express a cell surface TLR9 and whether this receptor can trigger an activation signal upon binding and recognition of its agonist in the extracellular milieu. Using an approach combining immunological and microscopic techniques, we investigated the cellular distribution

and the functionality of TLR9 in lymphoid and myeloid cells. We demonstrate that surface TLR9 interacts with CpG ODN, leading to the activation of PMNs, and that surface expression of TLR9 is enhanced upon PMN activation.

Results

Human PMNs spontaneously express TLR9 at the cell surface

To investigate the *ex vivo* expression of TLR9 at the surface of non-stimulated cells, we first analyzed simultaneously all the human leukocyte populations in several independent healthy donors. Cells were prepared by dextran centrifugation and the two layers containing either PBMCs or PMNs were harvested and mixed, yielding a leukocyte population depleted from erythrocytes and platelets. As shown in Figure 1A, the R1 gate contained only PMNs (CD66b-positive cells), whereas the R2 gate contained essentially T lymphocytes, B lymphocytes, NK/NKT cells, and a few monocytes. Freshly isolated cells were then stained for cell surface or intracellular TLR9 using a specific mAb (clone 5G5). Focusing on gate R1, we identified cell-surface expression of TLR9 on PMNs (Fig. 1B), all the cells being double-positive for CD66b and CD11b. Gating on R2, and as already reported, B lymphocytes also express TLR9 at the cell surface (Fig. 1C, middle panel). Similarly, gating on CD3⁺CD19⁺ cells, we confirmed that part of the monocytes also express cell surface TLR9 (Fig. 1C, lower panel). Interestingly, no cell surface TLR9 was detected on T lymphocytes (Fig. 1C, upper panel), NK cells, or NKT cells (Fig. 1D, lower and upper panels, respectively). However, all the cell types analyzed expressed TLR9 intracellularly and intracellular expression was stronger than surface expression. No binding of the isotype control was observed, indicating that the staining was TLR9 specific. The specificity of the TLR9 staining was confirmed by comparing BM cells prepared from WT and TLR9-KO mice. Indeed, the 5G5 anti-TLR9 mAb used in the present study recognizes both human and mouse TLR9 [14]. We gated on Ly-6G^{high} cells (most of them are CD11b⁺ cells and thus granulocytes) that are known to express intracellular TLR9. WT PMNs indeed express intracellular TLR9 whereas no expression was observed in TLR9-KO PMNs, as expected (Fig. 1E). Those results indicate that the signal measured at the surface of human PMNs corresponds to TLR9. More importantly, only the cells expressing TLR9 at the cell surface (namely PMNs, B lymphocytes, and monocytes) strongly bind the TLR9 ligand (FITC-CpG-ODN 2006) at the cell surface (Fig. 1B–D), whereas all the cell types were stained positively with that ligand upon fixation/permeabilization, suggesting that the CpG-ODN also binds to its intracellular receptor. This observation confirms the presence of TLR9 at the cell surface and the specific interaction with its ligand suggests that surface-expressed TLR9 is active. To determine whether PMNs express a mature form of TLR9 at the cell surface, human PMNs were isolated from fresh blood and analyzed by flow cytometry after staining with another TLR9-specific mAb (clone 26C593, Supporting Information Fig. 1),

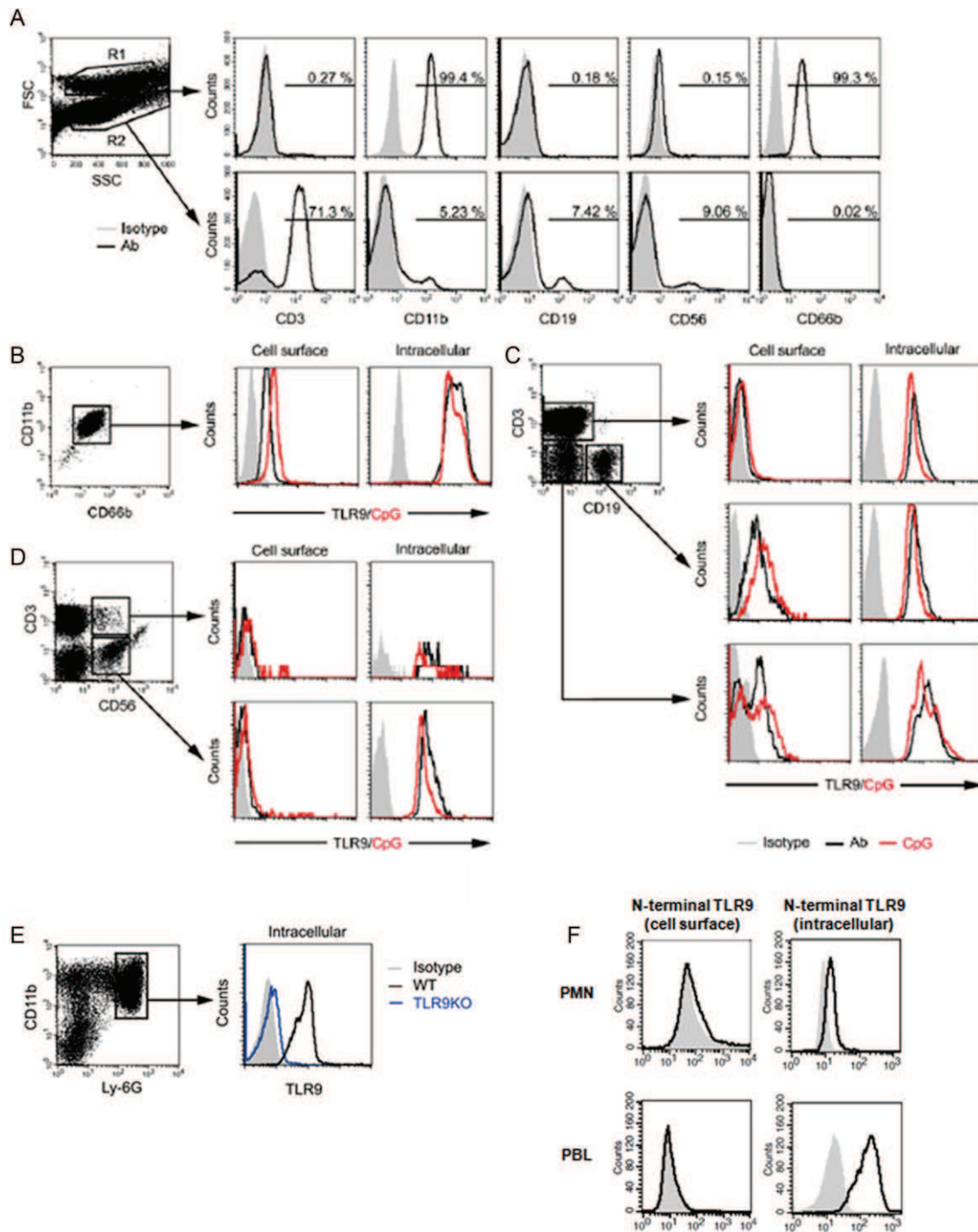


Figure 1. Human primary PMNs express a processed TLR9 at the cell surface. PBMCs and PMNs were freshly isolated from the peripheral blood by dextran centrifugation and mixed (except in (F)). Cells were analyzed by multicolor flow cytometry using different gates. (A) Cells contained in gates R1 and R2 were characterized and the percentages of gated cells positive for the marker of interest are indicated. (B) Cells from gate R1, which are PMNs according to the staining for CD66b and CD11b (left), were stained for cell surface (without permeabilization) and intracellular (after permeabilization) TLR9 using an anti-TLR9-FITC mAb (5G5) and anti-FITC-Alexa Fluor 488 antibody. Alternatively, cells were stained with a FITC-CpG-ODN (a TLR9 ligand). (C, D) Cells from gate R2 were stained for (C) CD3 and CD19 or (D) CD3 and CD56 and analyzed for surface and intracellular TLR9 expression or stained with the FITC-CpG-ODN as described in (B). (E) BM cells were isolated from WT and TLR9-KO mice and stained for Ly-6G and CD11b or the corresponding isotype control. Ly-6G-positive cells were then analyzed for intracellular TLR9 expression as in (B). (F) PMNs mainly express a cleaved form of TLR9 at the cell surface. Human PMNs and PBMCs were isolated separately and stained for cell surface and the intracellular N-terminal region of TLR9 (black histograms, N-terminal TLR9 staining). In PBMCs, PBLs were gated. Data are representative of ten independent experiments (except E, five experiments) using cells isolated from independent donors. Ab: antibody; CpG: FITC-CpG-ODN 2006. Filled gray histograms depict isotype controls. (B–D) Black histograms represent TLR9 staining; red histograms represent FITC-CpG-ODN staining.

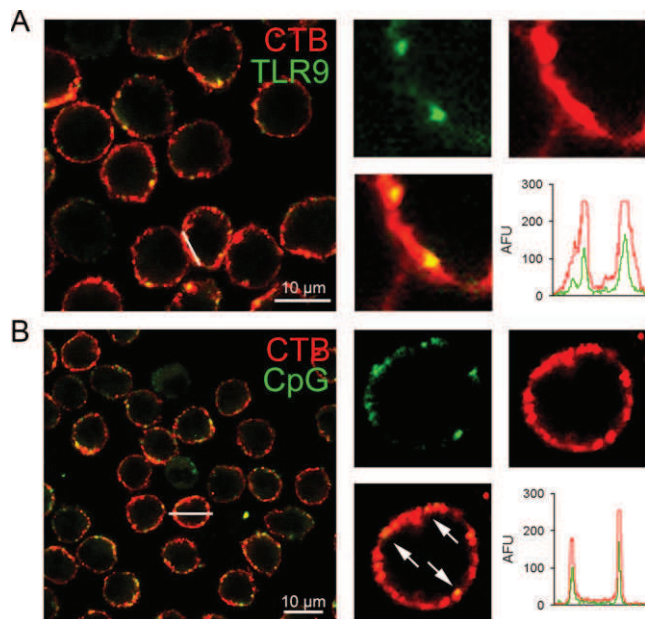


Figure 2. Human primary PMNs express a cell surface TLR9 and bind to TLR9 ligands. PMNs were purified from fresh blood and analyzed by confocal microscopy in the absence of PBMCs. (A) PMNs were stained consecutively with anti-TLR9-FITC (5G5) and anti-FITC-Alexa Fluor 488 (without permeabilization) at 4°C in the presence of Alexa Fluor 555-CTB. The individual fluorescence channels and the merged signal are shown (right). The intensity of both signals (measured along the white bar) is also depicted. (B) PMNs were then incubated with FITC-CpG-ODN 2006 at 4°C in the presence of Alexa Fluor 555-CTB and analyzed. The individual channels, the merged signal (arrows) and the intensity of both signals across the cells (white bar) are depicted. (A, B) The scale bar represents 10 μm. Data shown are representative of eight independent experiments performed. CpG, FITC-CpG-ODN 2006; AFU: arbitrary fluorescence units.

which recognizes the TLR9 moiety cleaved and removed during TLR9 processing and maturation. This N-terminal fragment should not be transported to the cell surface because it contains no transmembrane domain. Therefore, this mAb should not stain the processed TLR9 at the cell surface. We used from this point on highly purified PMNs, yielding only the cell population corresponding to gate R1 and PMNs were not mixed with PBMCs. In most cases, PMNs and PBLs were only weakly stained at the cell surface with this mAb specific for unprocessed TLR9 (Fig. 1F) and therefore only express low levels of full-length TLR9 at the cell surface. As a control, clone 26C593 recognized intracellular TLR9 in both cell types, especially in PBLs. Since PMNs (and PBLs) were stained with the 5G5 mAb at the cell surface (Fig. 1B), those results suggest that PMNs (and PBLs) mainly express a processed TLR9 at the cell surface.

To confirm the presence of TLR9 at the cell surface, highly purified human PMNs were analyzed by confocal microscopy. Cells were stained for TLR9 expression (green) at 4°C in the presence of cholera toxin subunit B (CTB, red) to stain the cell surface. As shown in Figure 2A, a TLR9-specific signal was observed at the cell surface of PMNs, as demonstrated by the merged signal with CTB staining. The histogram depicting the intensity of both signals (measured along the white bar) shows that both signals

overlay along the cell membrane. PMNs were then incubated with FITC-CpG-ODN 2006 (green) in the presence of CTB and analyzed (Fig. 2B). The TLR9 ligand bound to the cell surface of PMNs (merged signal), in line with the cell-surface expression of TLR9. When analyzing both signals across the cells (white bar), we only detected the FITC-CpG-ODN at the cell surface, as depicted by the overlay in the histogram showing the intensity of both signals. The binding of the CpG-ODN at the cell surface suggests that TLR9 recognizes its ligand.

To support our observations, several control experiments were performed. We first analyzed unpurified PMNs in whole blood instead of isolated PMNs to show that the PMN isolation procedure used above does not influence TLR9 cell-surface expression. RBCs were lysed and fresh whole blood cells were directly stained at 4°C and analyzed by flow cytometry. Moreover, a different combination of antibodies was used to confirm the staining reproducibility and specificity. Gating on PMNs, we detected TLR9 at the cell surface (Supporting Information Fig. 2A). Then, to prove that the detected TLR9 is at the cell surface and not inside cells, freshly isolated PMNs were analyzed by flow cytometry (with the same antibody combination as was used in Fig. 1B) in the presence of Trypan blue (TB) that quenches the extracellular FITC fluorescence, whereas intracellular FITC fluorescence is not altered [31]. The PMNs used were highly pure (Supporting Information Fig. 2B) and uniformly expressed surface TLR9 (Supporting Information Fig. 2C). As a negative control, we analyzed the endocytosis of fluorescent molecules at 37°C using FITC nucleosomes as a marker (nucleosomes slightly bind to the PMN cell surface whereas they are strongly endocytosed by PMNs [32]). FITC nucleosomes were taken up by PMNs and the signal was not inhibited by TB (Supporting Information Fig. 2D). As expected, the staining of surface CD66b was decreased in the presence of TB, confirming its activity. In contrast to FITC-nucleosomes, the staining of surface TLR9 (and CD66b) at 4°C was decreased in the presence of TB (Supporting Information Fig. 2E). Those results indicate that TLR9 is indeed present at the cell surface of PMNs.

Primary mouse PMNs also express TLR9 at the cell surface

To confirm the specificity of the TLR9 staining and to show that the CpG-ODN mainly binds to the cell surface TLR9 and not to an as-yet-unidentified DNA sensor as proposed [33], PMNs were isolated from WT and TLR9-KO mice by magnetic cell sorting. Mouse PMNs were stained in the presence of CTB and analyzed by confocal microscopy. WT PMNs showed a strong cell surface TLR9 signal upon staining with the 5G5 mAb, as demonstrated by the co-localization with the CTB signal, which was not detected upon staining with the corresponding isotype control (Fig. 3A). More importantly, the TLR9 staining was not observed with TLR9-KO PMNs, indicating that the cell-surface signal measured with WT PMNs was TLR9 specific. Likewise, the TLR9 ligand CpG-ODN strongly bound to the cell surface of WT PMNs, whereas no or low binding was detected with TLR9-KO PMNs, confirming that the

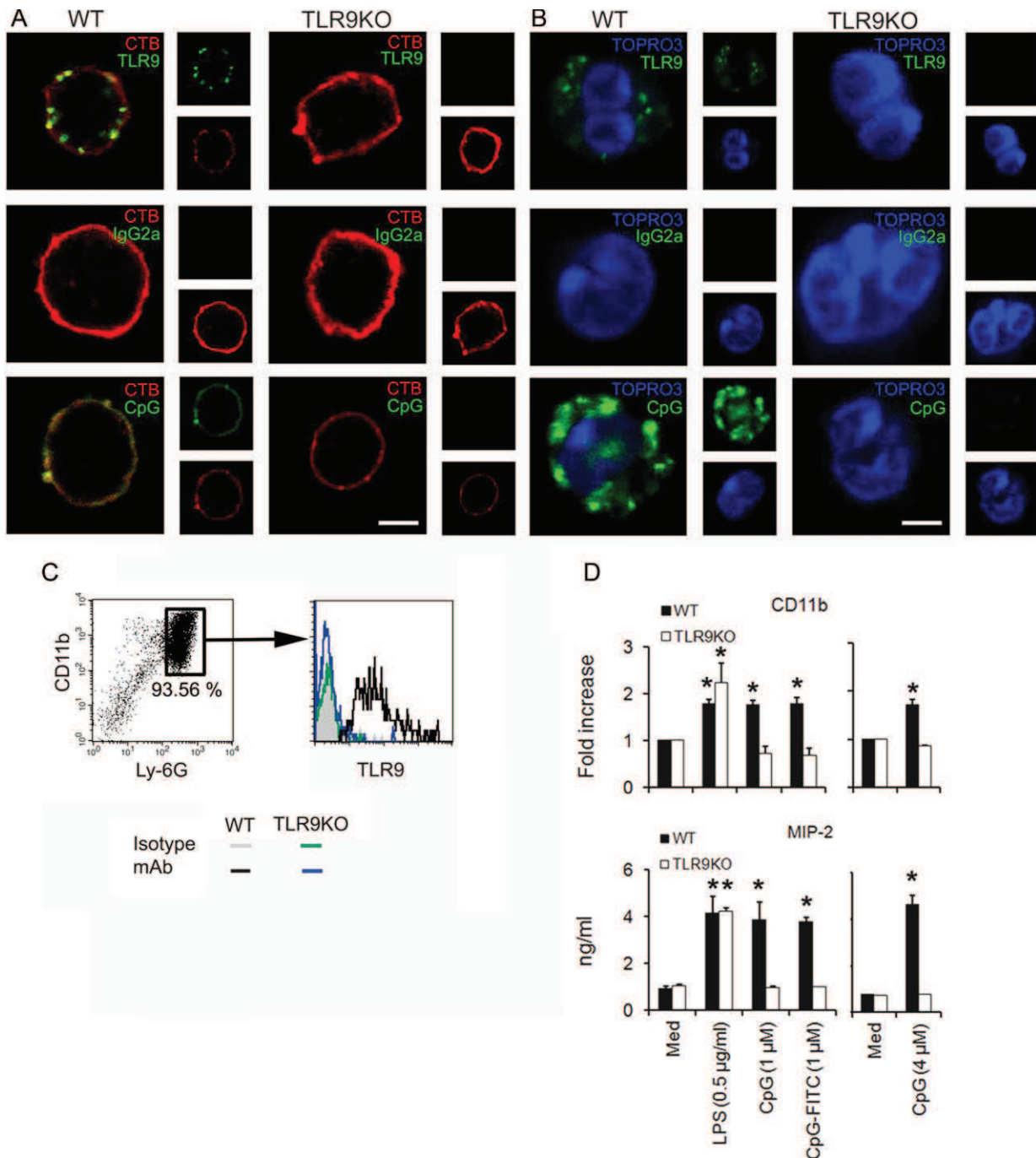


Figure 3. Mouse PMNs express also a cell surface TLR9 and the staining is specific. PMNs were purified from the BM of WT and TLR9-KO mice. (A) Cells were stained consecutively with anti-TLR9-FITC (5G5, upper panel) or the corresponding isotype control (middle panel) and anti-FITC-Alexa Fluor 488 or were directly incubated with FITC-CpG-ODN 2006 (lower panel) at 4°C in the presence of Alexa Fluor 555-CTB (without permeabilization). PMNs were then analyzed by confocal microscopy as described in Figure 2. CpG, FITC-CpG-ODN 2006. (B) The same staining was performed using permeabilized cells to detect intracellular TLR9 expression and CpG-FITC binding, except that PMNs were stained with TO-PRO-3 instead of CTB. (A, B) The scale bar represents 5 µm. The individual fluorescence channels and the merged signal are shown. (C) Purified PMNs isolated from WT and TLR9-KO mice were analyzed by flow cytometry. The phenotype of the isolated cells was verified by Ly-6G and CD11b staining. Nonpermeabilized Ly-6G-positive cells (all of them are CD11b-positive) were analyzed for cell surface TLR9 expression as described in Figure 1. (D) The mouse PMNs isolated in (C) were cultured with LPS, CpG-ODN 2006, FITC-CpG-ODN 2006, or CpG-ODN 1826 (right histograms) for 16 h. Cell activation was then estimated by measuring CD11b upregulation (flow cytometry, depicted as fold increase versus medium) and MIP-2 secretion (ELISA). Data are shown as mean + SD of five samples pooled from five independent experiments. **p* < 0.05 versus medium, Student's *t*-test.

binding of the CpG-ODN to the cell surface of PMNs is essentially mediated by TLR9. The same experiment was then reproduced with fixed and permabilized cells (Fig. 3B). Cells were stained with the DNA dye TO-PRO-3 instead of CTB in order to stain the nucleus. Only WT, but not TLR9-KO, PMNs showed a TLR9 signal, whereas no signal was observed upon staining with the isotype control, confirming that the mAb used was TLR9 specific and that the control mice used were TLR9-KO. Similarly, the CpG-ODN only bound to the intracellular TLR9 present in WT PMNs. The surface expression of TLR9 by those purified PMNs was confirmed by flow cytometry. Nonpermeabilized WT PMNs show a strong expression of surface TLR9, which was not observed with TLR9-deficient PMNs (Fig. 3C). To confirm that the FITC-CpG-ODN 2006 used is an active TLR9 agonist for mouse PMNs, cells were cultured with different stimuli and cell activation was estimated. Indeed, CpG-ODNs are often cell type specific and the conjugation to a FITC molecule may interfere with cell activation. WT PMNs were equally activated by CpG-ODN 2006 and FITC-CpG-ODN 2006, as shown by CD11b upregulation and MIP-2 secretion (Fig. 3D), whereas activation was not observed with TLR9-deficient PMNs. Similarly, only WT PMNs were activated by the mouse-optimized CpG-ODN 1826. As a control, WT and TLR9-deficient PMNs were activated by LPS, indicating that all the CpG-ODN used (conjugated to FITC or not) are TLR9 ligands and are not contaminated by endotoxins (which is an important control for the functional assay of surface TLR9 described under *TLR9 expressed at the cell surface of primary neutrophils is functional*). All those results confirmed the specificity of the TLR9 staining and the presence of TLR9 at the cell surface of PMNs. The strong binding of the CpG-ODN at the cell surface of WT but not TLR9-KO PMNs indicates that TLR9 expressed at the cell surface is able to recognize its ligand.

TLR9 expressed at the cell surface of primary neutrophils is functional

The results described above clearly show that the TLR9 ligand binds to the cell surface of primary PMNs and that the binding is specifically mediated by TLR9. It therefore indicates that this receptor is at least partially functional since it recognizes this ligand. We then analyzed whether ligation of FITC-CpG-ODN 2006 to the cell surface TLR9 triggers activation of primary human PMNs. In order to specifically stimulate TLR9 at the cell surface, the FITC-CpG-ODN 2006 was cross-linked by UV irradiation onto a nitrocellulose cell culture plate. The technical approach used is shown in Supporting Information Fig. 3A. The efficacy was verified by measuring the FITC fluorescence at all the different steps using a fluorometer (Supporting Information Fig. 3B, upper part). The results show that the ODN was covalently bound to the wells. Nevertheless, only $25.6 \pm 9.8\%$ of the incubated ODN was efficiently immobilized onto the plate. Freshly isolated PMNs were then cultured in the CpG-ODN-coated plate. As negative and positive controls, PMNs were cultured in medium alone or supplemented with LPS, respectively. As a comparison, PMNs were

cultured with the FITC-CpG-ODN 2006 free in solution at a sub-optimal concentration (adjusted to the amount of the cross-linked ODN). The concentration of the free ODN used was either the same than that of the cross-linked ODN (as estimated by measuring the FITC fluorescence) or slightly higher. Indeed, UV irradiation did not allow the cross-linking of an optimal amount of ODN. After overnight culture, the cross-linked ODN was still detectable in the cell culture whereas only a slight signal was detected for that ODN in the supernatants (Supporting Information Fig. 3B, lower part), suggesting that only a minute amount of the ODN is released and that most of it is still nitrocellulose bound. A stronger signal was detected for the free (not cross-linked) ODN in both the culture and supernatants, indicating that the latter was essentially in solution and not immobilized. Importantly, the cross-linked ODN induced the activation of PMNs, as shown by the IL-8 (CXCL8) secretion (Fig. 4A), indicating that the cell surface TLR9 is functional. The activation was even stronger than the activation measured with the same ODN in solution, whereas the latter was used at a stronger concentration. After cell culture, the FITC fluorescence was also measured in PMNs by flow cytometry. As expected, a strong signal was detected in PMNs incubated with the free FITC-ODN (Fig. 4B and Supporting Information Fig. 3C, left panel). Surprisingly, PMNs incubated with the cross-linked ODN showed an intermediate signal, suggesting that PMNs are able to detach part of the FITC molecules or part of the cross-linked ODN from the nitrocellulose filter. To determine whether the signal corresponds to a cell-surface signal only, the same cells were measured in the presence of ammonium chloride (AC), an inhibitor of endosomal acidification. The FITC fluorescence is indeed inhibited at low pH values and AC protects and restores the endosomal FITC fluorescence [31]. As shown in Figure 4B and Supporting Information Figure 3C (right panel), whereas the FITC fluorescence of the free ODN was significantly increased in the presence of AC ($p < 0.001$), the fluorescence of the cross-linked ODN was slightly but significantly decreased ($p = 0.029$), indicating that the ODN has different properties upon immobilization. Compared to the expected behavior of the free ODN that reaches endosomes, the results confirm that the cross-linked ODN bound only to the PMN surface (i.e. is cell bound but remains external) and did not reach the endosomal TLR9. The activation observed with the cross-linked ODN is therefore triggered by the cell surface TLR9. Primary PMNs were then isolated from six independent healthy donors and cell activation by the cross-linked ODN was determined in six independent experiments. The coated ODN induced a significant IL-8 secretion ($p = 0.014$), showing clearly that the TLR9 expressed at the cell surface of PMNs recognized its ligand and is functional (Fig. 4C). To support this hypothesis, PMN activation was estimated in the presence/absence of the lysosomotropic agent AC or the LPS inhibitor polymyxin B (PB). Free CpG-ODN activated PMNs independently of endosomal acidification whereas activation with Resiquimod (R848), a TLR7/8 ligand in humans, was abolished in the presence of AC (Fig. 4D), indicating that TLR9 can signal from the cell surface. As a control, activation with the TLR4 ligand LPS but not with free CpG-ODN was inhibited by PB, excluding that the noninhibition of free CpG-ODN by AC is

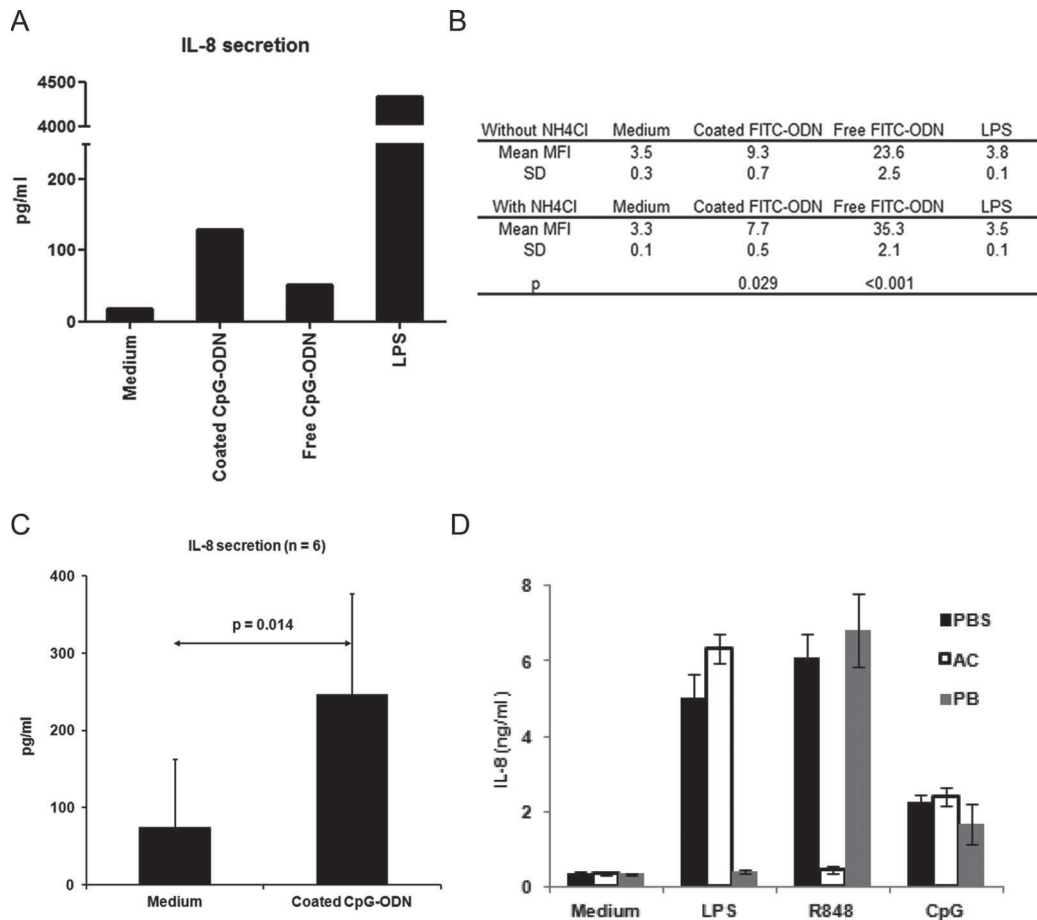


Figure 4. Human primary PMNs express a functional cell surface TLR9. (A–C) UV-treated nitrocellulose plates were incubated with PBS or FITC-CpG-ODN 2006 in PBS and the efficiency of the ODN cross-linking was verified by measuring the FITC fluorescence using a fluorometer. Human PMNs were isolated from healthy individuals and cultured in the cross-linked plate for 16 h. As a control, cells were activated with free (noncross-linked) FITC-CpG-ODN 2006 or LPS (5 ng/mL). The actual concentrations were 0.48 and 1 μM for the cross-linked and the free ODN, respectively. (A) The level of PMN activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. (B) Cultured PMNs were also analyzed by flow cytometry for the FITC fluorescence in the absence or presence of ammonium chloride (AC, NH₄Cl). The impact of AC on the FITC fluorescence was estimated by a Student's *t*-test or a Mann–Whitney rank sum test on the MFI measured (mean ± SD of triplicates). (A, B) One representative experiment of three experiments performed is shown. (C) PMNs were isolated from healthy individuals and the capacity of the cross-linked ODN to trigger surface TLR9-mediated cell activation was tested. IL-8 secretion was determined by ELISA. The cumulative results (normalized to the actual concentration of the cross-linked ODN measured with the fluorometer) are shown as mean ± SD. Data are from six experiments performed in triplicates. Statistical significance measured by a Student's *t*-test. (D) Isolated PMNs were cultured in medium supplemented with PBS, AC, or PB. Cells were stimulated or not with 7.5 ng/mL LPS, 0.3 μg/mL R848, or 2 μM free CpG-ODN, and activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. Data are shown as mean ± SD of one experiment representative of six performed in triplicates.

due to the presence of endotoxins. Similar results were obtained in the presence of bafilomycin A1 (Supporting Information Fig. S4). Bafilomycin A1 is, however, able to inhibit TLR9 signaling in PBMC (Supporting Information Fig. 5).

TLR9 surface expression is upregulated in response to PMN stimulation

We next investigated whether the expression of the cell surface TLR9 is modulated upon PMN activation. Cells from healthy individuals were incubated with different TLR ligands or purified nucleosomes, an autoantigen that activates PMNs in a TLR9-independent manner [32]. Interestingly, CpG-ODN-mediated PMN activation led to an upregulation of the cell surface TLR9 in part of the donors (Fig. 5A). No significant effect was observed in

response to the control GpC-ODN (ODN with GpC motifs instead of CpG). Activation with R848 or LPS also led to surface TLR9 upregulation in some donors. Importantly, nucleosome-induced PMN activation was associated with a concentration-dependent upregulation of the cell surface TLR9 in most of the donors (Fig. 5A and B). In most cases, surface TLR9 upregulation was associated with an upregulation of the intracellular TLR9 (Supporting Information Fig. 6), with LPS being a potent inducer of endosomal TLR9 expression and nucleosomes potent inducers of surface TLR9 expression. Modulation of TLR9 expression is therefore not restricted to TLR9 ligands. Priming of PMNs with GM-CSF was not efficient in upregulating cell surface TLR9, although it enhanced PMN activation by free CpG-ODN and upregulated intracellular TLR9 (Supporting Information Fig. 7). Activation-induced upregulation of TLR9 expression was

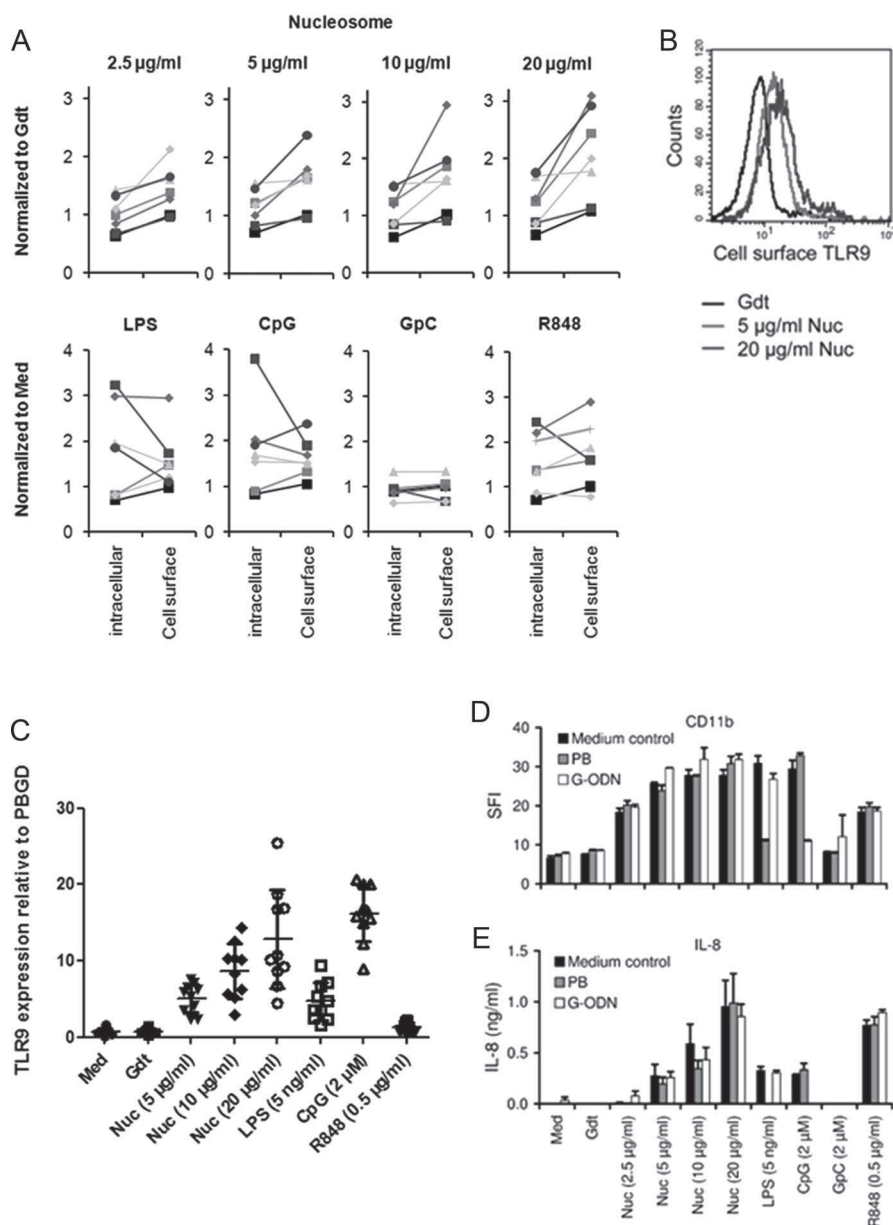


Figure 5. Surface TLR9 is upregulated in human PMNs upon cell activation. PMNs were isolated from seven independent healthy donors and cultured with different concentrations of nucleosomes, LPS (5 ng/mL), CpG-ODN (2 µM), GpC-ODN (2 µM), or R848 (0.5 µg/mL). (A) After 16 h, cells were stained for surface and intracellular TLR9 (clone 5G5) and analyzed by flow cytometry as described in Figure 1. The fluorescence was normalized to that of the gradient or medium controls in order to visualize the modulation (fold increase) of TLR9 expression induced by either nucleosomes or the TLR ligands, respectively. Shown are all the donors tested; each line represents a donor. (B) A typical flow cytometry histogram showing the nucleosome-induced upregulation of cell surface TLR9 in human PMNs is depicted. Cell surface TLR9 expression was measured in untreated PMNs (Gdt) and PMNs stimulated with nucleosomes (Nuc). (C) TLR9 expression was analyzed in PMNs at the mRNA level by quantitative RT-PCR. PMNs were untreated or stimulated and the activation-induced TLR9 upregulation was determined. TLR9 mRNA levels were normalized to porphobilinogen deaminase mRNA levels and were compared using a Student's *t*-test. The results show ten independent healthy donors (each dot represents one donor) with mean ± SD (depicted as fold increase). PMN activation was verified by measuring the CD11b upregulation by (D) flow cytometry and (E) IL-8 secretion by ELISA. Data are shown as mean + SD of triplicates from one donor of the seven donors tested in (A). Data are representative of seven independent experiments. PB: polymyxin B; G-ODN: TLR9 antagonist; Med: medium; Gdt: nucleosome purification buffer; Nuc: nucleosomes.

confirmed in PMNs at the mRNA level by quantitative RT-PCR (Fig. 5C). TLR9 mRNA were strongly increased by nucleosomes in a dose-dependent manner (16.7-fold increase at 20 µg/mL; $p < 0.0001$ versus the purification buffer (Gdt) and by the cognate TLR9 agonist (CpG-ODN, 20.9-fold increase; $p < 0.0001$ versus medium). LPS also led to a significant increase of TLR9 mRNA levels (6.05-fold increase; $p = 0.0001$ versus medium), whereas R848 surprisingly induced a lower but still significant increase (1.72-fold increase; $p = 0.026$ versus medium). PMN activation was verified by measuring the CD11b upregulation (Fig. 5D) and IL-8 secretion (Fig. 5E). Nucleosomes trigger a concentration-dependent PMN activation that was not inhibited by PB or the TLR9 antagonist ODN containing a G5 motif (G-ODN). As a control, LPS and CpG induced PMN activation but were inhibited by PB or G-ODN, respectively, whereas GpC-ODN did not activate. Therefore, the

nucleosome-mediated PMN activation and the surface TLR9 upregulation occurred independently of TLR9 triggering and are not influenced by endotoxins. R848 activated PMNs and was not inhibited by PB or G-ODN. Thus, all the potential stimuli led to PMN activation, indicating that the modulation of endosomal/cell surface TLR9 expression is correlated with cell activation.

Discussion

We have shown for the first time that primary human and mouse PMNs express TLR9 at the cell surface. This is also the first demonstration that an ectodomain-cleaved functional TLR9 is expressed at the cell surface of human primary cells. Previous studies have already reported that monocytes and B lymphocytes

express a cell surface TLR9 [24–27, 29] but PMNs have not been described. Moreover, the functionality and the processing of the cell surface TLR9 have not been addressed so far. Although activation by the cross-linked ODN was relatively low, IL-8 secretion was significantly increased. It therefore suggests that the surface-expressed TLR9 is less functionally efficient than the endosomal TLR9. Nevertheless, other causes, essentially technical reasons, may explain the apparent low activity of the surface TLR9 using this approach. For example, we observed that the nitrocellulose plates used are not optimal for PMN activation. Thus, when PMNs were cultured with CpG-ODN 2006 in solution in standard cell culture plates and nitrocellulose plates in parallel, cell activation was much stronger in standard plates (our unpublished observations). Moreover, UV irradiation only allowed the cross-linking of low amounts of CpG-ODN ($0.51 \pm 0.20 \mu\text{M}$, final concentration), whereas we found that $2 \mu\text{M}$ of the same ODN is required for optimal PMN activation in standard plates. By measuring the FITC fluorescence at all steps of the cross-linking procedure, we have clearly shown that the cross-linked ODN did not reach endosomal TLR9. Activation could therefore only be achieved through the triggering of surface TLR9. The flow cytometric analysis of the FITC fluorescence confirmed that the free CpG-ODN reached the endosome, as evidenced by the increased signal intensity in the presence of AC. On the contrary, a decrease in signal intensity was observed with the cross-linked ODN in the presence of AC, indicating that this ODN only bound to the cell surface and was not taken up by PMNs. Altogether, we have confirmed that the CpG-ODN used in the present study triggers only TLR9 and that this cross-linked ODN is cell bound. Therefore, the signal triggered at the cell surface of human PMNs by the cross-linked ODN is TLR9 mediated. Most importantly, to support our conclusions and to discriminate between TLR9 located at the plasma membrane from TLR9 located in the endosomes, we have shown that CpG-ODN-mediated PMN activation is not inhibited by AC or bafilomycin A1, demonstrating that TLR9 can also signal from the cell surface. Finally, we observed that intracellular TLR9 and cell surface TLR9 are upregulated in most donors upon activation. TLR9 upregulation occurred not only in PMNs activated with CpG-ODN but also in the presence of LPS, R848, or nucleosomes, as reported previously, and is therefore TLR9 independent and even not TLR restricted.

In conclusion, PMNs express a functional cell surface TLR9 that is upregulated upon PMN activation. Therefore, CpG-ODNs do not need to be accumulated in subcellular compartments for TLR9 binding and signaling in PMNs. Our results might partly explain why CpG-ODNs are still able to activate immune cells in the absence of granulin (although at a lower extent) as granulin has been described to particularly potentiate the delivery of CpG-ODNs to endosomal TLR9 [22]. We suggest that surface TLR9 expression works as a rescue mechanism for PMN activation when pathogen-derived TLR9 ligands have no access to endosomal TLR9 or when intracellular TLR9 is resistant to activation. Alternatively, surface TLR9 may also be involved in the transport of extracellular TLR9 ligands to endosomes. Finally, the cell surface TLR9 may recognize ligands that normally do not activate intracellular

TLR9 as previously reported for transfected cell lines [21]. TLR9 carrying mutations in the transmembrane region can access the cell surface and responds to extracellular DNA, which leads to fatal inflammation *in vivo* [34]. Particularly, cell surface TLR9 might be involved in the typical immune response to self-DNA that characterizes some inflammatory autoimmune diseases [35], especially systemic lupus erythematosus, particularly if self-DNA is able to upregulate cell surface TLR9. This is indeed the situation we mimicked in the present work with purified nucleosomes. Recently, impaired trafficking of TLR9 and TLR7 was shown to provoke systemic lethal inflammation [36]. Increased cell-surface expression of TLR9 may be a pro-inflammatory activation marker during infectious or autoimmune diseases. Thus, identification of TLR9 cell-surface expression in PMNs is critical for our further understanding of the triggering and the regulation of inflammation, and might lead to the discovery of so far unknown TLR9 ligands specific for the cell-surface receptor. Our results also contribute in delineating the mechanisms involved in the recognition of DNA. Nevertheless, future studies will be required to determine whether the intracellular and cell surface TLR9 are encoded by the same gene, whether they represent isoforms or whether the endosomal TLR9 may be translocated to the cell surface.

Materials and methods

Mice

TLR9-deficient mice [8] on a C57BL/6 genetic background were obtained from Professor H. Wagner (Munich, Germany). WT C57BL/6 control mice were purchased from Charles River. Experiments were approved by the local animal ethics committee (Regierungspräsidium Tübingen, § 4 Abs. 3 and the Darwin Committee of the University of Paris 13).

Human samples

Heparin or EDTA blood from random, healthy individuals was used. Human experiments were approved by the local ethics committee (reference 386/2006V). Alternatively, blood samples were obtained from the blood bank of Bobigny.

Nucleosome purification

Mononucleosomes (major lupus autoantigens known to induce PMN activation [37]) were purified by ultracentrifugation onto sucrose gradients as described previously [38]. As a control, an empty gradient (not loaded with chromatin) was prepared. The preparations contain low endotoxin levels (10–50 IU/mg nucleosomes) as determined using a Limulus Amebocyte Lysate assay (BioWhittaker). A similar concentration (in IU/mL) was measured in purified nucleosomes and in the purification buffer (empty gradient) that was used as a negative control. Nucleosome

preparations were always first tested using PMNs cultured with and without the LPS inhibitor PB (Fluka). For endocytosis assays, nucleosomes were dialyzed against PBS and conjugated to FITC as previously described [39].

Cell isolation, culture, and activation

Human PBMCs and PMNs were freshly isolated from peripheral blood by dextran density centrifugation [37]. Contaminating RBCs were lysed using a hypotonic buffer. Mouse neutrophils were isolated from BM cells obtained from adult WT and TLR9-KO mice (sex and age matched, 8–12 weeks old). Neutrophils were enriched by positive selection for Ly-6G⁺ cells using magnetic beads (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's recommendations. Contaminating RBC were lysed. Human (defined as CD3⁻, CD19⁻, CD56⁻, CD11b⁺, CD66b⁺ cells, purity >90% of living cells) and mouse PMNs (defined as F4/80⁻, CD3⁻, B220⁻, CD11b⁺, Ly6G^{high} cells, purity >90%) were cultured in RPMI 1640 medium (BioWhittaker), supplemented with 10% FCS (PAA), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (both from Gibco), and 50 µM 2-ME (Roth). For cell activation studies, human and mouse PMNs were plated into 96-well plates at a density of 1 or 1.5 × 10⁶ cells/mL, respectively. G-CSF (50 ng/mL, ImmunoTools) was added to mouse PMNs. Cells were either incubated in medium alone or activated with purified nucleosomes, the purification buffer as negative control (empty gradient (Gdt)), R848 (Alexis), LPS (from *Salmonella typhimurium* or *Escherichia coli*, Sigma), CpG-ODN 2006 (5'-tcgtcgttttgcgtttgtcgtt-3', Metabion or Invivogen) and 1826 (5'-tccatgacgttctgacgtt-3', Metabion), GpC-ODN 2006 (Metabion), and FITC-CpG-ODN 2006 (Invivogen). All ODNs were phosphorothioate. Experiments were conducted in the presence/absence of PB (6.25–25 µg/mL), AC (2 mM, Roth), or a TLR9 antagonist (G-ODN, 4 µM, Metabion). After 16 h, cell culture supernatants were harvested and cells were analyzed by flow cytometry.

Antibodies and flow cytometry

All antibodies were purchased from BD Biosciences, if not stated otherwise. The antibodies used are described in Supporting Information. Human PMNs and PMBCs were first incubated with PBS/5% heat-inactivated human serum, whereas PBS/2% heat-inactivated autologous mouse serum was used for mouse PMNs. After washing, cells were incubated with the indicated mAbs or the corresponding isotype controls in PBS/serum/0.01% sodium azide to reduce the unspecific uptake of mAbs. For surface TLR9 staining, cells were incubated with FITC-CpG-ODN 2006 or with anti-TLR9-FITC (5G5 mAb) or anti-N-terminal region of TLR9 (26C593 mAb) or the corresponding isotype controls and then with anti-FITC-Alexa Fluor 488 (Invitrogen) or GAM-PE. For intracellular staining, cells were first stained for surface markers, permeabilized with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences), and incubated with anti-TLR9-FITC or anti-N-terminal region of TLR9 (or the corresponding isotype controls), washed and then with anti-FITC-Alexa Fluor

488 or GAM-PE or directly incubated with FITC-CpG-ODN 2006 in PBS/0.1% saponin (Sigma). All incubations were carried out at 4°C for 30 min. Cells were finally fixed with 1% paraformaldehyde and analyzed on a four-color FACSCalibur apparatus (Becton Dickinson). Data were evaluated with CELLQuest software (Becton Dickinson).

In some cases, PMNs were stained, incubated in the presence/absence of 0.1% TB and immediately analyzed by flow cytometry to determine whether the signal detected is an intracellular or a cell-surface staining. To confirm the inhibition of extracellular fluorescence, cells were stained with the anti-CD66b-FITC mAb. As a control, to analyze nucleosome endocytosis (not inhibited by TB) PMNs were incubated with or without 10 µM FITC-nucleosomes at 37°C in 10% FCS-containing PBS for 30 min.

Confocal microscopy

To demonstrate the cell-surface expression of TLR9, PMNs were incubated with FITC-CpG-ODN 2006 or were consecutively incubated with anti-TLR9-FITC (or the corresponding isotype control) followed by anti-FITC-Alexa Fluor 488 in PBS/serum/0.01% sodium azide (30 min, 4°C for all steps). To stain the cell surface, cells were incubated with Alexa Fluor 555-conjugated CTB (20 µg/mL, Molecular Probes) and fixed. For intracellular TLR9 staining, cells were permeabilized and incubated with anti-TLR9-FITC (or the corresponding isotype control) and then with anti-FITC-Alexa Fluor 488 or directly incubated with FITC-CpG-ODN 2006 in PBS/0.1% saponin. To stain the nucleus, cells were then incubated with TO-PRO-3 (1/1,000, Molecular Probes). Finally, cells were mounted on Lab-Tek Chambered 1.0 borosilicate coverglass systems (Nunc) and kept in the dark at 4°C. Confocal microscopy was conducted using an inverted LSM510 confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss) fitted with a Plan-Apochromat 63×/1.4 OIL DIC objective, and the pinhole was set to scan layers of 1 µm. FITC and Alexa 488 were excited at 488 nm with an argon-ion laser. Alexa 555 and TO-PRO-3 were excited at 543 and 633 nm, respectively, with helium–neon lasers. Images were acquired by single-track measurement and scales are indicated.

ELISA

Detection of IL-8 and MIP-2 secretion by human and mouse PMNs was analyzed by sandwich ELISA using OptEIA set or mAb pairs and streptavidin-peroxidase conjugate from BD Biosciences or R&D Systems, respectively, and according to the manufacturer's instructions. Cytokine concentrations in cell culture supernatants are depicted as mean ± standard deviation of triplicates.

Cell surface TLR9 functional assay

Nitrocellulose plates (Millipore, MSHA S4510) were activated by UV irradiation at 254 nm (UV Stratalinker 1800, Stratagene,

20 J/cm²) and coated with PBS or FITC-CpG-ODN 2006 in PBS (1.5–2.5 μ M) for 4 h at room temperature. The presence of the FITC-CpG-ODN 2006 was confirmed by measuring the FITC fluorescence using a SPECTRA Fluor fluorometer (TECAN). Plates were then washed three times with PBS and the last wash was measured with the fluorometer to confirm the absence or free (unbound) FITC-CpG-ODN. The plate was filled with PBS and the FITC fluorescence was measured in order to estimate the CpG-ODN binding efficiency. Plates were then emptied and used for cell culture using human PMNs (1.5 \times 10⁶ cells/mL). LPS and free FITC-CpG-ODN 2006 were used as controls. After 16 h, the FITC fluorescence in the plate was measured. Cell culture supernatants were then transferred, the FITC fluorescence was measured and the IL-8 secretion was estimated by ELISA. Simultaneously, PMNs were harvested and analyzed by flow cytometry for the FITC fluorescence in the presence/absence of AC (10 mM).

cDNA synthesis and quantitative RT-PCR analysis

For quantitative PCR analysis of TLR9 mRNA levels, total RNA was isolated from 2 \times 10⁶ PMNs with Trizol reagent (Gibco BRL) according to the manufacturer's protocol. RNA template was treated with DNase I (amplification grade) and reverse-transcribed into cDNA by using Superscript II Reverse Transcriptase (both from Invitrogen). Prior to PCR, the resulting cDNA samples were treated for 30 min at 37°C with four units of RNase H (Ambion). The quantity and quality of the isolated RNA were established by UV spectroscopy and by the ability of the sample to be linearly amplified in a serial dilution with the low abundance housekeeping gene porphobilinogen deaminase. mRNA levels were determined with a PRISM 7000 sequence detection system with SYBR Green (both from Applied Biosystems) as the fluorophore and the following oligonucleotide primers (SA Biosciences): 5'-tgaagacttcaggcccaactg-3' (forward), 5'-tgcacggtcaccaggtgt-3' (reverse). Quantitative PCR data were analyzed with 7000 Systems SDS Software v1.2.3 (Applied Biosystems) and checked for correct amplification and dissociation of the products. TLR9 mRNA levels were normalized to porphobilinogen deaminase mRNA levels and were calculated according to the cycle threshold method.

Statistical analysis

The mean FITC fluorescences measured by flow cytometry in the presence/absence of AC were compared using a Student's *t*-test or a Mann-Whitney rank sum test. The mean IL-8 concentrations induced in PMNs by either the medium alone or the coated CpG-ODN were compared using a Student's *t*-test after normalization of the different experiments to the actual concentration of the coated CpG-ODN. CD11b expression and MIP-2 secretion by mouse PMNs were compared using a Student's *t*-test. The TLR9 mRNA levels in untreated and activated PMNs were compared using a Student's

t-test. The SigmaStat software was used and a *p* value < 0.05 was considered significant.

Acknowledgements: We thank Prof. H. Wagner (Munich, Germany) and Dr. L. Grosse-Hovest (Tübingen, Germany) for the gift of TLR9-deficient mice and aliquots of anti-TLR9 mAb, respectively, and F. Poirier (University of Paris 13, Bobigny, France) for technical advice. This work was supported by grants from the German Research Foundation (DFG, DE 879/1-1 and 879/1-2), the University of Tübingen (IZKF-Nachwuchsgruppe, 1604-0-0 and 1604-0-1) and the Fritz-Thyssen Foundation to Dr. Patrice Decker and by the University of Paris 13 as well as Inserm. Part of the research of Dr. Dennis Lindau was performed within the framework of project D1-101 of Top Institute Pharma. I.J. received a fellowship from the German Research Foundation (Graduiertenkolleg 794). B.J.W. was supported by a fellowship from the fortune-program of the University of Tübingen (1793-0-1).

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- 1 Nathan, C., Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 2006. 6: 173–182.
- 2 Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., Cosmi, L. et al., Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 2010. 115: 335–343.
- 3 Garcia-Romo, G. S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M. et al., Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 2011. 3: 73ra20.
- 4 Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S. et al., Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 2011. 3: 73ra19.
- 5 Yamashiro, S., Kamohara, H., Wang, J. M., Yang, D., Gong, W. H. and Yoshimura, T., Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J. Leukoc. Biol.* 2001. 69: 698–704.
- 6 Bennouna, S., Bliss, S. K., Curiel, T. J. and Denkers, E. Y., Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J. Immunol.* 2003. 171: 6052–6058.
- 7 van Gisbergen, K. P., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T. B. and van Kooyk, Y., Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J. Exp. Med.* 2005. 201: 1281–1292.
- 8 Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M. et al., A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000. 408: 740–745.

- 9 Yasuda, K., Yu, P., Kirschning, C. J., Schlatter, B., Schmitz, F., Heit, A., Bauer, S. et al., Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J. Immunol.* 2005. **174**: 6129–6136.
- 10 Okabe, Y., Kawane, K., Akira, S., Taniguchi, T. and Nagata, S., Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation. *J. Exp. Med.* 2005. **202**: 1333–1339.
- 11 Yasuda, K., Rutz, M., Schlatter, B., Metzger, J., Luppa, P. B., Schmitz, F., Haas, T. et al., CpG motif-independent activation of TLR9 upon endosomal translocation of “natural” phosphodiester DNA. *Eur. J. Immunol.* 2006. **36**: 431–436.
- 12 Haas, T., Metzger, J., Schmitz, F., Heit, A., Muller, T., Latz, E. and Wagner, H., The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines Toll-like receptor 9 activation. *Immunity* 2008. **28**: 315–323.
- 13 Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Knetter, C. F., Lien, E. et al., TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* 2004. **5**: 190–198.
- 14 Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M. and Wagner, H., Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol.* 2002. **32**: 1958–1968.
- 15 Rutz, M., Metzger, J., Gellert, T., Luppa, P., Lipford, G. B., Wagner, H. and Bauer, S., Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur. J. Immunol.* 2004. **34**: 2541–2550.
- 16 Ewald, S. E., Lee, B. L., Lau, L., Wickliffe, K. E., Shi, G. P., Chapman, H. A. and Barton, G. M., The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 2008. **456**: 658–662.
- 17 Park, B., Brinkmann, M. M., Spooner, E., Lee, C. C., Kim, Y. M. and Ploegh, H. L., Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* 2008. **9**: 1407–1414.
- 18 Hacker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T., Heeg, K. et al., CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* 1998. **17**: 6230–6240.
- 19 Kim, Y. M., Brinkmann, M. M., Paquet, M. E. and Ploegh, H. L., UNC93B1 delivers nucleotide-sensing Toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 2008. **452**: 234–238.
- 20 Brinkmann, M. M., Spooner, E., Hoebe, K., Beutler, B., Ploegh, H. L. and Kim, Y. M., The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J. Cell Biol.* 2007. **177**: 265–275.
- 21 Barton, G. M., Kagan, J. C. and Medzhitov, R., Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.* 2006. **7**: 49–56.
- 22 Park, B., Buti, L., Lee, S., Matsuwaki, T., Spooner, E., Brinkmann, M. M., Nishihara, M. et al., Granulin is a soluble cofactor for Toll-like receptor 9 signaling. *Immunity* 2011. **34**: 505–513.
- 23 Hayashi, F., Means, T. K. and Luster, A. D., Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003. **102**: 2660–2669.
- 24 Dasari, P., Nicholson, I. C., Hodge, G., Dandie, G. W. and Zola, H., Expression of Toll-like receptors on B lymphocytes. *Cell Immunol.* 2005. **236**: 140–145.
- 25 Baiyee, E. E., Flohe, S., Lendemans, S., Bauer, S., Mueller, N., Kreuzfelder, E. and Grosse-Wilde, H., Expression and function of Toll-like receptor 9 in severely injured patients prone to sepsis. *Clin. Exp. Immunol.* 2006. **145**: 456–462.
- 26 Cunningham-Rundles, C., Radigan, L., Knight, A. K., Zhang, L., Bauer, L. and Nakazawa, A., TLR9 activation is defective in common variable immune deficiency. *J. Immunol.* 2006. **176**: 1978–1987.
- 27 Cognasse, F., Hamzeh-Cognasse, H., Lafarge, S., Chavarin, P., Pozzetto, B., Richard, Y. and Garraud, O., Identification of two subpopulations of purified human blood B cells. *Immunology* 2008. **125**: 430–437.
- 28 Eaton-Bassiri, A., Dillon, S. B., Cunningham, M., Ryczyn, M. A., Mills, J., Sarisky, R. T. and Mbow, M. L., Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect. Immun.* 2004. **72**: 7202–7211.
- 29 Saikh, K. U., Kissner, T. L., Sultana, A., Ruthel, G. and Ulrich, R. G., Human monocytes infected with *Yersinia pestis* express cell surface TLR9 and differentiate into dendritic cells. *J. Immunol.* 2004. **173**: 7426–7434.
- 30 Lee, J., Mo, J. H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A. N., Liu, Y. T., Lee, H. K. et al., Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 2006. **8**: 1327–1336.
- 31 Van Strijp, J. A., Van Kessel, K. P., van der Tol, M. E. and Verhoef, J., Complement-mediated phagocytosis of herpes simplex virus by granulocytes. Binding or ingestion. *J. Clin. Invest.* 1989. **84**: 107–112.
- 32 Lindau, D., Rönnefarth, V., Erbacher, A., Rammensee, H. G. and Decker, P., Nucleosome-induced neutrophil activation occurs independently of TLR9 and endosomal acidification: implications for systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Immunol.* 2011. **41**: 669–681.
- 33 Fuxman Bass, J. I., Gabelloni, M. L., Alvarez, M. E., Vermeulen, M. E., Russo, D. M., Zorreguieta, A., Geffner, J. R. et al., Characterization of bacterial DNA binding to human neutrophil surface. *Lab. Invest.* 2008. **88**: 926–937.
- 34 Mouchess, M. L., Arpaia, N., Souza, G., Barbalat, R., Ewald, S. E., Lau, L. and Barton, G. M., Transmembrane mutations in Toll-like receptor 9 bypass the requirement for ectodomain proteolysis and induce fatal inflammation. *Immunity* 2011. **35**: 721–732.
- 35 Viglianti, G. A., Lau, C. M., Hanley, T. M., Miko, B. A., Shlomchik, M. J. and Marshak-Rothstein, A., Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity* 2003. **19**: 837–847.
- 36 Fukui, R., Saitoh, S., Kanno, A., Onji, M., Shibata, T., Ito, A., Onji, M. et al., Unc93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating Toll-like receptor 7 and 9 trafficking. *Immunity* 2011. **35**: 69–81.
- 37 Rönnefarth, V. M., Erbacher, A. I. M., Lamkemeyer, T., Madlung, J., Nordheim, A., Rammensee, H. G. and Decker, P., TLR2/TLR4-independent neutrophil activation and recruitment upon endocytosis of nucleosomes reveals a new pathway of innate immunity in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 2006. **177**: 7740–7749.
- 38 Decker, P., Le Moal, A., Briand, J. P. and Muller, S., Identification of a minimal T cell epitope recognized by antinucleosome Th cells in the C-terminal region of histone H4. *J. Immunol.* 2000. **165**: 654–662.
- 39 Decker, P., Wolburg, H. and Rammensee, H. G., Nucleosomes induce lymphocyte necrosis. *Eur. J. Immunol.* 2003. **33**: 1978–1987.

Abbreviations: **AC:** ammonium chloride · **CpG-ODN:** ODNs containing CpG motifs · **CTB:** cholera toxin subunit B · **G-ODN:** ODN containing a G5 motif (TLR9 antagonist) · **GpC-ODN:** ODN with GpC motifs instead of CpG · **ODNs:** oligonucleotides · **PB:** polymyxin B · **PMNs:** polymorphonuclear cells · **TB:** Trypan blue

Full correspondence: Dr. Patrice Decker, University of Paris 13, Sorbonne Paris Cité, EA4222, Li2P, 74 Rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France
Fax: +33-1-48-38-88-93
e-mail: patrice.decker@univ-paris13.fr

See accompanying Commentary:
<http://dx.doi.org/10.1002/eji.201343882>

Current address: Dr. Dennis Lindau, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Department of Tumor Immunology, Radboud University, 6525 GA Nijmegen, The Netherlands

Current address: Dr. Viktoria M. Rönnefarth, Hain Lifescience GmbH, 72147 Nehren, Germany

Current address: Dr. Ivan Jelcic, Department of Neurology, University Hospital, Zurich, Switzerland

Received: 30/9/2011

Revised: 29/3/2013

Accepted: 14/5/2013

Accepted article online: 18/5/2013

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Les NET sont reconnus par les ACPA et sont immunogènes.

L'étude des NET est en vogue, travailler sur ce sujet est donc très concurrentiel. Les NET ont été découverts il y a 20 ans et sont étudiés depuis une dizaine d'années. Les études qui concernent le rôle immunogène des NET sont bien plus récentes. Logiquement, les NET sont étudiés dans le lupus car la chromatine est le principal auto-antigène de cette maladie. Pourtant, de plus en plus d'équipes étudient le rôle des NET dans la polyarthrite rhumatoïde, elle aussi une maladie auto-immune. Bien que de l'ADN extracellulaire soit retrouvé chez les patients atteints de PR (266), il n'est sûrement pas l'auto-antigène principale car la PR n'est pas caractérisée par la présence d'anticorps anti-ADN. Mais de nombreuses études ont rapporté que les NET présentent des motifs citrullinés ; il a même été montré que la citrullination des histones était nécessaire à la formation de NET (78). Or, les protéines citrullinées semblent, elles, être les principaux auto-antigènes dans la PR. Il est donc légitime d'étudier les NET dans la PR. Les NET sont d'autant plus intéressants que les PNN sont très présents et activés ou pré-activés dans le sang et les articulations de patients atteints de PR.

A. Les immunoglobulines purifiées contenant des ACPA lient les NET.

1. Définition morphologique et moléculaire des NET.

Pour obtenir ces résultats, j'ai d'abord dû mettre au point l'ensemble des techniques utilisées pour ces expériences car rien n'avait été fait au laboratoire à ce sujet avant mon arrivée et celle de Patrice Decker, mon directeur. Il a fallu tout d'abord purifier les PNN de donneurs (sain ou patient PR), induire la formation de NET et définir ce qu'était un « NET ». Il existait de nombreuses photos de microscopie électronique de NET dans la littérature mais beaucoup moins en microscopie à fluorescence à l'époque. Les études publiées en 2012 décrivaient les NET comme des fibres dans lesquelles de l'ADN, des histones et une enzyme normalement contenue dans les granules, souvent la MPO, étaient colocalisés. Pourtant déjà, des groupes utilisaient le terme NET en microscopie à partir du moment où de l'ADN et la MPO étaient colocalisés même si la structure fibreuse n'était pas observée (cellules juste gonflées) (65,93). Pour être le plus rigoureux possible nous avons appelé NET une structure fibreuse composée de chromatine (ADN + histones) observée en microscopie à fluorescence (Figure 3). Nous avons en parallèle testé un grand nombre de stimuli susceptibles d'être impliqués dans la PR (ligands TLR, cytokines) et susceptibles d'induire la formation de NET mais seul le PMA nous a permis d'observer les structures précédemment décrites. Néanmoins, même si nous n'avons pas utilisé d'inducteurs naturels, les NET induits par PMA permettent de mimer le processus physiologique. Nous n'avons donc pas retrouvé les résultats décrits par le groupe de Kaplan (75). Celui-ci a rapporté que l'IL-17 pouvait induire la formation de NET, pourtant il a été rapporté que les PNN n'exprimaient pas le récepteur fonctionnel à l'IL-17(35). De plus Khandpur a utilisé pour mesurer la formation de NET dans ses expériences, le Sytox Green en condition de culture, c'est-à-dire directement dans le milieu avec les cellules, estimant que seuls les NET seraient marqués. Donc, il est impossible de vérifier si la

fluorescence est due réellement à des NET (structure fibreuse de chromatine extracellulaire). La fiche technique du Sytox indique qu'il entre dans la cellule à partir du moment où l'intégrité des cellules est modifiée, d'ailleurs ce produit a été conçu pour mesurer la viabilité cellulaire. Il y a donc une possibilité que Kaplan ait mesuré l'apoptose ou la nécrose des cellules bien que le temps de culture employé soit court (1 heure). De la même façon, l'équipe de Niess a rapporté la libération de « NET » (ADN libre) dans la circulation sanguine après un effort intense. Cependant le résumé de l'étude ne fait pas référence à une mesure de la mortalité des cellules après un tel effort(77).

2. Les IgG ACPA+ lient les NET

Nous avons ensuite utilisés les immunoglobulines G purifiées de patients atteints de maladies rhumatologiques. Les IgG des patients testés positifs pour les ACPA ont été mélangées (ACPA+) et les IgG de patients ne contenant pas d'ACPA ont été mélangées dans un autre groupe (ACPA-). Les NET ont ensuite été marqués grâce à ces immunoglobulines et à un anticorps de chèvre anti-humain conjugué à un fluorochrome (canal rouge). Nous avons donc pour ces expériences un réel contrôle négatif. Nous avons aussi utilisé un deuxième contrôle : le marquage avec des IgG purifiées de donneurs sains. Ce marquage s'est révélé systématiquement négatif. Pour comparer les intensités de fluorescence, nous nous sommes focalisés uniquement sur les structures fibreuses composées d'ADN. Cette évaluation était plutôt qualitative puisque nous n'avons pas pu effectuer la quantification automatique publiée par Brinkmann(93). Pour ne pas biaiser les observations, les champs ont été choisis dans le canal vert de l'ADN(impossible de savoir si la structure a été marquée par les IgG ou non) puis la photo a été prise en vert puis en rouge. Les photos ont été analysées en aveugle par deux personnes. Les réglages d'exposition et d'amélioration des contrastes ont été les mêmes pour tous les donneurs traités. Vingt-six donneurs ont été testés, 10 sains, 16 PR. 19 expériences étaient exploitables (présence de NET) et nous avons obtenu 15 expériences (79%, 8 sains, 7 PR) pour lesquels le marquage avec des IgG ACPA+ était plus fort que le marquage IgG ACPA- sur les NET. En cytométrie en flux nous avons montré que le marquage sur des neutrophiles intègres était faible et identique avec les IgG normales, les IgG ACPA+ ou les IgG ACPA-. Ainsi, nous avons confirmé que le marquage plus fort sur les NET avec les IgG ACPA+ était bien spécifique de ces structures.

B. Les NET sont immunogènes.

L'étape suivante était de montrer que les NET sont immunogènes après avoir démontré que les ACPA s'y fixent spécifiquement. Les techniques employées pour induire les NET et les marquer n'étaient pas directement utilisables pour les tests fonctionnels puisque pour le marquage les NET sont fixés au paraformaldéhyde (PFA). Le PFA résiduel peut aussi avoir un effet nocif pour les cellules en culture. J'ai donc dû adapter les protocoles. Nous avons choisi d'utiliser des NET solubles, c'est-à-dire détachés de leur PNN (et du plastique), pour effectuer les tests fonctionnels. Ainsi nous nous libérons des problèmes engendrés par le PFA et les éventuels produits de culture qui pourraient rester dans le support (PMA, cytokines). Nous avons en effet constaté que ces derniers activaient les cellules cibles ajoutées.

1. Les NET solubles

Pour obtenir des NET solubles, il faut les détacher des PNN qui les ont formés. Pour cela certains utilisent la force d'un simple pipetage ; nous avons choisi d'utiliser la DNase I pour détacher les NET. Pour ne pas dégrader complètement les NET, il a fallu calibrer la digestion. Cette méthode a aussi l'avantage de permettre la préparation d'un tampon qui ne contient pas de NET et qui représente un bon contrôle négatif. Pour obtenir des NET solubles, les PNN sontensemencés à forte densité, la NETose est induite par le PMA et les NET digérés faiblement avec de la DNase. La réaction est stoppée avec de l'EDTA. En contrôle, la même procédure est effectuée sans ensemencer les PNN mais toujours avec l'utilisation de PMA, de DNase et d'EDTA. Ce contrôle est nécessaire car le tampon contenant la DNase pourrait avoir un effet direct sur les macrophages ou les PNN. Il contient en effet du calcium nécessaire à l'activité de la DNase mais il contient aussi de l'EDTA qui peut empêcher l'activation des cellules. L'équipe de Chollet-Martin n'utilise pas la DNase I pour solubiliser les NET(90) car il semblerait que cette méthode ne leur permette pas d'obtenir de NET immunogènes. Et pour cause, la réaction de digestion n'est apparemment pas stoppée avec de l'EDTA et donc il est possible que les NET soient complètement dégradés lorsqu'ils sont mis en culture (et donc non fonctionnels). Le même raisonnement est à tenir avec la nucléase micrococcale. L'équipe de Chollet-Martin utilise en revanche une enzyme de restriction : Alu I, qui ne nécessite pas d'arrêt de réaction puisqu'elle coupe selon des séquences nucléotidiques précises(90). Lorsqu'il n'y a plus de site disponible, la digestion s'arrête. Ainsi ce groupe obtient des fragments de NET de grande taille qui selon eux, sont les plus immunogènes. Cette équipe n'utilise en revanche pas le tampon enzymatique en contrôle. Les NET solubles que nous obtenons sont qualifiés biochimiquement et quantifiés afin d'utiliser différentes préparations de NET mais relativement uniformes. Initialement nous souhaitions utiliser en contrôle négatif (absence de NET), des PNN activés par le PMA mais dont la NETose a été inhibée par inhibiteurs classiques décrits : DPI, NAC, Chlore-Amidine. Ce contrôle n'a pas été concluant car ces inhibiteurs ont une efficacité médiocre excepté pour DPI. La formation de NET n'était pas totalement inhibée avec NAC et Chlore-Amidine. Ceci a été vérifié par immunofluorescence et par la concentration en NET soluble. Le DPI quant à lui inhibe effectivement totalement la formation de NET mais il inhibe aussi totalement l'activation des PNN (vérifié par ELISA). Il est donc logique de ne pas voir de NET. Les résultats publiés par Marcos sont donc à prendre avec précautions d'autant plus que certains résultats ont été rétractés (76), cet inhibiteur de la NOX n'est donc pas spécifique de la formation de NET. De notre côté nous avons fait le choix de ne pas utiliser ce témoin.

2. Les NET ont un effet pro et anti-inflammatoire à la fois.

Grâce aux NET solubles de donneurs sains ou de patients PR que nous avons préparés, nous avons pu montrer que ceux-ci activent d'une part les macrophages mais aussi les PNN. En effet, les NET entraînent la libération d'IL-8, plus rarement de TNF par les macrophages et d'IL-8 par les PNN. Afin de vérifier que les cytokines mesurées après culture des PNN ou macrophages ne soient pas issues de la mixture qui contient les NET, j'ai dosé systématiquement les cytokines provenant des NET solubles. Les quelques expériences où la présence de cytokine a été détectée dans les NET n'ont pas été prises en compte. Les NET

ont donc un effet activateur sur les macrophages et PNN. En revanche, lorsque les macrophages sont activés par du LPS et mis en présence de NET, la sécrétion d'IL-6 et de TNF est diminuée par rapport aux macrophages activés par le LPS sans présence de NET. Ces résultats corroborent ceux rapportés par Barrientos sur les DC(118), cependant cette équipe n'avait pas vu l'effet direct des NET sur de telles cellules. D'après cette équipe, l'effet inhibiteur des NET serait dû aux molécules présentées par les NET. Cette hypothèse doit être vérifiée par des études complémentaires. Nous avons aussi cherché à démontrer que les IgG ACPA+ liées aux NET pouvaient rendre les NET davantage immunogènes. Cependant bien que les IgG ACPA+ se fixent aux NET, nous n'avons pas pu démontrer un effet additionnel des IgG ACPA+ sur l'activation des macrophages ou des neutrophiles. Par contre, nos résultats suggèrent que les TLR endosomaux ne sont pas impliqués dans la reconnaissance des NET puisque l'inhibition de l'acidification des endosomes n'altère pas l'activité des NET.

3. C1q module l'effet immunogène des NET.

C1q a été décrit comme interagissant avec les NET mais des rôles contradictoires ont été décrits (115,117). Nous avons donc cultivé des NET et des cellules en présence de C1q. De plus, les PNN et les macrophages expriment des récepteurs au C1q. Nous avons pu constater que C1q augmente les effets des NET sur la sécrétion d'IL-8 par les macrophages. Mais C1q semble inverser l'effet des NET sur la sécrétion de TNF par les macrophages activés avec le LPS sans influencer l'IL-6 (données non montrées). C1q module donc l'effet des NET sur les macrophages. En effet, les NET seuls inhibent la sécrétion de TNF par les macrophages activés par le LPS mais en présence de C1q les NET n'inhibent plus cette sécrétion. Il y donc une interaction NET/C1q qui modifie la nature immunogène des NET. Dans un contexte inflammatoire local, par exemple dans l'articulation, il peut y avoir présence conjointe de NET et de C1q. L'interaction de ces deux partenaires pourrait engendrer une augmentation de l'inflammation par activation des PNN et macrophages tous présents dans les articulations de patients PR. Nous allons vérifier cette hypothèse, en injectant de façon systémique et locale, des NET à des souris qui n'expriment pas C1q comparées à des souris normales. Et grâce à notre expertise sur l'arthrite au collagène, nous allons aussi pouvoir vérifier cette hypothèse dans le contexte l'inflammation articulaire. Ainsi nous pourrions confirmer que les NET associés à C1q sont responsables, au moins en partie, de l'inflammation locale dans l'AEC. Cette expérience permettrait aussi de vérifier le rôle des NET *in vivo* dans la rupture de la tolérance dans un modèle animal d'arthrite et l'induction d'auto-anticorps.

Enfin, d'après des résultats récents que nous avons publiés, le TLR9 exprimé à la surface des PNN, pourrait être un des récepteurs activables par les NET. Ce point est en cours d'investigation.

II. C1q est nécessaire à l'(auto-) immunisation et l'expression de ses récepteurs reflète l'activité de la PR chez les patients.

La PR est une maladie dans laquelle l'immunité adaptative joue un rôle important ; la présence d'ACPA reflète cette implication. Nous savons que certains facteurs de l'immunité innée pourraient jouer un rôle dans le développement ou le maintien de cette pathologie. Par exemple, le complément est activé chez les patients et C1q est produit dans le tissu synovial(301). C1q est un bon candidat d'étude car il peut potentiellement reconnaître les ACPA, les facteurs rhumatoïdes ou la CRP et ainsi contribuer à l'activation du complément chez les patients. Par ailleurs, des polymorphismes nucléotidiques dans les gènes codant pour C1q ont été identifiés et sont associés à la PR (257). De plus, C1q possède des fonctions non classiques indépendantes de l'activation de la voie classique du complément et de la reconnaissance des CI. Par exemple, cette protéine reconnaît et participe à l'élimination des cellules apoptotiques et se fixe aux NET.

A. C1q est indispensable au développement de l'AEC.

L'implication de C1q et de la voie classique du complément avaient déjà été étudiées dans des modèles d'arthrites expérimentales. Cependant, l'utilisation de modèles tels que la CAIA ou le transfert de sérum de souris K/BxN ont permis aux équipes qui ont réalisé ces études de conclure que la voie classique et C1q ne sont pas nécessaires au développement de l'arthrite(302). Pour eux, c'est la voie alterne, largement dépendante de C3a, qui serait la voie indispensable au développement de l'arthrite expérimentale. Les deux modèles animaux cités sont des modèles d'immunisation passive de la souris. Ils permettent d'étudier les voies effectrices impliquées dans l'arthrite, l'inflammation ou l'atteinte articulaire. Néanmoins ces modèles ne permettent pas d'étudier l'implication du complément (ou d'autres facteurs) dans les phases précoces de la maladie, par exemple au moment de l'immunisation ou de la rupture de la tolérance. Nous avons choisi d'utiliser le modèle d'arthrite expérimentale au collagène pour palier à cet écueil. J'ai donc immunisé avec du CII des souris déficientes pour C1q ou leurs contrôles sauvages (« true littermate ») pour étudier le rôle de C1q dans les phases précoces de la maladie. J'ai montré que les souris qui n'expriment pas C1q ne développent pas d'arthrite et donc j'ai conclu que C1q est indispensable au développement de l'AEC (article 2). La protection des souris C1q^{-/-} contre l'arthrite est accompagnée d'une production plus faible d'anticorps anti-collagène que dans les souris sauvages. Les taux mesurés d'anticorps anti-collagène étaient tout de même forts dans les deux groupes (et leurs isotypes aussi). Il se pourrait qu'il y ait un seuil de quantité d'anticorps nécessaire au développement de l'arthrite. Pourtant d'après l'expertise du laboratoire dans l'utilisation de ce modèle, il apparaît que des souris produisant un fort taux d'anticorps peuvent ne jamais développer d'arthrites, et ce sans avoir pu expliquer ce phénomène. La production d'anticorps anti-collagène n'est donc sûrement pas le seul mécanisme lié au développement de l'arthrite dans ce modèle. N'ayant pu prouver l'existence d'un effet seuil d'anticorps anti-

collagène dans le développement de l'AEC, nous avons conservé cette hypothèse dans la protection des souris C1q^{-/-} dans l'AEC. Pour tenter de savoir si ce taux plus faible d'anticorps était responsable de cette protection nous avons tenté de transférer passivement l'arthrite des souris d'un protocole AEC à des souris naïves. Le principe était de transférer du plasma de souris arthritiques à des souris receveuses sauvages pour induire de l'arthrite. Ainsi en comparant les résultats obtenus en injectant du plasma de souris sauvage arthritique (issue de l'AEC) ou du plasma de souris non arthritique C1q^{-/-} (issue de l'AEC), on aurait pu montrer (au moins en partie) que le taux d'anticorps était responsable de cette protection. Malheureusement, nous n'avons pas été capables de transférer l'arthrite d'une telle façon. Ce type d'expérience avait déjà été réalisé avec succès mais en concentrant les anticorps(303) mais nous ne souhaitons pas utiliser ce protocole pour conserver intacts les autres facteurs contenus dans le plasma et susceptibles de participer au développement de l'arthrite.

Pour expliquer le plus faible taux d'anticorps chez les souris qui n'expriment pas le C1q, nous avançons l'hypothèse que C1q pourrait être impliqué dans la prise en charge et l'apprêtement de l'antigène lors de l'immunisation et donc avant la production d'anticorps. Cette hypothèse semble probable étant donné que les autres voies du complément sont activées dans l'AEC chez les souris qui n'expriment pas C1q. La présence de C3a dans ces souris indique que les voies des lectines et/ou alterne sont activées et donc que les fonctions inflammatoires et cytotoxiques du complément sont actives et activables dans ces souris. La protection n'est donc pas due à un défaut d'activation du complément. C1q pourrait, en se liant à l'antigène, favoriser sa prise en charge par les CPA, l'apprêtement et l'immunisation. Cependant, la protection contre l'AEC peut aussi s'expliquer par le fait que les souris C1q^{-/-} produisent moins d'IL-6 que les souris C1q^{+/+} ce qui suggère que l'inflammation systémique est relativement plus faible chez les souris C1q^{-/-}. Néanmoins, il ne s'agit pas d'un défaut global de C1q mais bien spécifique à l'AEC car les réponses immunitaires ne sont pas les mêmes en réponse à d'autres antigènes. Au cours de l'AEC, les IgG1 anti-CII sont diminuées dans les souris C1q^{-/-} contrairement à ce qui a été décrit avec un autre modèle par le groupe de Botto (qui a créé ces souris)(304).

Une autre explication peut être avancée pour justifier cette modification du titre d'anticorps. C1q possède une homologie de structure avec le collagène. Pourtant en absence d'inflammation, il n'y a pas de réactions antigéniques croisées entre ces deux protéines. Mais des modifications protéolytiques de C1q par des collagénases ou des ROS peuvent conduire à une reconnaissance de C1q par des anticorps anti-collagène(234). Or, des collagénases et ROS sont retrouvés dans les articulations de patients et le C1q présent dans les liquides synoviaux de patients PR est reconnu par les anticorps anti-collagène. Cela suggère que C1q est bel et bien modifié dans le contexte de la PR. Ainsi, C1q est potentiellement un auto-antigène dans la PR. D'autre part, une équipe a immunisé des rats avec du C1q oxydé ce qui a induit la survenue d'arthrite associée à la production d'anticorps anti-C1q et anti-collagène(305). Ces chercheurs ont émis l'idée que l'induction d'une réponse immunitaire anti-CII pouvait passer par le C1q et que cette protéine du complément pouvait être l'un des premiers antigènes endogènes impliqué précocement dans l'induction des arthrites, avant que le collagène ne devienne lui-même un antigène. C1q pourrait donc à lui seul enclencher la rupture de la tolérance et c'est pourquoi les souris qui ne possèdent pas C1q ne développeraient pas d'arthrite. Néanmoins, le modèle d'AEC n'est pas le reflet exact de la

maladie chez l'homme et il dépend essentiellement d'une immunisation contre le collagène qui pourrait présenter une réaction croisée avec C1q. De plus, le CII n'est pas l'auto-antigène majeur dans la PR. Il serait intéressant d'utiliser un protocole d'arthrite avec une immunisation active, différente de l'AEC, et indépendante du collagène comme le modèle d'arthrite à la méthyl-BSA.

B. La fréquence des PNN et des monocytes exprimant les récepteurs à C1q est corrélée à l'activité de la maladie chez l'homme.

Dans le but d'étudier le rôle de C1q dans la PR nous avons mesuré la capacité des leucocytes du sang à lier C1q. D'après les expériences effectuées avant le début de ma thèse, nous savions qu'il existe une relation entre l'activation des leucocytes et l'expression des récepteurs à C1q, en particulier dans le contexte du lupus. L'expression des récepteurs à C1q par les leucocytes est aussi potentiellement liée à la capacité des leucocytes à réagir aux stimuli engendrés par la fixation de C1q, c'est-à-dire prendre en charge les complexes immuns, les cellules apoptotiques, l'ADN ou tout ligand associé à C1q. La mesure de la capacité des cellules à fixer C1q est donc une façon indirecte d'étudier l'implication de C1q dans la pathologie et éventuellement la présence d'un facteur influençant l'expression de ces récepteurs. De cette façon, nous avons mis en évidence une corrélation significativement positive entre la proportion de PNN qui fixent C1q et le DAS28, reflet de l'activité de la maladie. La même corrélation a été trouvée avec les monocytes fixant C1q et le DAS28. Nous avons montré que la proportion de PNN et monocytes qui fixent C1q est positivement et significativement corrélée à la CRP (reflet de l'inflammation). En revanche, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence significative de capacité de fixation de C1q par les sous-populations de leucocytes entre les donneurs sains et les patients PR. Mais la dispersion des valeurs est plus importante chez les donneurs sains que chez les patients PR (non montré). La méthode que nous avons utilisée nous a permis d'étudier sans distinction tous les récepteurs ou sites cellulaires de fixation à C1q (y compris ceux inconnus) à la surface des leucocytes. Par contre, cette méthode ne permet pas de mettre en évidence la différence d'expression d'un type précis de récepteurs. Pour aller plus loin dans l'étude, nous pourrions tester l'activation du système du complément dans les plasmas ou liquides synoviaux de chacun des donneurs présentés dans cette étude afin de déterminer la relation qui existe entre l'expression des récepteurs à C1q et l'activation des différentes voies du complément. D'autre part, nous pourrions grâce à des co-immuno-précipitations chercher les ligands de C1q chez les patients mais aussi doser le C1q libre ou sous forme de complexe C1 chez les patients et comparer à l'expression des récepteurs à C1q. De cette façon, nous pourrions déterminer si la présence de certains complexes C1q/ligands est liée à l'expression des récepteurs à C1q ou si ces deux phénomènes sont indépendants.

III. Les PNN murins et humains expriment un TLR9 de surface fonctionnel.

Dans le but d'approfondir les connaissances et la caractérisation des polynucléaires neutrophiles, nous avons cherché de nouvelles fonctions ou caractéristiques de ces cellules. Nous avons à ce titre montré que les PNN, qu'ils soient de souris ou d'homme, expriment un TLR9 de surface fonctionnel. Pour faire accepter cette idée auprès de la communauté scientifique, il a fallu mettre en œuvre de nombreuses techniques et approches afin de prouver l'existence de cette caractéristique.

A. Un TLR9 de surface est exprimé sur les PNN et lie ses ligands.

Nous avons montré une expression de TLR9 à la surface des PNN par cytométrie en flux et confirmé cette expression par microscopie confocale. De plus nous avons montré que ce TLR9 de surface est capable de lier un des ses ligands spécifiques : un oligonucléotide contenant des motifs CpG. Ces motifs ont été retrouvés fixés à la surface des PNN et colocalisés avec le TLR9 détecté par immunofluorescence (clone 5G5) et par cytométrie en flux (clone 5G5). Cette expression a été retrouvée chez la souris. L'utilisation de souris déficientes pour le TLR9 a confirmé que le marquage du TLR9 de surface était spécifique et seules les souris WT fixaient le ligand TLR9. Enfin, pour appuyer nos dires, nous avons à nouveau confirmé qu'il existait bien un TLR9 de surface en inhibant le marquage de surface avec du bleu trypan. En effet le bleu trypan a la faculté d'affaiblir la fluorescence de la fluorescéine à la surface des cellules. Nous avons montré qu'en présence de bleu trypan le marquage du TLR9 conjugué à la fluorescéine est diminué et donc qu'il y a bien présence d'un TLR9 en surface des PNN.

B. Le TLR9 de surface exprimé par les PNN est fonctionnel.

Nous avons montré dans un premier temps que le TLR9 de surface exprimé par les PNN était fonctionnel en utilisant des motifs CpG fixés chimiquement sur une plaque. Ainsi les motifs CpG ne peuvent pas être internalisés et ne peuvent activer que des récepteurs de surface. Nous avons montré que les motifs CpG adsorbés activent les PNN et donc que le TLR9 de surface est fonctionnel. Par ailleurs nous avons montré que le TLR9 exprimé en surface l'est principalement sous sa forme clivée (non reconnue par le clone 26C593), c'est-à-dire la forme fonctionnelle du TLR9. De plus, en inhibant les endosomes *in vitro* par plusieurs moyens, nous avons pu montrer que les PNN étaient toujours réactifs aux ligands spécifiques du TLR9 tandis que les ligands spécifiques des TLR7 et 8 n'activaient plus ces cellules. Nous avons donc montré que les TLR endosomaux étaient bien inhibés avec ces techniques et donc qu'il existait un TLR9 de surface et fonctionnel. L'activation par le TLR9 endosomal reste cependant plus efficace que celle de surface. Cependant, les plaques utilisées pour fixer l'ODN-CpG ne permettent qu'une activation sub-optimale des PNN (non montré).

C. Les anticorps utilisés sont spécifiques.

Enfin, pour valider l'étude, nous avons prouvé que les anticorps utilisés pour détecter les TLR9 étaient bien spécifiques. Nous avons extrait les protéines totales des PBMC et des PNN, procédé à une séparation sur gel d'électrophorèse (SDS-PAGE), puis marqué les protéines avec nos deux clones d'anticorps anti-TLR9 après transfert sur membrane. Nous avons ainsi montré que le clone 5G5 révèle une protéine de 100kDa (taille attendue pour la protéine entière immature) dans les PNN et les PBMC, le clone 26C593 qui reconnaît le fragment éliminé lors de la maturation du TLR9 marque non seulement une protéine de 100kDa (forme entière immature) mais aussi une protéine de 50kDa (taille attendue du fragment clivé puis éliminé, celui-ci ne devrait pas être transporté à la surface des cellules).

Il avait déjà été montré que les lymphocytes B, les DC et d'autres cellules non immunes pouvaient exprimer un TLR9 de surface mais sans démontrer son activité. D'autre part un groupe a montré que l'expression en surface d'un TLR normalement restreint à l'endosome entraîne la reconnaissance de ligands normalement non reconnus. Nous avons montré que les PNN humains et de souris expriment un TLR9 de surface naturel et fonctionnel qui reconnaît et répond au moins à des ligands classiques. Nous souhaitons maintenant identifier les ligands atypiques susceptibles d'activer le TLR9 de surface. Ainsi, nous pourrions identifier des ligands potentiellement impliqués dans la polyarthrite rhumatoïde.

IV. L'arthrite et l'inflammation se développent indépendamment du TLR9.

Dans l'objectif d'étudier davantage le rôle de l'immunité innée dans la PR, nous avons aussi étudié le rôle du TLR9 dans l'AEC. Notre hypothèse de départ était que dans les modèles expérimentaux, où l'on maîtrise assez bien l'environnement, le TLR9 reconnaît des DAMP générés durant le développement de l'arthrite et contribue au maintien de l'inflammation et de l'arthrite. De plus, le TLR9 étant l'un des senseurs des infections, nous avons étudié son expression chez les donneurs sains et les patients atteints de PR afin de vérifier si l'environnement des patients avait pu influencer leur maladie. En effet, la stimulation du TLR9 entraîne souvent sa surexpression(306). Ainsi, en mesurant l'expression du TLR9 on peut estimer l'éventuelle stimulation de celui-ci par des ligands endogènes (DAMP) ou exogènes (PAMP).

A. Le TLR9 n'est pas nécessaire au développement de l'arthrite expérimentale au collagène.

Dans cette étude, nous avons montré que le TLR9 n'était pas nécessaire au développement et au maintien des arthrites. Pour arriver à cette conclusion, nous avons induit l'arthrite chez des souris mâles C57BL/6 en injectant deux fois en sous-cutané 50µg de collagène de poulet dans de l'adjuvant complet de Freund avec 21 jours d'intervalle. Pour cela, nous avons optimisé le protocole d'AEC chez la souris C57BL/6, moins sensible que les souris DBA1. Contrairement à d'autres équipes nous n'avons pas injecté de LPS dans le but d'aggraver les arthrites. Il a d'ailleurs été montré que la stimulation du TLR4 pouvait, en association avec la stimulation du TLR9, induire une aggravation du lupus(307) ou être impliquée dans l'AEC chez la souris DBA/1(308). Toutefois nous avons tenté d'effectuer le même protocole avec 100µg de collagène à chaque injection pour générer des stimuli plus forts sans modifier la nature des stimuli. Ce protocole n'a pas engendré de résultats divergents. Pour ces deux protocoles, la même quantité de CFA et donc de mycobactéries a été utilisée. Au cours de l'arthrite, nous n'avons pas décelé de modification des populations leucocytaires entre les deux groupes de souris. De la même façon, les titres d'anticorps anti-collagène sont identiques entre les deux groupes, la balance d'isotypes IgG1/IgG2a n'est pas modifiée. Cela suggère que la balance entre les réponses Th1/Th2 n'est pas modifiée. Pourtant, il a été rapporté que la stimulation des DC par le TLR9 entraînait un déséquilibre de la balance vers une réponse Th1(309,310). Les souris qui n'expriment donc pas le TLR9 devraient produire relativement moins d'isotypes délétères IgG2a que les souris sauvages, ce qui n'est pas le cas ici. En revanche, nous avons bien pu mettre en évidence une quantité plus faible d'IL-12 dans les plasmas de souris TLR9^{-/-}. L'IL-12 permet la différenciation des lymphocytes T naïfs en Th1. Ce phénomène n'a pas été étudié au niveau cellulaire et mériterait d'être investigué d'une manière plus approfondie. Nous avons des plus, étudié la capacité des cellules souches de moelle osseuse issues des souris ayant subi le protocole d'arthrite à se différencier en ostéoclastes. Les motifs CpG influencent l'ostéoclastogénèse(311,312) mais pour nos

expériences aucun motif CpG n'a été utilisé en dehors de ceux potentiellement contenus dans le CFA ou générés de façon endogène durant le développement des arthrites. Ainsi, les cellules de moelle osseuse de souris TLR9^{-/-} et TLR9^{+/+} ont la même capacité à se différencier en ostéoclastes, ce qui corrobore les résultats cliniques et histologiques des arthrites.

D'après les études d'autres équipes, le TLR9 inhiberait le TLR7(299), notamment sur les lymphocytes B. De plus, une étude concernant l'implication du TLR9 dans un modèle lupique montre que des souris déficientes pour le TLR9 ont un développement de la maladie plus sévère (auto-anticorps anti-nucléaire, néphrite...) accompagné d'une surexpression du TLR7 et d'une augmentation de l'activation des LB et des pDC dépendante du TLR7 (313). De manière intéressante, chez les souris TLR9^{-/-} qui ont subi l'AEC, nous n'avons pas mis en évidence de surexpression du TLR7 dans les cellules du sang et les organes lymphoïdes (LB, LT, PNN). De la même façon, il n'y a pas d'augmentation de la fréquence des cellules qui expriment TLR7. Par contre, ce qui est intéressant est qu'*in vitro* les leucocytes (du sang ou des ganglions lymphatiques) issus des souris TLR9^{-/-} ayant subi l'AEC répondent davantage au ligand TLR7 que les souris TLR9^{+/+} (souris AEC). Il faut être prudent avec les résultats de cytométrie sur l'étude du TLR7 car il est connu que les anticorps commerciaux n'ont pas une efficacité optimale pour cette application mais nos résultats de stimulation *in vitro* semblent être en accord avec les observations décrites par les autres équipes. Il semble aussi que le TLR4 réponde d'avantage chez les souris TLR9^{-/-} que TLR9^{+/+} mais cette différence n'est pas significative. Nos hypothèses sont donc qu'il y aurait, au cours du développement de l'AEC, une compensation du déficit de réponse TLR9 (dans les souris TLR9^{-/-}) par une réponse spécifique accrue du TLR7 ce qui conduit à une inflammation normalisée entre les deux groupes de souris. Une hypothèse alternative serait qu'il n'y a pas de DAMP spécifiques du TLR7 et du TLR9 générés au cours de l'AEC, ce qui concorde avec le fait qu'il n'y a pas de différence entre les deux groupes. Pour vérifier ces hypothèses, il nous faudrait induire la maladie dans des souris dont les gènes du TLR9 et du TLR7 ont été invalidés. Si les souris double KO, développent les mêmes arthrites que les souris sauvages alors il n'y a en effet pas de DAMP spécifiques du TLR7 et 9 dans l'AEC. Si les arthrites sont diminuées ou retardées dans les souris double KO alors cela voudrait dire qu'il y a bien une compensation du déficit de TLR9 par le TLR7 et qu'il y a dans l'AEC des DAMP spécifiques du TLR7 et 9 responsables en partie de l'inflammation. Il reste aussi à confirmer ou infirmer un éventuel partenariat entre les TLR4, 7 et 9 car nos résultats non significatifs (pour le TLR4) ne permettent pas d'avancer d'hypothèse.

B. Il n'y a pas de modification d'expression du TLR9 chez les patients PR.

Pour approfondir l'étude de l'implication du TLR9 dans la polyarthrite rhumatoïde, nous avons cherché à savoir s'il existait une différence d'expression du TLR9 chez les patients et les donneurs sains. Cette surexpression pourrait être le reflet d'une stimulation du TLR9 *in situ* ou être à l'origine d'une inflammation anormale. Nous avons donc mesuré l'expression du TLR9 endosomal sur les leucocytes du sang de patients et de donneurs sains mais nous avons aussi mesuré l'expression du TLR9 de surface sur les PNN de ces donneurs. Le TLR9

de surface pourrait reconnaître des ligands atypiques et il était intéressant de savoir s'il était impliqué dans la pathologie. Nous avons mis en évidence qu'il n'y a pas de différence d'expression du TLR9 dans les leucocytes du sang entre les patients PR et les donneurs sains, ni de différence d'expression à la surface des PNN. Il n'y a pas non plus d'association de l'expression du TLR9 avec les données cliniques. Cela confirme qu'il n'y aurait pas de DAMP spécifiques du TLR9 libérés au cours de la PR (au moins dans le sang). De la même façon, il ne semble pas y avoir de stimuli atypiques qui stimuleraient le TLR9 de surface chez les patients PR. On ne peut pas cependant exclure chez les patients ou les donneurs sains, la présence d'une stimulation du TLR9 due à l'environnement. Vu les résultats que nous observons, il semble que cette stimulation, si elle a lieu, est équivalente dans les deux groupes. Toutefois il serait intéressant d'étudier l'expression locale de TLR9 car au cours de l'arthrite les ligands potentiels se trouvent principalement dans l'articulation. Le TLR9 pourrait donc jouer un rôle dans l'inflammation au niveau local ce que nous n'avons pas encore étudié.

CONCLUSION

Mes objectifs étaient de mieux définir l'implication de plusieurs mécanismes de l'immunité innée dans la polyarthrite rhumatoïde. Je me suis focalisé sur l'étude du rôle des PNN et des NET, de C1q et du TLR9 chez les patients PR et dans un modèle animal.

Dans ce travail, j'ai pu montrer que les NET de donneurs sains aussi bien que les NET de patients PR sont reconnus spécifiquement par les immunoglobulines contenant des ACPA. Les ACPA sont des auto-anticorps hautement spécifiques de la PR. A ce titre, les NET pourraient être une source d'auto-antigènes dans la PR. J'ai aussi montré que les NET, qu'ils proviennent de donneurs sains ou de patients PR sont immunogènes et ce indépendamment de leur fixation aux ACPA. Nous avons aussi montré que C1q oriente la réponse aux NET des macrophages ce qui fait de C1q un partenaire important des NET dans leur rôle inflammatoire. La présence des NET, plus que l'origine des NET serait donc pathogène.

D'autre part, j'ai montré que C1q jouait un rôle prépondérant dans le modèle d'arthrite expérimentale au collagène ce qui n'avait pas encore jamais été décrit. En effet, C1q est indispensable au développement de la maladie et pourrait participer au processus d'immunisation, ce qui n'avait jamais été décrit non plus. C1q et ses récepteurs semblent aussi être impliqués dans la PR puisqu'il existe une corrélation positive en la capacité des PNN et monocytes à lier C1q et la gravité de la maladie et l'inflammation. Les éclairages apportés par les deux premiers articles laissent entrevoir des perspectives encourageantes quant à la compréhension des mécanismes liés à l'immunogénicité des NET et à la modulation de celles-ci par C1q, ainsi que des phénomènes qui conduisent à la rupture de la tolérance et à l'inflammation chronique.

D'autre part, nous avons démontré que les PNN exprimaient un TLR9 de surface, ce qui ouvre des perspectives sur la découverte de nouvelles fonctions ou stimuli des neutrophiles. Nous avons aussi montré que le TLR9 n'a pas un rôle prépondérant dans l'AEC, toutefois il se pourrait que les DAMP spécifiques du TLR9 aient une importance bien moindre dans la polyarthrite rhumatoïde que dans le lupus. La collaboration entre le TLR7 et le TLR9 reste à approfondir. Chez les patients atteints de PR, le TLR9 ne semble pas non plus impliqué au niveau systémique mais une étude au niveau local serait nécessaire pour conclure définitivement sur le rôle du TLR9 dans la PR. Ainsi dans l'articulation, nous n'avons pas exclu l'hypothèse que le TLR9, notamment de surface, pourrait reconnaître des DAMP. L'étude de la contribution du TLR9 dans la réponse humorale anti-NET est la prochaine étape pour démontrer un rôle potentiel du TLR9 dans la PR.

D'après nos études, les PNN joueraient un rôle capital dans la PR, d'une part car ils sont la source des NET qui sont potentiellement auto-antigènes et sûrement immunogènes. D'autre part nous avons décrit de nouvelles fonctions qui pourraient être à l'origine d'une inflammation chronique (production d'IFN α , TLR9 de surface).

Ces travaux apportent de nouvelles informations sur les événements précoces dans le développement d'une PR et ouvrent certaines perspectives diagnostiques et thérapeutiques. L'étude de C1q et de ses récepteurs pourrait servir de facteurs diagnostiques précoces de la maladie. Dans l'hypothèse de pouvoir un jour dépister la PR très précocement, l'inhibition partielle de C1q pourrait prévenir le développement d'une auto-immunisation.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bainton DF, Ulliyot JL, Farquhar MG. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med*. 1971 Oct 1;134(4):907–34.
2. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010 Nov 24;33(5):657–70.
3. Rothman JE, Wieland FT. Protein Sorting by Transport Vesicles. *Science*. 1996 Apr 12;272(5259):227–34.
4. Sheshachalam A, Srivastava N, Mitchell T, Lacy P, Eitzen G. Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. *Front Immunol*. 2014;5:448.
5. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 1997 May 15;89(10):3503–21.
6. Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*. 2013 Nov;17(3):638–50.
7. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, et al. Expression and Function of Toll-Like Receptors in Eosinophils: Activation by Toll-Like Receptor 7 Ligand. *J Immunol*. 2003 Oct 15;171(8):3977–82.
8. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003 Oct 1;102(7):2660–9.
9. Newton K, Dixit VM. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Mar 1;4(3):a006049.
10. Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol*. 2006 Jan;7(1):49–56.
11. Eaton-Bassiri A, Dillon SB, Cunningham M, Ryczyn MA, Mills J, Sarisky RT, et al. Toll-Like Receptor 9 Can Be Expressed at the Cell Surface of Distinct Populations of Tonsils and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells.
12. Dasari P, Nicholson IC, Hodge G, Dandie GW, Zola H. Expression of toll-like receptors on B lymphocytes. *Cell Immunol*. 2005 Jul;236(1–2):140–5.
13. Guerrier T, Pochard P, Lahiri A, Youinou P, Pers J-O, Jamin C. TLR9 expressed on plasma membrane acts as a negative regulator of human B cell response. *J Autoimmun*. 2014 Jun;51:23–9.
14. Lee J, Mo J-H, Katakura K, Alkalay I, Rucker AN, Liu Y-T, et al. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol*. 2006 Dec;8(12):1327–36.
15. Boulé MW, Broughton C, Mackay F, Akira S, Marshak-Rothstein A, Rifkin IR. Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. *J Exp Med*. 2004 Jun 21;199(12):1631–40.

16. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*. 2002 Apr 11;416(6881):603–7.
17. Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 2010 Mar 4;464(7285):104–7.
18. Huang H, Evankovich J, Yan W, Nace G, Zhang L, Ross M, et al. Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. *Hepatology*. 2011 Sep 2;54(3):999–1008.
19. Lindau D, Rönnefarth V, Erbacher A, Rammensee H-G, Decker P. Nucleosome-induced neutrophil activation occurs independently of TLR9 and endosomal acidification: implications for systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol*. 2011 Mar;41(3):669–81.
20. Haas T, Metzger J, Schmitz F, Heit A, Müller T, Latz E, et al. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity*. 2008 Mar;28(3):315–23.
21. Loo Y-M, Gale M. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*. 2011 May 27;34(5):680–92.
22. Aleyd E, van Hout MWM, Ganzevles SH, Hoeben KA, Everts V, Bakema JE, et al. IgA enhances NETosis and release of neutrophil extracellular traps by polymorphonuclear cells via Fcα receptor I. *J Immunol*. 2014 Mar 1;192(5):2374–83.
23. Peipp M, Lammerts van Bueren JJ, Schneider-Merck T, Bleeker WWK, Dechant M, Beyer T, et al. Antibody fucosylation differentially impacts cytotoxicity mediated by NK and PMN effector cells. *Blood*. 2008 Sep 15;112(6):2390–9.
24. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:459–89.
25. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Lab Invest*. 2000 May 1;80(5):617–53.
26. Ambruso DR, Cusack N, Thurman G. NADPH oxidase activity of neutrophil specific granules: requirements for cytosolic components and evidence of assembly during cell activation. *Mol Genet Metab*. 2004 Apr;81(4):313–21.
27. Kennedy AD, DeLeo FR. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res*. 2009;43(1-3):25–61.
28. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.
29. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*. 2004 Mar;4(3):181–9.

30. Haegens A, Heeringa P, Suylen RJ van, Steele C, Aratani Y, O'Donoghue RJJ, et al. Myeloperoxidase Deficiency Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Inflammation and Subsequent Cytokine and Chemokine Production. *J Immunol*. 2009 Jun 15;182(12):7990–6.
31. Smith JD. Myeloperoxidase, inflammation, and dysfunctional high-density lipoprotein. *J Clin Lipidol*. 2010 Sep 1;4(5):382–8.
32. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Mol Innate Immun*. 2014;5:508.
33. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011 Aug;11(8):519–31.
34. Bennouna S, Bliss SK, Curiel TJ, Denkers EY. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Dec 1;171(11):6052–8.
35. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*. 2010 Jan;115(2):335–43.
36. Katayama M, Ohmura K, Yukawa N, Terao C, Hashimoto M, Yoshifuji H, et al. Neutrophils are essential as a source of IL-17 in the effector phase of arthritis. *PLoS One*. 2013;8(5):e62231.
37. Moran EM, Heydrich R, Ng CT, Saber TP, McCormick J, Sieper J, et al. IL-17A Expression Is Localised to Both Mononuclear and Polymorphonuclear Synovial Cell Infiltrates. *PLoS One*. 2011;6(8):e24048.
38. Assi LK, Wong SH, Ludwig A, Raza K, Gordon C, Salmon M, et al. Tumor necrosis factor alpha activates release of B lymphocyte stimulator by neutrophils infiltrating the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum*. 2007 Jun;56(6):1776–86.
39. Huard B, McKee T, Bosshard C, Durual S, Matthes T, Myit S, et al. APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. *J Clin Invest*. 2008 Aug;118(8):2887–95.
40. Scapini P, Nardelli B, Nadali G, Calzetti F, Pizzolo G, Montecucco C, et al. G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BlyS. *J Exp Med*. 2003 Feb 3;197(3):297–302.
41. Scapini P, Bazzoni F, Cassatella MA. Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BlyS) expression in human neutrophils. *Immunol Lett*. 2008 Feb 15;116(1):1–6.
42. Singer BB, Opp L, Heinrich A, Schreiber F, Binding-Liermann R, Berrocal-Almanza LC, et al. Soluble CEACAM8 interacts with CEACAM1 inhibiting TLR2-triggered immune responses. *PLoS One*. 2014;9(4):e94106.
43. Lefrancais E, Roga S, Gautier V, Gonzalez-de-Peredo A, Monsarrat B, Girard JP, et al. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan 31;109(5):1673–8.

44. Gosselin EJ, Wardwell K, Rigby WF, Guyre PM. Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma, and IL-3. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1993 Aug 1;151(3):1482–90.
45. Radsak M, Iking-Konert C, Stegmaier S, Andrassy K, Hänsch GM. Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology*. 2000 Dec;101(4):521–30.
46. Reinisch W, Lichtenberger C, Steger G, Tillinger W, Scheiner O, Gangl A, et al. Donor dependent, interferon-gamma induced HLA-DR expression on human neutrophils in vivo. *Clin Exp Immunol*. 2003 Sep;133(3):476–84.
47. Kropshofer H, Vogt AB. *Antigen Presenting Cells: From Mechanisms to Drug Development*. John Wiley & Sons; 2006. 653 p.
48. Beauvillain C, Delneste Y, Scotet M, Peres A, Gascan H, Guermonprez P, et al. Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood*. 2007 Oct 15;110(8):2965–73.
49. Scapini P, Cassatella MA. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*. 2014 Jul 31;124(5):710–9.
50. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):349–61.
51. Dinauer MC. Disorders of neutrophil function: an overview. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2007;412:489–504.
52. Segel GB, Halterman MW, Lichtman MA. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J Leukoc Biol*. 2011 Mar 1;89(3):359–72.
53. Macdowell AL, Peters SP. Neutrophils in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2007 Nov;7(6):464–8.
54. Gernez Y, Tirouvanziam R, Chanez P. Neutrophils in chronic inflammatory airway diseases: can we target them and how? *Eur Respir J*. 2010 Mar 1;35(3):467–9.
55. Souto JC, Vila L, Brú A. Polymorphonuclear neutrophils and cancer: intense and sustained neutrophilia as a treatment against solid tumors. *Med Res Rev*. 2011 May;31(3):311–63.
56. Drechsler M, Döring Y, Megens RTA, Soehnlein O. Neutrophilic granulocytes - promiscuous accelerators of atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2011 Nov;106(5):839–48.
57. Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, Wang JY, Riblett M, Yalavarthi S, et al. Mast Cells and Neutrophils Release IL-17 through Extracellular Trap Formation in Psoriasis. *J Immunol*. 2011 Jul 1;187(1):490–500.
58. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*. 2011 Mar 9;3(73):73ra19.

59. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*. 2011 Mar;3(73):73ra20.
60. Decker P, Singh-Jasuja H, Haager S, Kötter I, Rammensee H-G. Nucleosome, the main autoantigen in systemic lupus erythematosus, induces direct dendritic cell activation via a MyD88-independent pathway: consequences on inflammation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 Mar 15;174(6):3326–34.
61. Ronnefarth VM, Erbacher AI, Lamkemeyer T, Madlung J, Nordheim A, Rammensee HG, et al. TLR2/TLR4-independent neutrophil activation and recruitment upon endocytosis of nucleosomes reveals a new pathway of innate immunity in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2006 Dec 1;177(11):7740–9.
62. Lindau D, Mussard J, Rabsteyn A, Ribon M, Kötter I, Igney A, et al. TLR9 independent interferon α production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen. *Ann Rheum Dis*. 2014 Dec;73(12):2199–207.
63. Németh T, Mócsai A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunol Lett*. 2012 Mar 30;143(1):9–19.
64. Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J Leukoc Biol*. 1996 Feb;59(2):229–40.
65. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007 Jan 15;176(2):231–41.
66. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood*. 2013 Oct 17;122(16):2784–94.
67. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*. 2009 Nov;16(11):1438–44.
68. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BNV, Zbytnuik LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 2012 Sep;18(9):1386–93.
69. Hirsch JG. Bactericidal action of histone. *J Exp Med*. 1958 Dec 1;108(6):925–44.
70. Kahlenberg JM, Kaplan MJ. Little Peptide, Big Effects: The Role of LL-37 in Inflammation and Autoimmune Disease. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013 Nov 15;191(10):4895–901.
71. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2009 Oct;5(10):e1000639.
72. Gupta AK, Giaglis S, Hasler P, Hahn S. Efficient Neutrophil Extracellular Trap Induction Requires Mobilization of Both Intracellular and Extracellular Calcium Pools

- and Is Modulated by Cyclosporine A. PLoS ONE [Internet]. 2014 May 12 [cited 2014 May 19];9(5).
73. Mohammed BM, Fisher BJ, Kraskauskas D, Farkas D, Brophy DF, Fowler AA, et al. Vitamin C: A Novel Regulator of Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Nutrients*. 2013 Aug 9;5(8):3131–50.
 74. Mitroulis I, Kambas K, Chrysanthopoulou A, Skendros P, Apostolidou E, Kourtzelis I, et al. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 β and autophagy-related signaling in gout. *PloS One*. 2011;6(12):e29318.
 75. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2013 Mar;5(178):178ra40.
 76. Marcos V, Zhou Z, Yildirim AO, Bohla A, Hector A, Vitkov L, et al. CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nat Med*. 2010 Sep;16(9):1018–23.
 77. Beiter T, Fragasso A, Hudemann J, Schild M, Steinacker JM, Mooren FC, et al. Neutrophils release extracellular DNA traps in response to exercise. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985*. 2014 May 15;
 78. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*. 2009 Jan 26;184(2):205–13.
 79. Tadie J-M, Bae H-B, Jiang S, Park DW, Bell CP, Yang H, et al. HMGB1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with Toll-like receptor 4. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013 Mar 1;304(5):L342–9.
 80. Neumann A, Berends ETM, Nerlich A, Molhoek EM, Gallo RL, Meerloo T, et al. The antimicrobial peptide LL-37 facilitates the formation of neutrophil extracellular traps. *Biochem J*. 2014 Sep 2;
 81. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2010 Nov 1;191(3):677–91.
 82. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007 Apr;13(4):463–9.
 83. Martinelli S, Urosevic M, Daryadel A, Oberholzer PA, Baumann C, Fey MF, et al. Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. *J Biol Chem*. 2004 Oct 15;279(42):44123–32.
 84. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Sep 15;189(6):2689–95.
 85. Parker H, Dragunow M, Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J Leukoc Biol*. 2012 Oct;92(4):841–9.

86. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarker U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med.* 2009 Jun;15(6):623–5.
87. Behnen M, Leschczyk C, Möller S, Batel T, Klinger M, Solbach W, et al. Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via Fc γ RIIB and Mac-1. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2014 Aug 15;193(4):1954–65.
88. Itagaki K, Kaczmarek E, Lee YT, Tang IT, Isal B, Adibnia Y, et al. Mitochondrial DNA Released by Trauma Induces Neutrophil Extracellular Traps. *PLoS ONE.* 2015 Mar 16;10(3):e0120549.
89. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2011 Jul;187(1):538–52.
90. Barrientos L, Marin-Esteban V, de Chaisemartin L, Le-Moal VL, Sandré C, Bianchini E, et al. An improved strategy to recover large fragments of functional human neutrophil extracellular traps. *Front Immunol.* 2013;4:166.
91. Schauer C, Janko C, Munoz LE, Zhao Y, Kienhöfer D, Frey B, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med.* 2014 Apr 28;
92. McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubes P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe.* 2012 Sep;12(3):324–33.
93. Brinkmann V, Goosmann C, Kühn LI, Zychlinsky A. Automatic quantification of in vitro NET formation. *Front Immunol.* 2012;3:413.
94. Neeli I, Radic M. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. *Front Immunol.* 2013;4:38.
95. Muñoz Caro T, Hermosilla C, Silva LMR, Cortes H, Taubert A. Neutrophil extracellular traps as innate immune reaction against the emerging apicomplexan parasite *Besnoitia besnoiti*. *PloS One.* 2014;9(3):e91415.
96. Remijnsen Q, Berghe TV, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, et al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* 2011 Feb;21(2):290–304.
97. Knight JS, Luo W, O'Dell AA, Yalavarthi S, Zhao W, Subramanian V, et al. Peptidylarginine deiminase inhibition reduces vascular damage and modulates innate immune responses in murine models of atherosclerosis. *Circ Res.* 2014 Mar 14;114(6):947–56.
98. Wang Y, Li P, Wang S, Hu J, Chen XA, Wu J, et al. Anticancer peptidylarginine deiminase (PAD) inhibitors regulate the autophagy flux and the mammalian target of rapamycin complex 1 activity. *J Biol Chem.* 2012 Jul 27;287(31):25941–53.

99. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med*. 2010 Aug 30;207(9):1853–62.
100. Barrientos L. Modulation fonctionnelle des cellules dendritiques par les " Neutrophil Extracellular Traps " THESE: UNIVERSITÉ PARIS-SUD; 2013. Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01016696/document>
101. Pilszczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Dec;185(12):7413–25.
102. Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe*. 2012 Jul 19;12(1):109–16.
103. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol*. 2014 Nov;15(11):1017–25.
104. Halverson TWR, Wilton M, Poon KKH, Petri B, Lewenza S. DNA Is an Antimicrobial Component of Neutrophil Extracellular Traps. *PLoS Pathog*. 2015 Jan 15;11(1):e1004593.
105. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*. 2012 Sep 3;198(5):773–83.
106. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 7;107(36):15880–5.
107. Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood*. 2014 May 1;123(18):2768–76.
108. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest*. 2013 Jul 1;
109. Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Gebhardt S, Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol*. 2005 Nov;66(11):1146–54.
110. Manzenreiter R, Kienberger F, Marcos V, Schilcher K, Krautgartner WD, Obermayer A, et al. Ultrastructural characterization of cystic fibrosis sputum using atomic force and scanning electron microscopy. *J Cyst Fibros*. 2012 Mar;11(2):84–92.
111. Erbacher AIM, Rönnefarth VM, Decker P. Circulating nucleosomes due to a defective clearance of dying cells: consequences for systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2007 Jun;40(4):311–4.
112. Darrah E, Andrade F. NETs: the missing link between cell death and systemic autoimmune diseases? *Front Immunol*. 2012;3:428.

113. Korb LC, Ahearn JM. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1997 May 15;158(10):4525–8.
114. Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, Thacker SG, Anderson M, Sandy AR, et al. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Mar 15;184(6):3284–97.
115. Leffler J, Martin M, Gullstrand B, Tydén H, Lood C, Truedsson L, et al. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Apr 1;188(7):3522–31.
116. Knight JS, Kaplan MJ. Lupus neutrophils: “NET” gain in understanding lupus pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol*. 2012 Sep;24(5):441–50.
117. Farrera C, Fadeel B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013 Sep 1;191(5):2647–56.
118. Barrientos L, Bignon A, Gueguen C, de Chaisemartin L, Gorges R, Sandré C, et al. Neutrophil Extracellular Traps Downregulate Lipopolysaccharide-Induced Activation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2014 Oct 22;
119. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med*. 2008 Sep;14(9):949–53.
120. Schorn C, Janko C, Latzko M, Chaurio R, Schett G, Herrmann M. Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front Immunol*. 2012;3:277.
121. Von Köckritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M, et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*. 2008 Mar 15;111(6):3070–80.
122. Webster SJ, Daigneault M, Bewley MA, Preston JA, Marriott HM, Walmsley SR, et al. Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Sep 1;185(5):2968–79.
123. Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Wardini AB, Pinto-da-Silva LH, Saraiva EM. ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. *J Parasitol Res*. 2012 Feb 26;2012:e929743.
124. Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol*. 2007 Aug;28(8):340–5.
125. Dunkelberger JR, Song W-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*. 2009 Dec 15;20(1):34–50.
126. Chatenoud L, Bach JF. *Immunologie*. 6th ed.

127. Tsuji RF, Kawikova I, Ramabhadran R, Akahira-Azuma M, Taub D, Hugli TE, et al. Early local generation of C5a initiates the elicitation of contact sensitivity by leading to early T cell recruitment. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000 Aug 1;165(3):1588–98.
128. Ricklin D, Lambris JD. Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol*. 2007 Nov;25(11):1265–75.
129. Kishore U, Reid KB. C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology*. 2000 Aug;49(1-2):159–70.
130. Galvan MD, Greenlee-Wacker MC, Bohlson SS. C1q and phagocytosis: the perfect complement to a good meal. *J Leukoc Biol*. 2012 Sep;92(3):489–97.
131. Kishore U, Gaboriaud C, Waters P, Shrive AK, Greenhough TJ, Reid KBM, et al. C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility. *Trends Immunol*. 2004 Oct;25(10):551–61.
132. Sontheimer RD, Racila E, Racila DM. C1q: Its Functions within the Innate and Adaptive Immune Responses and its Role in Lupus Autoimmunity. *J Invest Dermatol*. 2005 Jul;125(1):14–23.
133. Nauta AJ, Trouw LA, Daha MR, Tijmsa O, Nieuwland R, Schwaeble WJ, et al. Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur J Immunol*. 2002 Jun;32(6):1726–36.
134. Zohair A, Chesne S, Wade RH, Colomb MG. Interaction between complement subcomponent C1q and bacterial lipopolysaccharides. *Biochem J*. 1989 Feb 1;257(3):865–73.
135. Roumenina LT, Popov KT, Bureeva SV, Kojouharova M, Gadjeva M, Rabheru S, et al. Interaction of the globular domain of human C1q with *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Sep;1784(9):1271–6.
136. Yamada M, Oritani K, Kaisho T, Ishikawa J, Yoshida H, Takahashi I, et al. Complement C1q regulates LPS-induced cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2004 Jan;34(1):221–30.
137. Tissot B, Daniel R, Place C. Interaction of the C1 complex of complement with sulfated polysaccharide and DNA probed by single molecule fluorescence microscopy. *Eur J Biochem FEBS*. 2003 Dec;270(23):4714–20.
138. Fraser DA, Laust AK, Nelson EL, Tenner AJ. C1q Differentially Modulates Phagocytosis and Cytokine Responses during Ingestion of Apoptotic Cells by Human Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *J Immunol*. 2009 Nov 15;183(10):6175–85.
139. Benoit ME, Clarke EV, Morgado P, Fraser DA, Tenner AJ. Complement protein C1q directs macrophage polarization and limits inflammasome activity during the uptake of apoptotic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Jun 1;188(11):5682–93.
140. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*. 2010 Sep;11(9):785–97.

141. Tyagi S, Nicholson-Weller A, Barbashov SF, Tas SW, Klickstein LB. Intercellular adhesion molecule 1 and beta2 integrins in C1q-stimulated superoxide production by human neutrophils: an example of a general regulatory mechanism governing acute inflammation. *Arthritis Rheum.* 2000 Oct;43(10):2248–59.
142. Romero IR, Morris C, Rodriguez M, Du Clos TW, Mold C. Inflammatory potential of C-reactive protein complexes compared to immune complexes. *Clin Immunol Immunopathol.* 1998 May;87(2):155–62.
143. Baruah P, Dumitriu IE, Peri G, Russo V, Mantovani A, Manfredi AA, et al. The tissue pentraxin PTX3 limits C1q-mediated complement activation and phagocytosis of apoptotic cells by dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2006 Jul;80(1):87–95.
144. Nayak A, Ferluga J, Tsolaki AG, Kishore U. The non-classical functions of the classical complement pathway recognition subcomponent C1q. *Immunol Lett.* 2010 Jul 8;131(2):139–50.
145. Gaipf US, Beyer TD, Heyder P, Kuenkele S, Böttcher A, Voll RE, et al. Cooperation between C1q and DNase I in the clearance of necrotic cell-derived chromatin. *Arthritis Rheum.* 2004 Feb;50(2):640–9.
146. Kojouharova MS, Gadjeva MG, Tsacheva IG, Zlatarova A, Roumenina LT, Tchorbadjieva MI, et al. Mutational analyses of the recombinant globular regions of human C1q A, B, and C chains suggest an essential role for arginine and histidine residues in the C1q-IgG interaction. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2004 Apr 1;172(7):4351–8.
147. Albertí S, Marqués G, Hernández-Allés S, Rubires X, Tomás JM, Vivanco F, et al. Interaction between complement subcomponent C1q and the *Klebsiella pneumoniae* porin OmpK36. *Infect Immun.* 1996 Nov;64(11):4719–25.
148. Jiang H, Cooper B, Robey FA, Gewurz H. DNA binds and activates complement via residues 14-26 of the human C1q A chain. *J Biol Chem.* 1992 Dec 15;267(35):25597–601.
149. Ghebrehwet B, Kew RR, Gruber BL, Marchese MJ, Peerschke EI, Reid KB. Murine mast cells express two types of C1q receptors that are involved in the induction of chemotaxis and chemokinesis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1995 Sep 1;155(5):2614–9.
150. Peerschke EI, Reid KB, Ghebrehwet B. Identification of a novel 33-kDa C1q-binding site on human blood platelets. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1994 Jun 15;152(12):5896–901.
151. Chen A, Gaddipati S, Hong Y, Volkman DJ, Peerschke EI, Ghebrehwet B. Human T cells express specific binding sites for C1q. Role in T cell activation and proliferation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1994 Aug 15;153(4):1430–40.
152. Baruah P, Dumitriu IE, Malik TH, Cook HT, Dyson J, Scott D, et al. C1q enhances IFN-gamma production by antigen-specific T cells via the CD40 costimulatory pathway on dendritic cells. *Blood.* 2009 Apr 9;113(15):3485–93.

153. Teo BHD, Bobryshev YV, Teh BK, Wong SH, Lu J. Complement C1q production by osteoclasts and its regulation of osteoclast development. *Biochem J.* 2012 Oct 15;447(2):229–37.
154. Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, et al. C1q and Mannose Binding Lectin Engagement of Cell Surface Calreticulin and Cd91 Initiates Macropinocytosis and Uptake of Apoptotic Cells. *J Exp Med.* 2001 Sep 17;194(6):781–96.
155. McGreal EP, Ikewaki N, Akatsu H, Morgan BP, Gasque P. Human C1qRp Is Identical with CD93 and the mNI-11 Antigen But Does Not Bind C1q. *J Immunol.* 2002 May 15;168(10):5222–32.
156. Norsworthy PJ, Fossati-Jimack L, Cortes-Hernandez J, Taylor PR, Bygrave AE, Thompson RD, et al. Murine CD93 (C1qRp) contributes to the removal of apoptotic cells in vivo but is not required for C1q-mediated enhancement of phagocytosis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2004 Mar 15;172(6):3406–14.
157. Ricklin D, Lambris JD. Complement in Immune and Inflammatory Disorders: Pathophysiological Mechanisms. *J Immunol.* 2013 Apr 15;190(8):3831–8.
158. Botto M, Dell’Agnola C, Bygrave AE, Thompson EM, Cook HT, Petry F, et al. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat Genet.* 1998 May;19(1):56–9.
159. Frisell T, Holmqvist M, Källberg H, Klareskog L, Alfredsson L, Askling J. Familial risks and heritability of rheumatoid arthritis: role of rheumatoid factor/anti-citrullinated protein antibody status, number and type of affected relatives, sex, and age. *Arthritis Rheum.* 2013 Nov;65(11):2773–82.
160. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* 2000 Jan;43(1):30–7.
161. McMichael AJ, Sasazuki T, McDevitt HO, Payne RO. Increased frequency of HLA-Cw3 and HLA-Dw4 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1977 Jun;20(5):1037–42.
162. Stastny P. Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1976 May;57(5):1148–57.
163. Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 1978 Apr 20;298(16):869–71.
164. Auger I, Roudier J. HLA-DR and the development of rheumatoid arthritis. *Autoimmunity.* 1997;26(2):123–8.
165. Hall FC, Weeks DE, Camilleri JP, Williams LA, Amos N, Darke C, et al. Influence of the HLA-DRB1 locus on susceptibility and severity in rheumatoid arthritis. *QJM Mon J Assoc Physicians.* 1996 Nov;89(11):821–9.
166. Auger I, Sebbag M, Vincent C, Balandraud N, Guis S, Nogueira L, et al. Influence of HLA-DR genes on the production of rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated fibrinogen. *Arthritis Rheum.* 2005 Nov;52(11):3424–32.

167. Balandraud N, Picard C, Reviron D, Landais C, Toussirot E, Lambert N, et al. HLA-DRB1 genotypes and the risk of developing anti citrullinated protein antibody (ACPA) positive rheumatoid arthritis. *PloS One*. 2013;8(5):e64108.
168. Jiang Y, Zhang R, Zheng J, Liu P, Tang G, Lv H, et al. Meta-Analysis of 125 Rheumatoid Arthritis-Related Single Nucleotide Polymorphisms Studied in the Past Two Decades. *PLoS ONE*. 2012 Dec 10;7(12):e51571.
169. Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature*. 2014 Feb 20;506(7488):376–81.
170. Heliövaara M, Aho K, Aromaa A, Knekt P, Reunanen A. Smoking and risk of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1993 Nov;20(11):1830–5.
171. Lugli EB, Correia R, Fischer R, Lundberg K, Bracke KR, Montgomery AB, et al. Expression of citrulline and homocitrulline residues in the lungs of non-smokers and smokers: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015 Jan 20;17(1):9.
172. Bingham CO, Moni M. Periodontal disease and rheumatoid arthritis: the evidence accumulates for complex pathobiologic interactions. *Curr Opin Rheumatol*. 2013 May;25(3):345–53.
173. Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen K-A, Lundberg K, et al. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and α -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010 Sep;62(9):2662–72.
174. Arvikar SL, Collier DS, Fisher MC, Unizony S, Cohen GL, McHugh G, et al. Clinical correlations with *Porphyromonas gingivalis* antibody responses in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(5):R109.
175. Hitchon CA, Chandad F, Ferucci ED, Willemze A, Ioan-Facsinay A, van der Woude D, et al. Antibodies to *porphyromonas gingivalis* are associated with anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis and their relatives. *J Rheumatol*. 2010 Jun;37(6):1105–12.
176. Martinez-Martinez RE, Abud-Mendoza C, Patiño-Marin N, Rizo-Rodríguez JC, Little JW, Loyola-Rodríguez JP. Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients. *J Clin Periodontol*. 2009 Dec;36(12):1004–10.
177. Blaschke S, Schwarz G, Moneke D, Binder L, Müller G, Reuss-Borst M. Epstein-Barr virus infection in peripheral blood mononuclear cells, synovial fluid cells, and synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2000 Apr;27(4):866–73.
178. Balandraud N, Meynard JB, Auger I, Sovran H, Mugnier B, Reviron D, et al. Epstein-Barr virus load in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis: accurate quantification using real-time polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum*. 2003 May;48(5):1223–8.

179. Saal JG, Krimmel M, Steidle M, Gerneth F, Wagner S, Fritz P, et al. Synovial Epstein-Barr virus infection increases the risk of rheumatoid arthritis in individuals with the shared HLA-DR4 epitope. *Arthritis Rheum.* 1999;42(7):1485–96.
180. Al-Arfaj HF. Klinefelter's syndrome and rheumatoid arthritis: report of a case and review of the literature. *Int J Rheum Dis.* 2010 Feb 1;13(1):86–8.
181. Ostensen M, Villiger PM. The remission of rheumatoid arthritis during pregnancy. *Semin Immunopathol.* 2007 Jun;29(2):185–91.
182. Forger F, Marcoli N, Gadola S, Moller B, Villiger PM, Ostensen M. Pregnancy induces numerical and functional changes of CD4+CD25 high regulatory T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008 Jul;67(7):984–90.
183. Islander U, Jochems C, Lagerquist MK, Forsblad-d'Elia H, Carlsten H. Estrogens in rheumatoid arthritis; the immune system and bone. *Mol Cell Endocrinol.* 2011 Mar 15;335(1):14–29.
184. Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov.* 2003 Jun;2(6):473–88.
185. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31(3):315–24.
186. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis.* 2010 Sep;69(9):1580–8.
187. McInnes I, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2011;365(23):2205–24.
188. Boissier MC, Assier E, Biton J, Denys A, Falgarone G, Bessis N. Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine.* 2009 Jan;76(1):10–4.
189. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med.* 2004 Aug 2;200(3):277–85.
190. Boissier M-C. Cell and cytokine imbalances in rheumatoid synovitis. *Jt Bone Spine Rev Rhum.* 2011 May;78(3):230–4.
191. Law SC, Street S, Yu C-HA, Capini C, Ramnoruth S, Nel HJ, et al. T-cell autoreactivity to citrullinated autoantigenic peptides in rheumatoid arthritis patients carrying HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(3):R118.
192. Martinez-Gamboa L, Brezinschek H-P, Burmester GR, Dörner T. Immunopathologic role of B lymphocytes in rheumatoid arthritis: rationale of B cell-directed therapy. *Autoimmun Rev.* 2006 Aug;5(7):437–42.
193. Adamopoulos IE, Bowman EP. Immune regulation of bone loss by Th17 cells. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(5):225.

194. Peck A, Mellins ED. Breaking old paradigms: Th17 cells in autoimmune arthritis. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2009 Sep;132(3):295–304.
195. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 2008 Nov;118(11):3537–45.
196. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2007 Jun;7(6):429–42.
197. Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2002 May;2(5):364–71.
198. Boissier MC, Assier E, Falgarone G, Bessis N. Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine.* 2008 Jul;75(4):373–5.
199. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:1–21.
200. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, et al. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science.* 1992 Jul 3;257(5066):88–91.
201. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485–517.
202. Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, et al. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 1999;42:963–70.
203. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med.* 2006 Nov 27;203(12):2673–82.
204. Waaler E. On the Occurrence of a Factor in Human Serum Activating the Specific Agglutination of Sheep Blood Corpuscles. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1940;17(2):172–88.
205. Vincent C, Nogueira L, Clavel C, Sebbag M, Serre G. Autoantibodies to citrullinated proteins: ACPA. *Autoimmunity.* 2005 Feb;38(1):17–24.
206. Rollet-Labelle E, Vaillancourt M, Marois L, Newkirk MM, Poubelle PE, Naccache PH. Cross-linking of IgGs bound on circulating neutrophils leads to an activation of endothelial cells: possible role of rheumatoid factors in rheumatoid arthritis-associated vascular dysfunction. *J Inflamm Lond Engl.* 2013;10(1):27.
207. Anquetil F, Clavel C, Offer G, Serre G, Sebbag M. IgM and IgA Rheumatoid Factors Purified from Rheumatoid Arthritis Sera Boost the Fc Receptor- and Complement-Dependent Effector Functions of the Disease-Specific Anti-Citrullinated Protein Autoantibodies. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2015 Apr 15;194(8):3664–74.
208. Laurent L, Anquetil F, Clavel C, Ndongo-Thiam N, Offer G, Miossec P, et al. IgM rheumatoid factor amplifies the inflammatory response of macrophages induced by the

- rheumatoid arthritis-specific immune complexes containing anticitrullinated protein antibodies. *Ann Rheum Dis.* 2014 Mar 11;
209. Pratesi F, Dioni I, Tommasi C, Alcaro MC, Paolini I, Barbetti F, et al. Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann Rheum Dis.* 2013 Jun 1;
 210. Amara K, Steen J, Murray F, Morbach H, Fernandez-Rodriguez BM, Joshua V, et al. Monoclonal IgG antibodies generated from joint-derived B cells of RA patients have a strong bias toward citrullinated autoantigen recognition. *J Exp Med.* 2013 Mar 11;210(3):445–55.
 211. György B, Tóth E, Tarcsa E, Falus A, Buzás EI. Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(10):1662–77.
 212. Valesini G, Gerardi MC, Iannuccelli C, Pacucci VA, Pendolino M, Shoenfeld Y. Citrullination and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2015 Jan 28;
 213. Damgaard D, Senolt L, Nielsen M, Pruijn G, Nielsen CH. Demonstration of extracellular peptidylarginine deiminase (PAD) activity in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis using a novel assay for citrullination of fibrinogen. *Arthritis Res Ther.* 2014 Dec 5;16(6):498.
 214. Darrah E, Giles JT, Ols ML, Bull HG, Andrade F, Rosen A. Erosive rheumatoid arthritis is associated with antibodies that activate PAD4 by increasing calcium sensitivity. *Sci Transl Med.* 2013 May 22;5(186):186ra65.
 215. Romero V, Fert-Bober J, Nigrovic PA, Darrah E, Haque UJ, Lee DM, et al. Immune-mediated pore-forming pathways induce cellular hypercitrullination and generate citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med.* 2013 Oct 30;5(209):209ra150.
 216. Clavel C, Nogueira L, Laurent L, Iobagiu C, Vincent C, Sebbag M, et al. Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fc gamma receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum.* 2008 Mar;58(3):678–88.
 217. Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, et al. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest*
 218. Hill JA, Bell DA, Brintnell W, Yue D, Wehrli B, Jevnikar AM, et al. Arthritis induced by posttranslationally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice. *J Exp Med.* 2008 Apr 14;205(4):967–79.
 219. Kuhn KA, Kulik L, Tomooka B, Braschler KJ, Arend WP, Robinson WH, et al. Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J Clin Invest.* 2006 Apr;116(4):961–73.
 220. Uysal H, Bockermann R, Nandakumar KS, Sehnert B, Bajtner E, Engström Å, et al. Structure and pathogenicity of antibodies specific for citrullinated collagen type II in experimental arthritis. *J Exp Med.* 2009 Feb 16;206(2):449–62.

221. Trouw LA, Haisma EM, Levarht EWN, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, Daha MR, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways. *Arthritis Rheum.* 2009 Jul;60(7):1923–31.
222. Gan RW, Trouw LA, Shi J, Toes REM, Huizinga TWJ, Demoruelle MK, et al. Anti-carbamylated Protein Antibodies Are Present Prior to Rheumatoid Arthritis and Are Associated with Its Future Diagnosis. *J Rheumatol.* 2015 Jan 15;
223. Shi J, van de Stadt LA, Levarht EWN, Huizinga TWJ, Toes REM, Trouw LA, et al. Anti-carbamylated protein antibodies are present in arthralgia patients and predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2013 Apr;65(4):911–5.
224. Pruijn GJM. Citrullination and carbamylation in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Front Immunol.* 2015;6:192.
225. Schaller M, Stohl W, Benoit V, Tan S-M, Johansen L, Ditzel HJ. Patients with inflammatory arthritic diseases harbor elevated serum and synovial fluid levels of free and immune-complexed glucose-6-phosphate isomerase (G6PI). *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Oct 20;349(2):838–45.
226. Dwivedi N, Radic M. Citrullination of autoantigens implicates NETosis in the induction of autoimmunity. *Ann Rheum Dis.* 2013 Nov 29;
227. Dwivedi N, Neeli I, Schall N, Wan H, Desiderio DM, Csernok E, et al. Deimination of linker histones links neutrophil extracellular trap release with autoantibodies in systemic autoimmunity. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2014 Mar 26;
228. Pap T, Nawrath M, Heinrich J, Bosse M, Baier A, Hummel KM, et al. Cooperation of Ras- and c-Myc-dependent pathways in regulating the growth and invasiveness of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004 Sep;50(9):2794–802.
229. Lee H-Y, Jeon H-S, Song E-K, Han M-K, Park S-I, Lee S-I, et al. CD40 ligation of rheumatoid synovial fibroblasts regulates RANKL-mediated osteoclastogenesis: Evidence of NF- κ B-dependent, CD40-mediated bone destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006 Jun 1;54(6):1747–58.
230. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature.* 1986 Feb 6;319(6053):516–8.
231. Ottonello L, Cutolo M, Frumento G, Arduino N, Bertolotto M, Mancini M, et al. Synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis inhibits neutrophil apoptosis: role of adenosine and proinflammatory cytokines. *Rheumatology.* 2002 Nov 1;41(11):1249–60.
232. Chakravarti A, Raquil MA, Tessier P, Poubelle PE. Surface RANKL of Toll-like receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood.* 2009 Aug 20;114(8):1633–44.
233. Poubelle PE, Chakravarti A, Fernandes MJ, Doiron K, Marceau A-A. Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils

- from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. *Arthritis Res Ther.* 2007 Apr 1;9(2):1–12.
234. Heinz HP, Brackertz D, Loos M. Enzymatic alteration of C1q, the collagen-like subcomponent of the first component of complement, leads to cross-reactivity with type II collagen. *FEBS Lett.* 1988 Feb 15;228(2):332–6.
235. Kundu S, Ghosh P, Datta S, Ghosh A, Chattopadhyay S, Chatterjee M. Oxidative stress as a potential biomarker for determining disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Free Radic Res.* 2012 Dec;46(12):1482–9.
236. Iking-Konert C, Ostendorf B, Sander O, Jost M, Wagner C, Joosten L, et al. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cells. *Ann Rheum Dis.* 2005 Oct;64(10):1436–42.
237. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2014 Jun 10;
238. Neeli I, Dwivedi N, Khan S, Radic M. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immun.* 2009;1(3):194–201.
239. Sur Chowdhury C, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res Ther.* 2014 Jun 13;16(3):R122.
240. Crockard AD, Thompson JM, Malhotra R, McNeill TA. Increased expression of C1q receptors on neutrophils from inflammatory joint fluids. *Immunol Lett.* 1993 May;36(2):195–201.
241. Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2001 Aug 1;167(3):1601–8.
242. Monach PA, Nigrovic PA, Chen M, Hock H, Lee DM, Benoist C, et al. Neutrophils in a mouse model of autoantibody-mediated arthritis: critical producers of Fc receptor gamma, the receptor for C5a, and lymphocyte function-associated antigen 1. *Arthritis Rheum.* 2010 Mar;62(3):753–64.
243. Kontinen YT, Ceponis A, Meri S, Vuorikoski A, Kortekangas P, Sorsa T, et al. Complement in acute and chronic arthritides: assessment of C3c, C9, and protectin (CD59) in synovial membrane. *Ann Rheum Dis.* 1996 Dec 1;55(12):888–94.
244. Biró E, Nieuwland R, Tak PP, Pronk LM, Schaap MCL, Sturk A, et al. Activated complement components and complement activator molecules on the surface of cell-derived microparticles in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. *Ann Rheum Dis.* 2007 Aug;66(8):1085–92.
245. Strainic MG, Liu J, Huang D, An F, Lalli PN, Muqim N, et al. Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4⁺ T cells. *Immunity.* 2008 Mar;28(3):425–35.

246. Ballanti E, Perricone C, di Muzio G, Kroegler B, Chimenti MS, Graceffa D, et al. Role of the complement system in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis: relationship with anti-TNF inhibitors. *Autoimmun Rev*. 2011 Aug;10(10):617–23.
247. Moxley G, Ruddy S. Elevated C3 anaphylatoxin levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1985 Oct;28(10):1089–95.
248. Jose PJ, Moss IK, Maini RN, Williams TJ. Measurement of the chemotactic complement fragment C5a in rheumatoid synovial fluids by radioimmunoassay: role of C5a in the acute inflammatory phase. *Ann Rheum Dis*. 1990 Oct;49(10):747–52.
249. Giles JL, Choy E, van den Berg C, Morgan BP, Harris CL. Functional Analysis of a Complement Polymorphism (rs17611) Associated with Rheumatoid Arthritis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015 Feb 27;
250. Kiener HP, Baghestanian M, Dominkus M, Walchshofer S, Ghannadan M, Willheim M, et al. Expression of the C5a receptor (CD88) on synovial mast cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1998 Feb;41(2):233–45.
251. Yuan G, Wei J, Zhou J, Hu H, Tang Z, Zhang G. Expression of C5aR (CD88) of synoviocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Chin Med J (Engl)*. 2003 Sep;116(9):1408–12.
252. Okroj M, Heinegård D, Holmdahl R, Blom AM. Rheumatoid arthritis and the complement system. *Ann Med*. 2007 Jan 1;39(7):517–30.
253. Happonen KE, Saxne T, Geborek P, Andersson M, Bengtsson AA, Hesselstrand R, et al. Serum COMP-C3b complexes in rheumatic diseases and relation to anti-TNF- α treatment. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(1):R15.
254. Sjöberg A, Onnerfjord P, Mörgelin M, Heinegård D, Blom AM. The extracellular matrix and inflammation: fibromodulin activates the classical pathway of complement by directly binding C1q. *J Biol Chem*. 2005 Sep 16;280(37):32301–8.
255. Daha NA, Banda NK, Roos A, Beurskens FJ, Bakker JM, Daha MR, et al. Complement activation by (auto-) antibodies. *Mol Immunol*. 2011 Aug;48(14):1656–65.
256. Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, Fischer PB, Dwek RA, Sim RB. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat Med*. 1995 Mar;1(3):237–43.
257. Trouw LA, Daha N, Kurreeman FAS, Böhringer S, Goulielmos GN, Westra HJ, et al. Genetic variants in the region of the C1q genes are associated with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2013 Jul;173(1):76–83.
258. Kessel C, Nandakumar KS, Peters FB, Gauba V, Schultz PG, Holmdahl R. A single functional group substitution in C5a breaks B and T cell tolerance and protects from experimental arthritis. *Arthritis Rheum*. 2013 Oct 21;
259. Durigutto P, Macor P, Ziller F, De Maso L, Fischetti F, Marzari R, et al. Prevention of arthritis by locally synthesized recombinant antibody neutralizing complement component c5. *PloS One*. 2013;8(3):e58696.

260. Ji H, Ohmura K, Mahmood U, Lee DM, Hofhuis FMA, Boackle SA, et al. Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity*. 2002 Feb;16(2):157–68.
261. Monach PA, Verschoor A, Jacobs JP, Carroll MC, Wagers AJ, Benoist C, et al. Circulating C3 is necessary and sufficient for induction of autoantibody-mediated arthritis in a mouse model. *Arthritis Rheum*. 2007 Sep;56(9):2968–74.
262. Banda NK, Takahashi K, Wood AK, Holers VM, Arend WP. Pathogenic complement activation in collagen antibody-induced arthritis in mice requires amplification by the alternative pathway. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Sep 15;179(6):4101–9.
263. Etem EO, Elyas H, Ozgocmen S, Yıldırım A, Godekmerdan A. The investigation of toll-like receptor 3, 9 and 10 gene polymorphisms in Turkish rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int*. 2011 Oct;31(10):1369–74.
264. Kuznik A, Bencina M, Svajger U, Jeras M, Rozman B, Jerala R. Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Apr 15;186(8):4794–804.
265. Thwaites R, Chamberlain G, Sacre S. Emerging role of endosomal toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Front Immunol*. 2014;5:1.
266. Monach PA, Hueber W, Kessler B, Tomooka BH, BenBarak M, Simmons BP, et al. A broad screen for targets of immune complexes decorating arthritic joints highlights deposition of nucleosomes in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 15;106(37):15867–72.
267. Veiko NN, Shubaeva NO, Ivanova SM, Speranskii AI, Lyapunova NA, Spitkovskii DM. Blood serum DNA in patients with rheumatoid arthritis is considerably enriched with fragments of ribosomal repeats containing immunostimulatory CpG-motifs. *Bull Exp Biol Med*. 2006 Sep;142(3):313–6.
268. Thwaites R, Chamberlain G, Sacre S. Emerging Role of Endosomal Toll-Like Receptors in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 2014;5:1.
269. Huang H, Chen H-W, Evankovich J, Yan W, Rosborough BR, Nace GW, et al. Histones activate the NLRP3 inflammasome in Kupffer cells during sterile inflammatory liver injury. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013 Sep 1;191(5):2665–79.
270. Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LAB, Koenders MI, Devesa I, Roelofs MF, Radstake TRDJ, et al. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J Clin Invest*. 2008 Jan;118(1):205–16.
271. Deng GM, Nilsson IM, Verdrengh M, Collins LV, Tarkowski A. Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nat Med*. 1999 Jun;5(6):702–5.
272. Dong L, Ito S, Ishii KJ, Klinman DM. Suppressible oligonucleotides protect against collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum*. 2004 May;50(5):1686–9.
273. Wu H-J, Sawaya H, Binstadt B, Brickelmaier M, Blasius A, Gorelik L, et al. Inflammatory arthritis can be reined in by CpG-induced DC-NK cell cross talk. *J Exp Med*. 2007 Aug 6;204(8):1911–22.

274. Boissier M-C. *Biothérapies en rhumatologie*. Springer; 2011
275. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(20):9784–8.
276. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, et al. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet*. 1994;344(8930):1105–10.
277. Thiolat A, Semerano L, Pers YM, Biton J, Lemeiter D, Portales P, et al. Interleukin-6 receptor blockade enhances CD39+ regulatory T cell development in rheumatoid arthritis and in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2014 Feb;66(2):273–83.
278. Richez C, Truchetet M-E, Schaefferbeke T, Bannwarth B. Atacicept as an investigated therapy for rheumatoid arthritis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2014 Sep;23(9):1285–94.
279. Ruderman EM, Pope RM. Drug Insight: abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2006 Dec;2(12):654–60.
280. Delavallee L, Le Buanec H, Bessis N, Assier E, Denys A, Bizzini B, et al. Early and long-lasting protection from arthritis in tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) transgenic mice vaccinated against TNFalpha. *Ann Rheum Dis*. 2008 Sep;67(9):1332–8.
281. Delavallee L, Semerano L, Assier E, Vogel G, Vuagniaux G, Laborie M, et al. Active immunization to tumor necrosis factor-alpha is effective in treating chronic established inflammatory disease: a long-term study in a transgenic model of arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(6):R195.
282. Durez P, Vandepapeliere P, Miranda P, Toncheva A, Berman A, Kehler T, et al. Therapeutic Vaccination with TNF-Kinoid in TNF Antagonist-Resistant Rheumatoid Arthritis: A Phase II Randomized, Controlled Clinical Trial. *PloS One*. 2014;9(12):e113465.
283. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo J*. 1991;10(13):4025–31.
284. Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell*. 1996 Nov 29;87(5):811–22.
285. Matsumoto I, Staub A, Benoist C, Mathis D. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science*. 1999 Nov 26;286(5445):1732–5.
286. Kagari T, Doi H, Shimozato T. The importance of IL-1 beta and TNF-alpha, and the noninvolvement of IL-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Aug 1;169(3):1459–66.
287. Banda NK, Thurman JM, Kraus D, Wood A, Carroll MC, Arend WP, et al. Alternative complement pathway activation is essential for inflammation and joint destruction in

- the passive transfer model of collagen-induced arthritis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Aug 1;177(3):1904–12.
288. Nandakumar KS, Holmdahl R. Antibody-induced arthritis: disease mechanisms and genes involved at the effector phase of arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2007 Jan 11;8(6):223.
289. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med*. 1977;146(3):857–68.
290. Yoo TJ, Kim SY, Stuart JM, Floyd RA, Olson GA, Cremer MA, et al. Induction of arthritis in monkeys by immunization with type II collagen. *J Exp Med*. 1988 Aug 1;168(2):777–82.
291. Boissier M-C, Feng XZ, Carlouz A, Roudier R, Fournier C. Experimental autoimmune arthritis in mice. I. Homologous type II collagen is responsible for self-perpetuating chronic polyarthritis. *Ann Rheum Dis*. 1987;46:691–700.
292. Hegen M, Keith JC, Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008 Nov;67(11):1505–15.
293. Mussard J. Etude fonctionnelle du “Toll-like receptor 9” et des neutrophiles au cours de l’inflammation: implication dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde et d’un modèle expérimental. Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité.; 2015.
294. Terato K, Hasty KA, Reife RA, Cremer MA, Kang AH, Stuart JM. Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1992 Apr 1;148(7):2103–8.
295. Bajtner E, Nandakumar KS, Engström A, Holmdahl R. Chronic development of collagen-induced arthritis is associated with arthritogenic antibodies against specific epitopes on type II collagen. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(5):R1148–57.
296. Goldschmidt TJ, Holmdahl R. Anti-T cell receptor antibody treatment of rats with established autologous collagen-induced arthritis: suppression of arthritis without reduction of anti-type II collagen autoantibody levels. *Eur J Immunol*. 1991 May;21(5):1327–30.
297. Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Immunol*. 2004 Mar 1;172(5):2731–8.
298. Neumann E, Barnum SR, Turner IH, Echols J, Fleck M, Judex M, et al. Local production of complement proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum*. 2002 Apr;46(4):934–45.
299. Desnues B, Macedo AB, Roussel-Queval A, Bonnardel J, Henri S, Demaria O, et al. TLR8 on dendritic cells and TLR9 on B cells restrain TLR7-mediated spontaneous autoimmunity in C57BL/6 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jan 28;111(4):1497–502.
300. Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol*. 2006 Jan;7(1):49–56.

301. Breitner S, Störkel S, Reichel W, Loos M. Complement components C1q, C1r/C1s, and C1INH in rheumatoid arthritis. Correlation of in situ hybridization and northern blot results with function and protein concentration in synovium and primary cell cultures. *Arthritis Rheum.* 1995 Apr;38(4):492–8.
302. Ji H, Ohmura K, Mahmood U, Lee DM, Hofhuis FMA, Boackle SA, et al. Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity.* 2002 Feb;16(2):157–68.
303. Stuart JM, Dixon FJ. Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice. *J Exp Med.* 1983 Aug 1;158(2):378–92.
304. Cutler AJ, Botto M, van Essen D, Rivi R, Davies KA, Gray D, et al. T cell-dependent immune response in C1q-deficient mice: defective interferon gamma production by antigen-specific T cells. *J Exp Med.* 1998 Jun 1;187(11):1789–97.
305. Trinder PK, Maeurer MJ, Stoerker SS, Loos M. Altered (oxidized) C1q induces a rheumatoid arthritis-like destructive and chronic inflammation in joint structures in arthritis-susceptible rats. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997 Feb;82(2):149–56.
306. Lindau D, Mussard J, Wagner BJ, Ribon M, Rönnefarth VM, Quettier M, et al. Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9. *Eur J Immunol.* 2013 May 18;
307. Lee T-P, Huang JC, Liu C-J, Chen H-J, Chen Y-H, Tsai Y-T, et al. Interactions of surface-expressed TLR-4 and endosomal TLR-9 accelerate lupus progression in anti-dsDNA antibody transgenic mice. *Exp Biol Med Maywood NJ.* 2014 Jun;239(6):715–23.
308. Pierer M, Wagner U, Rossol M, Ibrahim S. Toll-like receptor 4 is involved in inflammatory and joint destructive pathways in collagen-induced arthritis in DBA1J mice. *PloS One.* 2011;6(8):e23539.
309. Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med.* 2005 Dec 19;202(12):1715–24.
310. Theiner G, Rössner S, Dalpke A, Bode K, Berger T, Gessner A, et al. TLR9 cooperates with TLR4 to increase IL-12 release by murine dendritic cells. *Mol Immunol.* 2008 Jan;45(1):244–52.
311. Takami M, Kim N, Rho J, Choi Y. Stimulation by toll-like receptors inhibits osteoclast differentiation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2002 Aug 1;169(3):1516–23.
312. Zou W, Schwartz H, Endres S, Hartmann G, Bar-Shavit Z. CpG oligonucleotides: novel regulators of osteoclast differentiation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2002 Mar;16(3):274–82.
313. Santiago-Raber M-L, Dunand-Sauthier I, Wu T, Li Q-Z, Uematsu S, Akira S, et al. Critical role of TLR7 in the acceleration of systemic lupus erythematosus in TLR9-deficient mice. *J Autoimmun.* 2010 Jun;34(4):339–48.
314. Tilki D, Singer BB, Shariat SF, Behrend A, Fernando M, Irmak S, et al. CEACAM1: a novel urinary marker for bladder cancer detection. *Eur Urol.* 2010 Apr;57(4):648–54.

ANNEXES

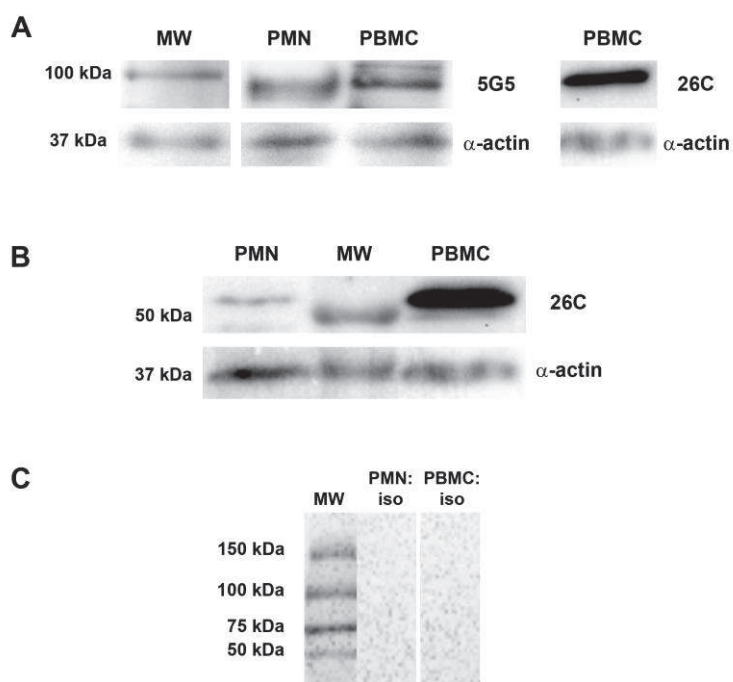
I. Annexe 1 : Figures et informations supplémentaires relatives à l'article 4 : Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9

Online supporting information

Supporting Materials and methods. The following mAb (from BD Biosciences if not stated) and secondary antibodies conjugated with different fluorochromes were used for flow cytometry analyses: anti-human CD3-PerCP (clone SK7), CD11b-PE (ICRF44), CD19-APC (HIB19), CD56-PE (B159), CD66b-FITC (G10F5), anti-human/mouse TLR9 (5G5, purified, AbD Serotec or FITC-conjugated, Abcam), anti-human/mouse N-terminal region of TLR9 (26C593, recognizes an epitope between amino acids 268-284 in the ectodomain, Abcam), GAM-IgG-PE (Jackson ImmunoResearch) and anti-mouse CD11b-PE (M1/70), Ly-6G-FITC (1A8), F4/80-APC (BM8, eBioscience), CD3-FITC (145-2C11, SouthernBiotech), B220-PE (RA3-6B2).

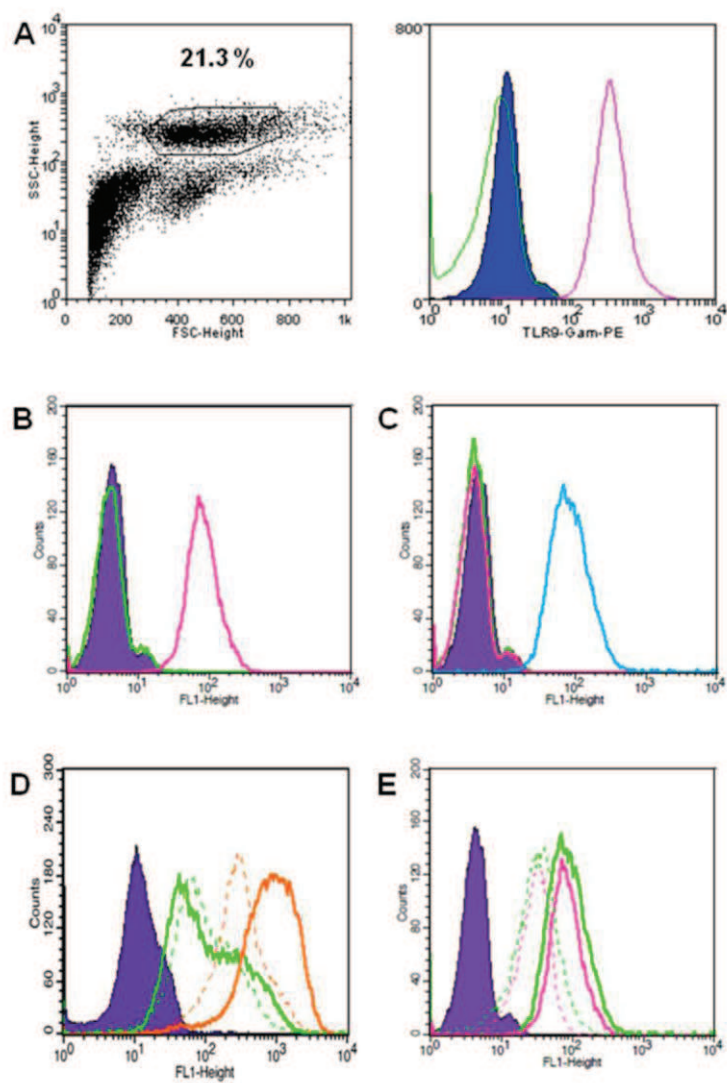
Supporting information Figure 1. The mAb 26C593 is specific for TLR9 and recognizes the N-terminal region of TLR9. Several studies have used this monoclonal antibody and have demonstrated its specificity for TLR9 (e.g., Droemann *et al.*, *Respir. Res.*, 2005, 6:1; Tabeta *et al.*, *Nature Immunol.*, 2006, 7:156), the latter reporting the absence of signal upon staining of macrophages from TLR9-knockout mice. Nevertheless, we have confirmed the antibody specificity by Western blot. Total cell lysates have been prepared on ice from freshly isolated human neutrophils and PBMCs in cold lysis buffer (0.025 M Tris pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.001 M EDTA, 1 % NP-40, 5 % glycerol, supplemented with a protease inhibitor cocktail) for 30 minutes. Samples were then centrifuged at 13,000 g, 4° C for 10 minutes and supernatants were harvested. Protein contents were measured by the Bradford method. Samples (25 µg total proteins) were separated on an 8 % SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Millipore). After saturation with TBS containing 0.05 % Tween 20 and 5 % non-fat milk, membranes were incubated (overnight, 4° C) with either the 5G5 (7.5 µg/ml) or the 26C593 (26C, 6 µg/ml) monoclonal antibodies or the isotype controls. After washing with TBS-Tween, bound antibodies were detected using a goat anti-mouse secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:6,000, ThermoFisher Scientific, 1 hour at room temperature) and revealed with ECL reagents (ThermoFisher Scientific) using an imaging system (ChemiDoc MP, Bio-Rad). After stripping (62.5 mM Tris pH 6.7, 2% SDS, 98.5 mM 2-ME, 30 min at 55° C), membranes were incubated with an anti-actin antibody (1:500, Santa Cruz, loading control) and a donkey anti-rabbit secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:10,000, BioLegend) and revealed as described above. (A) Immunoblotting with 5G5 revealed the expected band at ~ 100 kDa (full-length TLR9) in cell lysates from both PMNs and PBMCs (upper panel) and at similar levels according to the loading control (lower panel). When PBMC lysates were immunoblotted with 26C (right lane) instead of 5G5, the same band was revealed indicating that the 26C mAb does recognize TLR9. (B) 26C recognizes the N-terminal region of TLR9. The active form of TLR9 results from the cleavage

at position 471, generating the active C-terminal fragment (expected size of ~ 62 kDa) and an N-terminal fragment (expected size of ~ 52 kDa). The latter is inactive and should be intracellular and not at the cell surface as it lacks the transmembrane domain. Immunoblotting with 26C revealed the expected fragment of ~ 52 kDa in cell lysates from both PMNs and PBMCs (upper panel). Therefore, TLR9 is processed in both PMNs and PBMCs. (C) Stainings with 5G5 and 26C are specific. Cell lysates from PMNs or PBMCs were immunoblotted with the corresponding isotype controls (iso) instead of mAb. Results are from three independent Western blots using cell lysates from independent donors. In each panel, lanes have been selected from the same experiment and at the same exposure. MW, molecular weight markers.



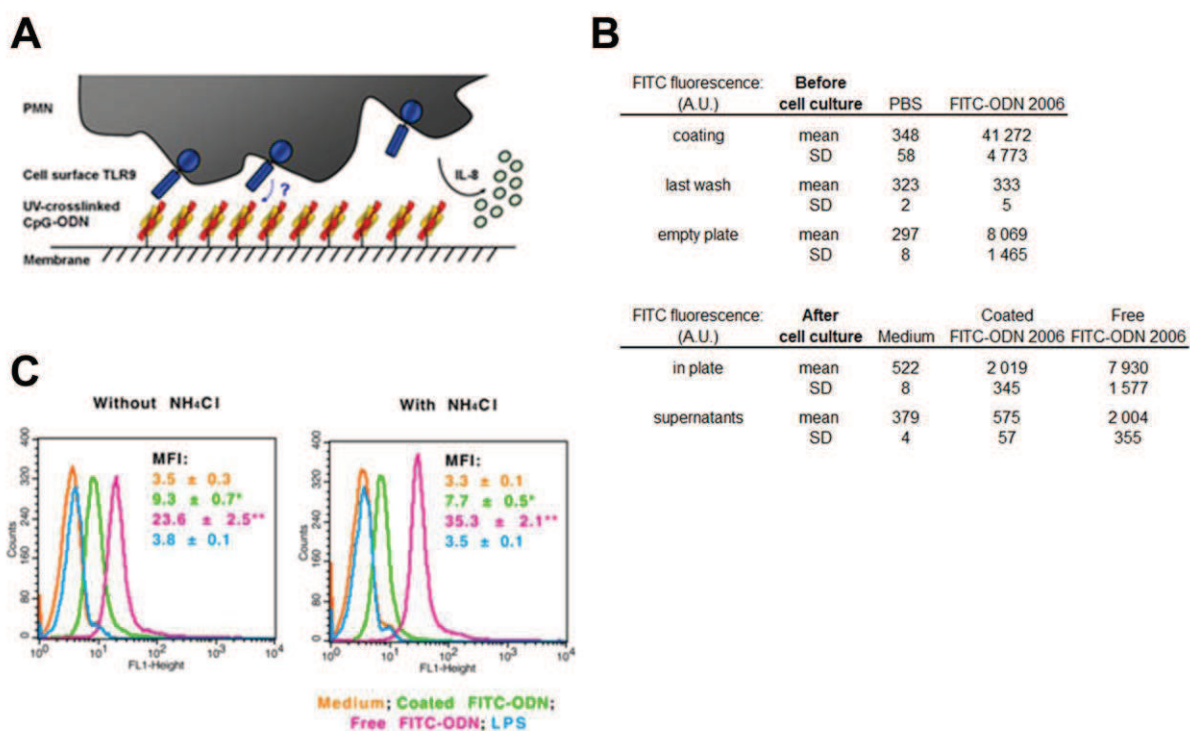
Supporting information Figure 2. TLR9 is present at the cell surface of human PMNs.

(A) Untouched PMNs in whole blood were analyzed ex-vivo upon red blood cell lysis. PMNs were gated and the percentage of PMNs in whole blood is indicated (left panel). Fresh whole blood cells were directly stained at 4° C for cell surface TLR9 (without permeabilization) and analyzed by flow cytometry as described in Figure 1, except that we used a purified anti-TLR9 mAb (5G5) in combination with a GAM-IgG-PE (Jackson ImmunoResearch, right panel). Blue histogram, unstained cells; green histogram, isotype control; pink histogram, TLR9 staining. (B-E) Isolated human PMNs were analyzed by flow cytometry in the presence/absence of trypan blue. (B) The PMN preparation was highly pure according to CD66b staining. Blue histogram, unstained cells; green histogram, isotype control; pink histogram, CD66b staining. (C) PMNs were stained at 4° C for cell surface TLR9. Blue histogram, unstained cells; green histogram, isotype control; pink histogram, anti-FITC antibody alone; open blue histogram, TLR9 staining (anti-TLR9-FITC 5G5 mAb in combination with the anti-FITC-Alexa Fluor 488 antibody). (D) Trypan blue does not inhibit intracellular FITC fluorescence. PMNs were incubated at 37° C with FITC-nucleosomes (green histograms) and an anti-CD66b-FITC (orange histograms) mAb to measure the endocytic activity in the absence (bold histograms) or presence (dashed histograms) of trypan blue. (E) Trypan blue decreases the fluorescence intensity of surface TLR9 (green histograms) and CD66b (pink histograms) staining. PMNs were stained at 4° C for cell surface TLR9 and CD66b in the absence (bold histograms) or presence (dashed histograms) of trypan blue. Data are representative of five independent experiments using PMNs from independent donors.



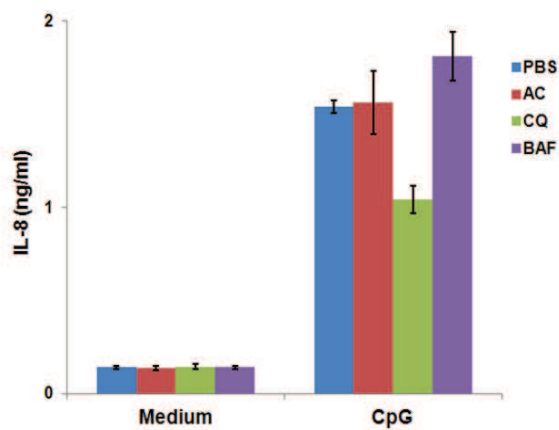
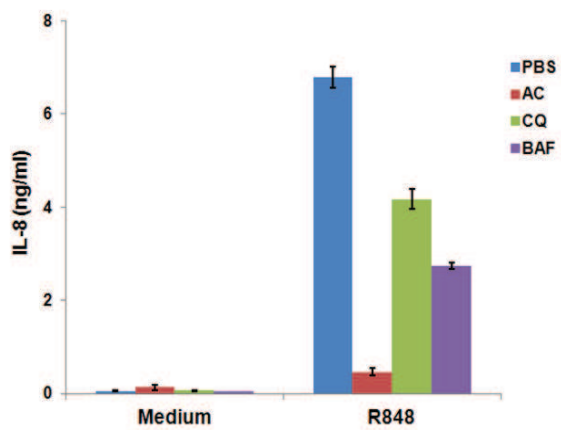
Supporting information Figure 3. TLR9 expressed at the cell surface of neutrophils is functional. (A) Scheme explaining the approach used to specifically trigger the cell surface TLR9. The FITC-CpG-ODN 2006 was cross-linked by UV irradiation into a cell culture plate so that it cannot reach endosomal TLR9. Plates were washed and then incubated with isolated PMNs. Cell activation via the cell surface TLR9 was estimated by measuring IL-8 secretion. (B) UV-treated nitrocellulose plates were incubated with PBS or FITC-CpG-ODN 2006 in PBS (upper panel, before cell culture). The efficiency of the ODN cross-linking was verified by measuring the FITC fluorescence in the plate (coating), in the last wash and in the empty plate after washing using a fluorometer (A.U., arbitrary units). Wells incubated with the FITC-ODN displayed a strong fluorescence, as expected (upper part, “coating”). The plate was washed three times to eliminate unbound CpG-ODNs and the fluorescence in the last wash was measured. No FITC fluorescence was detected in the last wash (upper part), confirming that all free CpG-ODNs were removed. The empty plate was then measured to estimate the amount of CpG-ODNs remaining in the wells (upper part), showing that the ODN was covalently bound to the wells. Human PMNs were then isolated from healthy individuals and cultured in the cross-linked plate (lower panel, after cell culture) for 16 hours. As a control, cells were activated with free (non-cross-linked) FITC-CpG-ODN 2006 or LPS (5 ng/ml). The FITC fluorescence was measured in the plate and in the cell culture supernatants. The cross-linked ODN was still detectable in the cell culture after overnight incubation (lower part, “in plate”) and the fluorescence was much stronger in the presence of the free ODN, indicating that the latter was present at a higher concentration. The fluorescence background was the same in medium and in medium supplemented with LPS (not shown). Only a slight signal was detected in the cell culture supernatants for the cross-linked ODN (lower part), suggesting that only a minority of the ODN is released and that most of it is still nitrocellulose-bound. A stronger signal was detected for the free (not cross-linked) ODN, indicating that part of it was still in solution. Shown is one representative

experiment. (C) Cultured PMNs were also analyzed by flow cytometry for the FITC fluorescence in the absence (left panel) or presence (right panel) of ammonium chloride (NH_4Cl). The impact of ammonium chloride on the FITC fluorescence was estimated by a Student's *t*-test or a Mann-Whitney rank sum test; * $p = 0.029$, ** $p < 0.001$. Representative flow cytometry histograms are shown. MFI are indicated (mean \pm SD of triplicates).



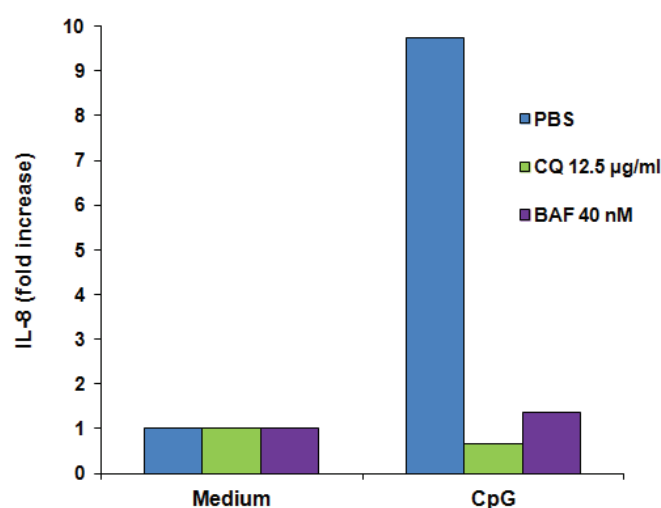
Supporting information Figure 4. Neutrophil surface TLR9 is not inhibited by bafilomycin A1. Isolated PMNs were cultured in medium supplemented with PBS, AC, chloroquine (CQ, 12.5 $\mu\text{g/ml}$, Sigma) or bafilomycin A1 (BAF, 40 nM, Sigma). Cells were stimulated or not with 0.25 $\mu\text{g/ml}$ R848 (left panel) or 2.5 μM free CpG-ODN (right panel) and activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. Data are representative of three independent experiments using PMNs isolated from three independent donors. Shown are means \pm SD of triplicates.

R848-induced IL-8 secretion was prevented by BAF in PMNs, indicating that endosomal acidification was inhibited. Blocking endosomal acidification by BAF did not inhibit activation by CpG-ODN, confirming that TLR9 can signal from the cell surface. In the presence of CQ, both R848-induced and CpG-ODN-induced PMN activation were partially inhibited. However, it is known that CQ not only inhibits endosomal acidification but also inhibits TLR9 by other mechanisms. Indeed, CQ (in contrast to BAF) inhibits the binding of CpG-DNA to TLR9 (Rutz *et al.*, *Eur. J. Immunol*, 2004, 34:2541). Moreover, CQ binds to nucleic acids and masks the TLR-binding epitope, resulting in TLR inhibition independently of the inhibition of endosomal acidification in contrast to BAF (Kuznik *et al.*, *J. Immunol.*, 2011, 186:4794). CQ is therefore not helpful to distinguish endosomal from surface TLR9 activity. Those findings support our results and the presence of an active cell surface TLR9 which may be inhibited by CQ.

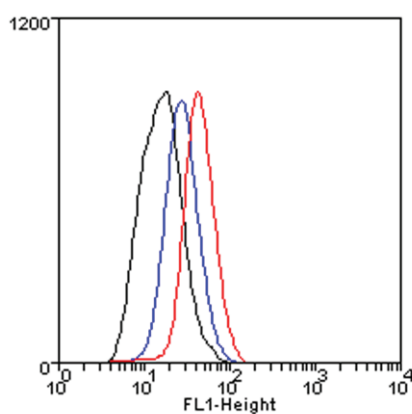


Supporting information Figure 5. Bafilomycin A1 and chloroquine inhibit TLR9 signaling in PBMCs. To verify that bafilomycin A1 (BAF) and chloroquine (CQ) are able to block TLR9 signaling in cells other than PMNs using the same experimental conditions, PBMCs were freshly isolated from the healthy donors depicted in Figure S4 and cultured in the same conditions (in medium supplemented with PBS, CQ (12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or BAF (40 nM)). Cells were stimulated or not with 2.5 μM free CpG-ODN 2006 and activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. Data are representative of three independent experiments using PBMCs isolated from three independent donors. IL-8 induction is depicted as fold increase.

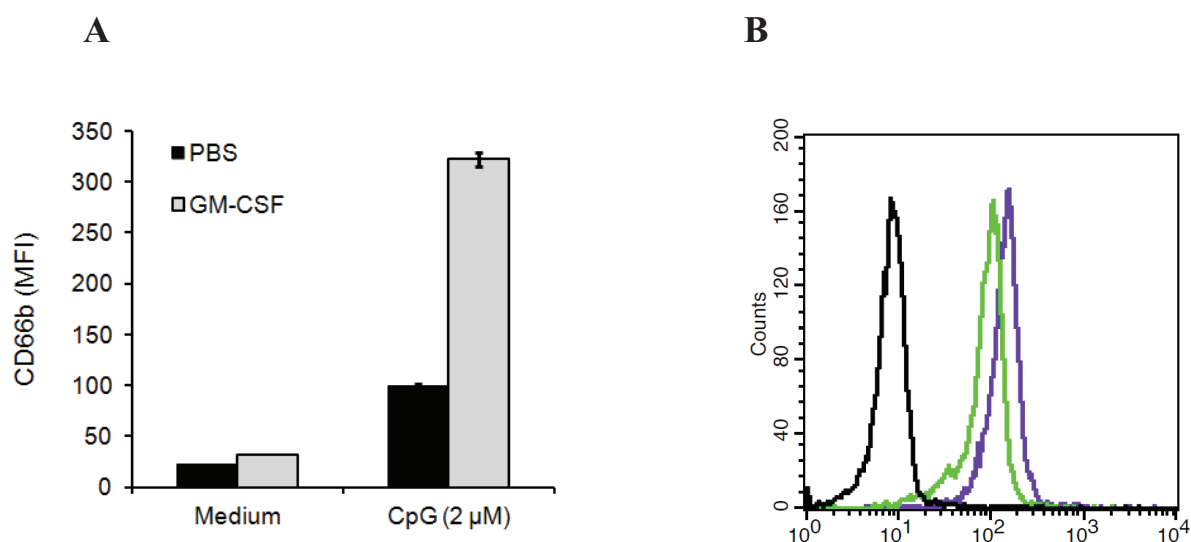
In PBMCs, TLR9 signaling in response to CpG-ODN is completely inhibited by CQ or BAF, whereas it was not inhibited in PMNs (Figure S4), indicating that the CpG-ODN concentration used can be inhibited. TLR9 can therefore signal from the cell surface in PMNs, supporting the recent finding that TLR9 mutations leading to cell surface expression of TLR9 result in fatal inflammation in vivo (Mouchess et al., *Immunity*, 2011, 35:721).



Supporting information Figure 6. Nucleosomes up-regulate also endosomal TLR9 in PMNs. PMNs were isolated from healthy donors and cultured with different concentrations of nucleosomes. After 16 hours, cells were permeabilized, stained for intracellular TLR9 (clone 5G5) and analyzed by flow cytometry as described in Fig. 1. A typical flow cytometry histogram showing the nucleosome-induced up-regulation of intracellular TLR9 in human PMNs is depicted. TLR9 expression was measured in untreated PMNs (black histogram) and PMNs stimulated with 5 or 20 $\mu\text{g/ml}$ nucleosomes (blue and red histograms, respectively).



Supporting information Figure 7. Priming with GM-CSF enhances PMN activation and up-regulates intracellular TLR9. (A) Isolated PMNs were primed (2 hours) by GM-CSF (100 ng/ml, ImmunoTools) or untreated (PBS) and then cultured in medium or free CpG-ODN for 14 hours. Cell activation was estimated by flow cytometry by measuring CD66b expression. (B) PMNs were cultured for 16 hours in medium (green) alone or supplemented with GM-CSF (purple) and intracellular TLR9 expression was estimated by flow cytometry. After permeabilization, PMNs were stained with the 5G5 mAb (green, purple) or the isotype control (black).



II. Annexe 2 :TLR9 independent interferon α production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen.

Dennis Lindau, Julie Mussard*, Armin Rabsteyn*, Matthieu Ribon, Ina Kötter, Annette Igney, Gosse J Adema, Marie-Christophe Boissier, Hans-Georg Rammensee, Patrice Decker.

* contribution égale

Ann Rheum Dis 2013, 73(12):2199-207

Production d'interféron alpha par les neutrophiles en NETose, indépendamment du TLR9, en réponse à la chromatine, un auto-antigène majeur du lupus.

L'interféron alpha (IFN α) est une cytokine clé dans la pathogenèse du lupus. Cette cytokine est décrite comme majoritairement produite par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) activées. La chromatine est, elle, l'auto-antigène majeur du lupus. Sous forme de complexe immun, cette chromatine active les DC via le TLR9. Cependant, les DC représentent moins de 1% des leucocytes circulants du sang et la déplétion des pDC n'entraîne pas une disparition de l'IFN α . Il y aurait donc d'autres sources d'IFN α .

Notre hypothèse était que les neutrophiles, la population de leucocytes la plus représentée dans le sang, étaient capables de produire cet IFN α .

Avec ces travaux, nous avons montré que les neutrophiles (de donneurs sains, de patients PR et de patients lupiques) activés étaient effectivement capables de produire de l'IFN α . Nous avons décrit plusieurs stimuli capables d'induire cette sécrétion d'IFN α et en particulier la chromatine libre sans nécessité de complexes immuns.

La chromatine induit l'activation et la NETose des PNN et la sécrétion d'IFN α indépendamment du TLR9. Les agonistes du TLR9 sont aussi capables d'induire l'activation des PNN et la sécrétion d'IFN α et ce, de façon dépendante du TLR9. Il existe donc plusieurs mécanismes qui conduisent à la sécrétion d'IFN α par les neutrophiles.

Les neutrophiles étant 100 fois plus nombreux que les pDC dans le sang, ils représentent donc une source non négligeable d'IFN α .



TLR9 independent interferon α production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen

Dennis Lindau, Julie Mussard, Armin Rabsteyn, et al.

Ann Rheum Dis published online September 7, 2013
doi: 10.1136/annrheumdis-2012-203041

Updated information and services can be found at:

<http://ard.bmj.com/content/early/2013/09/07/annrheumdis-2012-203041.full.html>

These include:

Data Supplement

"Supplementary Data"

<http://ard.bmj.com/content/suppl/2013/09/07/annrheumdis-2012-203041.DC1.html>

References

This article cites 45 articles, 24 of which can be accessed free at:

<http://ard.bmj.com/content/early/2013/09/07/annrheumdis-2012-203041.full.html#ref-list-1>

P<P

Published online September 7, 2013 in advance of the print journal.

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Advance online articles have been peer reviewed, accepted for publication, edited and typeset, but have not yet appeared in the paper journal. Advance online articles are citable and establish publication priority; they are indexed by PubMed from initial publication. Citations to Advance online articles must include the digital object identifier (DOIs) and date of initial publication.

To request permissions go to:

<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:

<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:

<http://group.bmj.com/subscribe/>

EXTENDED REPORT

TLR9 independent interferon α production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen

Dennis Lindau,^{1,2} Julie Mussard,³ Armin Rabsteyn,¹ Matthieu Ribon,³ Ina Kötter,⁴ Annette Igney,⁴ Gosse J Adema,² Marie-Christophe Boissier,^{3,5} Hans-Georg Rammensee,¹ Patrice Decker^{1,3}

Handling editor Tore K Kvien

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-203041>).

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to

Dr P Decker, University of Paris 13, Sorbonne Paris Cité, EA4222, Li2P, 74 Rue Marcel Cachin, Bobigny 93017, France; patrice.decker@univ-paris13.fr

JM and AR contributed equally to this paper.

Received 27 November 2012
Revised 2 June 2013
Accepted 18 August 2013
Published Online First
7 September 2013

ABSTRACT

Objectives Interferon (IFN) α is a key immunoregulatory cytokine secreted by activated plasmacytoid dendritic cells (PDC) that constitute less than 1% of leucocytes. IFN α plays an important role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). Nevertheless, the natural IFN α inducers in SLE as well as the different IFN α secreting cell types are only partially characterised.

Methods Chromatin was purified from calf thymus. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), neutrophils and mouse bone marrow neutrophils were purified and cultured with different stimuli. IFN α production was estimated by flow cytometry, ELISA and a bioassay, and gene expression by quantitative real time PCR. Neutrophil activation and NETosis were analysed by flow cytometry, ELISA and confocal microscopy.

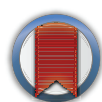
Results Neutrophils produced a bioactive IFN α on stimulation with purified chromatin. IFN α secretion was observed with steady state neutrophils purified from 56 independent healthy individuals and autoimmune patients in response to free chromatin and not chromatin containing immune complexes. Chromatin induced IFN α secretion occurred independently of Toll-like receptor 9 (TLR9). Neutrophil priming by granulocyte-colony stimulating factor, granulocyte macrophage-colony stimulating factor or IFN α was not necessary but PBMC sustained IFN α secretion by neutrophils. PDC were 27 times more efficient than neutrophils but blood neutrophils were 100 times more frequent than PDC. Finally, neutrophil activation by chromatin was associated with NETosis and DNA sensor upregulation.

Conclusions Neutrophils have the capability of producing IFN α on selective triggering, and we identified a natural lupus stimulus involved, unveiling a new mechanism involved in SLE. Neutrophils represent another important source of IFN α and important targets for future therapies aimed at influencing IFN α levels.

INTRODUCTION

Chromatin is a key lupus autoantigen¹ organised in nucleosomes (repetitive packing units² with a core particle composed of 146 bp dsDNA and a histone octamer³). Apoptotic cells are sensed by peroxisome proliferator activated receptor delta⁴ and a defective clearance, as observed in lupus patients,⁵ leads to an excess of circulating chromatin and anti-nuclear autoimmunity. Interferon (IFN) α plays an

important role in the pathogenesis of several autoimmune diseases.⁶ Systemic lupus erythematosus (SLE) is an inflammatory autoimmune disease of unknown aetiology in which elevated serum IFN α concentrations⁷ contribute to the break of peripheral tolerance by inducing differentiation/activation of myeloid dendritic cells⁸ and natural T regulatory cell dysfunction.⁹ The resulting autoimmune response is mainly directed against chromatin^{10 11} which is detected at higher concentrations in the plasma of SLE patients.¹² IFN α is secreted by activated plasmacytoid dendritic cells (PDC¹³) and is involved in SLE pathogenesis.¹⁴ Particularly, PDC activated by DNA/RNA containing immune complexes are believed to be the main producers of IFN α in SLE. This activation involves natural killer cells,¹⁵ is triggered by toll-like receptor (TLR) 9 or TLR7^{16 17} and hampers glucocorticoid activity in SLE.¹⁸ Moreover, serum IFN α activity is associated with autoantibody production.¹⁹ However, PDC represent a minor cell population accounting for less than 1% of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and blood PDC numbers are reduced in SLE patients.⁸ Moreover, PDC depletion experiments suggest that other cells produce IFN α in SLE,⁸ and type I IFN (IFNI) production occurs independently of Fc γ receptors in experimental mouse lupus.²⁰ On the other hand, neutrophils (polymorphonuclear leucocytes (PMN)) represent more than 50% of total blood leucocytes and thus are about 100 times more abundant than PDC. Only recently, a subset of proinflammatory PMN, named low density granulocytes, has been shown to produce IFN α in SLE patients but the natural stimulus has not been characterised.²¹ IFN α production was however not observed or was much lower on activation of steady state PMN. We therefore sought to determine the cellular source of IFN α and the natural lupus stimuli, focusing on PMN and chromatin. Granulocytes are indeed activated in SLE,²² and PMN form immunogenic neutrophil extracellular traps (NET) in SLE on activation with immune complexes.^{23 24} This mode of innate immunity,²⁵ named NETosis, indirectly leads to IFN α production via PDC activation. Therefore, PMN are usually not considered as IFN α producing cells. Moreover, IFN α induction by free chromatin would represent an early step, before antichromatin autoantibodies are produced.



CrossMark

To cite: Lindau D, Mussard J, Rabsteyn A, et al. *Ann Rheum Dis* 2014;**73**:2199–2207.

Basic and translational research

Our results indicate that PMN represent important targets for future therapies aimed at lowering IFN α levels in SLE.

MATERIALS AND METHODS

Chromatin purification

Mononucleosomes (HMGB1-free²⁶) were purified from calf thymus by ultracentrifugation onto sucrose gradients.^{27 28} In this paper, chromatin refers to mononucleosomes (see online supplementary text).

Cell isolation and culture

Human (non-inflammatory) PMN and PBMC were freshly isolated by classic density centrifugation through dextran or Ficoll. Mouse PMN were enriched by positive selection for Ly-6G⁺ cells from the bone marrow of adult wild-type (WT) and TLR9 knockout (KO, H Wagner, Munich, Germany, described by Hemmi and colleagues²⁹) C57BL/6 mice (n=12) using magnetic beads (Miltenyi Biotec).

PMN were cultured in complete medium supplemented or not with monensin (BD Biosciences) and left in medium alone or stimulated, in the absence/presence of polymyxin B or cytokines. After 5 or 15 h, cell culture supernatants were harvested and cells were analysed by flow cytometry (see online supplementary text).

Flow cytometry

PMN were stained with specific monoclonal antibodies or the corresponding isotype controls (BD Biosciences, eBioscience, SouthernBiotech). For intracellular IFN α staining, PMN were first stained for surface markers, fixed and permeabilised with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) and incubated with anti-IFN α -PE (BD Biosciences) in saponin buffer (0.1%, Sigma) (see online supplementary text).

cDNA synthesis and quantitative real time PCR analysis

Total RNA was isolated and reverse transcribed into cDNA. mRNA levels were normalised to the low abundance housekeeping gene porphobilinogen deaminase mRNA levels (see online supplementary text).

NETosis

Induction of NET was estimated by confocal microscopy according to Brinkmann and colleagues,²⁵ with some modifications (see online supplementary text).

ELISA and type I IFN cell reporter system

See online supplementary text.

Statistical analysis

See online supplementary text.

RESULTS

PMN are important producers of IFN α in peripheral blood in response to chromatin

To identify new IFN α producing cells, we first analysed IFN α production by human leucocytes of healthy donors (HD). Cells were isolated by dextran centrifugation and the two layers containing either PMN (gate G1) or PBMC (gate G2, see online supplementary figure S1A–C) were harvested and pooled to obtain total peripheral blood leucocytes (PBL) depleted from platelets and erythrocytes. Cells were not tested *ex vivo* for intracellular IFN α , which would reflect *in vivo* PMN activation by any (unknown) stimulus, but only *in vitro* after culture as the aim was to prove that PMN produce IFN α on stimulation and

to identify the stimulus involved. Non-stimulated cells did not produce IFN α (figure 1A). In contrast, chromatin activated PMN (upper panel) strongly produced IFN α whereas low production was observed with PDC (middle panel). It should be noted that free chromatin and not chromatin containing immune complexes was used. Interestingly, even some chromatin activated monocytes (lower panel) did produce IFN α whereas production by lymphocytes was negligible (middle panel, CD123 negative cells in the lymphocyte gate). As a control, we excluded chromatin preparations containing endotoxins (see online supplementary figure S1D). We then compared the ability of the different cell populations to produce IFN α in response to several stimuli. In total PBL, we showed that the main cells producing IFN α were chromatin activated PMN as well as PMN activated by oligonucleotides containing unmethylated CpG sequences (CpG-ODN, a TLR9 agonist, figure 1B). CpG-ODN is however not a natural lupus stimulus in contrast with chromatin. Thus chromatin activated PMN were also important IFN α producers in addition to PDC. The latter are known as good producers in response to other lupus stimuli, especially immune complexes. When analysing each cell population independently, we verified that CpG activated PDC produce IFN α (see online supplementary figure S2).

PMN isolated from HD and SLE patients produce IFN α on activation with chromatin

We next confirmed the above results with isolated PMN instead of PBL. Moreover, we compared PMN isolated from HD and SLE patients. The purity of the cell population is shown in the online supplementary figure S1E. The complete phenotype is also shown in the online supplementary figure S1A–C (gate G1, upper panels). Both normal (figure 2A) and lupus (see online supplementary figure S3A) PMN produced IFN α in response to nucleosomes or CpG-ODN but not lipopolysaccharide (LPS), as shown by flow cytometry. IFN α production by PMN occurred in a nucleosome concentration dependent manner (figure 2B and see online supplementary figure S3B). Cell activation was confirmed by measuring interleukin 8 (CXCL8) secretion by ELISA (figure 2C and see online supplementary figure S3C). In addition to nucleosomes and CpG-ODN, LPS also induced interleukin 8 secretion in normal and lupus PMN, indicating that the lack of IFN α induction by LPS is not due to inefficient cell activation. More importantly, IFN α secretion by activated PMN was confirmed by ELISA (figure 2D and see online supplementary figure S3D). Nucleosomes induced IFN α secretion in normal and lupus PMN. No secretion was observed in the presence of LPS whereas CpG-ODN induced lower IFN α release than nucleosomes in both normal and lupus PMN.

To support our findings, IFN α induction was analysed in isolated PMN at the mRNA level. Chromatin strongly upregulated IFN α and IFN β expression in a dose dependent manner (see online supplementary figure S4A, B). Moreover, we showed that IFN α produced by PMN in response to chromatin was bioactive using a type I IFN cell reporter system (see online supplementary figure S4C).

We then screened HD and SLE patients (figure 3A, black bars) for chromatin induced IFN α production by isolated PMN. The response and intensity were similar in both groups but showed interindividual variability, indicating the existence of good responders and non-responders among HD and SLE patients. PMN did not produce IFN α in the absence of chromatin. Importantly, a similar proportion of donors with IFN α positive PMN on activation with chromatin was observed in HD (8/22, 36.4%) and SLE patients (4/12, 33.3%, $p=1.0$) with no

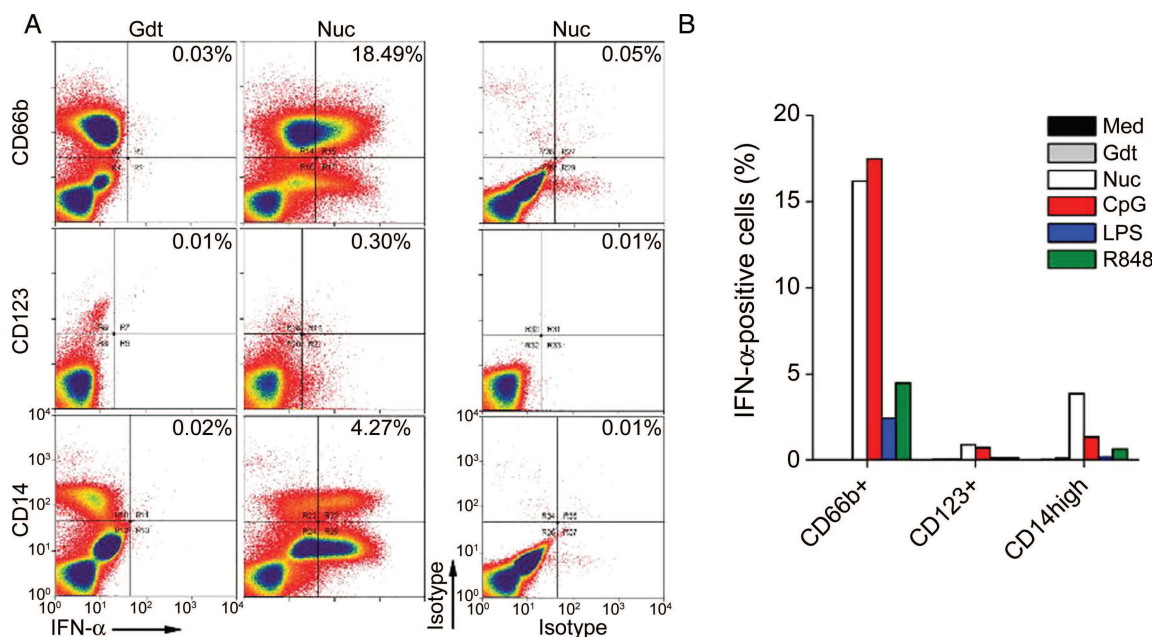


Figure 1 Chromatin activated polymorphonuclear leucocytes (PMN) are key leucocytes producing interferon α (IFN α). (A) Freshly isolated human peripheral blood leucocytes (PBL) were cultured with purified nucleosomes (Nuc 20 μ g/mL) or purification buffer (Gdt) in the presence of monensin. After 15 h, cells were harvested and stained for cell surface markers and intracellular IFN α on fixation/permeabilisation using specific monoclonal antibodies or the corresponding isotype controls (right panels). Cells were analysed by flow cytometry. The percentages of IFN α positive PMN (upper panels, CD66b⁺ cells), plasmacytoid dendritic cells (PDC) (middle panels, CD123⁺ cells) or monocytes (lower panels, CD14^{high} cells) are indicated. Percentages refer to PBL except for the middle panels where a lymphocyte gate was used to better distinguish PDC. Horizontal and vertical lines were set according to staining with isotype controls. (B) PBL were cultured in medium only (Med) or supplemented with the purification buffer, nucleosomes, the CpG-ODN 2006 (CpG), lipopolysaccharide (LPS), a toll-like receptor 4 (TLR4) ligand or R848 (a TLR7/8 ligand) and analysed as in (A). Results show the percentages of IFN α positive PMN (CD66b⁺), PDC (CD123⁺) and monocytes (CD14^{high}) in total PBL. The results show one representative experiment from five independent experiments using normal and systemic lupus erythematosus PBL and two different nucleosome preparations. The colour version of this figure is available online.

significant difference between the mean percentages of IFN α positive PMN. Non-inflammatory PMN from normal and SLE donors have therefore the ability to produce IFN α in response to chromatin.

As other blood components may influence IFN α production by PMN, we also analysed PMN in whole blood. For example, platelets can mediate proinflammatory reactions,^{30–31} especially in SLE.³² Therefore, we analysed whole blood from two HD for whom isolated PMN responded moderately to chromatin (see online supplementary text for definition, and see figure 3A, green bars, donor 21 being tested in two independent experiments) as well as five additional HD and SLE patients (blue bars). Whole blood was cultured in the presence/absence of nucleosomes. IFN α production was estimated by flow cytometry gating on PMN or PDC. Non-stimulated cells did not produce IFN α . In contrast, in all whole blood cultures from either HD or SLE patients (green and blue bars), nucleosomes stimulated PMN to produce IFN α (eight out of eight positive cultures, with 55–99% of the chromatin activated PMN producing IFN α in lupus cultures). The comparison with all cultures with isolated PMN (12 out of 34 positive cultures) indicates that PMN get help from other blood cells to efficiently produce IFN α ($p=0.0022$, excluding the duplicate of HD21). In particular, the percentage of IFN α producing PMN was increased in whole blood compared with isolated PMN (green bars compared with corresponding black bars). This effect was reproducible as whole blood from donor 21 was tested on two different dates.

In total, IFN α positive PMN were detected in 41.7% of HD (10/24) and 46.7% of SLE patients (7/15) by flow cytometry on activation with nucleosomes (figure 3A, $p=1.0$, normal vs SLE donors, with no significant difference between the mean

percentages), excluding an intrinsic difference between normal and lupus PMN in IFN α production on exposure to chromatin. Accordingly, no correlation was observed between IFN α production, clinical disease severity of patients and therapy. To support this hypothesis, we also tested three additional patients suffering from another inflammatory autoimmune disease but not characterised by the presence of circulating nucleosomes—namely, rheumatoid arthritis. PMN isolated from these patients produced IFN α on stimulation with chromatin (see online supplementary figure S4D) and to the same extent as HD (see online supplementary figure S4C). The bioactive type I IFN was already detectable 5 h after stimulation. One of the key events is thus the presence of increased concentrations of circulating nucleosomes, a situation met particularly in vivo in SLE patients. IFN α producing PMN were observed in patients positive or negative for antichromatin autoantibodies, suggesting that activation was not mediated by chromatin containing immune complexes. The latter was confirmed by comparing IFN α induction in PMN by chromatin and heat aggregated IgG, which mimic immune complexes. In contrast with aggregated IgG, nucleosome induced IFN α was completely abolished on boiling (see online supplementary figure S5), indicating that immune complex formation is not required.

In contrast, in whole blood cultures derived from the three lupus patients, less than 17% (0% for patient No 14) of the PDC were IFN α positive in response to chromatin (figure 3A, red bars) and the percentages would be even lower if normalised to the amount of total leucocytes, as shown in figure 1B. Therefore, we compared IFN α production by isolated human blood PMN and PDC. As expected, PDC were much more efficient than PMN in producing IFN α at the single cell level (see

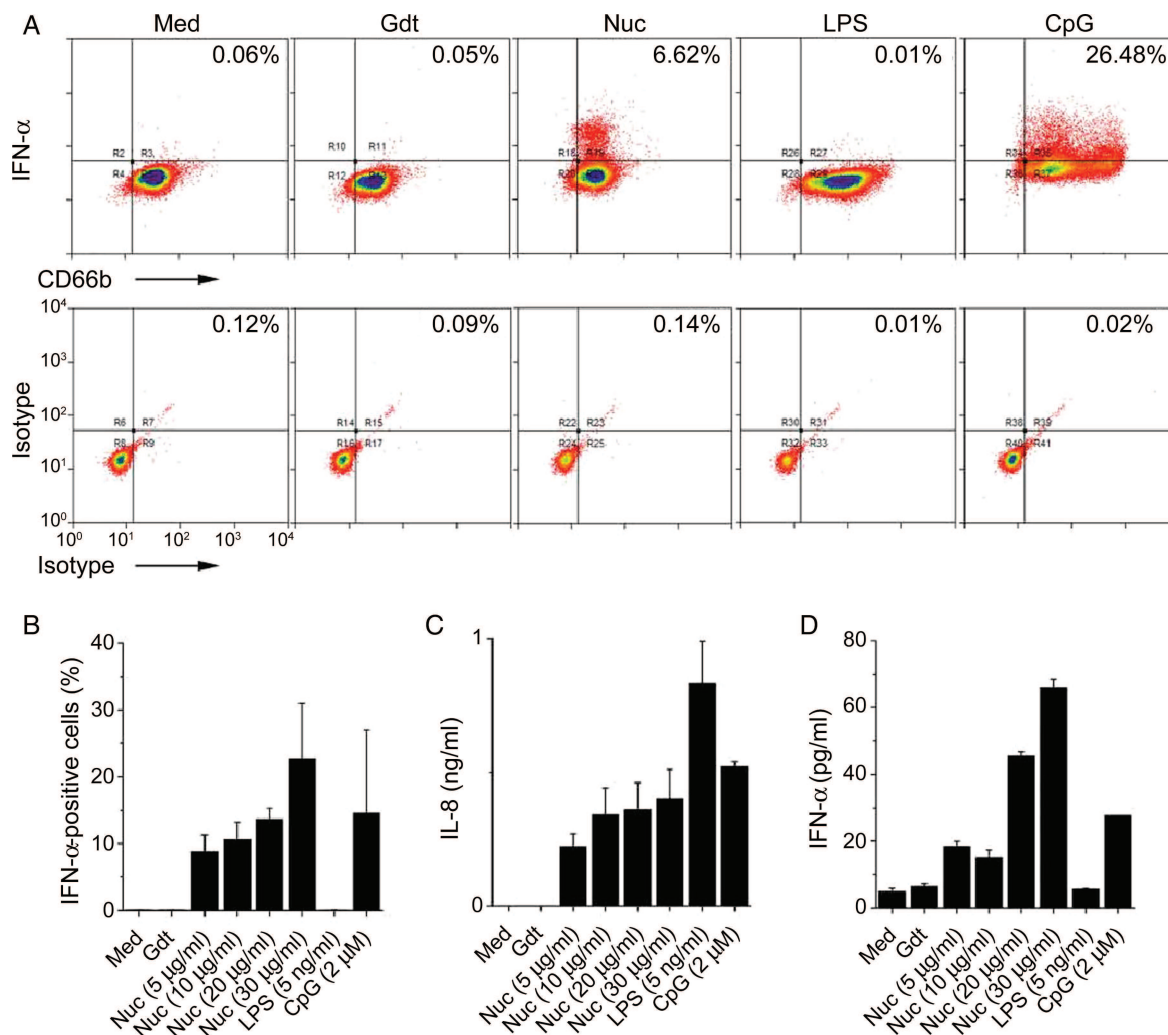


Figure 2 Isolated normal polymorphonuclear leucocytes (PMN) produce interferon α (IFN α) in response to chromatin or toll-like receptor 9 agonists. (A) PMN were freshly isolated from healthy donors and cultured with different stimuli (Nuc 5 μ g/ml). Cells were analysed by flow cytometry as in figure 1A. The upper and lower panels show cells double stained with monoclonal antibodies specific for IFN α and CD66b or the corresponding isotype controls, respectively. Numbers indicate the percentages of IFN α positive PMN (CD66b⁺ cells). (B) Results from (A) (upper panel) are summarised and show several nucleosome concentrations. (C) The extent of PMN activation was estimated by measuring interleukin 8 (IL-8) secretion by ELISA. (D) IFN α secretion was confirmed by measuring the IFN α concentration in cell culture supernatants by ELISA. In (B–D), results are the mean of triplicates and SDs are indicated. Results show a representative healthy donor from 12 independent experiments using six different nucleosome preparations (except for (D), four independent experiments). See figure 1 for other abbreviations. The colour version of this figure is available online.

online supplementary figure S6). As a mean, CpG-ODN activated PDC produced 27.2 times more IFN α than CpG-ODN activated PMN. However, blood PMN were about 100 times more frequent than PDC (see online supplementary figure S7). Therefore, the lower reactivity of PMN was largely compensated at the whole blood level.

In total, 56 independent blood donors were tested for chromatin induced IFN α production by PMN using different methods.

G-CSF, GM-CSF or IFN α do not act synergistically with chromatin on IFN α induction

To determine whether PMN priming is required, we next analysed the influence of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) on IFN α production by PMN in low responders. In such donors, non-activated PMN were IFN α negative whereas

less than 20% of PMN produced IFN α in response to chromatin or CpG-ODN (figure 3B, orange bars). G-CSF and GM-CSF slightly increased the spontaneous release of the cytokine and usually had an additive effect on chromatin induced IFN α production by PMN. Therefore, PMN priming is not required but only enhances in some donors IFN α production in response to chromatin. In contrast, G-CSF and GM-CSF often acted synergistically with CpG-ODN. One explanation could be the known upregulation of TLR9 in PMN by GM-CSF and G-CSF which would facilitate CpG-ODN mediated PMN activation. Likewise, IFN α production was only slightly enhanced when PMN were activated by nucleosomes in the presence of IFN α (see online supplementary figure S8).

PBMC sustain IFN α production by PMN in low responders

To determine whether in some cases PMN need help from other leucocytes to produce IFN α on activation with chromatin,

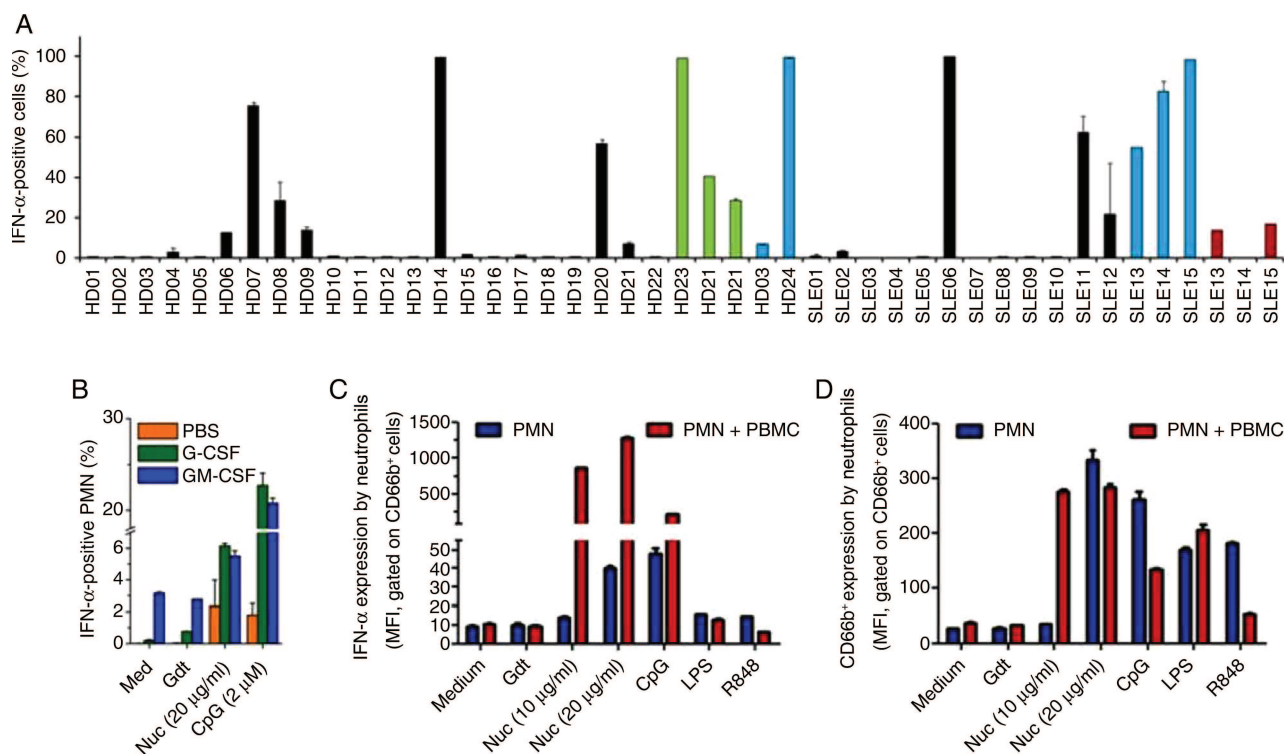


Figure 3 Independent blood donors were tested for chromatin induced interferon α (IFN α) production in polymorphonuclear leucocytes (PMN). (A) Isolated PMN (black bars) as well as PMN in whole blood (gated on CD66b⁺ cells, green and blue bars) from healthy donors (HD) and systemic lupus erythematosus (SLE) patients were activated with 20 μ g/mL of nucleosomes and the percentage of IFN α producing PMN was estimated by flow cytometry, as in figure 2A. Each bar represents a donor tested in triplicate. Green bars (whole blood) represent donors for whom isolated PMN responded moderately to chromatin (donor HD21 was tested twice in independent experiments). Blue bars represent additional donors tested only in whole blood cultures. As a comparison, the percentage of IFN α producing plasmacytoid dendritic cells (PDC) in whole blood cultures was determined in three SLE patients in response to nucleosomes (red bars). Results regarding PDC are not normalised to the total cell number but are percentages of PDC. (B) Isolated normal PMN were preincubated in medium supplemented with phosphate buffered saline (PBS), granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) or granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and then activated with different stimuli. PMN were analysed as in (A). (C, D) Normal PMN were cultured alone or cocultured with peripheral blood mononuclear cells in the presence of different stimuli and the extent of IFN α production (C) and CD66b expression (D) by PMN was estimated by flow cytometry. Non-activated PMN did not produce IFN α . Results are the mean of triplicates and SDs are shown. In (A), results are from 22 independent experiments using 12 different nucleosome preparations. In B–D, representative results are from three independent experiments. MFI, mean fluorescence intensity. See figure 1 for other abbreviations. The colour version of this figure is available online.

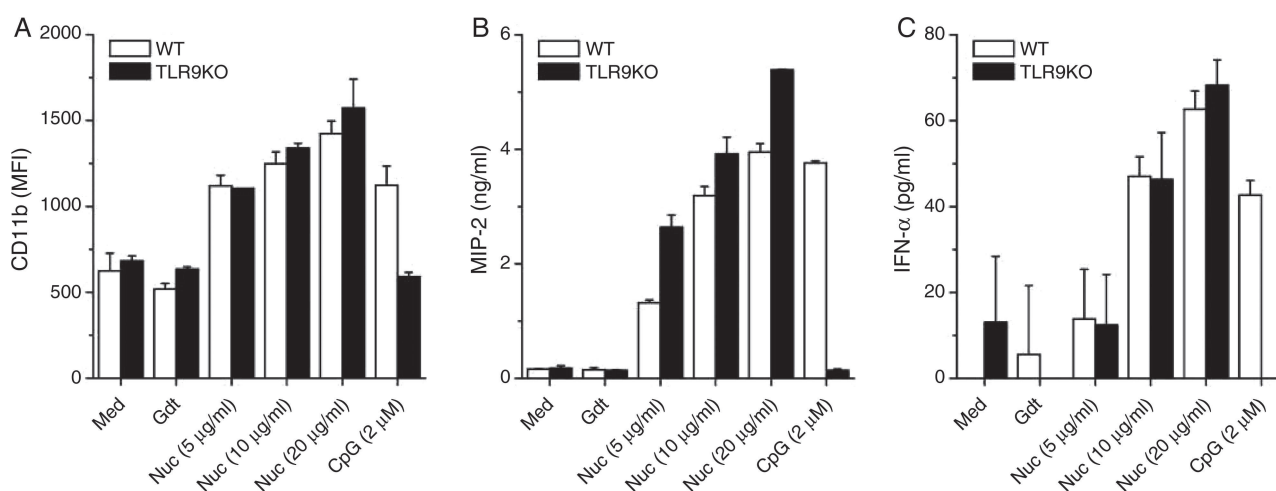


Figure 4 Chromatin triggered interferon α (IFN α) production occurs independently of toll-like receptor 9 (TLR9) in polymorphonuclear leucocytes (PMN). (A–C) PMN were purified from the bone marrow of wild-type and TLR9 knockout (KO) mice and cultured with different stimuli. Cell activation was estimated by measuring CD11b expression on Ly-6G^{high} cells by flow cytometry (A) and by measuring macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) secretion by ELISA (B). IFN α secretion was estimated by ELISA (C). Two mice were used per group (PMN were pooled) and per experiment. The experiment was performed three times ($n = 12$ mice). SDs are shown. The CpG-ODN 1826 was used. See figure 1 for other abbreviations. The colour version of this figure is available online.

Basic and translational research

we compared isolated PMN with cocultures of PMN and autologous PBMC (1:1 ratio, defined as PBL). To estimate the extent of cytokine production, we measured by flow cytometry IFN α mean fluorescence intensity, gating on PMN. In all cultures, the amount of IFN α positive PMN in the absence of stimulation was below 1% of the total PMN. For some donors, nucleosome induced IFN α production was strongly increased in PMN in the presence of PBMC. In the data presented (figure 3C), PMN in the PBL coculture were strongly activated by nucleosomes or CpG-ODN and produced larger amounts of IFN α , particularly in response to nucleosomes, than isolated PMN, as demonstrated by the large IFN α mean fluorescence intensity (61-fold increase with 10 μ g/mL nucleosomes in cocultures), indicating that PBMC strengthen IFN α production by classic PMN in low responders (PMN non-responders remained non-responders when tested in cocultures with PBMC). This cellular cooperation was also observed when we estimated cell activation by measuring CD66b expression by PMN (figure 3D) but was limited to low nucleosome concentrations and was not detected with CpG-ODN.

TLR9 is not required in PMN for chromatin induced IFN α secretion

The role of TLR9 in SLE development is still unclear. TLR9 is activated by unmethylated CpG motifs present in pathogen derived DNA.²⁹ Nevertheless, TLR9 is able to recognise mammalian DNA and even self DNA when DNA has access to TLR9.³³ As nucleosomes are composed of DNA and because the impact of TLR9 in IFN α secretion by PMN has never been investigated, we analysed the role of TLR9 in nucleosome induced IFN α production. Double stranded DNA has been reported to induce IFN α independently of all TLR³⁴ but the pathway triggered by nucleosomes, in which DNA is protected by histones, is unknown. We first verified that mouse PMN do produce and secrete IFN α on activation with different stimuli (detailed in online supplementary figure S9). Then we compared PMN purified from WT and TLR9-KO mice. The phenotype and purity are depicted in the online supplementary figure S10. Nucleosomes induced clear activation of both WT and TLR9-KO PMN, as estimated by CD11b upregulation (figure 4A) and macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) secretion (figure 4B). As expected, CpG-ODN only activated WT PMN. Importantly, nucleosomes induced IFN α secretion by mouse PMN (figure 4C) and independently of TLR9 as it was observed in WT and TLR9-KO PMN. In contrast, CpG-ODN only induced IFN α secretion by WT PMN. TLR9 independence was confirmed with human PMN (see online supplementary figure S11).

Chromatin induced PMN activation is associated with DNA sensor upregulation and leads to NETosis

As some DNA sensors have been suggested to contribute to lupus pathogenesis,^{35–37} we next analysed the consequences of chromatin mediated PMN activation on the gene expression of several sensors. Indeed, some cytoplasmic DNA sensors activate IFN α responses. Interestingly, although chromatin activated PMN in a TLR9 independent manner, chromatin strongly upregulated TLR9 as well as AIM2 (absent in melanoma 2), STING (stimulator of IFN genes) and DAI (DNA-dependent activator of IFN regulatory factors, at a lower extent) at the mRNA level (figure 5A–D) whereas RNA sensors melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA-5) and retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) were not upregulated (see online supplementary figure S12).

Finally, NETosis has been shown to trigger IFN α production by PDC (summarised in online supplementary figure S13). Enhanced NETosis may therefore amplify the PMN response and may sustain IFN α production. We thus investigated whether free chromatin also directly induced NETosis. PMN form large NET in response to chromatin compared with non-activated PMN (figure 5E), as demonstrated by the release of the typical chromatin fibres on staining of both DNA and histones. As a control, chromatin used as a stimulus was not stained in the absence of PMN, proving that the NET detected originated from activated PMN.

DISCUSSION

Circulating chromatin induces IFN α production in non-inflammatory PMN, the major PMN population, in both HD and autoimmune patients and in a TLR9 independent manner. IFN α production has been demonstrated at the mRNA and protein levels and as a secreted and bioactive form. Although both normal and lupus PMN are potentially able to produce IFN α in response to chromatin *in vitro*, IFN α production by PMN may only be triggered *in vivo* in patients when concentrations of circulating chromatin are elevated. Actually, plasmas from SLE patients (and not from HD) activate PMN in a nucleosome dependent manner.³⁸ Importantly, IFN α plays a pivotal role in SLE development, as demonstrated by the IFN inducible gene expression signature³⁹ which characterises a clinical subset of SLE patients with more severe disease. This is the first report demonstrating that steady state PMN secrete IFN α and identifying concurrently a major natural lupus stimulus involved, suggesting an initiating role for PMN in SLE pathogenesis. To date, only chromatin containing immune complexes, and not free chromatin (even associated with HMGB1), have been reported to induce IFN α secretion in PDC⁴⁰ and this information is not available for PMN. PMN have been reported to favour IFN α production^{23 24} but, in contrast with the present data, this mechanism requires autoantibodies and priming by IFN α and therefore occurs after the break of tolerance. Another difference is the involvement of TLR9 in the latter two studies, leading to IFN α production by PDC and not PMN. Nevertheless, a common feature is the formation of NET by activated PMN, which is associated with lupus development on inefficient clearance.⁴¹ Although NETosis is not the IFN inducing factor in our system, it may be involved in a positive feedback loop. Chromatin activated PMN are potentially important IFN α producers in SLE patients and may secrete IFN α early during the disease, before immune complexes are produced (as detailed in online supplementary figure S13), bypassing the classic mechanism requiring the induction of autoantibodies and the formation of immune complexes activating PDC. This pathway does not exclude the known mechanism involving PDC but suggests that PMN have not been considered as another important source of IFN α in SLE. Even if PMN secrete lower amounts of IFN α than PDC at the single cell level, the total amount of IFN α released by PMN should be compensated by the 100-fold excess of circulating PMN compared with PDC. Further studies are required to characterise non-responders (to determine for example if the absence of IFN α production depends on polymorphisms in the nucleosome receptor gene, once identified, or whether additional factors influence IFN α production) and to identify the pathway triggered.

To our knowledge, this is also the first study analysing the role of TLR9 in IFN α secretion by PMN. Several new DNA receptors have been reported but the nucleosome sensor has not

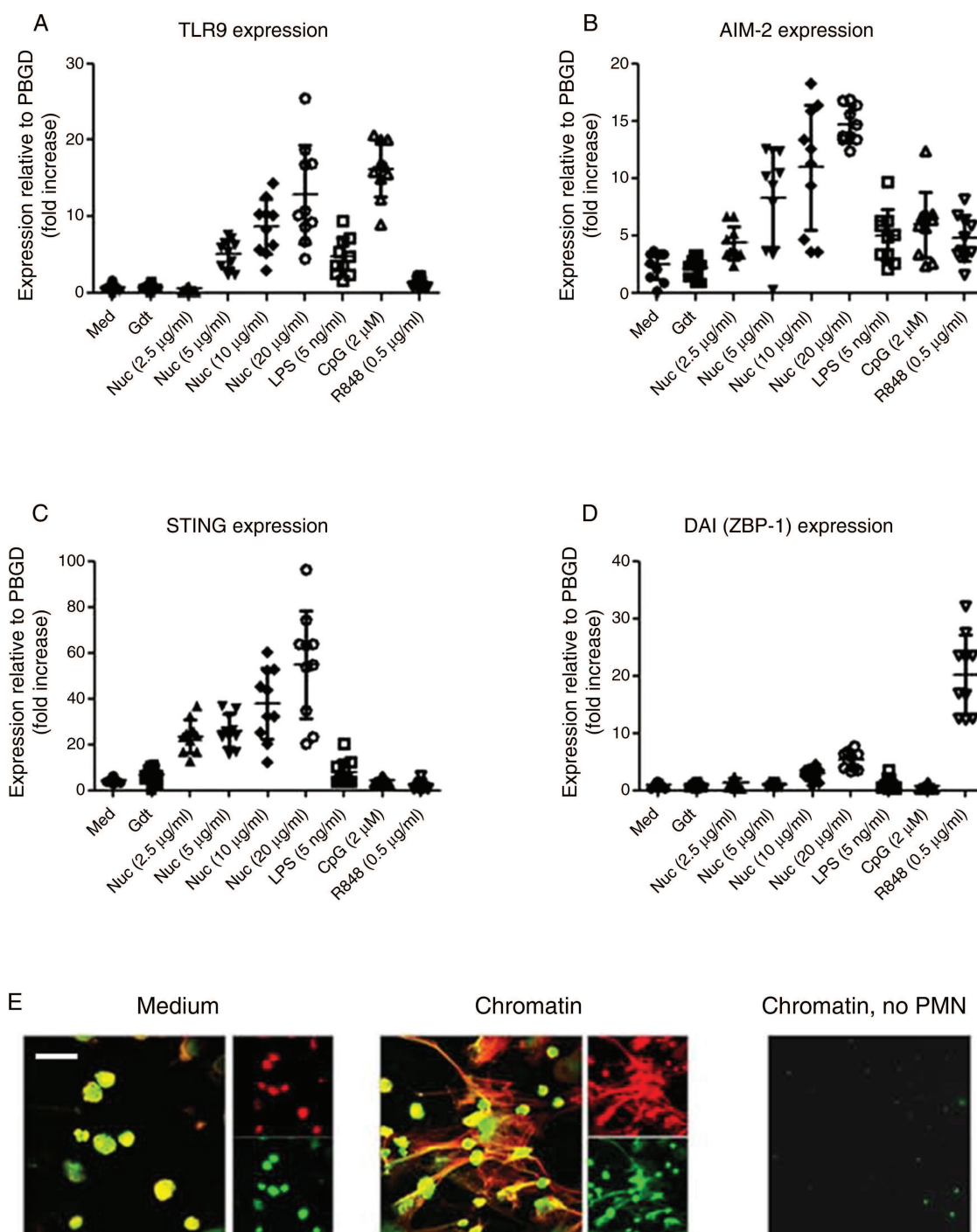


Figure 5 Chromatin stimulates DNA sensor upregulation in polymorphonuclear leucocytes (PMN) and NETosis. PMN were isolated from 10 independent healthy donors and cultured with different stimuli. TLR9 (toll-like receptor 9) (A), AIM2 (absent in melanoma 2) (B), STING (stimulator of IFN genes) (C) and DAI (DNA dependent activator of IFN regulatory factors, at a lower extent) (D) gene expression was analysed at the mRNA level by quantitative real time PCR. mRNA levels were normalised to porphobilinogen deaminase mRNA levels and were compared using a Student's *t* test or a Mann–Whitney rank sum test. The results are depicted as fold increase (each dot represents one donor) with mean±SD. $p < 0.05$ for all stimuli (A, B), all Nuc (C), Nuc 10, Nuc 20 and R848 (D). (E) Normal human PMN were cultured in medium alone (left) or with chromatin (middle) and the formation of neutrophil extracellular traps was estimated by confocal microscopy on staining of DNA (green) and histones (red). The individual channels and the merged signals are shown. To verify staining specificity, chromatin was incubated in medium in the absence of PMN and stained under the same conditions (right). The merged signal is shown. The bar represents 10 μm . One representative experiment of two is shown. See figure 1 for other abbreviations. The colour version of this figure is available online.

been identified to date. For example, the IFN inducible HIN-200 proteins regulate responses to cytoplasmic dsDNA, among which p202 (a candidate lupus susceptibility factor in mice) represses whereas AIM2 promotes the response to cytoplasmic DNA and leads to activation of the inflammasome and

cell death.⁴² Interestingly, expression of p202 and AIM2 are inversely correlated, and the p202 protein inhibits the formation of the inflammasome, favouring chronic innate immune responses.⁴³ Nevertheless, only some of those DNA receptors are involved in IFNI induction (eg, STING⁴⁴). So far, we

Basic and translational research

showed that some DNA sensors are upregulated by nucleosomes but, except for TLR9, we do not know whether they are required for nucleosome recognition or signalling. We also confirmed that TLR9 expression is modulated in response to non-TLR9 ligands. Similarly, we have reported that TLR9 is upregulated at the protein level by non-TLR9 agonists.³⁸ Chromatin may thus pre-activate PMN in SLE for a further activation by agonists of TLR9 or other DNA sensors.

In conclusion, we have identified a natural lupus stimulus able to induce IFN α production in non-inflammatory PMN in addition to PDC, suggesting that targeting PDC might not abolish the lupus IFN signature. Chromatin activated PMN may also be important targets for therapies aiming to control IFN α secretion,⁴⁵ a key pathogenic event in SLE, especially at the early stages of the disease.

Author affiliations

¹Department of Immunology, University of Tübingen, Institute for Cell Biology, Tübingen, Germany

²Department of Tumour Immunology, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Radboud University, Nijmegen, The Netherlands

³University of Paris 13, Sorbonne Paris Cité, EA4222, Li2P, Bobigny, France

⁴Internal Medicine II, University Hospital, Tübingen, Germany

⁵Rheumatology Department, AP-HP, Avicenne Hospital, Bobigny, France

Acknowledgements We thank Professor Hermann Wagner (Munich, Germany) for the gift of TLR9-KO mice and Dr Xavier Guillot (Rheumatology Department, Avicenne Hospital, AP-HP, Bobigny, France) for analysing the clinical data. We are grateful to Professor Bruce Beutler (The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA) for the gift of the reporter cells used to quantify IFN1.

Contributors DL performed the experiments, analysed the data and wrote the manuscript. JM, AR and MR performed the experiments and analysed the data. IK and AI recruited the patients and analysed the data. GA, M-CB and H-GR analysed the data. PD designed the project, performed the experiments, analysed the data and wrote the manuscript. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

Funding This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, DE 879/1-1 and DE 879/1-2), the Interdisziplinäres Zentrum für klinische Forschung Tübingen (IZKF-Nachwuchsgruppe, 1604-0-0 and 1604-0-1) and the Fritz-Thyssen Foundation to PD, and by the University of Paris 13 and Inserm. Part of the research of DL was performed within the framework of project D1-101 of Top Institute Pharma.

Competing interests None.

Ethics approval The study was approved by the University of Tübingen.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Mohan C, Adams S, Stanik V, et al. Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. *J Exp Med* 1993;177:1367–81.
- Oudet P, Gross-Bellard M, Chambon P. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 1975;4:281–300.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997;389:251–60.
- Mukundan L, Odegaard JI, Morel CR, et al. PPAR-delta senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. *Nat Med* 2009;15:1266–72.
- Erbacher AI, Rönnefarth VM, Decker P. Circulating nucleosomes due to a defective clearance of dying cells: consequences for systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 2007;40:311–4.
- Banchereau J, Pascual V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* 2006;25:383–92.
- Preble OT, Black RJ, Friedman RM, et al. Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon. *Science* 1982;216:429–31.
- Blanco P, Palucka AK, Gill M, et al. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* 2001;294:1540–3.
- Le Buanec H, Gougeon ML, Mathian A, et al. IFN-alpha and CD46 stimulation are associated with active lupus and skew natural T regulatory cell differentiation to type 1 regulatory T (Tr1) cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:18995–9000.
- Lu L, Kaliyaperumal A, Boumpas DT, et al. Major peptide autoepitopes for nucleosome-specific T cells of human lupus. *J Clin Invest* 1999;104:345–55.
- Chabre H, Amoura Z, Piette JC, et al. Presence of nucleosome-restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1995;38:1485–91.
- Rumore PM, Steinman CR. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *J Clin Invest* 1990;86:69–74.
- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999;284:1835–7.
- Rozzo SJ, Allard JD, Choubey D, et al. Evidence for an interferon-inducible gene, Ifi202, in the susceptibility to systemic lupus. *Immunity* 2001;15:435–43.
- Hagberg N, Berggren O, Leonard D, et al. IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells stimulated with RNA-containing immune complexes is promoted by NK cells via MIP-1beta and LFA-1. *J Immunol* 2011;186:5085–94.
- Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 2005;202:1131–9.
- Means TK, Latz E, Hayashi F, et al. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest* 2005;115:407–17.
- Guiducci C, Gong M, Xu Z, et al. TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature* 2010;465:937–41.
- Weckerle CE, Franek BS, Kelly JA, et al. Network analysis of associations between serum interferon-alpha activity, autoantibodies, and clinical features in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2011;63:1044–53.
- Lee PY, Kumagai Y, Li Y, et al. TLR7-dependent and FcgammaR-independent production of type I interferon in experimental mouse lupus. *J Exp Med* 2008;205:2995–3006.
- Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, et al. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J Immunol* 2010;184:3284–97.
- Bennett L, Palucka AK, Arce E, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 2003;197:711–23.
- Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2011;3:73ra20.
- Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2011;3:73 ra19.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303:1532–5.
- Rönnefarth VM, Erbacher AIM, Lamkemeyer T, et al. TLR2/TLR4-independent neutrophil activation and recruitment upon endocytosis of nucleosomes reveals a new pathway of innate immunity in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2006;177:7740–9.
- Stemmer C, Richalet-Secordel P, van Bruggen M, et al. Dual reactivity of several monoclonal anti-nucleosome autoantibodies for double-stranded DNA and a short segment of histone H3. *J Biol Chem* 1996;271:21257–61.
- Decker P, Singh-Jasuja H, Haager S, et al. Nucleosome, the main autoantigen in systemic lupus erythematosus, induces direct dendritic cell activation via a MyD88-independent pathway: consequences on inflammation. *J Immunol* 2005;174:3326–34.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740–5.
- Henn V, Slupsky JR, Grafe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391:591–4.
- Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, et al. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity* 2003;19:9–19.
- Duffau P, Seneschal J, Nicco C, et al. Platelet CD154 potentiates interferon-alpha secretion by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2010;2:47ra63.
- Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 2006;7:49–56.
- Ishii KJ, Coban C, Kato H, et al. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* 2006;7:40–8.
- Zhang W, Cai Y, Xu W, et al. AIM2 facilitates the apoptotic DNA-induced systemic lupus erythematosus via arbitrating macrophage functional maturation. *J Clin Immunol* 2013;33:925–37.
- Zhang W, Zhou Q, Xu W, et al. DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors (DAI) promotes lupus nephritis by activating the calcium pathway. *J Biol Chem* 2013;288:13534–50.
- Ahn J, Gutman D, Saijo S, et al. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:19386–91.
- Lindau D, Rönnefarth V, Erbacher A, et al. Nucleosome-induced neutrophil activation occurs independently of TLR9 and endosomal acidification: implications for systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol* 2011;41:669–81.
- Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2610–5.

- 40 Urbonaviciute V, Furnrohr BG, Meister S, *et al.* Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med* 2008;205:3007–18.
- 41 Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, *et al.* Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:9813–8.
- 42 Roberts TL, Idris A, Dunn JA, *et al.* HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* 2009;323:1057–60.
- 43 Panchanathan R, Duan X, Shen H, *et al.* Aim2 deficiency stimulates the expression of IFN-inducible Irf202, a lupus susceptibility murine gene within the Nba2 autoimmune susceptibility locus. *J Immunol* 2010;185:7385–93.
- 44 Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 2009;461:788–92.
- 45 Meyer O. Interferon-alpha as a treatment target in systemic lupus erythematosus. *Joint Bone Spine* 2012;79:113–16.

Online publication only

Materials and Methods

Chromatin purification. The same endotoxin concentration (as determined using a Limulus Amebocyte Lysate assay (BioWhittaker)) was measured in purified nucleosomes and in the empty gradient loaded with the purification buffer. There is no difference in protein sequence between core histones from calf, human and mouse. Moreover, we have previously demonstrated that nucleosomes purified with this protocol do not contain detectable amounts of the HMGB1 protein and that nucleosome-induced PMN activation occurs in a HMGB1-independent manner (Rönnefarth *et al.*, J. Immunol., 2006, 177:7740).

Cell isolation and culture. Heparin- or EDTA-blood from randomly selected healthy individuals or patients was used. Human PMN and PBMC were concomitantly freshly isolated by density centrifugation through dextran as described previously (Rönnefarth *et al.*, J. Immunol., 2006, 177:7740) and the two layers containing either PMN (lower layer) or PBMC (top) were harvested. Alternatively, when starting from higher blood volumes to get more cells, PBMC were isolated by classical density centrifugation through Ficoll. Human experiments were approved by the Tübingen ethics committee (reference 386/2006V). Alternatively, blood samples were obtained from the blood bank (Etablissement Français du Sang) of Bobigny. Patients fulfilled the American College of Rheumatology criteria and informed consents were collected. Mouse experiments were approved by the local ethics committee (Regierungspräsidium Tübingen, § 4 Abs. 3).

The phenotype of human (defined as CD3⁻, CD14^{low}, CD16^{high}, CD19⁻, CD56⁻, CD123⁻, CD11b⁺, CD66b⁺ cells) and mouse PMN (defined as F4/80⁻, CD3⁻, B220⁻, CD11b⁺, Ly-6G^{high}

cells) was estimated by flow cytometry. The purity was > 95 % of living cells and no contaminating PDC were detected.

Cells were cultured in RPMI 1640 medium (BioWhittaker) supplemented with 10 % FCS (PAA), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (both from Gibco) and 50 µM 2-ME (Roth). G-CSF (50 ng/ml, ImmunoTools) was added to mouse PMN. Cells ($1-1.5 \times 10^6$ cells/ml) were incubated in medium alone or activated with purified nucleosomes, the purification buffer as negative control, IFN- α (4,000 U/ml, R&D Systems), CpG-oligonucleotides (CpG-ODN, 2006 or 1826, type B, to minimize PDC-derived IFN- α (except in online supplementary Fig. S6, 2216, type A), 2 µM, InvivoGen or Metabion), R848 (0.5 µg/ml, Alexis) and LPS (5 ng/ml, from *Salmonella typhimurium*, Sigma). In some cases, human PMN were pre-incubated in the presence of polymyxin B (25 µg/ml, Fluka), G-CSF (50 ng/ml, Immunotools) or GM-CSF (1,000 U/ml, Immunotools) for 30 min at 37° C.

cDNA synthesis and quantitative RT-PCR analysis. For quantitative PCR analysis of mRNA levels, total RNA was isolated from 2×10^6 PMN with Trizol reagent (Gibco BRL) according to the manufacturer's protocol. RNA template was treated with DNase I (amplification grade) and reverse-transcribed into cDNA by using Superscript II Reverse Transcriptase (both from Invitrogen). Prior to PCR, the resulting cDNA samples were treated for 30 minutes at 37 °C with four units of RNase H (Ambion). The quantity and quality of the isolated RNA was established by UV spectroscopy and by the ability of the sample to be linearly amplified in a serial dilution with the low abundance housekeeping gene porphobilinogen deaminase (PBGD). mRNA levels were determined with a PRISM 7000 sequence detection system with SYBR Green (both from Applied Biosystems) as the fluorophore and the following oligonucleotide primers (SA Biosciences): 5'-tgaagacttcaggcccaactg-3' (TLR9, forward), 5'-tgcacggtcaccaggtgt-3' (TLR9, reverse), 5'-

tgtgctctacaggttgga-3' (RIG-I, forward), 5'-cactgggatctgattcgcaaaa-3' (RIG-I, reverse), 5'-caacatgggcagtgattcagg-3' (MDA-5, forward), 5'-tgggcaactccatttgtaag-3' (MDA-5, reverse), 5'-aacatgcagctacaattccaga-3' (DAI, forward), 5'-agtctcggttcacatctttgc-3' (DAI, reverse), 5'-cacttgatgcttgcctc-3' (STING, forward), 5'-gccacgttgaaattccctttt-3' (STING, reverse), 5'-tgctgcacaaaagtctctcc-3' (AIM2, forward), 5'-ctgcttgccttcttgggtct-3' (AIM2, reverse), 5'-ctgaaggacagacatgactttgga-3' (IFN- α 2, forward), 5'-ggatggttcagccttttga-3' (IFN- α 2, reverse), 5'-atgaccaacaagtgtctctcc-3' (IFN- β , forward), 5'-gctcatggaagagctgtagtg-3' (IFN- β , reverse). Quantitative PCR data were analyzed with 7000 Systems SDS Software v1.2.3 (Applied Biosystems) and checked for correct amplification and dissociation of the products. mRNA levels were normalized to PBGD mRNA levels and were calculated according to the cycle threshold method.

Flow cytometry. All incubations were carried out at 4° C for 30 minutes. Cells were analyzed on a FACSCalibur apparatus with CELLQuest software (Becton Dickinson). Donors having more than 2.5 % of IFN- α -positive PMN after activation but no IFN- α -positive PMN without activation were considered positive, provided that IFN- α -positive PMN formed a distinct cell population.

NETosis. Isolated PMN were seeded on glass coverslips coated with poly-L-Lysine (0.001 %, Sigma). After settling, cells were stimulated for 3 hours, washed and fixed with 4 % paraformaldehyde for 15 minutes. Slides were washed with PBS, blocked for 25 minutes in 2 % BSA/2% goat serum/0.2 % Triton X-100 in PBS and washed again. Slides were then incubated overnight with an anti-H2A-H2B-DNA mAb (clone PL2-3 (Losman *et al.*, J. Immunol., 1992, 148:1561), provided by Dr. Jürgen Dieker, Nephrology Research Laboratory, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Radboud University, Nijmegen,

The Netherlands) at 4° C and with a goat anti-mouse IgG secondary antibody conjugated to Alexa 647 (eBioscience) for 45 minutes at room temperature. Slides were finally washed, incubated with Sytox Green (Invitrogen) to stain the DNA and analyzed by confocal microscopy using a Zeiss LSM 510 microscope.

ELISA. Cytokine secretion by PMN was analyzed by sandwich ELISA using mAb pairs and streptavidin-peroxidase conjugate from BD Biosciences (IL-8, TNF- α), Bender MedSystems (human IFN- α), R&D Systems (MIP-2), BioLegend (IL-6) or Thermo Fisher Scientific (mouse IFN- α). Cytokine concentrations in supernatants are depicted as mean \pm standard deviation of triplicates.

Statistical analysis. The proportions of donors with IFN- α -positive PMN upon activation with chromatin among healthy donors and SLE patients and the mean percentages of IFN- α -positive PMN were compared using a Fisher Exact Test with $\alpha = 0.05$ or a Mann-Whitney rank sum test. mRNA levels and IFN concentrations in untreated and activated PMN or PDC were compared using a Student's *t*-test or a Mann-Whitney rank sum test (LPS, CpG and R848 were compared to medium whereas nucleosome concentrations were compared to the empty gradient). The SigmaStat software was used and *p* values < 0.05 were considered significant.

Table SI. Characteristics of SLE patients.

	Sex	Age	SLEDAI	ANA	anti-DNA	anti-ENA	Therapy	Organ involvement					
								kidney	skin	joint	CNS	blood	heart
SLE01	M	63	0	+++	134	-	MMF, Pred	+	+				+
SLE02	F	30	4	+++	-	-	Qu, Pred		+	+			+
SLE03	F	36	2	+++	251	-	Aza, Qu, Pred		+	+	+		
SLE04	F	45	0	+++	98	-	Lef, Pred	+	+		+		+
SLE05	F	55	1	++	-	-	Pred	+					+
SLE06	F	46	5	++	-	-	Pred	+	+				+
SLE07	F	42	0	+++	-	-	Aza, Pred	+	+				+
SLE08	F	42	8	++	-	(+)	Aza, Pred				+		+
SLE09	F	46	1	+++	-	+	Aza, Pred	+		+			+
SLE10	F	68	2	+++	-	-	Qu, Pred		+	+			
SLE11	M	27	2	+++	-	-	Aza, Pred		+				+
SLE12	F	61	8	++	-	-	MMF, Pred	+	+		+		
SLE13	F	26	0	+++	140	-	Pred	+		+			
SLE14	F	57	2	++	53	-	Pred	+	+	+			
SLE15	F	63	2	+++	240	-	MMF, Pred	+	+	+			+

SLE, systemic lupus erythematosus; SLEDAI, SLE disease activity index; ANA, anti-nuclear antibody titer; anti-DNA, anti-double-stranded DNA antibody titer (IU/ml); anti-ENA, anti-extractable nuclear antigen antibody titer; CNS, central nervous system; MMF, mycophenolate mofetil; Pred, prednisolone; Qu, hydroxychloroquine, Aza, azathioprine; Lef, leflunomide.

Figure S1. Phenotype of PMN and PBMC in total leukocytes (A-C), immunogenicity of purified nucleosomes (D) and phenotype/purity of isolated PMN (E). (A-E) Human leukocytes were freshly isolated by dextran centrifugation. (A) The two layers corresponding to either PMN (gate G1) or PBMC (gate G2) were pooled. (B-C) PMN (upper panels) and PBMC (lower panels) were characterized by flow cytometry upon staining of cell surface molecules with specific mAb or the corresponding isotype controls. The percentage of cells positive or with high expression (CD11b, CD16, CD14) in G1 or G2 is indicated. PMN and PBMC show the expected phenotypes. The leukocyte population contained 40-50 % of PMN (CD66b⁺CD123⁻ cells), 0.5 % of CD123⁺CD14⁻ cells (most of them are PDC) and 8 % of monocytes (CD14^{high}CD66b⁻ cells). Grey histogram, isotype control; open histogram, antibody staining. (D) To exclude the presence of endotoxins in purified nucleosomes, isolated PMN were cultured with different stimuli in the presence or absence of polymyxin B, a LPS inhibitor. Cell activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. Nucleosome induced PMN activation, which was not inhibited by polymyxin B. On the contrary, LPS-induced activation was completely inhibited by polymyxin B. As expected, activation by the CpG-ODN or R848 was not influenced by polymyxin B, indicating that purified nucleosomes do not contain endotoxins. Results are representative of ten independent experiments. In D, results are the mean of triplicates and standard deviations are indicated. (E) Phenotype and purity of isolated human PMN. PMN were freshly isolated from peripheral blood and stained with mAb specific for CD66b and CD11b or the corresponding isotype controls. Cells were analyzed by flow cytometry and the percentage of PMN is indicated. Horizontal and vertical lines represent staining with isotype controls. CD66b⁺CD11b⁺ cells are non-activated PMN. Upon activation, PMN have the following phenotype: CD66b^{high}CD11b^{high} (not shown). The experiment was performed forty times. See Figure 1 and main text for abbreviations.

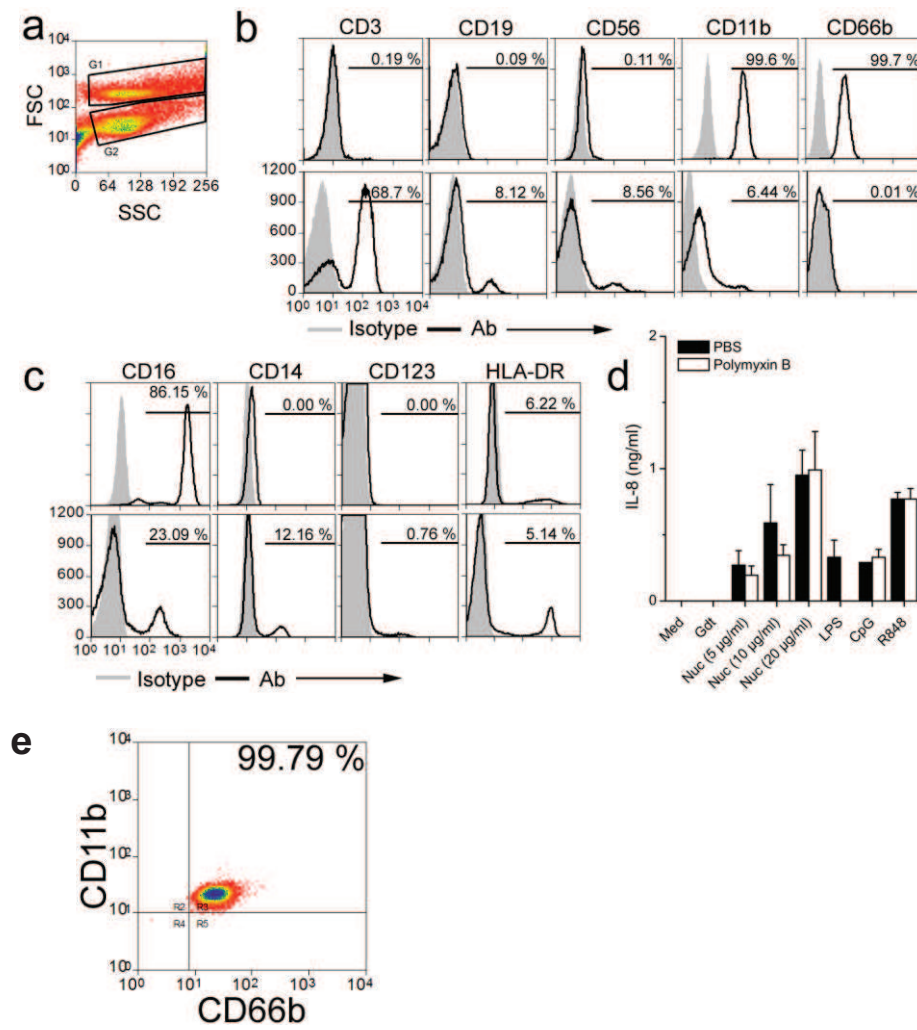


Figure S1

Figure S2. Analysis of IFN- α -producing cells among the different cell populations in PBL. Cells were cultured in medium only (Med) or supplemented with the purification buffer (Gdt), nucleosomes (Nuc), the CpG-ODN 2006 (CpG), LPS or R848 and analyzed as in Figure 1. Results show the percentages of IFN- α -positive cells among PMN, monocytes and PDC in the respective gate. Nucleosomes and oligonucleotides containing unmethylated CpG sequences (CpG-ODN) were the best inducers of IFN- α in PMN, PDC and monocytes (depicted are the percentages of IFN- α -producing cells in each individual cell population). IFN- α induction was low in response to LPS (a TLR4 ligand) and usually low or moderate with R848 (a TLR7/8 ligand).

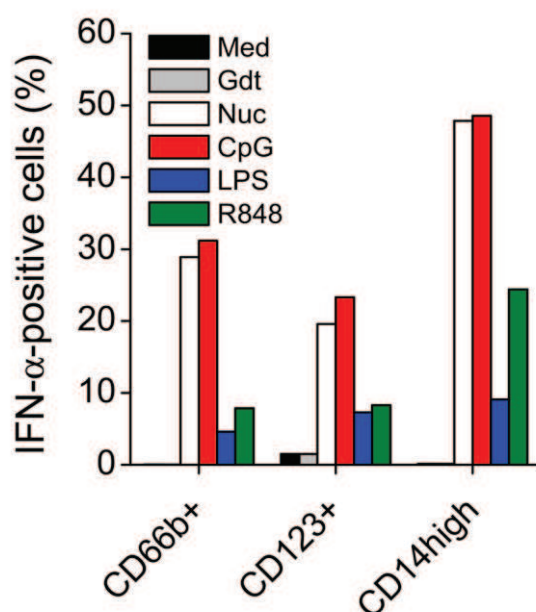


Figure S2

Figure S3. Isolated lupus PMN produce IFN- α in response to chromatin or TLR9 agonists.

(A) PMN were freshly isolated from SLE patients and cultured with different stimuli (Nuc, 5 μ g/ml) as in Figure 2. Cells were analyzed by flow cytometry as in Figure 1 A. The upper and lower panels show cells double-stained with mAb specific for IFN- α and CD66b or the corresponding isotype controls, respectively. Numbers indicate the percentages of IFN- α -positive PMN. (B) The results from A (upper panel) are summarized and show several nucleosome concentrations. (C) The extent of PMN activation was estimated by measuring IL-8 secretion by ELISA. (D) IFN- α secretion was confirmed by measuring the IFN- α concentration in cell culture supernatants by ELISA. In B-D, results are the mean of triplicates and standard deviations are indicated. Results show a representative lupus patient from eight independent experiments using four different nucleosome preparations (except for D, four independent experiments). See Figure 1 for abbreviations.

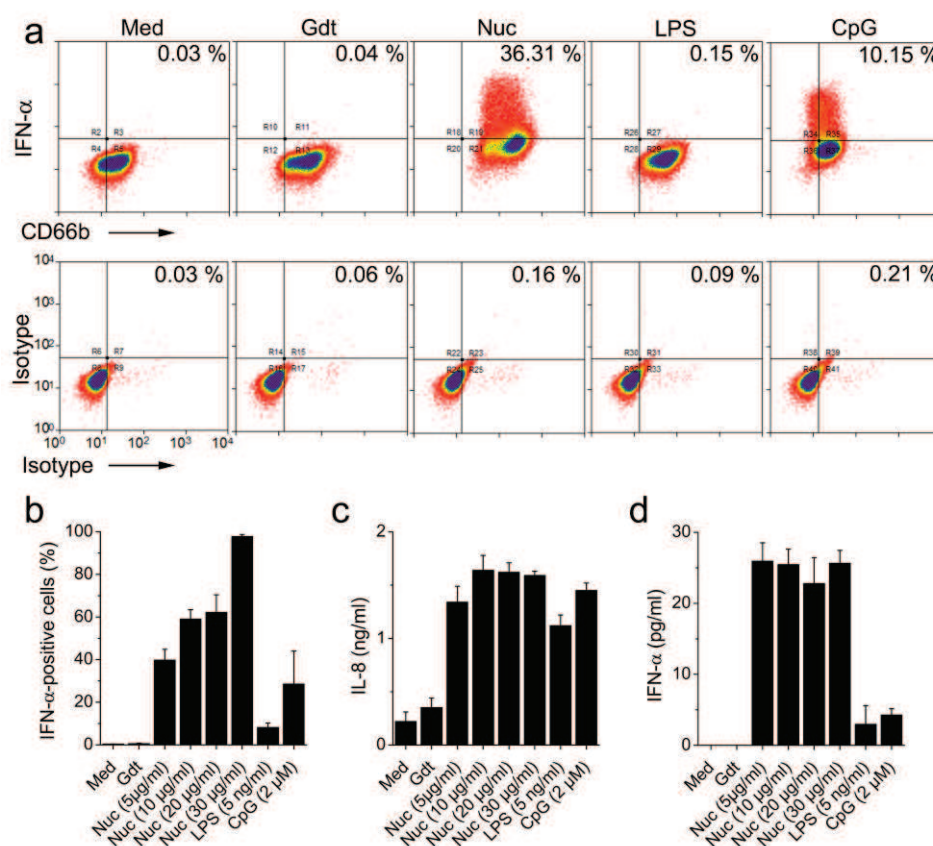


Figure S3

Figure S4. Isolated PMN up-regulate type I IFN at the mRNA level and secrete a bioactive type I IFN. (A, B) Chromatin induces a significant up-regulation of type I IFN. PMN were isolated from ten healthy donors and stimulated with different stimuli for 15 hours. IFN- α (A) and IFN- β (B) mRNA levels were analyzed by quantitative RT-PCR and normalized to porphobilinogen deaminase (PBGD) mRNA levels. Results (depicted as fold increase (each dot represents one donor) with mean \pm SD) are from ten experiments on ten independent donors and were compared using a Student's *t*-test or a Mann-Whitney rank sum test. $p < 0.05$ for all stimuli except Nuc 2.5 (A) and Nuc 2.5, Nuc 5 and LPS (B). (C, D) Chromatin stimulates PMN isolated from 3 healthy donors (HD, C) and 3 rheumatoid arthritis (RA, D) patients to produce a bioactive form of type I IFN. Total type I IFN secretion was determined after 15 hours (except for panel D bottom, 5 hours) using an IFN bioassay and luciferase reporter assay as described previously (Jiang *et al.*, Nature Immunol., 2005, 6:565; Crozat *et al.*, Mamm. Genome, 2006, 17:398). Cell culture supernatants were over-layed on ISRE-L929 IFN reporter cells and incubated for 4-6 hours. The reporter cells were lysed in Passive Lysis Buffer (Promega), mixed with firefly luciferin substrate (Biosynth) and measured in a luminometer. In C, $p = 0.0032$ for Nuc vs. Gdt. Results are from six experiments on six independent donors. See Figure 1 for abbreviations. Shown are means and SD of triplicates.

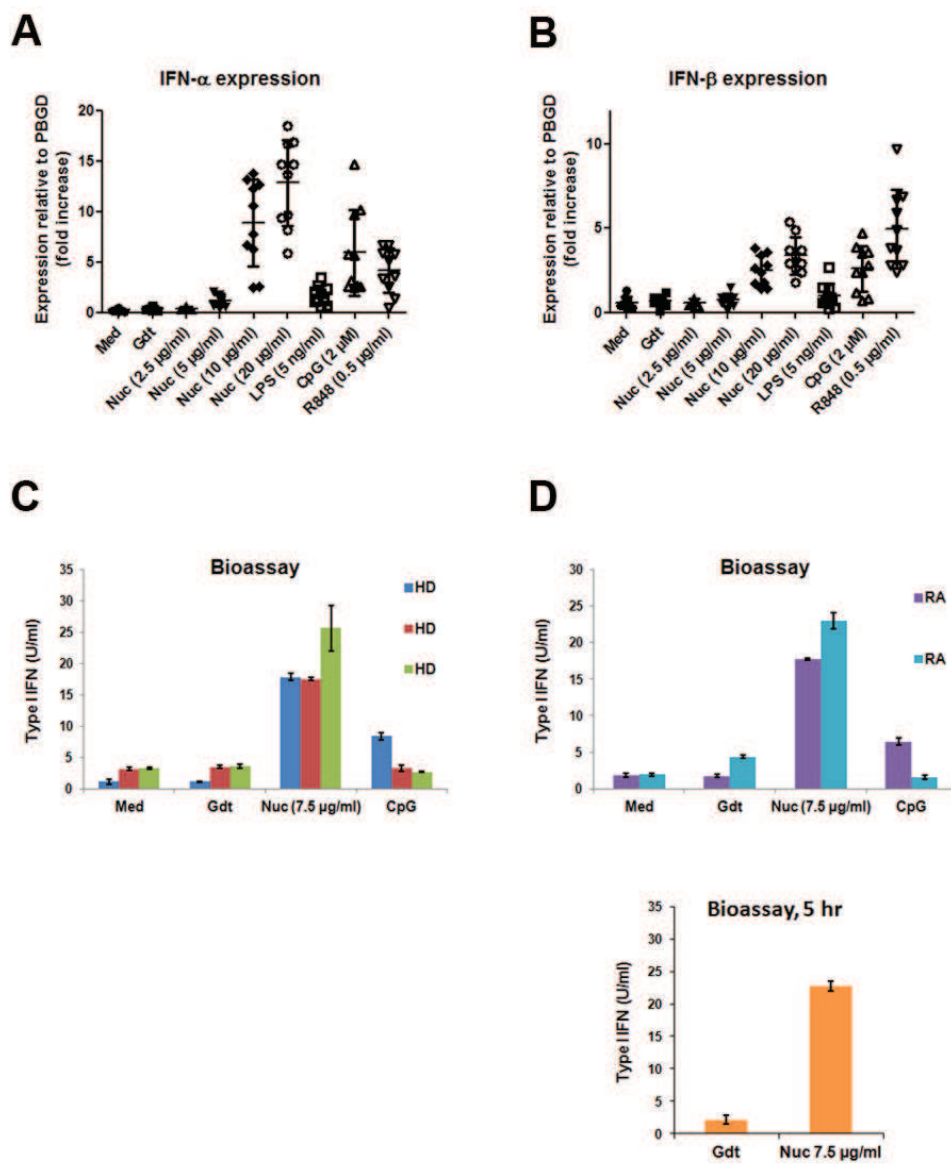


Figure S4

Figure S5. Chromatin-induced type I IFN production by PMN occurs independently of immune complex formation. (A) Boiled nucleosomes, but not boiled aggregated IgG, lose their IFN-stimulatory activity. Isolated human PMN were activated by nucleosomes (Nuc) or purified IgG pre-treated at 63° C to mimic immune complexes (aggregated IgG, agg. IgG). The different stimuli were either used native or after treatment at 95° C. Total type I IFN induction was estimated in the cell culture supernatants using the cell reporter system described in online Figure S4. (B) The residual activity of boiled aggregated IgG is not due to the presence of endotoxins. PMN were pre-incubated with or without the LPS inhibitor polymyxin B and cultured. IFN production was measured as described above. The LPS activity was completely lost in the presence of polymyxin B whereas the activity of aggregated IgG was not affected.

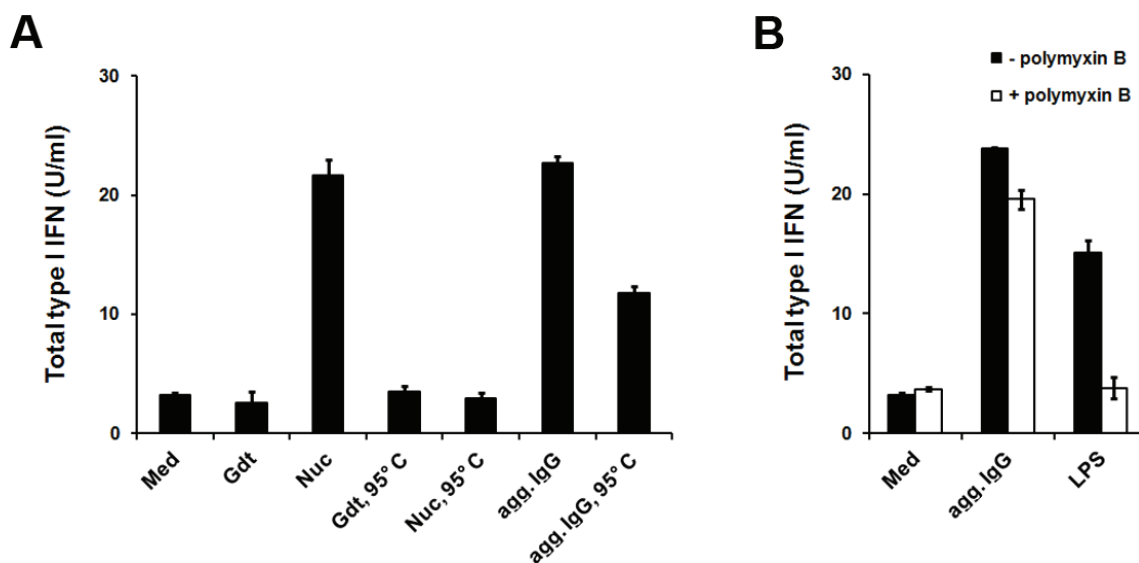


Figure S5

Figure S6. Comparative analysis of IFN-I production by human blood PMN and PDC. PMN (isolated by density centrifugation) and PDC (isolated by BDCA4 positive selection from PBMC using MACS magnetic beads) were both cultured at 10^6 cells/ml and cultured in medium alone or supplemented with CpG-ODN 2216. Type I IFN induction was estimated in the cell culture supernatants as described in online Figure S4. Shown are the means and SD from three independent experiments using different donors ($p \leq 0.0022$, Med vs. CpG, for both PMN and PDC).

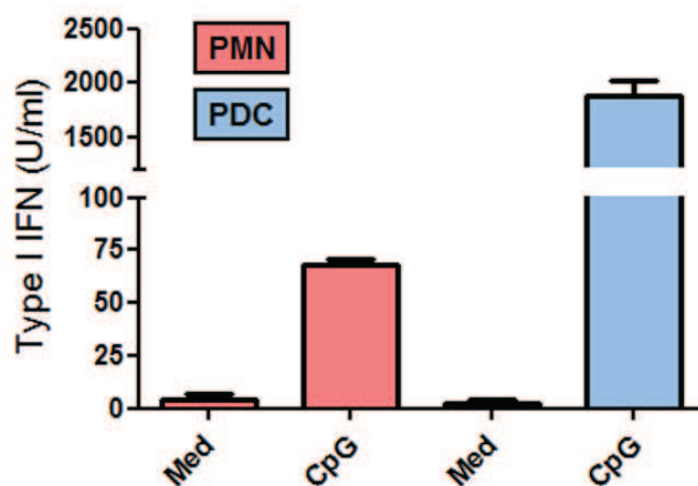


Figure S6

Figure S7. Influence of IFN- α on IFN-I production by human blood PMN. Isolated PMN were cultured in medium alone or activated with purified nucleosomes (Nuc) in the absence/presence of IFN- α (IFN). Type I IFN induction was estimated in the cell culture supernatants as described in online Figure S4. Results are from two independent experiments. Shown are the means and SD of triplicates from one representative donor.

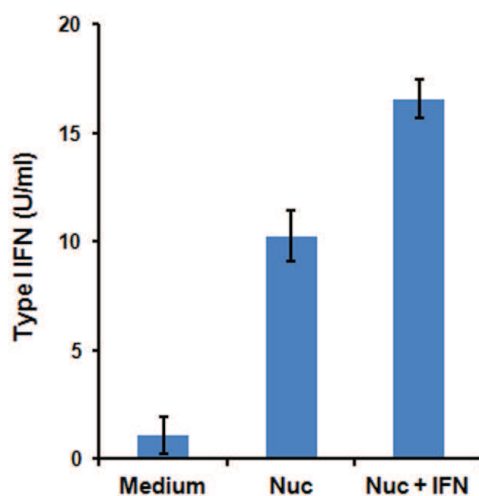


Figure S7

Figure S8. Purified mouse neutrophils secrete type I IFN upon activation. PMN were purified from the bone marrow by Ly-6G positive selection and cultured in medium alone (Med) or activated with different stimuli (CpG-ODN 1826, 4 μ M; R848, 0.5 μ g/ml; poly I:C, 20 μ g/ml (PharmaTech); PMA, 20 ng/ml (Calbiochem)). Cell activation was estimated by measuring CD11b up-regulation (A) and ROS production (B) by flow cytometry, by assessing NO_2^- production by a chemical reaction (C) and by analyzing cytokine production by ELISA (D). Intracellular ROS production was assessed with dihydrorhodamine 123 (Sigma) which becomes fluorescent upon oxidation during a respiratory burst. To detect nitrites, cell culture supernatants were mixed with Griess reagent (Promega) and the absorbance was read at 550 nm. For other methods, see main text. (E) Total type I IFN secretion by stimulated mouse PMN was determined as in online Figure S4 using the cell reporter assay. CpG-ODN, R848 and PMA induce PMN activation and type I IFN secretion, in contrast to poly I:C. Indeed, PMN do not express TLR3. Poly I:C can only activate PMN when transfected in order to trigger cytoplasmic RNA helicases. MFI, mean fluorescence intensity.

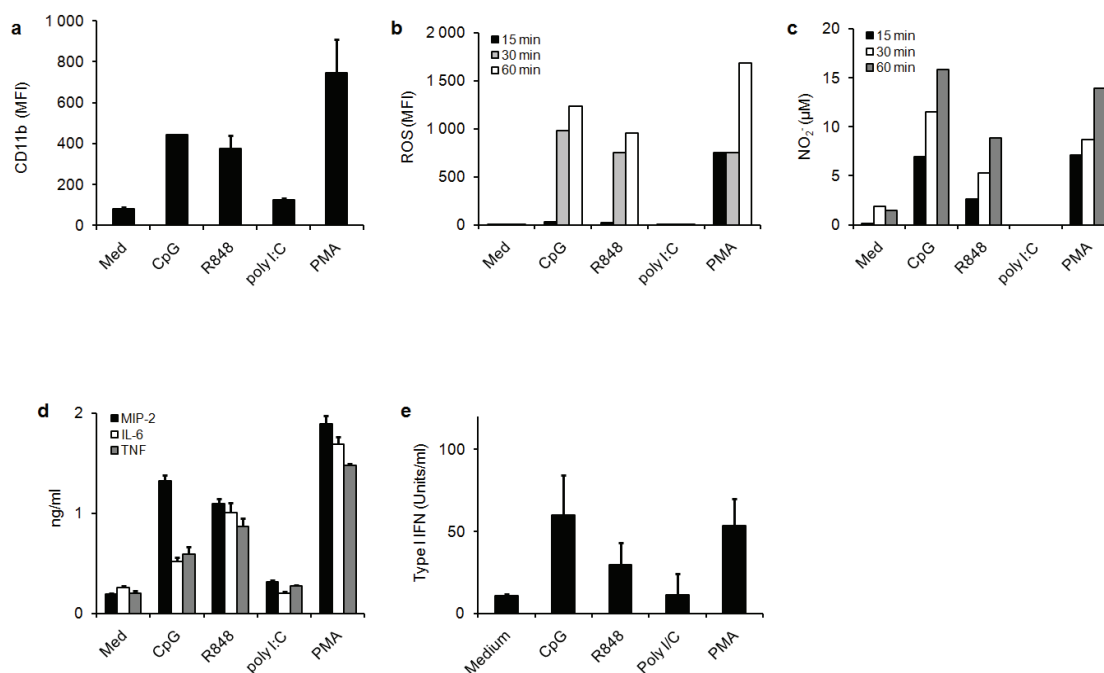


Figure S8

Figure S9. Phenotype and purity of PMN isolated from WT and TLR9-KO mice. PMN were purified from the bone marrow by Ly-6G positive selection. (A) Cells were stained with specific mAb or the corresponding isotype controls and analyzed by flow cytometry. The percentage of PMN (purity) and the percentage of cells positive for each marker is indicated. WT and TLR9-deficient PMN have the same phenotype. (B) A representative PMN enrichment is shown. The percentage of PMN (Ly-6G^{high}CD11b⁺ cells) is indicated. The box contains PMN according to the staining with isotype controls. The experiment was performed three times.

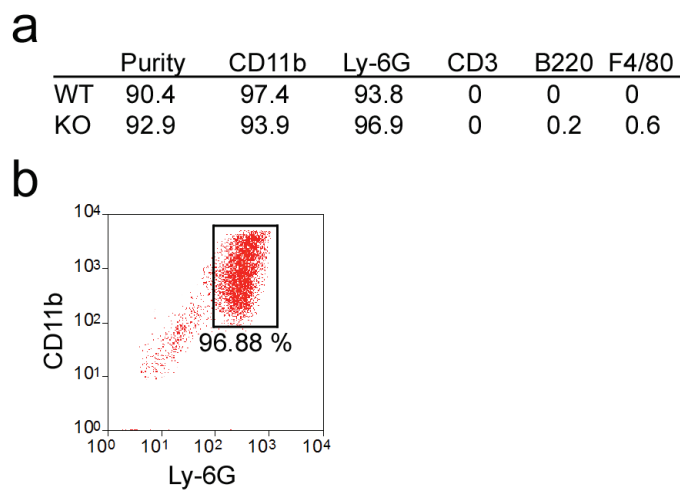


Figure S9

Figure S10. Chromatin does not up-regulate RNA sensors in PMN. PMN were isolated from ten independent healthy donors and cultured with different stimuli. MDA-5 (A) and RIG-I (B) gene expression was analyzed at the mRNA level by quantitative RT-PCR. mRNA levels were normalized to PBGD mRNA levels. The results are depicted as fold increase (each dot represents one donor) with mean \pm SD. They are from ten independent experiments and were compared using a Student's *t*-test or a Mann-Whitney rank sum test. $p < 0.05$ for R848 only.

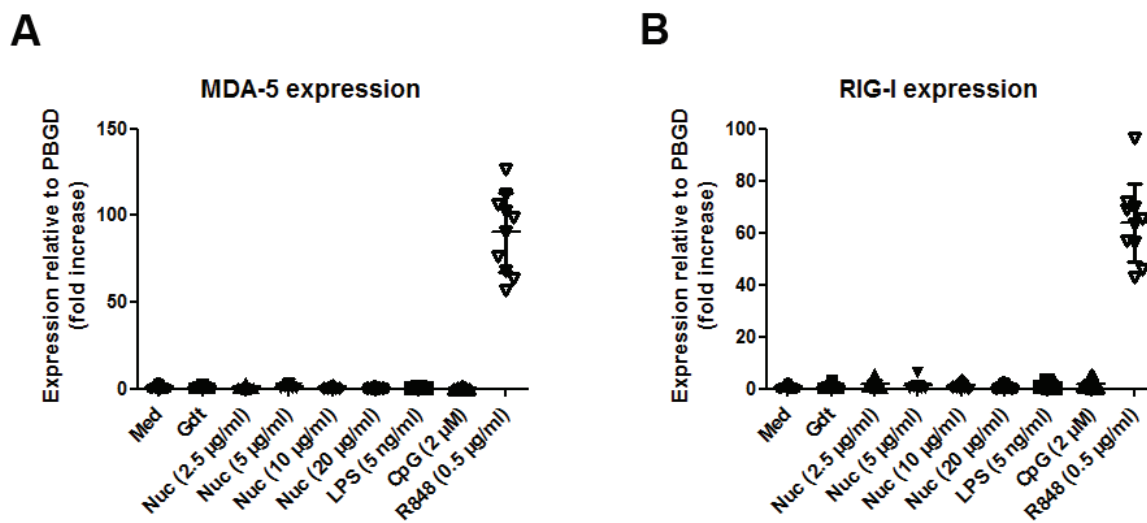


Figure S10

Figure S11. Scheme of the current model (blue arrows) and our new model (red arrows) explaining how IFN- α is produced in SLE patients. In the current model, impaired clearance of late apoptotic cells leads to secondary necrosis and the release of nucleosomes in the extracellular milieu. Circulating nucleosomes are recognized by MDC and induce MDC activation, which in turn favors the break of peripheral tolerance by stimulating Th lymphocytes and subsequently B lymphocytes. The latter secrete autoantibodies yielding immune complexes which deposit into tissues and induce inflammation and tissue damages upon activation of the complement system. Moreover, DNA/RNA-containing immune complexes stimulate PDC to secrete IFN- α which enhances MDC differentiation/activation, the break of tolerance and tissue damages. This mechanism is promoted by platelets and natural killer cells. Our model suggests that upon nucleosome release by late apoptotic cells and nucleosome accumulation in the circulation due to inefficient clearance by the complement protein C1q and/or DNase1, circulating nucleosomes not only activate MDC but also directly stimulate PMN to secrete IFN- α (initiation phase). PMN represent thus a primary source of IFN- α which directly triggers MDC differentiation/activation, the break of tolerance and consequently the secretion of autoantibodies and the production of immune complexes as described above. Anew the latter induce inflammation and tissue damages whereas some of them stimulate PDC to secrete IFN- α at a later step (perpetuation phase). PDC are therefore also involved in this model where they sustain MDC differentiation/activation, the break of tolerance and tissue damages, representing thus an amplification loop. Moreover, PMN-derived IFN- α perpetuates the inflammatory process and tissue damages. IFN- α secretion by PMN upon activation by free nucleosomes is therefore an earlier and triggering event occurring before chromatin-containing immune complexes are formed and before PDC are activated. Later, NETosis (or “netting” PMN) may be involved in a positive-feedback loop. DC, dendritic cells.

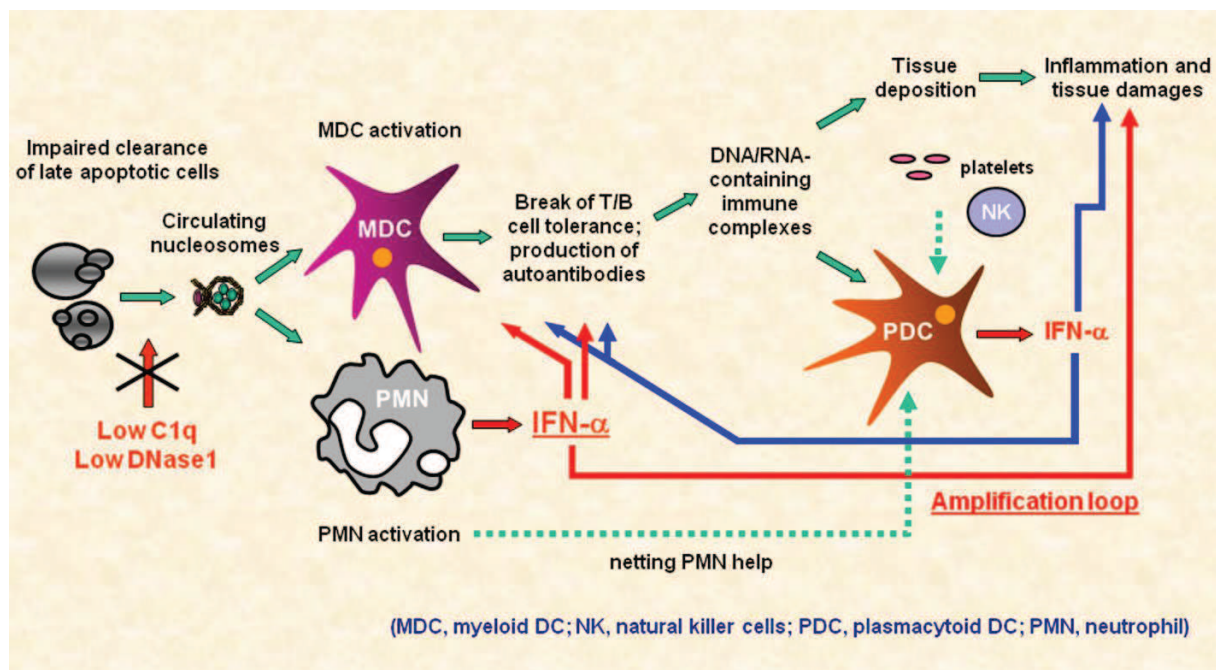


Figure S11

III. Annexe 3 : Sécrétion de CEACAM8 soluble par les neutrophiles activés.

Les CEACAM (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) sont des molécules exprimées par les PNN. Ce sont des intégrines de la famille $\beta 2$. On connaît mieux les CEACAM sous leur numéro de cluster de différenciation (CD), ce sont les CD66. Bernhard Singer a mis en évidence que les CEACAM, normalement exprimées à la surface des cellules, pouvaient être sécrétées sous forme soluble. Cette découverte a été faite dans le contexte du cancer. D'ailleurs, l'équipe de Singer a rapporté que la présence de CEACAM1 soluble (CD66a) dans les urines représentait un marqueur du cancer de la vessie(314). Nous avons débuté une collaboration avec Bernhard Singer afin d'étudier le rôle de la sécrétion de CEACAM solubles dans le contexte de la PR. Nous nous intéressions particulièrement à CEACAM8 soluble (CD66b) car elle est spécifique des polynucléaires neutrophiles humains. De plus, Singer nous avait rapporté que CEACAM8 soluble pouvait agir comme un cofacteur de stimulation des lymphocytes T et B (non publié), ce qui est particulièrement intéressant dans le contexte de la PR.

Notre hypothèse était que CEACAM8 soluble sécrété par les PNN jouerait un rôle important dans la PR. Mon objectif était de déterminer si les patients atteints de PR sécrétaient davantage de CEACAM8 soluble que les donneurs sains. Une éventuelle présence accrue de CEACAM8 soluble chez les patients PR aurait pu favoriser l'auto-immunisation et être responsable du déclenchement de la maladie. De plus, nous cherchions à savoir quels stimuli induisaient la sécrétion de CEACAM8 soluble.

Pour répondre à mes objectifs j'ai dû mettre au point les ELISA pour le dosage des différentes CEACAM soluble. J'ai ensuite testé différents stimuli potentiellement capables d'induire la sécrétion de CEACAM8 soluble.

Au cours de ces travaux nous avons confirmé que les PNN activés de donneurs sains et d'un patient atteint de PR étaient capables de sécréter CEACAM8 soluble (Figure 31) mais aussi CEACAM6 soluble (CD66c) (non montré) en réponse à la stimulation par différents TLR, mais aussi en réponse à des cytokines potentiellement impliquées dans la PR. Ces CEACAM solubles sont aussi sécrétées en réponse à la chromatine purifiée.

Les PNN de donneurs sains et d'un patient PR sécrètent CEACAM8 soluble après activation. Ils pourraient donc, par ce mécanisme, influencer sur la stimulation des lymphocytes T et B. Il faut à présent mesurer les taux de CEACAM8 soluble dans les plasmas de donneurs sains et de patients PR, et vérifier si CEACAM8 soluble issu de ces plasmas est capable de favoriser la co-stimulation des lymphocytes T et B (auto-)réactifs dans le contexte de la PR.

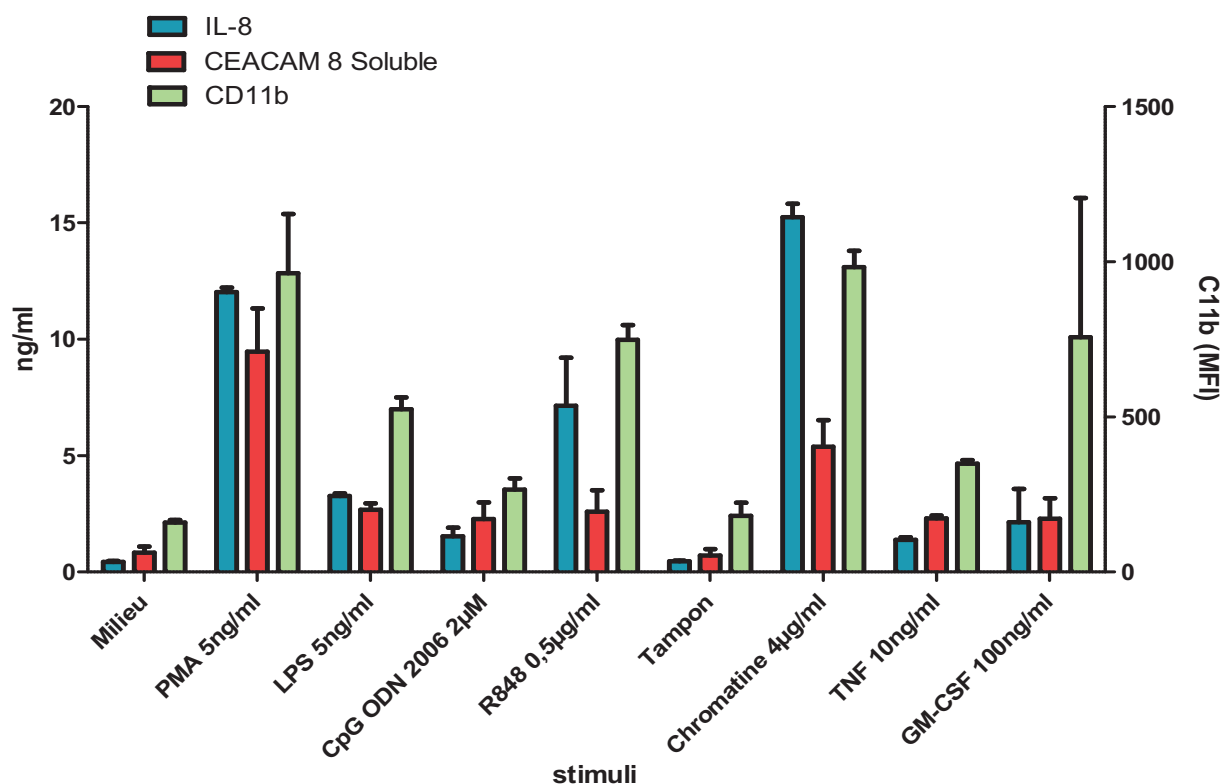


Figure 31: Les neutrophiles activés de donneur sain sécrètent CEACAM8 soluble.

Les PNN ont été purifiés à partir d'un donneur sain, puis cultivés 17 heures en présence d'agonistes des TLR : LPS (TLR4), CpG-ODN (TLR9), R848 (TLR7/8) ; ou en présence de cytokines ou en présence de chromatine et de son contrôle négatif (tampon). Le PMA est le contrôle positif ; le milieu, le contrôle négatif. Les surnageants sont récoltés pour les titrations ELISA et les cellules récoltées pour analyses par cytométrie en flux. L'activation des PNN a été mesurée par la sécrétion d'IL-8 et la surexpression de CD11b. Huit donneurs sains et un patient PR ont été testés, une expérience représentative est présentée. Les écarts types et les moyennes sont représentés. MFI : intensité de fluorescence.

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune inflammatoire. La PR touche les articulations jusqu'à les détruire. Elle est caractérisée par la présence d'anticorps anti protéines citrullinées (ACPA) mais l'auto-antigène n'est toujours pas connu. Dans cette maladie, l'implication de l'immunité adaptative ne fait donc aucun doute mais le rôle de l'immunité innée reste encore flou. Le système du complément joue un rôle important dans l'immunité innée tout comme les récepteurs de type Toll (TLR) qui sont des récepteurs de celle-ci. C1q, par la reconnaissance des ses ligands, active une des voies du complément, la voie classique. Chez les patients atteints de PR, le complément est activé et un dépôt de C1q est retrouvé dans l'articulation. Le TLR9 reconnaît des ADN dérivés de bactéries ou de virus mais une expression à la surface des cellules pourrait conduire à la reconnaissance d'autres motifs comme les signaux de danger (DAMP). D'ailleurs, nous avons montré récemment qu'il existait un TLR9 exprimé à la surface des polynucléaires neutrophiles (PNN). Enfin, il a été mis en évidence récemment un nouveau mécanisme bactéricide effectué par les PNN : la formation de NET (neutrophil extracellular traps). Mais en dehors de leur rôle bactéricide, les NET ont été montrés comme pathogènes dans certaines maladies comme le lupus. Dans ce travail de thèse, je me suis intéressé à l'implication de ces acteurs, NET, C1q et TLR9 dans la PR. Nous avons montré que C1q est indispensable au développement de l'arthrite dans un modèle animal. De plus, l'expression des récepteurs au C1q par les PNN et les monocytes est corrélée à l'activité de la maladie et à l'inflammation. Nous avons montré que les NET représentent une cible pour les ACPA (ce qui en fait des auto-antigènes potentiels dans la PR) et que ces NET sont immunogènes. L'immunogénicité des NET est modulée par C1q. Enfin, il semblerait que le TLR9 ait moins d'importance dans l'arthrite. Par ce travail, nous avons montré l'importance du rôle joué par l'immunité innée dans la PR et ses modèles.

Study of neutrophils, neutrophil extracellular traps, and the complement protein C1q in inflammatory responses. Physiopathological consequences in rheumatoid arthritis and an experimental model.

Rheumatoid arthritis (RA) is the most frequent rheumatic disease. This auto-immune disease causes pain and joint destruction. RA has been characterized by adaptative immunity involvement and anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) production. Involvement of innate immunity is less investigated. Complement system, part of innate immunity, is activated in RA. C1q activates classical complement pathway by binding its ligands. C1q is found in joint of RA patients. On the other hand Toll-like receptor (TLR), innate receptors could play a role in RA upon recognition of pathogen-derived DNA (TLR9). Cell surface expression of TLR9 has been reported as potentially pathological, and we describe that polymorphonuclear neutrophils (PMN) express a cell surface TLR9 which could recognize damage associated molecular pattern (DAMP). Finally, neutrophil extracellular traps (NET) which are expelled chromatin fiber and represent a physiological response to bacteria, have been reported as pathological in certain circumstances. We investigated the role of those three innate actors in RA. We have shown that C1q is mandatory to develop experimental arthritis and expression of their receptors on RA patient PMN and monocytes is correlated with disease activity and inflammation. We have also shown that NET are immunogenic and this immunogenicity is partly modulated and mediated by C1q. NET might trigger ACPA production in RA. Finally, it seems that involvement of TLR9 is less important in RA. With those experiments we have shown that the involvement of innate immunity in RA is more important than that has been reported so far.

Discipline: Biologie, mention Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mots clé : immunité innée, polyarthrite rhumatoïde, « neutrophil extracellular traps », neutrophiles, C1q, TLR9.

UMR INSERM 1125, Université Paris 13, USPC, 74, rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny.