



**HAL**  
open science

# Implication des polynucléaires neutrophiles au cours de la maladie d'Alzheimer et des tauopathies

Yuan Dong

► **To cite this version:**

Yuan Dong. Implication des polynucléaires neutrophiles au cours de la maladie d'Alzheimer et des tauopathies. Immunologie. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS445 . tel-02937879

**HAL Id: tel-02937879**

**<https://theses.hal.science/tel-02937879>**

Submitted on 14 Sep 2020

**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.



# THÈSE

PRÉSENTÉE À

**Sorbonne Université**

ÉCOLE DOCTORALE : Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Par Yuan DONG

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Immunologie

## **Implication des polynucléaires neutrophiles au cours de la maladie d'Alzheimer et des tauopathies**

Directrice de thèse : Carole ELBIM

Soutenue le : 03/10/2018

Devant la commission d'examen formée de :

Pr. Bertrand FRIGUET  
Pr. Sylvain FISSON  
Pr. Oliver NÜSSE  
Pr. Delphine BOCHE  
Dr. David BLUM  
Pr. Carole ELBIM

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examinatrice  
Examineur  
Directrice de thèse



## Remerciements

*Je souhaite remercier le Professeur **Bertrand Friguet** qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être président de mon jury de thèse. Qu'il accepte l'expression de ma respectueuse gratitude. Je tiens également à remercier le Professeur **Sylvain Fisson** et le professeur **Oliver Nüsse** d'avoir accepté d'être rapporteurs et d'avoir jugé mon travail de thèse. Leurs commentaires ont été particulièrement utiles. J'adresse mes remerciements au Professeur **Delphine Boche** et au Docteur **David Blum** d'avoir accepté d'être examinateurs de ma thèse et je leur fais part de ma sincère gratitude.*

*Je remercie très chaleureusement le Professeur **Carole Elbim** qui m'a encadré et soutenu au cours de ces trois années de thèse et durant mon stage de M2 avec une grande sympathie ainsi qu'une éternelle bonne humeur. Sa bienveillance, ses encouragements et ses conseils constants, de même que son aide précieuse, m'ont permis de réaliser ce travail. Qu'elle reçoive ici le témoignage de mes affections les plus sincères. Grâce à sa supervision, j'ai eu le privilège de partager sa vision de la science et de la recherche scientifique. Merci pour tout le soutien et l'aide que vous m'avez apportés, pour vos encouragements, et vos bons conseils au niveau professionnel et personnel.*

*Je tiens à remercier sincèrement le Professeur **Pierre Aucouturier** qui m'a chaleureusement accueilli au sein de son équipe et de m'avoir fourni les moyens de mener ce travail. Merci pour son soutien, ses connaissances débordantes et ses très bons conseils.*

*J'adresse également mes remerciements au Docteur **Guillaume Dorothee** pour ses conseils scientifiques précieux, sa disponibilité, ses encouragements en toutes circonstances, pour son sourire et sa bonne humeur.*

*J'exprime ma profonde reconnaissance au Professeur **Marie Sarazin** et au Docteur **Julien Lagarde** du service de Neurologie de la Mémoire et du langage de l'hôpital Saint-Anne pour le recrutement des patients, leurs conseils et nos discussions sur ce travail.*

*J'aimerais aussi remercier le Docteur **Pierre Bruhns** et le Docteur **Cécile Delarasse** d'avoir accepté d'être membres de mon comité de mi-thèse. Merci pour toute l'aide apportée, et aussi vos conseils.*

*Je remercie également toutes les personnes avec qui nous avons collaboré scientifiquement : le Docteur **Laura Xicota** et le Professeur **Marie-Claude Potier** de l'institut du cerveau et de la moelle épinière ; le Professeur **Bruno Crestani** du service de Pneumologie A de l'hôpital Bichat et le Docteur **Michel Bottlaender** de l'institut d'imagerie biomédicale.*

*Je tiens à partager des pensées pour **Hélène Corne**, **Adeline Michel** et les infirmières du service de Neurologie de la Mémoire et du langage de l'hôpital Saint-Anne qui nous permis de recruter les patients. Toujours réactives et bien organisées, il fut très agréable de travailler avec vous.*

*Je tiens à remercier **Thomas Chaigneau** pour l'implication dans mon projet, pour toutes ces heures passées devant les paillasses, pour ses conseils et son soutien tout au long de ma thèse.*

*Je tiens également à remercier **Annie Munier** pour ses grandes compétences en cytométrie en flux qui m'ont permis de réaliser l'ensemble de mes études.*

*Je remercie bien évidemment notre petit group « Neutrophiles » : le Docteur **David Weisenburger** pour sa sympathie, ses conseils et son soutien. Merci également à **Julie Dudal** et **Ricardo Ochoa** pour leur amical soutien, ce fut un réel plaisir de les encadrer.*

*Je remercie tout particulièrement mon co-thésard **Yannick Chantran**, mon cher voisin de bureau, qui m'a fait passer cette thèse avec la bonne humeur et m'a aussi appris beaucoup sur le langage français et la statistique biomédicale.*

*Je remercie aussi **Grégoire Stym-Popper** pour toutes ces discussions hilarantes que nous avons pu avoir dans le bureau, pour son soutien et sa bonne humeur communicative.*

*Un grand merci à tous les membres de l'équipe pour leur hospitalité, leur sympathie et leur soutien pendant ces trois années : le Docteur **Cira Dansokho**, **Marine Chapey**, **Salimata Magassa**, **Virginie Puchois**, **Mingli Chou**, **Olivia Cattaneo**, **Mélanie Féroul**, **Fluorian Kruse**, **Alexandre Elabbadi**.*

*Un chaleureux merci à mes parents, qui m'ont toujours soutenu dans toutes mes décisions, ont partagé mes réflexions scientifiques et personnelles et m'ont aidé par leur écoute et leurs conseils.*

*Merci bien sûr à tout mes amis pour votre réconfort, vos conseils, toute l'attention que vous avez eue à mon égard et tous les bons moments partagés ensemble. Un grand merci particulièrement au Docteur **Anastasia Tchoukaev** pour m'avoir toujours écouté et aidé au long de ces trois années de thèse, ton aide précieuse ne sera jamais oubliée.*

*Enfin je voudrais remercier les sujets « anonymes » qui ont accepté de donner de leur temps et un peu de leur sang, sans eux ce travail n'aurait pas été réalisable.*

# Sommaire

Sommaire.....	I
Abréviations.....	V
Liste des illustrations.....	IX
Introduction.....	1
I. La maladie d'Alzheimer (MA) .....	2
I.1. Définition.....	2
I.2. Découverte de la maladie .....	3
I.3. Epidémiologie de la MA.....	3
I.4. Aspect clinique de la MA.....	4
I.4.1. Signes cliniques de la MA.....	4
I.4.2. Diagnostic de la MA.....	6
I.4.3. Différents stades de la MA.....	12
I.5. Physiopathologie de la MA.....	14
I.5.1. Pathologie amyloïde.....	14
I.5.2. Tauopathie.....	19
I.5.3. Les autres pathologies associées à la MA.....	23
I.6. Facteurs de risque de la MA et traitement envisagés.....	24
I.6.1. Facteurs de risque.....	24
I.6.2. Approches thérapeutiques.....	25
II. Les processus inflammatoires au cours de la MA.....	28
II.1. Système nerveux central (SNC) et barrières cérébrales.....	28
II.2. Privilège immunitaire.....	30
II.3. Cellules immunitaires résidentes dans le SNC.....	31
II.3.1. Neurones.....	31
II.3.2. Cellules microgliales ou macrophages résidents du SNC.....	31
II.3.3. Astrocytes.....	32
II.3.4. Oligodendrocytes.....	33
II.3.5. Cellules mononuclées du SNC.....	33
II.4. Réponses immunitaires dans le SNC.....	34

II.4.1. Réponse immunitaire innée.....	34
II.4.1.1. Activation des cellules microgliales.....	34
II.4.1.2. Infiltration de cellules immunes périphériques.....	36
II.4.1.3. Induction de la réponse adaptative.....	37
II.4.2. Réponse immunitaire adaptative.....	38
II.5. Réponses immunitaires au cours de la MA.....	39
II.5.1. Réponses immunitaires innées au cours de la MA.....	39
II.5.2. Réponses immunitaires adaptatives au cours de la MA.....	42
II.6. Inflammation systémique.....	44
II.6.1. Inflammation systémique et neuro-inflammation.....	44
II.6.2. Implication de l'inflammation systémique au cours de la MA.....	46
III. Le polynucléaire neutrophile (PN), au cœur des processus inflammatoires.....	49
III.1. Origine du polynucléaire neutrophile.....	49
III.2. Granules des PN.....	53
III.2.1. Granules azurophiles ou primaires.....	53
III.2.2. Granules spécifiques ou secondaires.....	53
III.2.3. Granules gélatinases ou tertiaires.....	54
III.3. Principales étapes fonctionnelles des PN.....	54
III.3.1. Adhérence à la cellules endothéliale et migration transendothéliale.....	55
III.3.2. Reconnaissance des agents pathogènes par les PN.....	57
III.3.3. Phagocytose des agents pathogènes par les PN.....	59
III.3.4. Destruction des agents pathogènes par les PN.....	60
III.3.4.1. Système indépendant de l'oxygène.....	60
III.3.4.2. Système dépendant de l'oxygène ou explosion oxydative.....	61
III.3.4.3. Système de destruction extracellulaire : NETose.....	63
III.3.5. Production de médiateurs par les PN.....	65
III.3.6. Mort des PN.....	66
III.3.6.1. Apoptose des PN.....	66
III.3.6.2. Nécrose des PN.....	68
III.3.6.3. NETose des PN.....	68
III.3.6.4. Mort associée à l'autophagie des PN.....	68
III.4. Rôle des PN dans la résolution de l'inflammation.....	69
III.4.1. Phase de pro-résolution.....	69

III.4.2. Phase anti-inflammatoire.....	70
III.4.3. Phase de reconstitution tissulaire.....	71
III.5. Hétérogénéité des PN.....	71
III.5.1. Sous-populations des PN associées à l'homéostasie.....	71
III.5.1.1. PN sénescentes ou « âgés ».....	71
III.5.1.2. PN immunosuppresseurs.....	72
III.5.1.3. PN exprimant le marqueur CD177.....	73
III.5.1.4. PN exprimant le récepteur des cellules T.....	73
III.5.1.5. PN exprimant l'olfactoméline-4.....	73
III.5.1.6. PN-DC (cellules dendritiques) hybrides.....	74
III.5.2. Sous-populations des PN associées à des conditions pathologiques.....	74
III.5.2.1. Sous-populations de PN associés aux cancers.....	74
III.5.2.2. PN pro-angiogéniques.....	74
III.5.2.3. « Low Density Granulocytes » (LDG).....	74
III.5.3. Migration réverse des PN.....	75
III.6. Interaction des PN avec les autres de la réponse immunitaire.....	77
III.6.1. Interaction avec les monocytes/macrophages.....	77
III.6.2. Interaction avec les lymphocytes.....	78
III.6.3. Interaction avec les cellules dendritiques.....	79
III.6.4. Interaction avec les cellules NK (Nature Killer).....	79
III.7. Implication des PN au cours de la MA.....	79
III.7.1. Arguments en faveur du rôle des PN.....	79
III.7.2. Etudes antérieures.....	80
III.7.2.1. Etudes des PN au niveau cérébral.....	80
III.7.2.2. Etudes des PN circulants.....	80
Objectifs de travail.....	82
Résultats.....	85
<b>Partie I.</b>	
« Neutrophil hyperactivation correlates with Alzheimer's Disease progression » (Article)...	86

**Partie II.**

Etude phénotypique et fonctionnelle des PN chez les patients atteints de tauopathies en l'absence de plaque sénile et de MA atypique.....116

Discussions et perspectives.....124

Conclusions générales.....138

Références bibliographiques.....141

Annexes.....169

## *Abréviations*

<b>AAC</b>	Angiopathie amyloïde cérébrale
<b>A<math>\beta</math>Os</b>	Amyloid $\beta$ Oligomer soluble
<b>AC</b>	Anticorps
<b>AChE</b>	Acétylcholinestérase
<b>AD</b>	Alzheimer's Disease
<b>ADAM</b>	A disintegrin and metalloprotease
<b>AICD</b>	APP Intracellular Domain
<b>AINS</b>	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
<b>AK5</b>	Adenylate kinase 5
<b>APC</b>	Allophycocyanine
<b>ApoE</b>	Apolipoprotéine E
<b>APP</b>	Amyloid precursor protein
<b>ARF6</b>	ADP-ribosylation factor-6
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BACE</b>	$\beta$ -site APP cleaving enzyme
<b>Bcl2</b>	B-cell lymphoma 2
<b>BHE</b>	Barrière hémato-encéphalique
<b>BHL</b>	Barrière hémato-liquidienne
<b>BIN1</b>	Bridging integrator 1
<b>BPI</b>	Bactericidal/permeability increasing protein
<b>CCL</b>	Chemokine (C-C motif) ligand
<b>CDK</b>	Cyclin-Dependant kinases
<b>CDR</b>	Cinical dementia rating
<b>CEACAM1</b>	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
<b>C/EBP</b>	CCAAT-enhancer-binding protein
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CRIP2</b>	Cysteine rich protein 2
<b>CRP</b>	C-Reactive Protein
<b>CPA</b>	Cellules présentatrices d'antigène
<b>CTLA4</b>	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
<b>CXCL</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand



<b>CXCR4</b>	CXC chemokine receptor 4
<b>DAMPs</b>	Danger-Associated Molecular Patterns
<b>DC</b>	Dendritic cell
<b>DCB</b>	Dégénérescence corticobasale
<b>DHE</b>	Dihydroéthidine
<b>DNF</b>	Dégénérescences fibrillaires
<b>DTX1</b>	Deltex E3 ubiquitin ligase 1
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>Fas</b>	Fatty acid synthase
<b>Fc</b>	Fragment constant
<b>FITC</b>	Isothiocyanate de fluorescéine
<b>fMLP</b>	formyl-Methionyl-Leucyl-Phénylalanine
<b>FROs</b>	Formes réactives de l'oxygène
<b>FTLD</b>	Frontotemporal Lobar Degeneration
<b>G-CSF</b>	Granulocyte Colony Stimulating Factor
<b>GFAP</b>	Glial fibrillary acidic protein
<b>GFI1</b>	Growth factor independent 1
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte and Monocyte-Colony Stimulating Factor
<b>GPI</b>	Glycosyl Phosphatidyl inositol
<b>Grb2</b>	Growth factor receptor bound protein 2
<b>GSK</b>	Glycogen synthase kinase
<b>HSC</b>	Hematopoietic stem cell
<b>ICAM</b>	Inter Cellular Adhesion Molecule
<b>IDE</b>	Insulin-Degrading Enzyme
<b>IL</b>	Interleukine
<b>iNOS</b>	inducible Nitric Oxide Synthase
<b>IRAK</b>	Interleukin-1 receptor associated kinase
<b>IRM</b>	Imagerie par résonance magnétique
<b>ITAM</b>	Immunoreceptor tyrosine-based activation-like motif
<b>JAM-C</b>	Junctional Adhesion Molecule-C
<b>KPI</b>	Kunitz Protease Inhibitor
<b>LRP1</b>	Lipoprotein-Related Protein 1
<b>LCR</b>	Liquide céphalo-rachidien
<b>LRR</b>	Leucine rich repeat

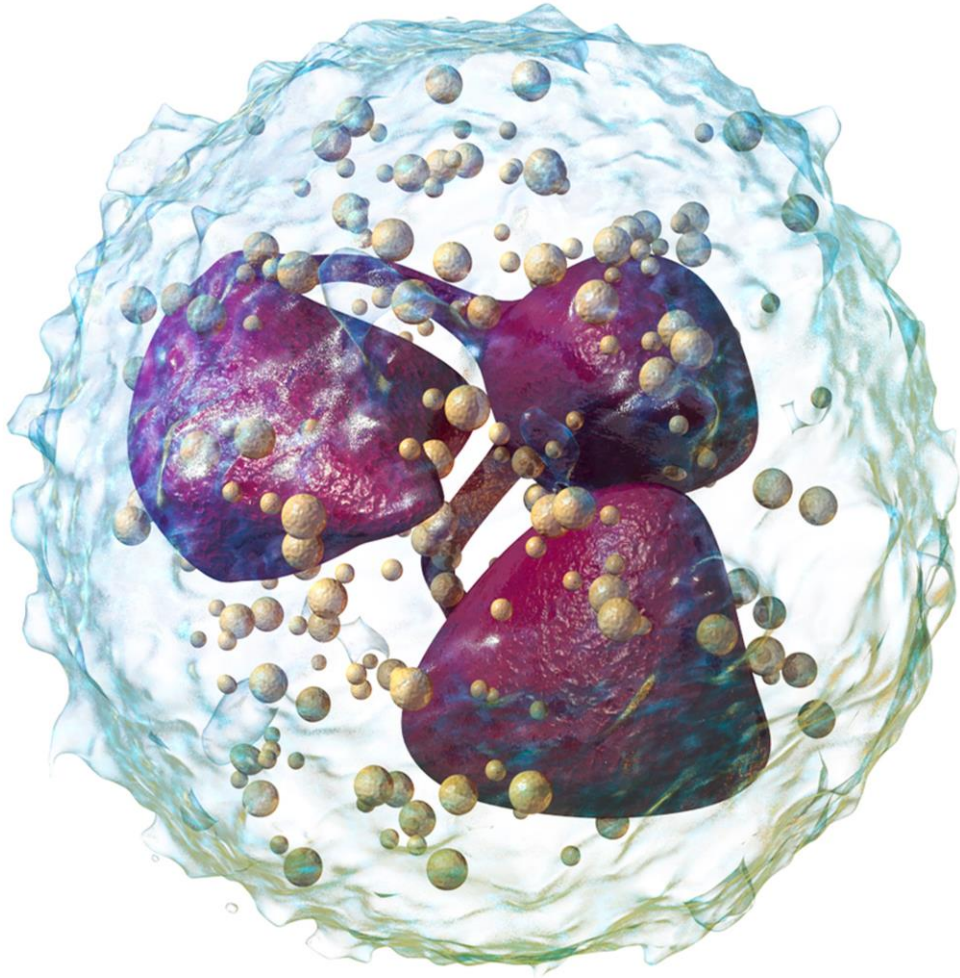
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>LTB4</b>	Leukotriène B4
<b>LXA4</b>	Lipoxine A4
<b>MA</b>	Maladie d'Alzheimer
<b>MAPK</b>	Mitogen Activated Protein Kinases
<b>MAPT</b>	Microtubule-associated proteine Tau
<b>MCI</b>	Mild Cognitive Impairment
<b>Mcl1</b>	Myeloid Cell Leukemia 1
<b>MDA5</b>	Melanoma differentiation associated gene 5
<b>MDSC</b>	Myeloid derived suppressor cells
<b>MIF</b>	Moyenne d'Intensité de Fluorescence
<b>MMP9</b>	Matrix metallopeptidase 9
<b>MMSE</b>	Mini-Mental State Examination
<b>MPO</b>	Myéloperoxidase
<b>NADPH</b>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
<b>NETs</b>	Neutrophil Extracellular Traps
<b>NFAT</b>	Facteur nucléaire des cellules T activées
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear Factor – $\kappa$ B
<b>NGAL</b>	Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin
<b>NLR</b>	Nod-Like Receptors
<b>NK cells</b>	Natural Killer cells
<b>OLFM4</b>	Olfactomedin-4
<b>PAD4</b>	Peptidylarginine deiminases 4
<b>PAMP</b>	Pathogen Associated Molecular Patterns
<b>PBS</b>	Phosphate-Buffered Saline
<b>PD1</b>	Programmed death-1
<b>PE</b>	Phycoérythrine
<b>PECAM</b>	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
<b>PEN</b>	Presenilin enhancer
<b>PHF</b>	Paired helical filaments
<b>PiB</b>	Pittsburg compound B
<b>PICALM</b>	Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein
<b>PKR</b>	RNA-dependent Protein Kinase
<b>PN</b>	Polynucléaire Neutrophile

<b>PRR</b>	Prolin-Riche Region
<b>PRRs</b>	Pattern-Recognition Receptors
<b>PS1</b>	Presenilin-1
<b>PSMB8</b>	Proteasome subunit beta 8
<b>PSP</b>	Paralysie supranucléaire progressive
<b>RAGE</b>	Advanced glycosylation end-product specific receptor
<b>RIG1</b>	Retinoic-acid-inducible protein 1
<b>RLR</b>	RIG1-Like Receptor
<b>ROR</b>	RAR-related orphan receptor
<b>SDF1</b>	Stromal-Derived Factor 1
<b>SEM</b>	Moyenne d'erreur standard
<b>Siglec9</b>	Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 9
<b>SIK1</b>	Salt-inducible kinase 1
<b>SNARE</b>	Soluble Néthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor
<b>SNC</b>	Système Nerveux Central
<b>SOB</b>	Sum of Boxes
<b>SORL1</b>	Sortilin related receptor 1
<b>SYK</b>	Spleen Tyrosine Kinase
<b>TANs</b>	Tumor Associated Neutrophils
<b>TAP1</b>	Transporter associated with antigen processing 1
<b>TEP</b>	Tomographie par émission de positons
<b>TGFβ</b>	Tumor growth factor β
<b>TLR</b>	Toll Like Receptor
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>TRAF</b>	TNF receptor associated factor
<b>TRAIL</b>	TNF-related apoptosis-inducing ligand
<b>Tregs</b>	T régulatrices
<b>TREM2</b>	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
<b>VAMP</b>	Vesicle associated Membrane Proteins
<b>VEGF-A</b>	Facteur de croissance endothélial vasculaire A
<b>3xTg-AD</b>	B6;129-PSEN1tm1Mpm Tg(APP <sup>Swe</sup> ,tau <sup>P301L</sup> )1Lfa-AD mouse
<b>5xFAD</b>	B6SJLTg(APP <sup>Swe</sup> FIL <sup>on</sup> ,PSEN1* <sup>M146L</sup> * <sup>L286V</sup> )6799Vas-AD mouse
<b>7AAD</b>	7-aminoactinomycine D

## *Liste des illustrations*

<b>Figure 1</b> : Lésions neuro-pathologiques de la maladie d'Alzheimer.....	2
<b>Figure 2</b> : Images obtenues par IRM structurale à haute résolution montrant une atrophie hippocampique .....	9
<b>Figure 3</b> : Image obtenue par la technique [ <sup>18</sup> F]Fluorbetaben TEP montrant l'Accumulation du peptide amyloïde au niveau cortical .....	9
<b>Figure 4</b> : Représentation graphique des différents profils biologiques.....	11
<b>Figure 5</b> : Nouveau modèle d'évaluation de l'utilité de biomarqueurs grâce à un partenariat des structures privées et publiques.....	12
<b>Figure 6</b> : Processus du clivage de la protéine précurseur amyloïde et production du peptide amyloïde $\beta$ .....	16
<b>Figure 7</b> : Vue de l'ensemble du gène MAPT et les différentes isoformes.....	20
<b>Figure 8</b> : Sites de phosphorylation de la protéine Tau.....	21
<b>Figure 9</b> : Illustration schématique des barrières cérébrales.....	29
<b>Figure 10</b> : Régulation moléculaire des réponses immunitaires innée par PRRs.....	35
<b>Figure 11</b> : Illustration schématique de l'activation des cellules immunitaires au niveau cérébral au cours des maladies neuro-dégénératives.....	40
<b>Figure 12</b> : Recrutement des cellules immunitaires en réponse aux dommages aigus du SNC.....	45
<b>Figure 13</b> : Dialogues entre les cellules du système immunitaire périphérique et les divers acteurs cellulaires du SNC dans la neuro-inflammation.....	46
<b>Figure 14</b> : Co-morbidités inflammatoires au niveau du SNC.....	47
<b>Figure 15</b> : L'hématopoïèse.....	50
<b>Figure 16</b> : La granulopoïèse de PN et les facteurs de transcription associés.....	51
<b>Figure 17</b> : Illustration schématique du mécanisme d'activation des PN et de principales étapes fonctionnelles.....	55
<b>Figure 18</b> : Les voies de signalisation impliquées dans l'adhérence des PN aux cellules endothéliales.....	56
<b>Figure 19</b> : Voies de signalisation des PRRs exprimés par les PN.....	57
<b>Figure 20</b> : Représentation schématique du complexe NADPH oxydase au seins des PN au repos et des PN activés.....	61

<b>Figure 21</b> : Formation des NETs en réponse à une cellule tumorale.....	63
<b>Figure 22</b> : Deux hypothèses sur la formation des NETs.....	64
<b>Figure 23</b> : La liste des médiateurs libérés par les PN activés.....	65
<b>Figure 24</b> : Représentation schématique de différents types de la migration réverse des PN.....	75
<b>Figure 25</b> : Représentation schématique d'altérations phénotypiques des PN au cours de l'inflammation.....	77
<b>Figure 26</b> : Absence d'anomalie de la production de cytokines par les PN des patients MA.....	92
<b>Figure 27</b> : Corrélation entre les paramètres des PN et les variations des scores MMSE et CDR-SOB.....	94
<b>Figure 28</b> : Expression du CD11b et du CD62L à la surface des PN.....	118
<b>Figure 29</b> : Etude de l'explosion oxydative des PN.....	119
<b>Figure 30</b> : Expression des sous-populations de PN sénescence et immunosuppressive.....	120
<b>Figure 31</b> : Evaluation de la capacité de phagocytose et de l'apoptose spontanée des PN circulants.....	121
<b>Figure 32</b> : Effet du peptide A $\beta$ <sub>42</sub> fibrillaire sur le niveau d'expression du CD11b, CD62L à la surface des PN et la production des FROs.....	122
<b>Figure 33</b> : Effet du peptide A $\beta$ <sub>42</sub> sur les sous-populations des PN.....	123
<b>Figure 34</b> : Corrélation positive entre le pourcentage de PN immunosuppresseurs et le pourcentage de cellules T régulatrices.....	131
 <b>Tableau 1</b> : Expression différente de gènes des PN chez les patients AD-D en comparaison de ceux chez sujets témoins.....	 91



# Introduction

## I. La Maladie d'Alzheimer

### I.1. Définition

La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neuro-dégénérative caractérisée par des altérations destructrices des neurones à l'origine d'anomalies cognitives. Deux types de lésions neuro-pathologiques ont été décrites : les dégénérescences fibrillaires (DNF), correspondant à des dépôts fibrillaires intracellulaires de protéine Tau anormalement phosphorylée, et les plaques séniles, qui correspondent à des dépôts fibrillaires extracellulaires de peptide amyloïde  $\beta$  (**Fig 1**). La maladie est également caractérisée par une atrophie cérébrale et une neuro-inflammation chronique résultant d'une activation des cellules microgliales et des astrocytes entourant les dépôts amyloïdes.

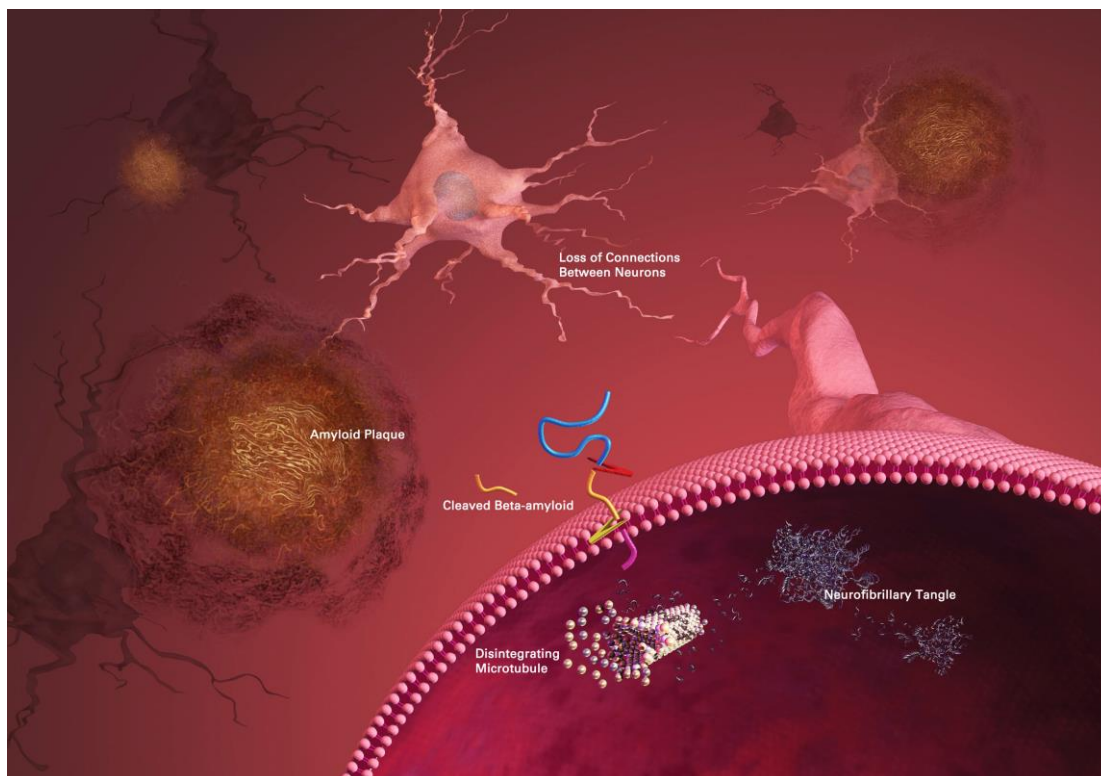


Figure 1 : Lésions neuro-pathologiques de la maladie d'Alzheimer. (Institute nationale de la santé aux Etats-Unis)

Les patients atteints de la MA présentent une évolution progressive et irréversible des lésions neuro-pathologiques entraînant secondairement une atrophie cérébrale et une inflammation neuronale ; ces atteintes conduisent à une atteinte du langage, des fonctions

instrumentales et des fonctions exécutives, aboutissant à la perte d'autonomie au stade de démence (Ballard *et al.*, 2011).

La MA a un impact important non seulement sur les patients et leurs proches, mais également sur la société. Elle constitue donc un problème de santé publique en France comme dans le reste du monde, et est devenue une des priorités dans le domaine de la recherche médicale au niveau national et international

## **I.2. Découverte de la maladie**

Le premier cas de MA a été identifié par, Aloïs Alzheimer neurologue, neuropathologiste et psychiatre allemand, chez une patiente, Auguste D., ayant consulté à l'âge 51 ans. Il a rapporté cette pathologie pour la première fois lors d'une conférence des psychiatres allemands à Tübingen en 1906 ; la même année, Madame D. est décédée en raison des lésions liées à cette pathologie.

D'après les descriptions d'Aloïs Alzheimer, la patiente présentait lors de son admission des troubles émotionnels et une désorientation spatiale. Le déficit cognitif est apparu secondairement, ainsi que les troubles du langage alors que son état se détériorait rapidement. Durant la dernière année de sa vie, la patiente est devenue complètement apathique. L'examen post-mortem du cerveau a révélé une atrophie importante et a mis en évidence la présence de deux lésions, qui sont connues à ce jour à savoir les plaques séniles et les dégénérescences fibrillaires (DNF) (Burnes *et al.*, 2002).

Malgré les publications de Fisher et d'Alzheimer, la maladie a été considérée comme une pathologie survenant chez les sujets jeunes jusqu'aux années 1960-70. Mais les travaux remarquables des cliniciens ont permis de définir un processus neuro-pathologique différent de celui associé au vieillissement normal. Les critères et tests spécifiques de l'évolution de la MA ont été décrits. Cependant, l'origine physiopathologique de cette maladie reste mal connue, ce qui freine les avancées en termes de stratégies de diagnostic et de traitements efficaces.

## **I.3. Epidémiologie de la MA**

Le déclin progressif des fonctions cognitives est le mot clé pour décrire la démence, les causes les plus fréquentes de démence sont la maladie d'Alzheimer (MA, 50-75%), les



démences vasculaires (DV, 20-30%), les démences fronto-temporales incluant la maladie de Parkinson (DFT, 5-10%) et la démence à corps de Lewy (DCL, <5%). (World Alzheimer's Disease report 2014, Alzheimer's Disease International).

A ce jour, plus de 47 millions personnes du monde entier sont atteints de démence. Le nombre atteindra 131 millions en 2050 du fait du vieillissement de la population mondiale (World Alzheimer's Disease report 2017, Alzheimer's Disease International). Par conséquent, le nombre de démences liées à la MA est estimé à environ 65,5 à 98,25 millions en 2050. D'après les informations publiées par l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), plus de 3 millions de personnes en France sont affectées par la MA à ce jour, dont plus de 850 000 montrent des symptômes de la MA. Le chiffre s'élève à 225 000 nouveaux cas par an dans le territoire français. Ces chiffres de prévalence devraient globalement doubler dans vingt prochaines années en raison du vieillissement de la population.

La démence est un problème mondial. A l'heure actuelle, les pays développés comptent le plus grand nombre de cas de démence. Parallèlement dans les pays sous-développés, l'amélioration des soins de santé permet d'augmenter l'espérance de vie. La proportion de personnes âgées contribue donc à augmenter la prévalence de la démence qui explosera dans les prochaines années. Faute de moyens financiers, d'outils technologiques, et de personnels formés, il est plus difficile de faire le diagnostic et d'assurer la prise en charge des patients dans les pays pauvres ou les pays en voie de développement.

La MA a un impact économique important dans la société. Le coût lié à la MA inclue principalement les dépenses de suivi médical, l'hospitalisation, l'aide sociale, ainsi que l'aide à la famille et aux proches qui sont toutefois difficiles à estimer. Le montant mondial atteint 436 milliards euros dont l'essentiel concerne les pays européens et de l'Amérique du Nord. Néanmoins les dépenses sont sous-estimées dans les pays sous-développés et devraient probablement augmenter le coût de façon importante dans le futur.

## **I.4. Aspect clinique de la MA**

### **I.4.1. Signes cliniques de la MA**

Sur le plan clinique, la MA est identifiée et diagnostiquée par les manifestations cliniques suivantes (Dubois *et al.*, 2007) :

#### I.4.1.1. Un affaiblissement de la fonction cognitive

Les patients atteints de MA ont des difficultés à apprendre de nouvelles informations, à retenir les informations apprises antérieurement, ou à retrouver les objets stockés dans différents endroits. Cette altération de la mémoire est présente depuis au moins six mois. Les patients montrent une altération de la mémoire épisodique qui est une forme de mémoire à court terme. Cet affaiblissement de la mémoire épisodique ne peut pas être normalisé même si les patients reçoivent les informations effectivement encodées. Au cours de la progression de la maladie, d'autres changements cognitifs pourront apparaître associés à l'altération de la mémoire épisodique. En même temps, les patients rapportent avoir du mal à planifier, organiser et exécuter des tâches complexes, surtout les doubles tâches. Les patients atteints de MA démontrent des difficultés d'expression ou/et de compréhension orale, écrite ou gestuelle. Comme décrit chez la première patiente de MA suivie par le Dr Alois Alzheimer, les dysfonctions cérébrales altèrent les capacités des patients à distinguer l'orientation ou la position relative dans l'environnement, même avec des objets de référence. Les patients manifestent parallèlement, dans la vie quotidienne, des changements d'humeur et de personnalité, tels que la crainte et la dépression.

#### I.4.1.2. Une altération des fonctions d'exécution

Les patients atteints de la MA ont du mal à raisonner, planifier, organiser et exécuter des tâches complexes. Les fonctions exécutives peuvent être atteintes aux stades précoces de la maladie.

#### I.4.1.3. L'agnosie et l'aphasie

La capacité à reconnaître et à saisir la signification d'un objet par l'un des sens est altérée. La perturbation du langage affecte l'expression ou la compréhension orale ou écrite. Elle survient en dehors de tout déficit sensoriel, ou de dysfonctionnement de la musculature laryngopharyngée.

#### I.4.1.4. Trouble dans les fonctions visio-spatiales

L'altération des fonctions mentales permettant la distinction par la vue de la position relative des objets est observée chez les patients de la MA.

#### I.4.1.5. Changement d'humeur et de personnalité

Les patients atteints de la MA souffrent d'apathie et/ou de dépression ce qui perturbe leurs les activités sociales.

#### I.4.2. Diagnostic de la MA

La maladie d'Alzheimer est sous-diagnostiquée. Il est notamment difficile de faire le diagnostic différentiel entre une MA précoce et une symptomatologie liée au vieillissement normal. D'autre part, les sujets consultant pour des troubles cognitifs sont souvent au stade symptomatique de la maladie (MCI : Mild Cognitive Impairment) (Cantegreil-Kallen *et al.*, 2004).

Depuis les années 1980, les chercheurs ont décrit avec plus de précision les troubles associés à la MA, permettant ainsi de déterminer des critères de diagnostic. Ainsi, le diagnostic de la MA repose sur des critères définis par le Manuel Diagnostic et Statistiques des Troubles Mentaux (DSM-5) de l'Association Américaine de Neuropsychologie (Sachdev *et al.*, 2014; Simpson 2014) et le « National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Associations » (NINCDS-ADRDA). Ces deux systèmes sont mis à jours régulièrement. Ils proposent une procédure en 2 étapes : classement des sujets selon la sévérité des troubles cognitifs, et par la suite recherche de l'étiologie permettant de poser un diagnostic possible, probable ou certaine. De nouveaux critères IWG-2 basés sur les anomalies cérébrales au niveau clinique, biomédical et métabolique chez les patients atteints de MA ont été proposés (Dubois *et al.*, 2014).

Un diagnostic le plus précoce possible associé à une intervention précoce reste le point majeur de la recherche actuelle soulignant l'intérêt de découvrir de nouveaux bio-marqueurs diagnostics et prédictifs (World Alzheimer's Disease report 2014, Alzheimer's Disease International).

##### I.4.2.1. Evaluation neuropsychologique

Le but de l'examen neuropsychologique est d'évaluer chacune des conditions cognitives, telles que les fonctions cognitives globales, la mémoire épisodique, la mémoire sémantique, les fonctions exécutives, l'attention et les fonctions instrumentales (<https://www.has-sante.fr>). Cette évaluation est réalisée par les gériatres ou les neuropsychologues dans le service lors de la consultation des sujets. Les tests utilisés dans le

cadre de l'évaluation neuropsychologique permettent d'établir un profil cognitif des sujets qui est utile pour les cliniciens afin de préciser les atteintes cérébrales chez les sujets.

#### I.4.2.1.1. Mini-Mental State Examination (MMSE)

Le test MMSE ou test Folstein est un des tests largement utilisé dans l'évaluation des conditions cognitives. Ce test a été rapporté pour la première fois par Marshal Folstein en 1975. Il comprend trente questions et chaque réponse correcte apporte un point. Le score maximum est donc de 30 points (Folstein *et al.*, 1975). Plus le score est proche de 0, plus l'état de démence du patient est avancé. Un score  $26 > \text{MMSE} > 19$  suggère une démence légère, un score de  $18 < \text{MMSE} < 11$  suggère une démence modérée, un score de  $10 < \text{MMSE} < 0$  suggère une démence sévère (Folstein *et al.*, 1975; Cockrell and Folstein 1988; Derouesné *et al.*, 1999). Mais ce test comporte des limites et est considéré comme un test rapide et général. En effet, les scores finaux sont facilement influencés par le contexte culturel et social des patients. Une combinaison avec d'autres tests est donc conseillée afin d'augmenter la précision des résultats (Mitchell 2009).

#### I.4.2.1.2. Clinical dementia rating (CDR)

Développé pour la première fois en 1976, le CDR est principalement utilisé afin de détecter et classifier la sévérité chez les sujets atteints de démence, surtout en cas de MA. Le test contient six paramètres : la mémoire, l'orientation spatio-temporelle, le jugement et la résolution des problèmes, le comportement socioprofessionnel, le comportement à la maison et l'hygiène personnelle. Chaque paramètre est noté indépendamment et le score de la synthèse correspond à un niveau de sévérité : CDR=0 (pas de démence), CDR=0,5 (démence très légère, stade MCI), CDR=1 (démence légère), CDR= 2 (démence modérée), CDR= 3 (démence sévère) (Lima *et al.*, 2017). Le score de ces six domaines peut être additionné comme CDR Sum of Boxes ou CDR-SOB qui est récemment utilisé d'évaluer la sévérité des patients au stade précoce (Cedarbaum *et al.*, 2013).

D'autres tests permettant d'explorer des fonctions cognitives particulières, altérées lors de la MA, peuvent également être utilisés au cours de l'examen neuropsychologique, tels que le test Rey-Osterrieth Complex Figure (RCFT, Baerresen *et al.*, 2015) , le test Buschke Selective Reminding (SRT, Venneri *et al.*, 2011) et l'épreuve des 5 mots (Dubois *et al.*, 2002).

Pour information, l'ensemble de ces test ne permet pas de faire un diagnostic certain

de la MA.

#### I.4.2.2. Imagerie cérébrale

Seule l'analyse post-mortem des cerveaux des patients atteints de MA permet de faire un diagnostic définitif. En revanche, elle donne peu ou pas d'informations concernant la localisation des premières lésions ni leur progression dans le cerveau. Des techniques d'imageries permettent quant à elles de répondre à cette problématique.

Les techniques les plus largement utilisées sont l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomographie par émission de positons (TEP). Ce sont des techniques non invasives permettant de détecter les lésions *in vivo*, pratiquées dans le diagnostic et le suivi des patients de la MA.

##### I.4.2.2.1. Imagerie structurale, IRM (Imagerie par résonance magnétique)

L'IRM permet de détecter des altérations au niveau de la substance blanche et grise. Elle permet d'évaluer *in vivo* la perte neuronale dans des régions cérébrales spécifiques impliquées dans la MA, telles que l'hippocampe ou le cortex entorhinal qui sont des régions cérébrales clés pour la fonction du langage et de la mémoire chez l'homme (Bobinski *et al.*, 2000). Les anomalies détectées sont considérées comme un bio-marqueur des lésions neuronales chez les sujets atteints de MA (Dubois *et al.*, 2014). Grâce aux technologies non-invasives de l'imagerie comme l'IRM et la TEP, l'atrophie au niveau cérébral est détectée chez les patients. Cette atrophie concerne la région hippocampique, le cortex, ou l'amygdale qui sont des régions cérébrales clés pour la fonction du langage et de la mémoire chez l'homme. De plus, l'atrophie cérébrale détectée par l'IRM, est associée à la sévérité de la maladie. Chez les patients au stade précoce qui présentent déjà des atteintes de la mémoire, l'atrophie cérébrale est localisée uniquement dans le cortex cingulaire postérieur et le cortex orbitofrontal. Au cours de l'évolution de la maladie, alors que le déclin cognitif touche le langage et la fonction exécutive, l'IRM détecte une atrophie qui s'étend au niveau hippocampique et du lobe frontal (**Fig 2**) (Del Sole *et al.*, 2016).

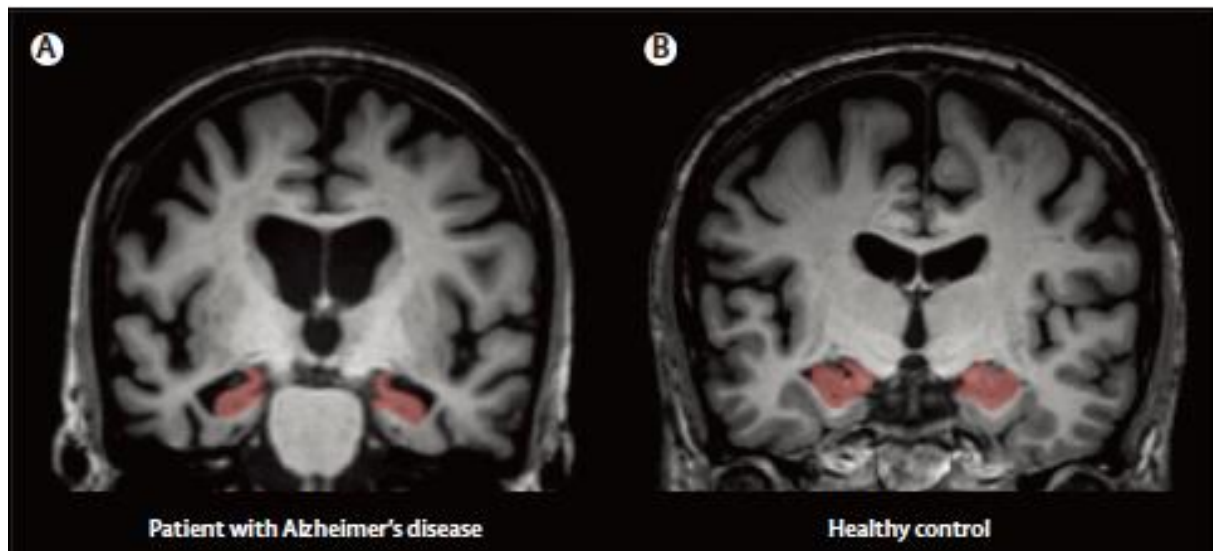


Figure 2 : Images obtenues par IRM structurale à haute résolution montrant une atrophie hippocampique chez un patient atteint de la MA (A) par rapport à un témoin apparié en âge (B) (Teipel *et al.*, 2015).

#### I.4.2.2.2. Imagerie fonctionnelle, TEP (Tomographie par émission de positons)

Cette technique permet d'augmenter la précision du diagnostic et de détecter de faibles modifications dans le cerveau (Dukart *et al.*, 2011). Elle utilise des molécules biologiquement actives et faiblement radio-marquées. Elle permet d'identifier des interactions biologiques *in vivo*.

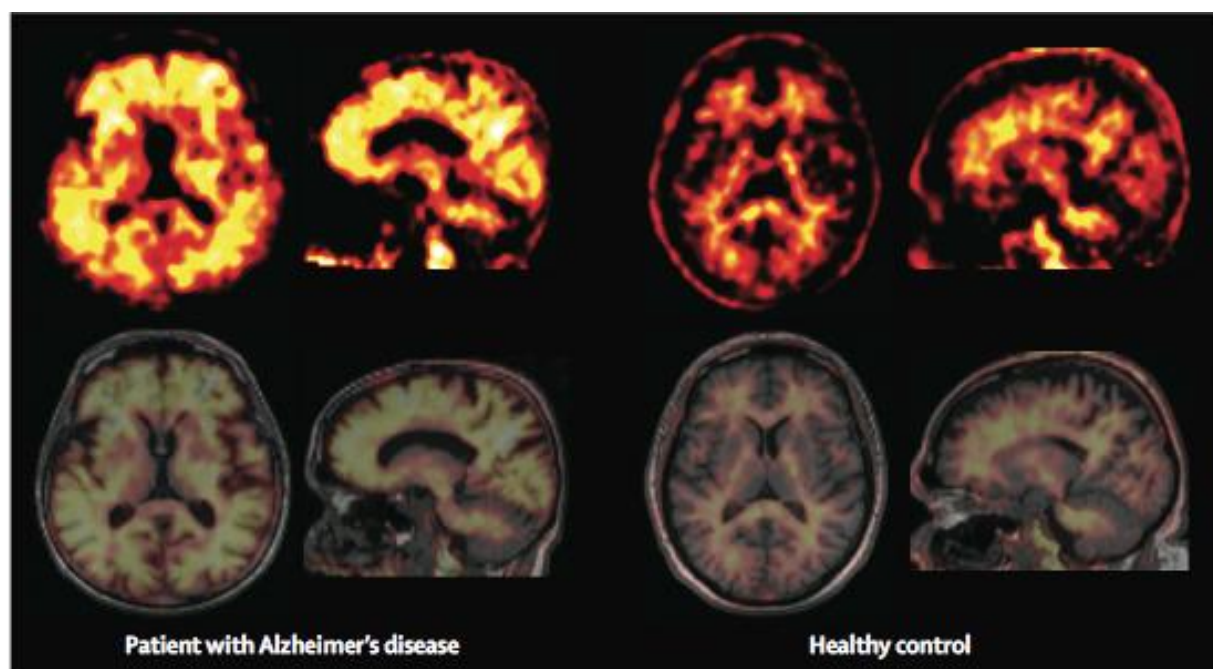


Figure 3 : Image obtenue par la technique [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorbetaben TEP montrant l'accumulation du peptide amyloïde au niveau cortical chez un patient atteint de la maladie (à gauche) en comparaison avec un sujet contrôle sain (à droite) avec le marqueur (Teipel *et al.*, 2015).

En tant qu'un analogue du glucose, le [ $^{18}\text{F}$ ] FDG permet de donner des informations sur le métabolisme du glucose au niveau cérébral qui est un reflet de l'activité synaptique. En effet, dans notre cerveau, la glycolyse aérobie est la source principale d'énergie pour soutenir les activités biologiques des neurones (Vlassenko *et al.*, 2015). Une baisse du métabolisme du glucose reflète une perte neuronale est caractéristique de la MA.

Le  $^{11}\text{C}$ -PIB (Pittsburg compound B) se fixe sur des dépôts fibrillaires amyloïdes ainsi qu'à d'autres lésions contenant le peptide amyloïde  $\text{A}\beta$  telles que l'angiopathie amyloïde cérébrale. Ce composé se lie préférentiellement aux peptides amyloïdes sous formes des fibrilles et permet donc de visualiser la charge amyloïde qui est 2 à 3 fois plus importante chez les patients par rapport aux témoins appariés en l'âge (Klunk *et al.*, 2003). Un autre marqueur de la charge amyloïde, le [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorbetaben se lie aux plaques séniles  $\beta$ -amyloïdes dans le cerveau. In vitro, le [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorbetaben présente une affinité nanomolaire pour les fibrilles  $\beta$ -amyloïdes synthétiques et pour l'homogénat de cerveau atteint de la MA (**Fig 3**).

De la même manière, d'autres ligands ont été développés pour suivre la progression des dégénérescences fibrillaires en ciblant les formes pathologiques de protéine Tau. Le marqueur idéal doit se lier spécifiquement aux protéines Tau et posséder une forte capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique. Le marqueur  $^{18}\text{F}$ -AV-1451 est désormais utilisé afin d'évaluer la progression de la maladie (Mattsson *et al.*, 2018).

#### I.4.2.3. Bio-marqueurs

L'analyse des bio-marqueurs dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) permet d'augmenter la précision du diagnostic au stade précoce de la maladie. Le LCR étant directement en contact avec l'espace extracellulaire du cerveau, le niveau de l'expression de ces bio-marqueurs reflète donc l'altération ou la modification physiologique et pathologique du système nerveux central lui-même.

À ce jour, chez les patients atteints de la MA, il existe trois bio-marqueurs clés dans LCR. Ce sont les peptides  $\text{A}\beta_{1-42}$  ( $\text{A}\beta_{42}$ ), la protéine Tau (T-Tau) totale et la protéine Tau



phosphorylée (P-Tau) (Charidimou *et al.*, 2018). Une expression anormalement faible de l' $A\beta_{42}$ , associée à une expression élevée de la T-Tau et la P-Tau, et surtout un ratio plus important T-Tau/ $A\beta_{42}$  ou P-Tau/ $A\beta_{42}$ , ont été observés chez les patients de la MA par rapport aux témoins appariés en âge. La sensibilité et la précision atteignent 85% dans les cas cliniques (Olsson *et al.*, 2016). Le rapport du peptide  $A\beta_{42}$  sur la protéine T-Tau, nommé comme « IATI » (« Innotest Amyloïde Tau Index », ratio  $A\beta_{1-42}/(240 + 1,18 \times \text{tau})$ ) nous permet d'avoir quatre profils biologiques ; le profil biologique de la MA correspond à un IATI bas (<1), associé à une valeur élevée de Tau phosphorylées (**Fig 4**) (Dumurgier *et al.*, 2014).

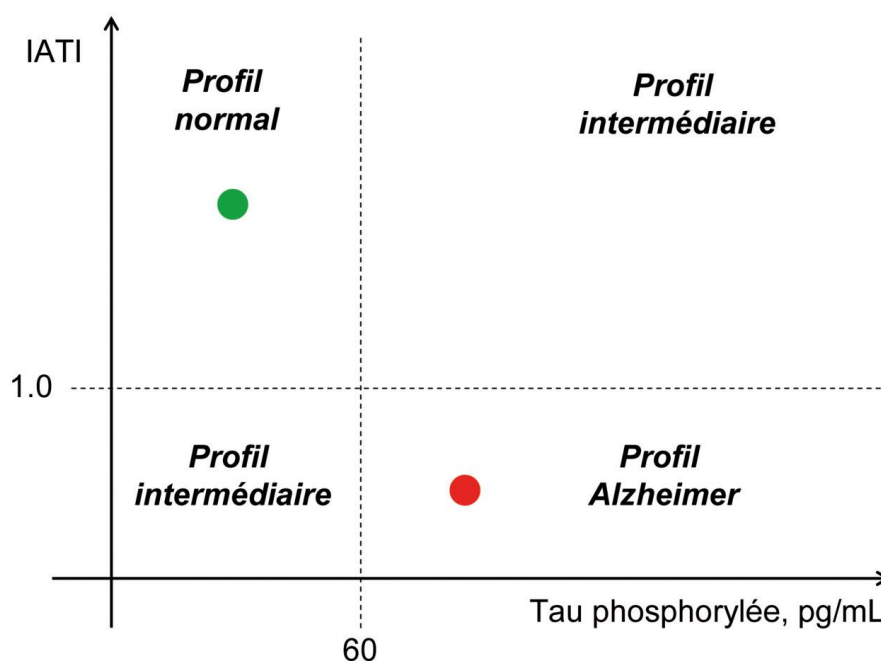


Figure 4 : Représentation graphique des différents profils obtenus en fonction des taux de biomarqueurs dans le LCR (Dumurgier *et al.*, 2014)

D'autres marqueurs du LCR ont été développés afin d'améliorer le diagnostic de MA au stade précoce. Par exemple, la protéine PKR (RNA-dependent Protein Kinase) est une kinase ubiquitaire et pro-apoptotique. La PKR sous la forme phosphorylée s'accumule dans les neurones en dégénérescence au cours de la MA. Dans une étude longitudinale, une forte concentration de la PKR phosphorylée détectée au début de l'inclusion des patients était prédictive d'un déclin cognitif plus rapide (Hugon *et al.*, 2009). Un marqueur des cellules microgliales et des astrocytes, YKL-40 (aussi appelée Chitinase-3-like 1, CHI3L1), a été également proposé; en effet, une méta-analyse a mis en évidence une augmentation de ce



marqueur chez les patients MA, particulièrement chez les patients atteints de formes très légères de la maladie (Olsson *et al.*, 2016).

À part les bio-marqueurs du LCR, de plus en plus d'attention a été portée sur l'identification de bio-marqueurs sanguins. Contrairement au LCR, le sang présente l'avantage d'être plus facile à prélever chez les patients et les sujets contrôles. Même si certaines protéines plasmatiques ( $A\beta_{42}$ , Apo-A1, A2M) sont associées à la charge amyloïde, aucun bio-marqueur sanguin n'a été validé à ce jour. Très récemment, un modèle coopératif a été proposé en prenant en compte plusieurs concepts pour la découverte des biomarqueurs sanguins et leur utilisation en clinique (**Fig 5**). Ce modèle, établi avec des partenaires académiques et industriels, fournit un paradigme clair et utile pour le développement des biomarqueurs sanguins pour la MA et d'autres maladies neuro-dégénératives (O'Bryant *et al.*, 2017).

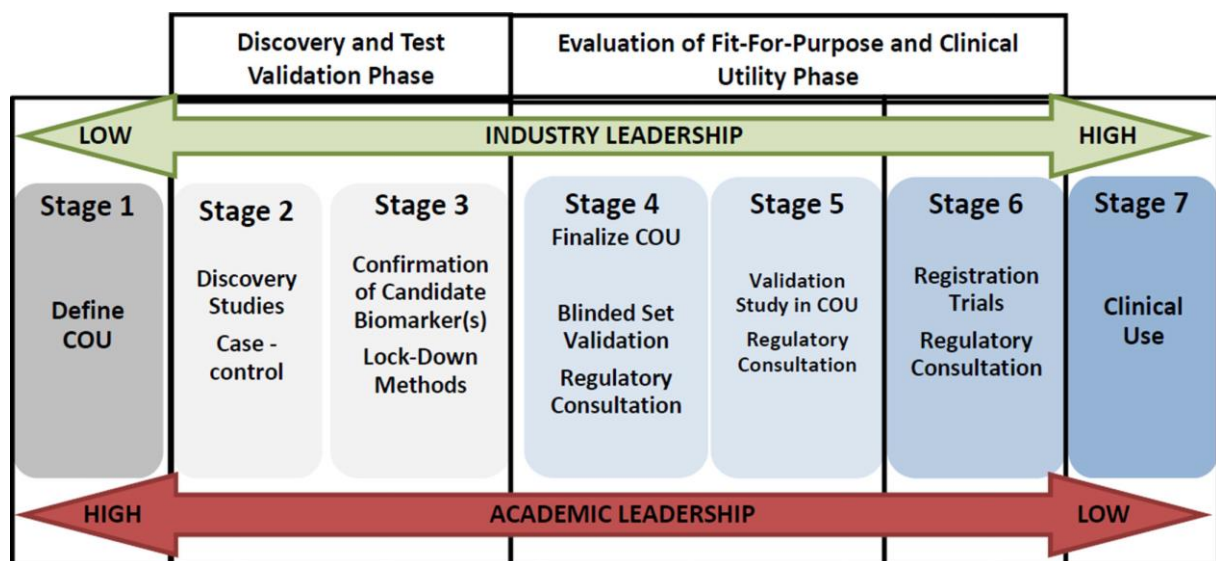


Figure 5 : Nouveau modèle d'évaluation de l'utilité de biomarqueurs grâce à un partenariat des structures privées et publiques (O'Bryant *et al.*, 2017).

#### I.4.3. Différents stades de la MA.

À l'aide des tests neuropsychologiques, de l'imagerie cérébrale ainsi que du dosage des bio-marqueurs du LCR, un profil complet du patients atteint de MA peut être établi permettant de distinguer les différents stades de cette maladie :

#### I.4.3.1. Stade asymptotique (« Clinical Dementia Rating », CDR=0)

Les sujets à ce stade présentent des signes d'accumulation du peptide amyloïde sur l'imagerie cérébrale par TEP et/ou un taux faible de peptide  $A\beta_{42}$  au niveau du LCR. Par contre, il n'existe pas de neuro-dégénérescence, ni de troubles cognitifs (Sperling *et al.*, 2011). C'est la phase la plus longue de la maladie ; elle commence plusieurs dizaines d'années avant l'apparition des symptômes. Il est donc important de trouver des outils de prédiction de la transition du stade asymptotique au stade suivant (MCI). Dans une étude préliminaire, un algorithme utilisant des variables facilement accessibles auprès des praticiens (âge, sexe, nombre d'années d'études, statut marital, historique médical, etc.) a permis de générer des scores de prédiction afin de prédire la conversion du stade asymptotique au stade prodromal (Pankratz *et al.*, 2015). Par ailleurs, des bio-marqueurs du LCR tels que la préséniline 1 (PS1), dont la sa mutation induit la surproduction du peptide amyloïde, à l'origine des formes familiales de la MA, pourraient permettre le diagnostic de la maladie dès le stade asymptotique. En effet, l'altération des complexes PS1 est fréquemment retrouvée en cas de MA génétique ou sporadique et une augmentation des complexes stables de la PS1 dans le LCR pourrait constituer un bio-marqueur de la maladie au stade asymptotique (Sogorb-Esteve *et al.*, 2016).

#### I.4.3.2. Stade MCI (« Mild Cognitive Impairment », CDR=0,5)

Au cours du stade MCI, les patients présentent des déficits cognitifs légers. Plusieurs formes de MCI ont été décrites : MCI amnésiques purs, MCI avec altération de plusieurs fonctions cognitives (y compris la mémoire), MCI avec plusieurs déficits cognitifs sauf la mémoire (Petersen *et al.*, 2014). Plusieurs paramètres, dont la fonction cognitive, l'âge, le langage, la mémoire, les fonctions visio-spatiales, la vie quotidienne, et la vie sociale sont pris en compte par le clinicien afin de pouvoir diagnostiquer de la façon la plus précise possible les patients à ce stade, ce diagnostic restant toutefois difficile.

Certains patients MCI restent stables et ne développeront jamais de syndromes démentiels, tandis que d'autres développent une démence. Un groupe Japonais a annoncé avoir développé un système diagnostique assisté par ordinateur qui analyse les données issues de l'IRM structurale pour pouvoir prédire la progression du stade MCI vers la démence entre un et trois ans avant la confirmation par le diagnostique clinique (Beheshti *et al.*, 2017).

### I.4.3.3. Stade de la démence

Cette phase est facilement identifiable. Le patient présente des troubles cognitifs multiples et sévères qui ne lui permettent pas de réaliser les travaux quotidiens au cours de sa vie personnelle ou sociale. A ce stade, la vitesse d'évolution de la maladie est difficile à déterminer. Cette vitesse de la progression pourrait être influencée par différents paramètres comme l'âge, le sexe, l'éducation...

## I.5. Physiopathologie de la MA

Les lésions de la MA associent l'accumulation de certaines protéines, des pertes de neurones et de synapse, et des altérations liées à des processus réactionnels. Les modèles animaux, ont permis d'identifier deux manifestations neuro-pathologiques principales : les plaques séniles dues à des dépôts du peptide amyloïde A $\beta$  à l'extérieur des neurones, et les dégénérescences neuro-fibrillaires formées par des agrégats intracellulaires de protéines Tau hypersphosphorylées.

### I.5.1. Pathologie amyloïde

Ayant été identifiée depuis 1984 (Glennner *et al.*, 1984), une surproduction du peptide amyloïde A $\beta$  est favorable à la formation des plaques séniles susceptibles de déclencher la cascade pathologique de la MA et contribuer à d'autres pathologies liées à cette maladie. Une piste traditionnelle de traitement consiste à agir sur la pathologie liée au peptide A $\beta$ , en diminuant sa production et en augmentant sa clairance par immunothérapie active ou passive afin de réduire la formation des plaques.

#### I.5.1.1. Protéine précurseur amyloïde (« Amyloid Precursor Protein » ou APP)

La pathologie amyloïde est caractérisée par des agrégats extracellulaires principalement constitués des peptides amyloïdes A $\beta$ . Les peptides A $\beta$  sont issus du catabolisme de la protéine précurseur amyloïde. Cette dernière et ses homologues APLP1 et APLP2 (« Amyloid Precursor Like Protein ») sont des glycoprotéines de type I présentant une large portion extracellulaire, un domaine transmembranaire et une partie C-terminale appelée APP Intracellular Domain (AICD) (Lamb *et al.*, 1993).

Le gène codant pour l'APP humaine se trouve sur le chromosome 21 et contient environ 290586 pb de l'ADN génomique. Par différents épissages, nous pouvons générer

environ dix isoformes de la protéine APP de longueur variable qui couvrent 639-770 acides aminés (aa). Le nom des différentes isoformes est désigné en fonction du nombre d'acides aminés (aa) qu'elles contiennent. Les isoformes les plus connues qui sont générées par clivage séquentiel réalisé par les  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétases sont l'APP695, l'APP751 et l'APP770. Ces deux dernières sont exprimées préférentiellement dans les cellules non-neuronales, tandis que l'APP 695 est surtout exprimée dans les neurones. Les trois isoformes partagent une structure protéique conservée contenant un grand domaine extracellulaire, un petit domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique (Muresan *et al.*, 2015). Cependant, l'APP751 et l'APP770 contiennent un domaine de type Kunitz dans la région extracellulaire qui inhibe la protéase sérine (Kunitz Protease Inhibitor, domaine KPI) et qui est absent dans l'APP695. A part ce domaine KPI, l'APP770 contient en parallèle un domaine d'homologie avec l'antigène MRC-OX2 (Haass *et al.*, 1991).

L'absence ou la présence des domaines KPI et OX2 influence la fonctionnalité des isoformes. Une augmentation de l'expression de l'APP 770 dans le cortex occipital et temporal, parallèlement à l'augmentation observée dans l'hippocampe chez les patients de la MA montre que le domaine KPI pourrait induire le catabolisme aberrant de l'APP et favoriser l'accumulation de l'A $\beta$  au niveau cérébral (Tanaka *et al.*, 1988). D'ailleurs, comme l'activation des récepteurs à NMDA (N-méthyl-D-aspartate) ou NMDARs (les NMDARs sont impliqués dans des processus de plasticité synaptique, donc de mémoire) pourrait induire une expression variable de l'APP en fonction de leur locations cellulaires, plusieurs études ont été récemment lancées sur l'impact des NMDARs sur la production de peptide A $\beta$  (Green *et al.*, 2008). D'après les résultats obtenus, l'activation des NMDARs extra-synaptiques peut augmenter l'expression du peptide A $\beta$  via une induction du domaine KPI (Bordji *et al.*, 2010). Des altérations au cours de l'épissage de l'APP pourraient par conséquent, induire une expression altérative du peptide A $\beta$  qui contribue à la pathogénèse de la MA.

#### I.5.1.2. La génération du peptide A $\beta$ et des dépôts amyloïdes

Le peptide A $\beta$  est connu comme le produit protéolytique de l'APP après que l'APP ait été transloquée dans le réticulum endoplasmique. L'APP subit un clivage de façon séquentielle par différentes sécrétases ( $\alpha$ -/ $\beta$ -/ $\theta$ -/ $\eta$ -/ $\gamma$ -sécrétase). Ce processus est divisé en deux voies en fonction du produit obtenu après le clivage : voie non-amyloïdogène et voie amyloïdogène.

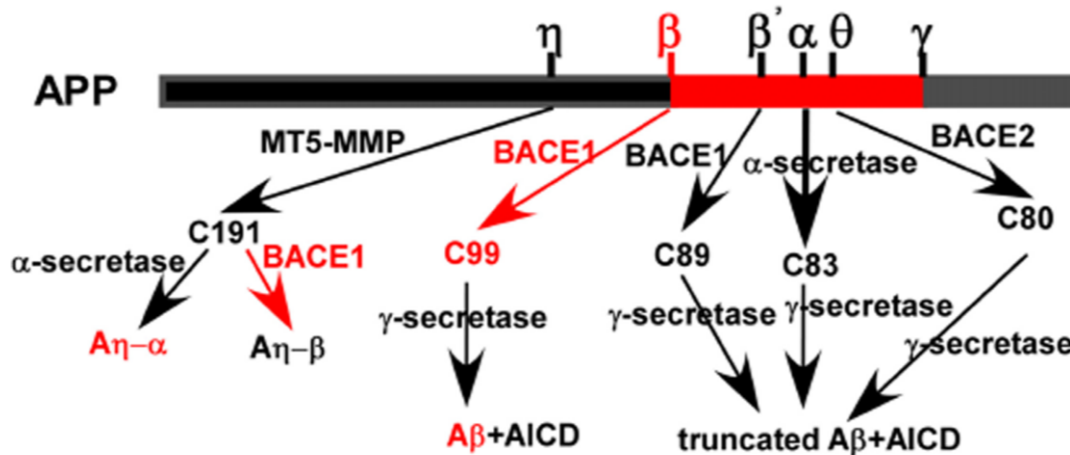


Figure 6 : Processus du clivage de la protéine précurseur amyloïde (APP) et production du peptide amyloïde  $\beta$  ( $A\beta$ ) (Wang *et al.*, 2017).

La majorité de l'APP procède par la voie non-amyloïdogène, qui est associée au clivage entre les acides aminés lysine16 et leucine17 par l' $\alpha$ -sécrétase afin de générer un fragment N-terminal soluble (sAPP $\alpha$ ), ainsi qu'un fragment C-terminal de 83 acides aminés (C83). Ce dernier est ensuite clivé par la  $\gamma$ -sécrétase pour libérer un fragment court de 3 kDa (P3) et un domaine intracellulaire APP (AICD). Le clivage réalisé par l' $\alpha$ -sécrétase se déroule à la membrane plasmique et son activité est principalement régulée par trois membres de la famille ADAM (« A disintegrin and metalloprotease ») : ADAM9, ADAM10, ADAM17 (Sisodia 1992). De nombreuses études montrent un rôle neuro-trophique et synapto-trophique du fragment sAPP $\alpha$  et son implication dans des mécanismes de régulation cellulaire (Taylor *et al.*, 2008). En outre, comme montré dans la figure 6, l'enzyme BACE2 ( $\beta$ -site APP cleaving enzyme 2) est une  $\theta$ -sécrétase, qui est impliquée dans le clivage de l'APP sans production du peptide  $A\beta$  (Liu *et al.*, 2013).

D'autres APPs par la voie amyloïdogène, sont clivées par la  $\beta$ -sécrétase (également appelée BACE1 ( $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1) de façon compétitive avec l' $\alpha$ -sécrétase sur les sites Asp1 et Glu11. Ce dernier est le site préférentiel du clivage par la  $\beta$ -sécrétase au niveau du réseau Trans-Golgien, en produisant un fragment APP soluble (sAPP $\beta$ ) et un fragment C-terminal contenant 99aa (C99), qui est par la suite clivé par la  $\gamma$ -sécrétase. Ce clivage séquentiel libère le fragment AICD, et des peptides  $A\beta$  de différentes tailles entre 38 à 43 aa, dont les peptides essentiels sont l' $A\beta_{40}$  et l' $A\beta_{42}$  (Deng *et al.*, 2013).

La  $\gamma$ -sécrétase est un complexe protéique constitué de l'« anterior pharynx defective 1 » (Aph1), la « presenilin enhancer » 2 (PEN2), la nicastrine et les présénilines 1 et 2 (PSEN1 et PSEN2). Les présénilines sont les unités catalytiques de base de la  $\gamma$ -sécrétase, tandis que la nicastrine et la PEN2 servent à réguler la maturation et la stabilisation de ce complexe. Les mutations des gènes PSEN1, PSEN2 ou APP, à l'origine des formes familiales aboutissent à la surproduction de l'A $\beta$  altèrent le métabolisme de l'APP et/ou la longueur du peptide A $\beta$  généré, aboutissant à une surproduction de formes pathogènes (Moore *et al.*, 2015).

Les stratégies ciblant à la  $\gamma$ -sécrétase ont été développées afin d'inhiber la génération de l'A $\beta$ . En revanche, aucune n'a été administrée à ce jour en pathologie clinique (Godyn *et al.*, 2016).

La métalloprotéinase matricielle de type à la membrane est révélée afin de cliver l'APP générant un fragment C-terminal de 191 acides aminés (C191), qui est par la suite clivé par la  $\alpha$ -sécrétase ou la  $\beta$ -sécrétase pour produire respectivement l'amyloïde  $\eta$ - $\alpha$  et l'amyloïde  $\eta$ - $\beta$  (**Fig 6**).

### 1.5.1.3. Rôle pathogène du peptide amyloïde et l'hypothèse amyloïde

Les plaques séniles sont constituées d'agrégats extracellulaires du peptide amyloïde suite au déséquilibre entre la production de l'A $\beta_{42}$  et sa clairance. Les plaques amyloïdes ou plaques séniles, sont majoritairement constituées de fibrilles (contenant des structures en feuillet  $\beta$ ). Le peptide A $\beta_{42}$  est plus hydrophobe que le peptide A $\beta_{40}$  et par conséquent, il a donc plus tendance à former des fibrilles. Certaines études montrent que le peptide A $\beta$  aurait dans des conditions physiologiques un rôle neurotrophique, de protection contre les formes réactives de l'oxygène (Plant *et al.*, 2003; Lopez-Toledano and Shelanski 2004). En revanche, des niveaux d'expression élevés du peptide A $\beta$ , notamment suite à une altération de sa clairance, entraînent une cascade d'évènements toxiques aboutissant à l'altération de l'activité neuronale, de la transmission et la plasticité synaptique et de la mémoire (Palop and Mucke 2010; Roberson *et al.*, 2011).

L'hypothèse basée sur le rôle de ce peptide dans la MA a été confortée par plusieurs études cliniques ou précliniques. Ainsi, nous pouvons détecter chez les patients MA des

dépôts très importants du peptide amyloïde surtout dans les zones cérébrales qui touchent la capacité de la mémoire et de la cognition. Au stade précoce, les dépôts amyloïdes débutent dans les régions basales des lobes temporaux, frontaux et occipitaux sans toucher l'hippocampe. Au stade modéré, les dépôts envahissent toutes les zones associatives du néocortex et atteignent légèrement l'hippocampe. Au stade plus tardif, les dépôts finissent par envahir tout le néocortex et sont retrouvés plus importants au niveau hippocampique (Junker and Walker, 2013). Il a été également montré, dans des modèles animaux, que l'APP mutée favorise la production du peptide amyloïde et la formation des agrégats autour des neurones (Moore *et al.*, 2015).

Toutefois, de nombreux essais cliniques ciblant le peptide amyloïde n'ont pas permis d'avoir des effets bénéfiques chez les patients. Ces échecs pourraient être dues à des données obtenues chez les patients au stade tardif de la MA, alors qu'au stade prodromal les traitements anti-amyloïdes apportent de meilleurs résultats (Selkoe, 2011). Certains auteurs ont également rapporté que le déclin cognitif et la perte neuronale sont corrélés de façon plus importante avec la distribution des neuro-dégénérescences qu'avec la charge amyloïde (Gómez-Isla *et al.*, 1997). De plus, une surproduction du peptide amyloïde a été aussi observée dans certaines autopsies post-mortem chez les sujets ne présentant pas de déficit cognitif (Esparza *et al.*, 2013).

Certains travaux de ce fait ont été initiés afin de réévaluer l'hypothèse amyloïde. Des mutations héréditaires dans l'APP ou la préséniline causent des dépôts précoces d'amyloïde suivis d'une accumulation de filaments contenant des filaments de la protéine Tau (Bateman *et al.*, 2012). Il a été observé que les trois isoformes de l'ApoE (l'apolipoprotéine E, qui est impliqué dans le transport du cholestérol au niveau de la circulation) : APOE $\epsilon$ 2, APOE $\epsilon$ 3, APOE $\epsilon$ 4, s'associent à l'amyloïde et modulent sa fibrillogénèse différemment. Une clairance faible de l'amyloïde soluble suggère que l'ApoE contribue au moins partiellement au risque de développer la maladie en régulant l'élimination des amyloïdes solubles. (Zhao *et al.*, 2015).

Le peptide A $\beta$ <sub>42</sub> est la première forme à s'accumuler dans le cerveau avant la présence des symptômes cliniques. Au fil du temps, ce peptide initial pourrait être transformé en d'autres formes. Compte tenu de la complexité des formes amyloïdes chez l'homme, quantifier systématiquement tous les formes amyloïdes au stade précoce devient intéressant. Parmi ces différentes espèces, l'A $\beta$ Os (Amyloid  $\beta$  Oligomer soluble), se trouvant en extra- et



intra-cellulaire, se lie à la surface neuronale et est associé à la dysfonction des synapses liées à la mémoire (Lacor *et al.*, 2007). En endommageant les neurones, l'A $\beta$ O<sub>s</sub> peut activer les astrocytes et les cellules microgliales (Sondag *et al.*, 2009), déclencher également l'hyperphosphorylation de la protéine Tau (Shankar *et al.*, 2008) via les récepteurs du glutamate, et adrénergiques. Cela suggère l'intérêt de développer des anticorps ciblés à l'A $\beta$ O<sub>s</sub> afin de valider les traitements anti-amyloïdes.

## I.5.2. Tauopathie

### I.5.2.1. Protéine Tau

Depuis l'année 1975, la protéine tau, une protéine liée au microtubule, a été identifiée comme un composant critique pour la stabilité du microtubule en favorisant l'assemblage de la tubuline. Or cet assemblage permet de moduler les fonctions biologiques des neurones.

La protéine Tau est une protéine facilement soluble dont la structure secondaire est peu repliée. En fonction de la composition des acides aminés (aa), et des interactions fonctionnelles, la séquence totale de la protéine Tau est divisée, plus précisément, en 4 régions, telles que : 1) la région N terminale; 2) la région riche en proline ; 3) la région liée au microtubule ; 4) la région C terminale. Les microtubules peuvent générer des changements de la protéine Tau lors de sa fixation aux microtubules (Kadavath *et al.*, 2015). Durant cette fixation de la protéine Tau aux microtubules, la région chargée négativement, qui se trouve au niveau N terminal, s'éloigne de la surface des microtubules afin de créer des espaces entre ces microtubules et de permettre ainsi à certains composants membranaires comme l'Annexine 2 de se lier aux microtubules (Gauthier-Kemper *et al.*, 2011). La région riche en proline ou PRR (« Prolin-Riche Region ») est impliquée dans la signalisation cellulaire, et elle a été démontrée comme se liant aux kinases de la famille Src, à la protéine liée au récepteur du facteur de croissance Grb2, (« Growth factor receptor bound protein 2 ») et au phosphatidylinositol, Les régions répétitives de la protéine Tau, ainsi que les séquences adjacentes, forment la région liée au microtubule qui module le taux de polymérisation du microtubule. Les régions répétitives pourraient également avoir d'autres fonctions en raison de leur capacité à se lier à l'actine, la « tubuline désacétylase » et à la préséniline 1 (Morris *et al.*, 2011). La région C terminale est impliquée dans la régulation de la polymérisation du microtubule, et son interaction avec la membrane plasmique. D'ailleurs, cette région interagissant notablement avec certaines protéines dépliées, se trouve au sein des agrégats protéiniques dans certaines maladies dégénératives.



Le gène MAPT (« Microtubule-associated protéine Tau ») qui code la protéine Tau (**Fig 7**), se trouve sur le bras long du chromosome humain 17. Au niveau cérébral, les protéines Tau contiennent 6 isoformes de différente taille qui varient de 352 à 441 aa. Ces six isoformes diffèrent selon la présence de 3 (3R) ou 4 (4R) régions répétitives au niveau C terminal, ainsi que l'absence ou la présence d'un ou deux inserts au niveau N terminal (Arendt *et al.*, 2016). Certaines études ont montré que les zones répétitives au niveau C terminal sont responsables de l'assemblage du microtubule (Himmler *et al.*, 1989).

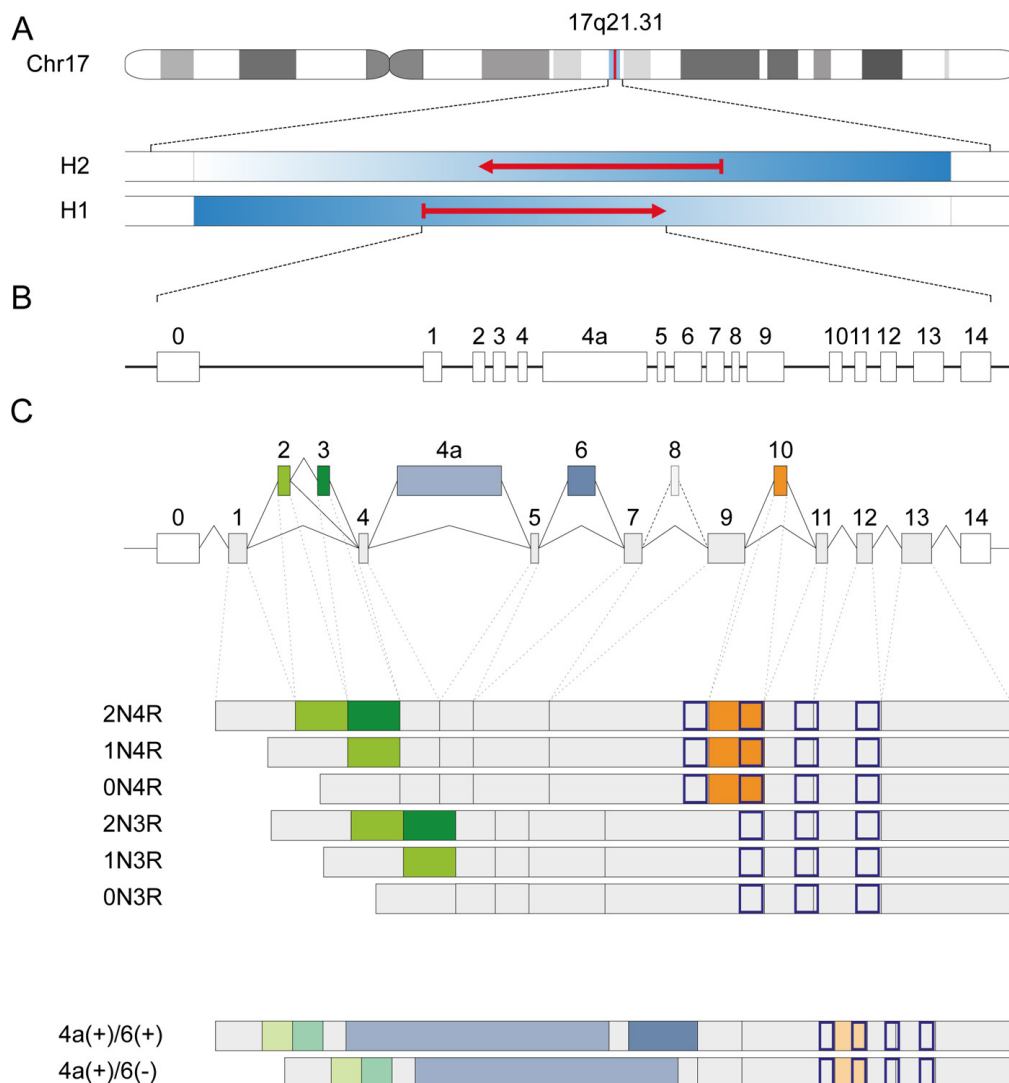


Figure 7 : Vue de l'ensemble du gène MAPT (« Microtubule-Associated Protéine Tau ») et les différentes isoformes.

Le gène MAPT se trouve à la position 17q21.31 sur le bras long du chromosome 17. Il contient deux haplotypes : H1 et H2 (A). Le gène codant la protéine Tau comprend 16 exons (B). Dans le système nerveux central, les exons 2, 3 et 10 du gène MAPT sont épissés alternativement, L'exon 3 est trouvé uniquement avec la présence de l'exon 2. L'exon 10 compose l'une des quatre régions de répétition. La présence de ces trois exons ainsi que des régions de répétitions forme 6 isoformes (C) (Arendt *et al.*, 2016).

Au cours du développement du cerveau, les six isoformes ont des rôles spécifiques. L'isoforme la plus courte possède 3 régions répétitives (3R), et ne présente pas le 4<sup>ème</sup> insert au terminal N ; le 4<sup>ème</sup> insert s'exprime au stade fœtal alors que les autres s'expriment au cours de l'âge adulte. Cette persistance de l'expression de l'isoforme fœtale pourrait être associée à la plasticité neuronale importante (Bullmann *et al.*, 2009). De plus, cette isoforme est exprimée transitoirement chez le rat durant la neuro-genèse au niveau hippocampique et ventriculaire, ce qui montre que l'isoforme fœtale est capable de favoriser l'intégration des neurones nouveau-nés dans le circuit neuronal (Hong *et al.*, 2011).

### I.5.2.2. Phosphorylation et hyper-phosphorylation de la protéine Tau

Les interactions fonctionnelles de la protéine Tau sont régulées non seulement par l'épissage alternatif de l'ARN, mais aussi par la phosphorylation de la protéine au niveau post-translational. Ainsi, l'isoforme la plus longue de la protéine Tau contient 45 résidus sérine (Ser), 35 résidus thréonine (Thr), et 5 résidus tyrosine (Tyr) qui sont phosphorylables (**Fig 8**). La plupart des résidus phosphorylables sont regroupés dans les régions flanquant les régions répétitives liées au microtubule.

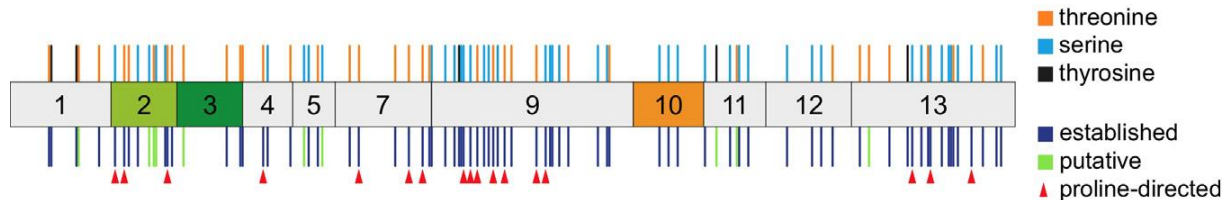


Figure 8 : Sites de phosphorylation de la protéine Tau. Les flèches rouges indiquent les sites de phosphorylation (Arendt *et al.*, 2016).

La phosphorylation de la protéine Tau module négativement sa fonction sur la stabilisation du microtubule. Le contrôle de la phosphorylation de la protéine Tau représente ainsi un mécanisme rapide pour réguler la liaison des protéines Tau aux microtubules, ce qui influence l'assemblage des microtubules (Schwalbe *et al.*, 2015). De plus, la phosphorylation de la protéine Tau module sa distribution subcellulaire et des interactions moléculaires majeures impliquées dans la régulation du transport axonal et la communication avec la membrane plasmique (Sontag *et al.*, 2012). Cette phosphorylation est régulée par les activités de protéines kinases et de phosphatases. Les kinases principalement impliquées dans la phosphorylation de la protéine Tau sont issues de la famille des kinases protéiniques de la proline, comprenant la kinase dépendante de la cycline 5 (CDK5) et des MAPK (« Mitogen

Activated Protein Kinases). Toutefois, il existe aussi des kinases qui régulent la phosphorylation sur les sites non Ser/Thr, telles que la kinase régulatrice associée aux microtubules (MARK), et la kinase II dépendante de la calmoduline (CaMKII) (Baudier *et al.*, 1987). Des mutations sur le gène codant la protéine Tau augmentent le taux de phosphorylation entraînant des changements de conformation et aboutissant à des agrégats. (Alonso *et al.*, 2004). En parallèle, une diminution des activités des phosphatases a été observée au niveau cérébral chez les patients en post-mortem. Le déséquilibre de l'activité des kinases et des phosphatases de la protéine Tau est donc critique pour la formation des agrégats fibrillaires.

Une fois hyperphosphorylée, la protéine non repliée à l'état natif, adopte une conformation anormale et ne peut plus se lier aux microtubules, ni les stabiliser. Plusieurs protéines hyperphosphorylées s'assemblent alors en filaments double hélice et forment des agrégats insolubles (Cowan and Mudher 2013). Ce processus fait intervenir plusieurs étapes déterminées à l'aide des anticorps spécifiques dirigés contre les sites de phosphorylation : 1) formation des « pre-tangles », 2) acquisition de la structure  $\beta$ -sheet, 3) nucléation des filaments et la formation des PHFs (paired helical filaments) matures. Les dégénérescences deviennent finalement insolubles après des modifications protéolytiques et restent au sein des cellules (Kuret *et al.*, 2005).

Différents arguments suggèrent que les agrégats de la protéine Tau sous forme d'oligomères solubles sont délétères, contrairement aux agrégats de grande taille (Decker *et al.*, 2015). Ces agrégats fibrillaires de la protéine Tau apparaissent au stade tardif de la MA et pourraient favoriser la progression de la maladie en influençant les fonctions normales des neurones (Ballatore *et al.*, 2007).

De nombreuses études montrent que la pathologie Tau et les dépôts amyloïdes ne sont pas des événements indépendants dans la MA. Il a été montré par exemple que la « glycogen synthase kinase-3 » (GSK-3), une kinase jouant un rôle clé dans la régulation de l'activité de Tau, régule l'activité de BACE1 (impliquée dans le catabolisme de l'APP) et favorise la production du peptide A $\beta$  (Ly *et al.*, 2013). De plus, dans des modèles murins de la maladie, la co-expression de la protéine Tau et de l'APP entraîne une aggravation des dégénérescences neurofibrillaires (Lewis *et al.*, 2001) et une déficience en protéine Tau prévient l'altération des fonctions cognitives dans un modèle murin de la maladie (APP23) (Ittner *et al.*, 2010).

### I.5.2.3. Pathologie de la protéine Tau

Les agrégats de protéines Tau hyperphosphorylées sont retrouvées dans un groupe de pathologies neuro-dégénératives qui ont été classifiées en deux sous groupes : tauopathies primaires ou secondaires, selon que la pathologie de Tau est considérée comme le facteur principal (primaires) contribuant à la progression de la maladie ou associée à d'autres pathologies (secondaires).

Les tauopathies primaires sont regroupées sous le terme de FTLD (« Frontotemporal Lobar Degeneration ») qui regroupe plusieurs maladies neuro-dégénératives touchant les lobes frontaux et temporaux. Ce groupe inclue la maladie de Picks, la paralysie supranucléaire progressive (PSP), la dégénérescence corticobasale (DCB), la dégénérescence frontotemporale avec mutation du gène MAPT, et la tauopathie gliale globulaire. Elles sont sporadiques ou familiales et dans la majorité des cas ne sont associés à aucune mutation. La PSP, la DCB et la maladie de Picks sont les formes les plus courantes. (Rossi *et al.*, 2015).

Les tauopathies secondaires sont associées avec d'autres types de pathologie. Elles représentent un groupe de troubles hétérogènes, dont certains sont causés par des facteurs environnementaux. De façon identique aux tauopathies primaires, elles se caractérisent par des neuro-dégénérescences et des dépôts astrocytaires. De plus, certaines sont associées à des mutations de gènes (comme la démence familiale type britannique ou danois) (Vidal *et al.*, 2000) ou des blessures traumatiques au niveau cérébral (comme l'encéphalopathie traumatique chronique) (Stein *et al.*, 2014).

### I.5.3. Les autres pathologies associées à la MA

La MA est également associée à des lésions vasculaires dont la principale est l'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC). Cette dernière est caractérisée par des dépôts de peptides amyloïdes solubles, l'A $\beta$ <sub>40</sub>, dans les parois vasculaires (Serrano-Pozo *et al.*, 2011). Même si l'AAC peut apparaître isolément, elle est aussi très souvent présente dans le cadre de la MA. L'AAC affecte généralement les capillaires corticaux, les artérioles petites, les artères de taille moyenne ainsi que les artères leptoméniges. Les hémorragies touchant les autres zones du cerveau, sont pour la plupart dues à de l'hypertension.

La perte synaptique est un facteur contribuant à l'atrophie corticale du cerveau des patients atteints de MA, s'associant à la perte neuronale. La perte de synapse a été démontrée

suite aux observations par immunohistochimie utilisant des anticorps contre des protéines pré- ou post-synaptiques et des études réalisées par le microscope électronique. Elle précède la perte neuronale. Cette dernière entraîne des dysfonctions entre les neurones restants et leurs partenaires synaptiques. La perte de densité synaptique est souvent corrélée avec le déclin cognitif (Ingelsson *et al.*, 2004).

La mise en évidence de l'expression de gènes codant des récepteurs immunitaires au niveau cérébral a suggéré l'implication de la neuro-inflammation durant la MA (Guerreiro *et al.*, 2013 ; Gricuic *et al.*, 2013). Les processus neuro-inflammatoires font intervenir les microgliales et les astrocytes présentent localement ainsi que les infiltrations au niveau cérébral de cellules du système immunitaire inné secondairement à la production de cytokines ou chimiokines par les cellules microgliales et astrocytaires activées. Les cellules microgliales expriment à leur surface de nombreux récepteurs qui reconnaissent les peptides amyloïdes et sont impliquées dans la clairance des différentes formes du peptide A $\beta$ . Les astrocytes sont caractérisés par une augmentation de l'expression du GFAP (« Glial fibrillary acidic protein »). L'implication de la neuro-inflammation dans la MA sera détaillé dans une autre partie de ce manuscrit.

## I.6. Facteurs de risque de la MA et traitements envisagés

### I.6.1. Facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risque interviennent dont notamment l'âge, l'histoire familiale de la MA, le gène APOE $\epsilon$ 4.

Parmi ces trois facteurs, l'âge est le facteur principal, la grande majorité des sujets atteints de la MA ayant plus de 65 ans. La probabilité d'être atteint de MA est de 3% pour les personnes de 65 à 74 ans, 17% de 75 à 84 ans, et 32% à l'âge 85 ans ou plus (Herbert *et al.*, 2010). Il est important de noter que la MA n'est pas associée au vieillissement normal. D'autres facteurs interviennent dans le développement la MA chez les sujets âgés (Alzheimer's Disease facts and figures 2017, Alzheimer's Disease International). Par ailleurs, certains patients ont moins de 60 ans au moment du diagnostic (Dong *et al.*, 2018).

La probabilité de développer une MA est plus importante en cas d'antécédents familiaux. (Loy *et al.*, 2014). Ceci pourrait être lié à l'environnement génétique, les facteurs environnementaux et le mode de vie identique. Une mutation à transmission autosomique

dominante dans la famille directe peut également contribuer au diagnostic. Il s'agit de trois gènes : la PSEN1 (« Préséniline 1 ») située sur le chromosome 14, l'APP (« Amyloïd Precursir Protéine ») sur le chromosome 21, ainsi que la PSEN2 (« Préséniline 2 ») localisée sur le chromosome 1. Il transmet ces gènes mutés à 50% de ses descendants si un membre de la famille déclare la MA.

Le gène APOE code une lipoprotéine qui transporte le cholestérol dans le sang. Tous les individus héritent de leurs parents 3 formes du gène APOE : APOE $\epsilon$ 2, APOE $\epsilon$ 3, APOE $\epsilon$ 4. L'APOE $\epsilon$ 3 est la forme la plus courante, alors que l'APOE $\epsilon$ 2 est la forme la moins courante. La forme l'APOE $\epsilon$ 4 peut augmenter le risque (x3) de développer la maladie par rapport à l'APOE $\epsilon$ 3. En revanche, l'APOE $\epsilon$ 2 peut diminuer la possibilité d'avoir cette maladie (Spinney, 2014). Très récemment, une vingtaine gènes impliqués dans la survenue de la MA ont été identifiés tels que BIN1 (« Bridging integrator 1 »), PICALM (« Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein »), SORL1 (« Sortilin related receptor 1 ») (Chouraki *et al.*, 2014) ainsi que de nombreux gènes connus pour jouer un rôle dans les réponses immunitaires: TREM2, CD33, HLA-DRB5/B1(CMH de classe II), CLU, CR1, EPHA1, MS4A4A, MS4A6E (Lambert *et al.*, 2013 ; Steinberg *et al.*, 2015). Ces données soulignent l'implication du système immunitaire dans la physiopathologie de la MA.

Il existe d'autres facteurs de risques associés au déclin cognitif. Les activités physiques régulières, la gestion de facteurs de risque cardiovasculaire, de bonnes habitudes alimentaires et un bon niveau d'éducation réduisent le risque du déclin cognitif et de démence. Des études supplémentaires suggèrent qu'un choc au niveau de la tête pourrait perturber la fonction cérébrale normale, ce qui entraîne une augmentation du risque de développer la MA.

### I.6.2. Approches thérapeutiques

Aucun traitement pharmacologique disponible à ce jour pour la MA ne peut ralentir ou arrêter les dommages et la destruction des neurones causés par la maladie. Il existe actuellement deux types de traitements sur le marché : les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) et les antagonistes des NMDARs. Les inhibiteurs de l'AChE ont été générés à la suite d'observations rapportant la présence de lésions cholinergiques chez les patients MA ayant conduit à l'hypothèse cholinergique. Le principe de ces molécules est d'inhiber l'action de l'AChE afin d'augmenter la disponibilité de l'acétylcholine dans les fentes synaptiques et potentialiser la neurotransmission cholinergique altérée au cours de la MA. Parmi les

inhibiteurs de la cholinestérase, le donezépil est largement prescrit à tous les stades de la MA pour ralentir le déclin cognitif. Malgré leur effet bénéfique uniquement temporaire sur les fonctions cognitives, ces deux types de médicaments, seuls ou combinés, continuent à être prescrits aux patients.

Suite à l'hypothèse du peptide amyloïde, plusieurs inhibiteurs des sécrétases ont été développés agissant sur la pathologie amyloïde en réduisant le clivage de l'APP et la production de l'A $\beta$ . Lors du clivage de l'APP, l'enzyme BACE1 joue un rôle très important pour la production de l'A $\beta$ , et devient donc une cible thérapeutique afin de moduler la génération de l'A $\beta$ . Cependant des inhibitions complètes pourraient entraîner des effets secondaires ayant conduit à l'arrêt de certains essais cliniques. De plus, certains essais en phase III ont été arrêtés du fait des difficultés de l'inhibiteur à traverser la barrière hémato-encéphalique et se fixer sur la cible. Le verubecestat (MK-8931) a été arrêté en raison des effets secondaires chez les patients. Néanmoins, ce dernier réduisait le dépôt de l'A $\beta$  au niveau cérébral chez les souris (Hawkes, 2017). Un modulateur de la  $\gamma$ -sécrétase, EVP-0962, qui pourrait être administré par voie orale, favorise la production des formes plus courtes du peptide amyloïde et réduit la production de l'A $\beta_{42}$  a été envisagé mais l'essai a été arrêté en phase II (Bulic *et al.*, 2011).

Outre l'inhibition de la production de l'A $\beta_{42}$ , augmenter sa clairance est aussi une bonne approche thérapeutique. Les études précliniques réalisées dans les modèles murins ont montré le potentiel de l'immunothérapie sur l'évolution de la maladie. Toutefois, une étude d'immunisation active utilisant le vaccin AN-1792 chez les patients de la MA au stade précoce ou modéré, a été interrompue en phase II, suite au développement d'encéphalites graves (Holmes *et al.*, 2008). L'affitope AD02 contenant 6 acides aminés pour mimer le terminal N du peptide amyloïde est au cours d'investigation en phase II (Davtyan *et al.*, 2014). L'immunisation anti-A $\beta$  passive est la stratégie la plus avancée pour traiter la MA. Le solanezumab, un anticorps monoclonal cible directement les formes solubles de l'A $\beta$ , a été arrêté en phase III sans aucun effet bénéfique notable sur les fonctions cognitives des patients (Honig *et al.*, 2018). Mais, il est actuellement testé dans une étude préventive chez les sujets asymptomatiques ayant des charges amyloïdes élevées (Panza *et al.*, 2014)

Quant à l'hypothèse de la protéine tau, on peut envisager de façon identique soit l'inhibition de la production des agrégats, soit l'augmentation de la clairance des agrégats

intracellulaires. L'épothilone D et le TPI287 permettent d'augmenter la stabilisation de la protéine Tau au microtubule mais conduisent à des effets délétères. Un inhibiteur de l'agrégation de la protéine Tau de deuxième génération est en cours d'investigation (phase III) (Panza *et al.*, 2016). Les anticorps de haute affinité dirigés contre la protéine tau hyperphosphorylée pourraient être utilisés en immunisation active. Il y a deux candidats pour cette approche : l'AADvac-1 contenant des peptides synthétiques Tau<sub>294-305</sub> et l'ACI-35 contenant les fragments de la protéine Tau<sub>393-408</sub>. Ces anticorps sont en cours d'étude (phase I).

Une autre approche thérapeutique consiste à moduler les processus inflammatoires. L'Azeliragon, un inhibiteur du RAGE (« Advanced glycosylation end-product specific receptor »), récepteur à la surface des cellules appartenant à la superfamille des immunoglobulines, est capable de réduire la charge amyloïde au niveau cérébral et améliorer la fonction cognitive des patients. Il est en cours d'investigation (phase III). Le CHF5074 est un modulateur spécifique de l'activation microgliale et est toujours en phase II pour valider ses effets sur la maladie (Porrini *et al.*, 2015).

Au total, plus de 200 composés sont parvenus en phase II depuis 2003, mais aucun entre eux n'a été approuvé comme thérapeutique contre la MA. La majorité de ces composés sont arrêtés en phase III malgré leurs efficacités à l'issue de la phase II. Une meilleure connaissance de la physiopathologie de la MA est nécessaire au développement de nouvelles approches thérapeutiques.



## *II. Les processus inflammatoires au cours de la MA*

### **II.1. Système Nerveux Central (SNC) et Barrières cérébrales**

Le SNC est constitué de l'encéphale et de la moelle épinière. L'encéphale comprend 3 éléments : le cerveau, le tronc cérébral et le cervelet. Elle contrôle la plupart des fonctions du corps, dont les mouvements, les sensations, les pensées et la mémoire. La moelle épinière est formée du canal de l'épendyme central, de la substance grise médiane, et de la substance blanche périphérique. Elle constitue un centre réflexe et aussi un centre conducteur. Les nerfs émergent de la moelle épinière pour innerver les deux côtés du corps. La moelle épinière permet la circulation des signaux nerveux, leur permettant d'aller et venir entre l'encéphale et les nerfs du reste du corps. Le cerveau et la moelle baignent dans un liquide stérile nommé le liquide céphalo-rachidien (LCR). C'est un liquide clair sécrété par des cavités localisées dans les ventricules, et constitué de plasma sanguin et d'ions, tels que  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Mg}^{2+}$ . Il diffuse des plexus choroïdes vers le reste du SNC, l'espace sous arachnoïde et se résorbe au niveau du bulbe olfactif et principalement au niveau des villosités arachnoïdes pour un rôle de protection et de soutien du SNC. Les méninges sont des membranes protégeant le cerveau et sont au nombre de trois. De l'extérieur vers l'intérieur le cerveau et la moelle épinière sont recouverts de la dure mère, la membrane arachnoïde et la pie-mère. Cette dernière est mince et appliquée au système nerveux.

Pour préserver son fonctionnement, le SNC a besoin d'un microenvironnement strictement contrôlé grâce à des barrières entre la circulation périphérique et le SNC : la barrière hémato-encéphalique (BHE), et la barrière hémato-liquidienne (BHL) (**Fig.9**) (Tietz and Engelhardt, 2017).

Parmi les barrières cérébrales, la BHE, grâce à ses propriétés physiques et biologiques, limite l'entrée de molécules étrangères et de cellules périphériques dans l'environnement cérébral et élimine des déchets métaboliques au niveau cérébral. Les cellules endothéliales cérébrales qui contribuent à la formation de la BHE se caractérisent par leur richesse en mitochondries ainsi que l'absence de fenestration et de canal transendothélial. La BHE est composée de jonctions serrées (« tight junction ») et adhérentes constituées de protéines transmembranaires et cytoplasmiques, qui restreignent le passage des molécules de la circulation à l'espace du cerveau. Parmi ces molécules, l'occludine et la E-cadhérine interviennent respectivement au niveau des jonctions serrées et adhérentes.

Le péricyte est incorporé dans une membrane basale vasculaire qui se connecte aux prolongements des pieds astrocytaires entourant les vaisseaux sanguins et formant la glia limitans. Une altération de la BHE entraîne l'infiltration des cellules du système immunitaire périphérique dans l'environnement cérébral.

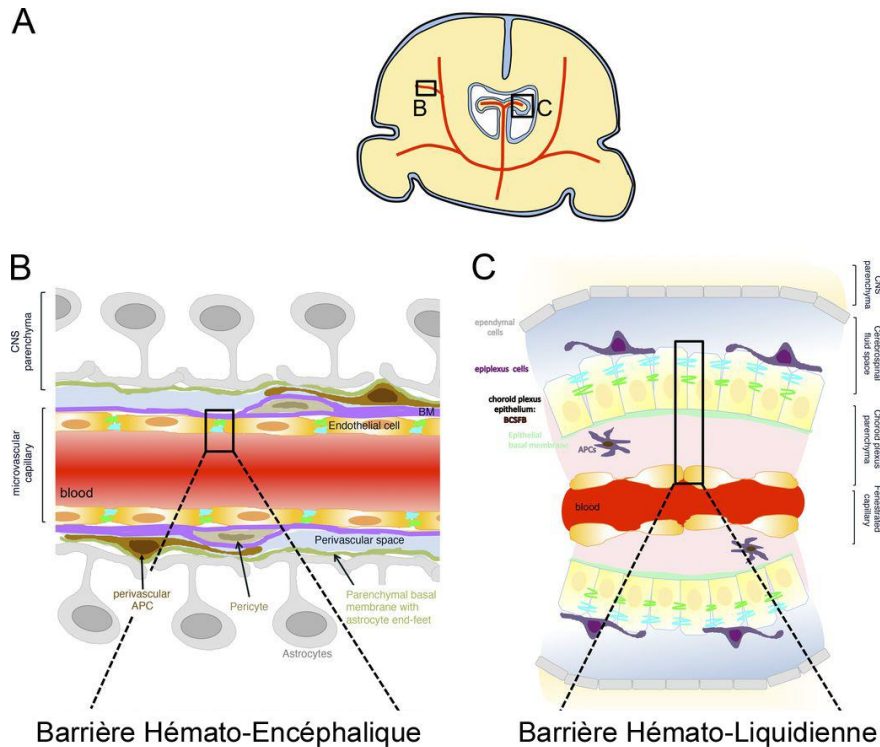


Figure 9 : Illustration schématique des barrières cérébrales (Tietz and Engelhardt, 2017). A) La localisation des barrières cérébrale au niveau du parenchyme et du plexus choroïde ; B) La composition cellulaire de la barrière hémato-encéphalique ; C) La composition cellulaire de la barrière hémato-liquidienne.

La barrière hémato-liquidienne ou hémato-méningée est constituée de cellules endothéliales reliées entre elles par des jonctions serrées, qui séparent les vaisseaux sanguins et le LCR. Au niveau des plexus choroïdes impliqués dans la sécrétion du LCR, les capillaires semi-perméables forment des filtres entourant une couche de cellules appelées épendymocytes qui limitent le trafic des protéines ou des ions. L'endothélium vasculaire y est fenestré, ce qui permet des échanges entre le sang et le stroma des plexus choroïdes. Ce sont les seuls endroits où il peut y avoir un échange entre le LCR et le sang en passant par l'endothélium du plexus choroïde.

De plus, la barrière méningo-encéphalique (BME) sépare le LCR du cerveau et est constituée par les cellules épendymaires extrachoroïdienne et la pie mère.

## II.2. Privilège immunitaire

À la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, Paul Ehrlich a observé que des colorants intra-vitaux, injectés dans la circulation sanguine, diffusent dans tous les organes sauf le cerveau. Dans la même période, des expériences de greffes de tissus hétérologues dans le SNC ont montré l'incapacité du système nerveux à déclencher une réponse immunitaire (Murphy and Sturm 1923). Le SNC est alors considéré comme un site immuno-privilegié isolé du système immunitaire par l'existence de la BHE.

Toutefois, ce dogme du privilège immunitaire du cerveau a été remis en question suite aux travaux de Medawar en 1948. Les greffes de peau dans le cerveau d'animaux naïfs n'induisent pas de réponse immunitaire. En revanche, si les animaux sont exposés en périphérie aux antigènes du greffon avant la greffe, les cellules du système immunitaire sont capables de rejeter le greffon au niveau cérébral au bout d'un certain temps. (Medawar, 1948). Ses résultats suggèrent l'existence au niveau cérébral d'un système de drainage des antigènes qui confère au SNC une tolérance plus élevée par rapport aux autres organes périphériques. Des observations cliniques et précliniques ont confirmé le passage des cellules du système immunitaire pourraient dans différents compartiments du SNC (LCR, ventricules et parenchyme) lors des conditions physiologiques (immunosurveillance) et pathologiques.

Dès lors, l'immuno-privilegié du SNC ne fait plus référence à un site totalement isolé, mais plutôt à un système hautement régulé. Cette régulation fait intervenir la faible expression de molécules du CMH-I et II par les cellules du SNC (neurones et cellules microgliales), la production locale de facteurs immunosuppresseurs (TGF $\beta$ , IL10), et le maintien des cellules microgliales dans un état « quiescent » par contact direct avec les neurones et les astrocytes, (Galea *et al.*, 2007). Cependant, une réponse immunitaire doit pouvoir se déclencher dans le SNC afin de contrecarrer l'entrée d'un éventuel pathogène et favoriser la résolution des lésions tissulaires en cas de pathologies cérébrales. Toutefois, une réaction immunitaire excessive et non contrôlée peut entraîner des effets délétères dans le SNC. Il est donc compréhensible que les processus inflammatoires au niveau cérébral puissent contribuer à la pathogenèse neuronale, notamment en cas de pathologies neuro-dégénératives.

### II.3. Cellules immunitaires résidentes dans le SNC

Une activation excessive ou inappropriée des cellules de défense dans le SNC va conduire à la libération des cytokines pro-inflammatoires qui aboutissent à une inflammation chronique au niveau neuronal, la neuro-inflammation.

Le SNC est principalement composé de deux types de populations cellulaires : les neurones et les cellules gliales. Les cellules gliales représentent une population hétérogène comprenant les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules de Schwann et les cellules microgliales.

#### II.3.1. Neurones

Les neurones jouent un rôle initial dans l'établissement des réponses immunitaires du SNC. La reconnaissance de signaux de danger par les neurones est assurée par la présence de récepteurs : les PRRs (« Pattern-Recognition Receptors ») notamment le « Toll-like Receptor » 3 (TLR3). De plus, les neurones expriment de protéines membranaires (CD22, CD47) inhibant cellules immunitaires en freinant l'inflammation. Les neurones libèrent de façon constitutive de nombreux facteurs (comme FasL (ligand de Fas), TGF- $\beta$ ) intervenant dans le contrôle de l'activation microgliale. Enfin, différentes cytokines libérées par les neurones permettent d'inhiber la fonction de certaines cellules immunitaires périphériques infiltrées dans le SNC, notamment des cellules cytotoxiques.

#### II.3.2. Cellules microgliales ou macrophages résidents du SNC

Les cellules microgliales constituent une population myéloïde distincte de celles retrouvées en périphérie. Elles sont issues de progéniteurs myéloïdes embryonnaires du sac vitellin qui colonisent le SNC au cours du développement. Ce sont les seules cellules du SNC qui sont d'origine hématopoïétique. Elles représentent en moyenne 10% des cellules gliales (Perdiguero *et al.*, 2015). Les cellules microgliales assurent deux fonctions essentielles : le maintien de l'homéostasie cérébrale et la défense immunitaire. Elles sont impliquées dans la maintenance et la plasticité des circuits neuronaux. Elles interagissent également avec les astrocytes, les neurones et les oligodendrocytes afin de maintenir l'intégrité et le remodelage des synapses ; par conséquent, elles jouent un rôle important dans les mécanismes d'apprentissage et de mémoire qui contribuent la protection et le remodelage synaptique (Kettenmann *et al.*, 2011). Parallèlement, Les cellules microgliales explorent continuellement

les zones cérébrales grâce à leurs ramifications, s'assurant de l'absence de pathogènes ou de débris cellulaires, et produisant des facteurs jouant un rôle dans la maintenance tissulaire. En cas de modification de leur microenvironnement ou en présence de pathogènes, les cellules microgliales subissent un changement morphologique (forme amiboïde) qui leur permet de se diviser et de se déplacer plus facilement.

Selon leur état d'activation, les cellules microgliales oscillent entre trois états : un état quiescent, un état activé et un état réactif (Masuda *et al.*, 2012). Une forte concentration d'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) favorise la polarisation des cellules microgliales vers un profil qui entraîne leur sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (comme IL-1, IL-6, IL-12, et IL-23), et renforce leur capacité microbicide. A l'inverse, la présence d'IL-4 favorise la polarisation des microglies vers un profil anti-inflammatoire produisant de l'IL-10 et de facteurs neurotrophiques tels que BDNF, IGF-1, NGF... La microglie est ainsi capable de participer à la réparation tissulaire et à la maintenance de l'homéostasie.

Au cours du vieillissement de l'individu, les microglies présentant des anomalies fonctionnelles, surtout la diminution de leurs propriétés neuroprotectrices, pourraient participer processus neuro-dégénératifs (Streit, 2005). De plus, une activation appropriée des microglies favorise la résolution de l'inflammation, la réparation et le renouvellement tissulaire, alors qu'une activation excessive pourrait aboutir à des lésions neuronales (London *et al.*, 2013).

Les cellules microgliales peuvent donc avoir un rôle bénéfique ou délétère en fonction de leur état d'activation (Nimmerjahn *et al.*, 2005). Elles ont été impliquées dans la physiopathologie des pathologies neuro-dégénératives. Ainsi, une des caractéristiques des maladies neuro-dégénératives est l'activation chronique des cellules microgliales favorisant leur différenciation vers un profil de type neurotoxique.

### II.3.3. Astrocytes

Les astrocytes font partie de la macroglie avec les oligodendrocytes et les cellules épendymaires. Ce sont les cellules les plus abondantes du SNC, représentant jusqu'à 70% de la névroglie, et les plus volumineuses des cellules gliales. Ces cellules ont une forme étoilée, et se caractérisent par leur expression de la GFAP (« Glial Fibrillary Acidic Protein »). Les astrocytes jouent un rôle important dans l'homéostasie du SNC intervenant dans la

maintenance de l'intégrité de la BHE, le métabolisme neuronal et la régulation de la transmission synaptique. En présence des signaux de danger, les astrocytes sont activés par un mécanisme appelé l'astrogliose. De façon identique aux cellules microgliales, les astrocytes expriment des PRRs, notamment le TLR3, afin de reconnaître et répondre aux signaux de danger. Après activation notamment lors d'agression au niveau du SNC, ils deviennent hypertrophiques, expriment fortement la GFAP et libèrent des chimiokines CXCL10 et CCL2 contribuant à la mise en place d'une réponse immunitaire. Ainsi, l'activation des astrocytes contribue à inhiber la progression de l'inflammation, et à construire un environnement favorable nécessaire au remodelage tissulaire. En revanche, l'activation des astrocytes pourrait également réduire la migration et la différenciation des cellules souches neuronales (Müller *et al.*, 2006).

Le fait qu'ils puissent libérer et être la cible de facteurs inflammatoires, suggère un rôle potentiel de ces cellules dans le processus neuro-inflammatoire au cours des pathologies neuro-dégénératives (Farina *et al.*, 2007; Sofroniew and Vinters 2010). Dans certaines maladies neuro-dégénératives (comme la MA), ils ont tendance à se regrouper à proximité des microglies activées (Merdeiros *et al.*, 2013).

#### II.3.4. Oligodendrocytes

Les oligodendrocytes jouent un rôle important dans le développement et la suivie des axones. Par l'expression constitutive de TGF- $\beta$  et du CD200 (une glycoprotéine membrane qui régule l'activité des cellules myéloïdes), les oligodendrocytes peuvent adresser des signaux anti-inflammatoires et inhiber les réponses microgliales via la liaison entre le CD200 et son récepteur exprimé par les microglies. Ils expriment également des TLRs à leur surface leur permettant de répondre aux signaux de danger (Wake *et al.*, 2011).

#### II.3.5. Cellules mononuclées du SNC

En dehors des cellules microgliales, le SNC contient d'autres cellules phagocytaires mononuclées localisées au niveau des méninges, des espaces périvasculaires et des plexus choroïdes (Ransohoff and Engelhardt, 2012). Les phagocytes méningés retrouvés dans l'espace sous arachnoïdien expriment fortement le CD45 et le CD11b, des marqueurs caractéristiques des macrophages périphériques. Les phagocytes périvasculaires sont présents dans l'espace périvasculaire entre le parenchyme et les vaisseaux. Ils peuvent restimuler les cellules T CD4<sup>+</sup> par l'expression de CMH-II, et favoriser leur passage dans le parenchyme. Ils

sont également impliqués dans la modification des cellules endothéliales. Les phagocytes des plexus choroïdes expriment des marqueurs de cellules dendritiques (DCs) (comme le CD11c) et fonctionnent probablement comme des cellules présentatrices d'antigène (CPA) dans les plexus choroïdes.

## II.4. Réponses immunitaires dans le SNC

### II.4.1. Réponse immunitaire innée

De façon générale, la réponse immunitaire innée représente la 1<sup>ère</sup> ligne de défense de l'organisme contre l'introduction d'un agent pathogène ou la présence de lésions.

#### II.4.1.1. Activation des cellules microgliales

Au sein du SNC, les cellules microgliales sont les phagocytes résidents et constituent donc la première ligne de défense contre les intrusions ou les lésions. La détection d'un signal de danger endogène ou exogène par ces cellules, modifie leur activité et une réponse immunitaire de type innée s'établit. Les signaux activateurs peuvent émaner de pathogènes, et être de type « Pathogen-Associated Molecular Patterns » (PAMPs), ou provenir de modifications du microenvironnement local et nommés alors « Danger-Associated Molecular Patterns » (DAMPs). Les PAMPs et les DAMPs sont détectés par des familles de récepteurs les « Pattern Recognition Receptor » (PRR) présents à la surface ou à l'intérieur des cellules microgliales. D'autres cellules, telles que les astrocytes, les oligodendrocytes, et les cellules endothéliales, s'expriment également certains récepteurs de PRRs (Hanamsagar *et al.*, 2012). Il existe plusieurs familles de PRRs, dont trois principales sont : TLRs (« Toll-Like Receptors »), NLRs (« Nod-Like Receptors »), et RLRs (« RIG1-Like Receptors »). L'activation des récepteurs de PRRs entraîne le déclenchement des voies de signalisations spécifiques conduisant à la libération de cytokines inflammatoires (**Fig 10**).



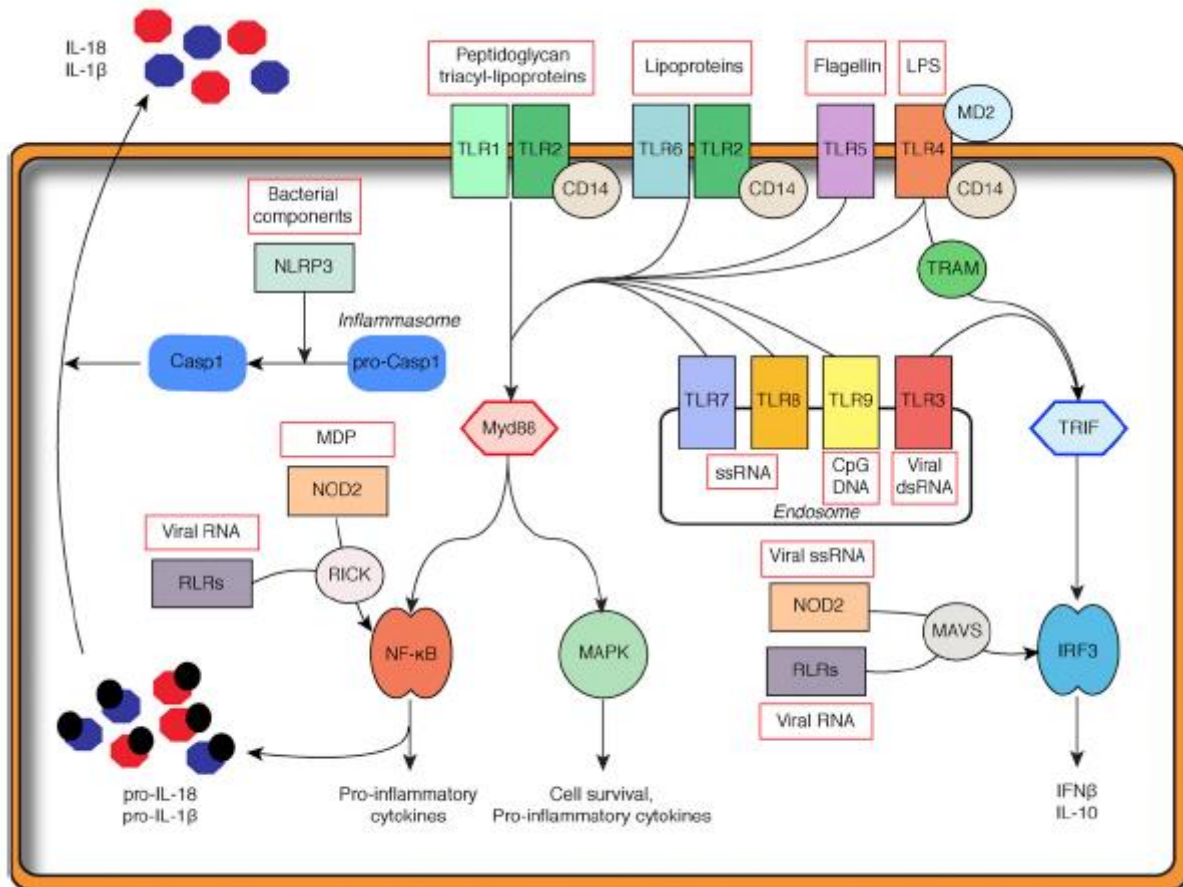


Figure 10 : Régulation moléculaire des réponses immunitaires innée par PRRs (Lampron *et al.*, 2013). La reconnaissance des pathogènes par les PRRs permet le déclenchement d'un certain nombre de voies de signalisation faisant notamment intervenir les protéines adaptatrices Myd88 et TRIF, conduisant respectivement à l'activation des facteurs de transcription NF-κB ou IRF3.

L'activité des cellules microgliales peut également être modifiée par l'absence de signal répresseur envoyé par les neurones à l'état basal. En effet, dans les conditions physiologiques, L'interaction entre certaines molécules exprimées à la surface des neurones d'une part et des cellules microgliales d'autre part (CD200/CD200R, CX3CL1/CX3CR1, CD47/SIRP  $\alpha$  (CD172)), maintient les cellules microgliales à l'état « quiescent ». En cas de destruction des neurones, notamment lors d'un processus neuro-dégénératif, la disparition de ce signal peut induire l'activation microgliale.

Dans les conditions pathologiques, les cellules microgliales sont activées classiquement ou alternativement en fonctions des signaux reçus. Elles peuvent avoir un profil pro-inflammatoire, sécrétant du TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ . A l'aide de la production des FROs



(Formes Réactives d'Oxygène) par l'iNOS (« inducible Nitric Oxide Synthase »), les microglies de ce type ont pour but d'éliminer des infections du SNC. Sous la régulation par l'IL-4 et l'IL-10, les microglies peuvent avoir le profil anti-inflammatoire, produisant les facteurs neurotrophiques tels que le VEGF, l'IGF1 afin de réparer le tissu endommagé (Boche *et al.*, 2013). Après leur activation, les cellules microgliales secrètent une quantité élevée de chimiokines comme le CCL (« Chemokine ligand »)-2, le CCL-3, et le CCL-5. Le CCL-2 est un chimioattractant favorisant le recrutement de leucocytes et de macrophages dérivés des monocytes en raison de la présence du récepteur CCR-2 à leur surface. Le CCL-3 est impliqué dans le recrutement et l'activation des granulocytes via les récepteurs CCR-1 ou CCR-5. Le CCL-5 est un chimioattractant des monocytes dans le sang circulant, ainsi que des éosinophiles. Il est favorable pour la libération des histamines des basophiles et des éosinophiles activés.

Le rôle bénéfique des cellules microgliales peut se manifester par : une activité phagocytaire entraînant la clairance des dépôts protéiques pathologiques et des agents pathogènes, la régulation de la plasticité synaptique par la libération de BDNF, et la régulation de la neurogénèse (Kettenmann *et al.*, 2011). A l'inverse, une des caractéristiques des maladies neurodégénératives est l'activation chronique des cellules microgliales favorisant leur différenciation vers un profil de type neurotoxique. Les astrocytes peuvent également reconnaître des PAMPs, via l'expression de TLR-2/3/4/5/9 et le NOD1/2. Les astrocytes interviennent afin d'assister la microglie dans sa fonction de sentinelle et de défense (Gimsa *et al.*, 2013).

#### II.4.1.2. Infiltration de cellules immunes périphériques

Cette infiltration résulte de deux processus intervenant de façon conjointe : l'effet chimioattractant exercé par les différentes chimiokines libérées au sein du SNC notamment par la microglie activée d'une part et d'autre part des altérations de la BHE.

En effet, après leur activation, les cellules microgliales secrètent une grande quantité de chimiokines telles que CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 et CXCL2. Le CCL2 est un chimioattractant favorisant le recrutement de leucocytes et de macrophages dérivés des monocytes exprimant à leur surface le CCR2. Cette forte production de cytokines par les cellules microgliales peut fragiliser la BHE et activer les cellules endothéliales. L'activation spécifique des cellules endothéliales cérébrales par l'activation du TLR2/6, diminue

l'expression des protéines des jonctions serrées, augmentant ainsi la perméabilité de la BHE (Nagyoszi *et al.*, 2010). De plus, l'activation des cellules endothéliales induit également la production de CCL2, CCL5 et CXCL10.

Cela entraîne une infiltration de cellules immunitaires périphériques telles que les macrophages CCR2<sup>+</sup> dans le SNC. Une fois dans le cerveau, la distinction entre les macrophages et les cellules microgliales est difficile. Elles sont généralement différenciées par leur niveau d'expression du marqueur CD45 (forte pour les macrophages et faible pour les cellules microgliales). Le rôle des macrophages infiltrant par rapport aux cellules microgliales reste sujet à de nombreuses controverses, du fait de l'absence de marqueur spécifique permettant de les distinguer.

#### II.4.1.3. Induction de la réponse adaptative

Une fonction essentielle de l'immunité innée est d'apporter l'information à l'immunité adaptative. Ainsi, Dans les organes périphériques, les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) détectent la présence des agents pathogènes. Les antigènes sont apprêtés et présentés à leur surface sur les molécules du CMH-I ou II et peuvent être présentés aux cellules T naïves ou mémoires.

En périphérie, il existe trois types de CPA professionnelles bien caractérisées qui ont seules la capacité d'activer des réponses lymphocytaires : les lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques.

Au niveau du SNC, dans les conditions physiologiques, les cellules dendritiques (DCs) exprimant les molécules du CMH-II sont présentes dans les vaisseaux lymphatiques méningés (Louveau *et al.*, 2015), dans les vaisseaux des plexus choroïdes (Prodinger *et al.*, 2011), dans les espaces périvasculaires et dans le LCR. Elles ne sont détectées dans le parenchyme cérébral qu'au cours d'un processus inflammatoire après altération de la BHE, y compris dans des contextes de maladies neuro-dégénératives. Par ailleurs, dans un contexte inflammatoire, les cellules microgliales expriment les molécules du CMH de classe II et les molécules de co-stimulation (CD80 et CD86), leur permettant ainsi potentiellement de présenter des antigènes. Les astrocytes expriment plus rarement les molécules du CMH de classe II, et peuvent donc potentiellement également présenter des antigènes.

L'activation des cellules microgliales entraîne une augmentation de l'expression du CMH-II et des molécules de stimulation (comme CD80, CD86) à la surface, ce qui va permettre d'initier la réponse adaptative. De plus, les cellules microgliales, ainsi que les astrocytes activées expriment les molécules du CMH-II, ce qui leur permet potentiellement de présenter des antigènes aux lymphocytes T.

#### II.4.2. Réponse immunitaire adaptative

Les lymphocytes B et T peuvent reconnaître les antigènes via les récepteurs BCRs (« B cells receptors ») et TCRs (« T cells receptors ») respectivement. Les lymphocytes B (LB) peuvent reconnaître directement des antigènes natifs, alors que les lymphocytes T (LT) reconnaissent des antigènes apprêtés par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA).

Les lymphocytes B sont des cellules mononuclées et jouent un rôle important dans la défense immunitaire d'hôte en produisant des anticorps via le système immunitaire adaptatif. En outre, comme nous l'avons précisé ci-dessus, les cellules B sont donc capables de présenter des antigènes aux lymphocytes T, exprimant les molécules du CMH-I et du CMH-II.

Les cellules T sont divisées en deux groupes : les lymphocytes T CD4 (LT CD4) reconnaissant les épitopes présentés par des molécules du CMH de classe II et les lymphocytes T CD8 (LT CD8) reconnaissant les épitopes présentés par les molécules du CMH de classe I. En fonction des signaux reçus et de l'environnement cytokinique, les LT CD4 naïfs se différencient en T helper (Th)-1, Th-2, Th-17 et les cellules T régulatrices (Tregs). Les LT CD4 naïfs se différencient en Th-1 respectivement et en Th2 en présence d'IL-12 et d'IL-4. La différenciation des cellules Th17 (associées à une fonction pro-inflammatoire) est contrôlée par le facteur de transcription ROR $\gamma$ t et est induite en présence d'IL-23 et d'IL-6 et de faibles concentrations de TGF $\beta$ . Ils jouent un rôle dans l'immunité des muqueuses en produisant notamment de l'IL-17, qui comme nous le verrons joue un puissant rôle activateur sur les polynucléaires neutrophiles, et de l'IL-22. Les Th1 et Th17 sont impliqués dans les réponses neuro-inflammatoires et sont associés à des lésions neuronales, comme dans la sclérose en plaques. La différenciation des Tregs est déclenchée par une forte présence du TGF $\beta$  (Zou and Restifo, 2010). Les Tregs sont caractérisés par leur forte expression du marqueur CD25 (chaîne  $\alpha$  de haute affinité du récepteur à l'IL2) et le facteur de transcription Foxp3, qui contrôle leur différenciation fonctionnelle. Ils produisent des

cytokines anti-inflammatoires, comme IL-10 et TGF $\beta$ , permettant de réguler les fonctions des lymphocytes T effecteurs.

Les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves sont stimulées dans les ganglions cervicaux par les DCs résidentes ayant captés les antigènes drainés par le LCR et le fluide interstitiel, ou potentiellement par les DCs drainés dans le LCR (Karman *et al.*, 2004 ; Hatterer *et al.*, 2008). Une fois activés, les LT CD4<sup>+</sup> migrent ensuite vers le site de la lésion ou de l'infection. Le passage à travers la BHE se fait par des mécanismes de roulement le long des vaisseaux méningés, et d'adhésion aux parois vasculaires. Le passage à travers l'endothélium se fait par extravasation grâce aux intégrines exprimées par les cellules T.

Il a été notamment montré que les lymphocytes Th-2 et les Tregs jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie du SNC et les fonctions cognitives soit à l'état physiologique, soit dans un contexte pathologique, comme dans la MA , comme nous le verrons ci-dessous.

## II.5. Réponses immunitaires au cours de la MA

### II.5.1. Réponses immunitaires innées au cours de la MA

Des données récentes suggèrent que la physiopathologie de la MA ne soit pas restreinte au compartiment neuronal mais inclue des interactions avec les acteurs du système immunitaire adaptatif et inné susceptibles d'agir très en amont de la cascade amyloïde pathogène, avant l'apparition des lésions. La neuro-inflammation a notamment été impliquée de façon centrale dans la pathogénèse de la maladie (**Fig 11**). Les principales étapes de ce processus neuro-inflammatoires sont les suivantes :

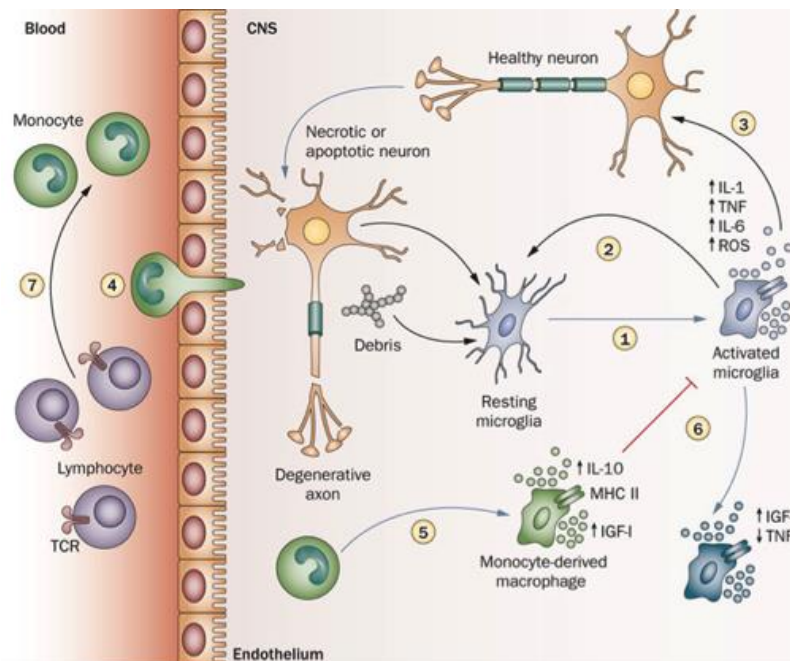


Figure 11 : Illustration schématique de l'activation des cellules immunitaires au niveau cérébral au cours des maladies neuro-dégénératives (Schwartz and Shechter, 2010). 1) Les dommages cérébraux activent les microglies résidentes. 2) Les cytokines pro-inflammatoires produites par les microglies activées pourraient activer d'autres microglies naïves, et 3) endommager les neurones. 4) Les monocytes de la circulation périphérique infiltrent le SNC endommagé, et 5) se différencient localement en macrophages. 6) Ces cellules sécrètent des facteurs de croissance et des cytokines anti-inflammatoires afin d'inhiber l'activation microgliale. 7) Les lymphocytes T augmentent le recrutement des monocytes circulants au niveau du SNC dont l'effet s'additionne à celui des microglies durant la neuro-dégénération.

Les cellules microgliales jouent un rôle important dans la progression de la MA en éliminant les plaques amyloïdes par phagocytose et en libérant des médiateurs inflammatoires (cytokines, chimiokines, ROS). La reconnaissance des oligomères A $\beta$ s ou des fibrilles A $\beta$ s par les récepteurs de surface (comme CD36, CD14, CD47, TLR2, TLR4, TLR6, et TLR9) des cellules microgliales conduit à leur activation et à la libération de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Cela entraîne une production exacerbée de facteurs inflammatoires et toxiques délétère pour les neurones. Parallèlement, les microglies ont la capacité de phagocyter les A $\beta$ s fibrillaires et les détruire par la voie lysosomiale. Toutefois, ce processus peut entraîner des lésions du lysosome conduisant à l'activation du récepteur intracellulaire NLRP3 favorisant l'assemblage de l'inflammasome. Ceci induit une activation de la voie des caspases et une sécrétion massive de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 (Heneka *et al.*, 2015).

Il a notamment été montré que l'inhibition de NLRP3 augmente l'activité phagocytaire des cellules microgliales et favorise leur différenciation fonctionnelle vers un profil anti-inflammatoire (Heneka *et al.*, 2013). Les fibrilles amyloïdes peuvent également être dégradées par des protéases extracellulaires libérées par les cellules microgliales (comme l'IDE (« Insulin-Degrading Enzyme ») et la néprilysine) (Lee and Landreth, 2010). Par ailleurs, l'exposition permanente de la microglie aux chimiokines et cytokines pro-inflammatoires diminue l'expression des récepteurs impliqués dans la phagocytose des peptides A $\beta$  et serait responsable de la capacité de phagocytose insuffisante de la microglie qui favorise le dépôt des plaques séniles (Hickman *et al.*, 2008). Cette hypothèse a été renforcée par des études identifiant l'association entre d'une part un risque augmenté de MA et d'autres part des mutations de gènes codant pour des facteurs régulant la clairance gliale de protéines mal conformées et les processus inflammatoires. Une mutation dans le domaine extracellulaire de TREM2 (Taylor *et al.*, 2015) hautement exprimé sur la microglie, augmente le risque de MA de 4%. De façon similaire, un polymorphisme du gène du récepteur microglial CD33 réduit la phagocytose du peptide A $\beta$  par les macrophages périphériques (Heneka *et al.*, 2015). Cependant des données récentes suggèrent que les facteurs anti-inflammatoires peuvent également avoir un effet délétère sur la progression de la maladie. En effet, dans des modèles murins de la MA, l'augmentation de la cytokine anti-inflammatoire, l'IL-10 induit une élévation de la charge amyloïde et inversement, la délétion de l'IL10 induit une diminution de la pathologie amyloïde augmentant, le recrutement des cellules microgliales autour des plaques et la phagocytose des peptides A $\beta$  augmentent en absence d'IL10 (Guillot-Sestier *et al.*, 2015; Chakrabarty *et al.*, 2015).

Ainsi, l'effet des cellules microgliales via leur activité phagocytaire serait bénéfique au début de la maladie. Au cours de l'évolution de la maladie, la capacité de phagocytose de ces cellules est réduite du fait de l'environnement pro-inflammatoire persistant mais également de l'action de certaines cytokines anti-inflammatoires dont l'IL-10. Ceci aboutit à une aggravation des dépôts amyloïdes.

Les astrocytes sont aussi impliqués dans les réponses immunitaires innée au cours de la MA. Comme les cellules microgliales, l'activation des astrocytes entraîne une libération de cytokines et de molécules cytotoxiques, ce qui aggrave les réponses inflammatoires au niveau neuronal. Ainsi, la diminution de l'astroglie observée lors de l'inhibition de la voie

de signalisation de la calcineurine/NFAT (facteur nucléaire des cellules T activées) améliore la condition cognitive, et réduit la charge amyloïde dans des modèles murins (Furman *et al.*, 2012). A l'inverse, les astrocytes activés peuvent libérer des protéases extracellulaires (comme la néprilysine et l'IDE), capable de dégrader l'A $\beta$  (Pihlaja *et al.*, 2011).

Le système du complément a également été impliqué. Au niveau cérébral, les cellules microgliales et les astrocytes synthétisent les protéines du système du complément. Les plaques amyloïdes sont capables d'activer le système du complément qui va à son tour stimuler la phagocytose par la microglie par un processus d'opsonisation. Des modifications de l'expression du récepteur du complément CR1, impliqué dans la régulation de l'activité du complément C3, pourrait entraîner une perturbation de l'élimination des débris cellulaires et de l'A $\beta$  (Lambert *et al.*, 2009).

Enfin, il existe d'autres candidats ayant le potentiel de moduler les processus inflammatoires au cours de la MA et qui deviennent ainsi des cibles thérapeutiques : 1) La LRP-1 (« Lipoprotein-Related Protein 1 ») est impliquée dans la clairance de l'A $\beta$  du cerveau à la circulation. En présence de LPS, la LRP-1 est surexprimée et permet aux cellules endothéliales d'internaliser des peptides amyloïdes toxiques et de la sortie des peptides amyloïdes du SNC (Deane *et al.*, 2008). 2) Le récepteur RAGE (« Récepteur des Produits de Glycation Avancée ») contrôle le transport de l'A $\beta$  de la circulation vers le SNC. Le tandem LRP-1/RAGE est donc impliqué dans la répartition des peptides amyloïdes entre le SNC et la circulation, et le déséquilibre de ce tandem a été impliqué dans la perte de l'intégrité de la BHE (Jeynes and Provia, 2008).

### II.5.2. Réponses immunitaires adaptatives au cours de la MA

Plusieurs données de recherche ont montré l'implication du système immunitaire adaptatif dans la physiopathologie au cours de la MA.

Les patients atteints de la MA montrent un grand nombre des cellules B à mémoire, telles que les cellules B IgG<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>. La déplétion des LB mémoire ralentit la progression de la MA via la diminution de la charge amyloïde, ainsi que de l'activité des LT (Stroopinsky *et al.*, 2012). Les LB régulateurs peuvent inhiber les macrophages activés et l'activité des cellules Th1 et Th17 via la production de l'IL-10 et de l'IL-35 (Shen *et al.*, 2014). Toutefois, le rôle des cellules B au cours de la MA est toujours mal connu.

La présence de LT, majoritairement CD8<sup>+</sup>, a été rapportée dans le cerveau des patients atteints de MA et une étude a mis en évidence une corrélation entre l'infiltration en cellules et la pathologie Tau chez les patients MA (Zotova *et al.*, 2013). Il a été également montré, dès le stade prodromal, une augmentation de cellules T activées dans la circulation sanguine et le LCR de patients MA (Lueg *et al.*, 2015) et l'augmentation des cellules T CD8<sup>+</sup> est corrélée avec les déficits cognitifs observés chez les patients. L'analyse au niveau génomique montre également l'implication des LT en rapportant un polymorphisme dans la présentation antigénique et la susceptibilité à développer la maladie d'Alzheimer (Lambert *et al.*, 2013).

Dans des modèles murins, la production d'IFN $\gamma$  par les cellules Th1 entraîne une aggravation de la pathologie amyloïde, augmente les déficits cognitifs (Browne *et al.*, 2013) et est également associée à une méningo-encéphalite (Monsonogo *et al.*, 2006). Le premier essai clinique d'immunisation active anti-A $\beta$  initié chez des patients a entraîné des réactions inflammatoires graves chez une partie de la cohorte de patients MA, expliquant l'arrêt de l'essai clinique (Orgogozo *et al.*, 2003). La survenue des cas de méningo-encéphalites a montré un effet délétère potentiel des que les cellules T anti-A $\beta$ .

Cependant plusieurs études effectués dans des modèles murins de MA ont montré que les cellules T peuvent avoir un effet bénéfique. La réactivité des cellules TCD4<sup>+</sup> pour le peptide A $\beta$  augmente chez les personnes âgées et chez les patients MA. Cela implique la présence des cellules T spécifiques de l'A $\beta$  circulant chez les patients MA, et suggère l'existence d'une réponse spontanée des cellules T anti-A $\beta$  chez les patients (Monsonogo *et al.*, 2003). Parallèlement dans des modèles murins, les cellules TCD4<sup>+</sup> induites par l'immunisation avec le peptide A $\beta$  favorisent la clairance des plaques (Fisher *et al.*, 2010). De plus, le transfert des LT CD4<sup>+</sup> spécifiques de l'A $\beta$  améliore les fonctions cognitives (Cao *et al.*, 2009). Il a été rapporté dans des modèles murins de MA, que les cellules Th-2 interviennent en diminuant les taux circulants de cytokines pro-inflammatoires (comme IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 et IL-4) et restaure les fonctions cognitives (Cao *et al.*, 2009). Concernant les cellules T régulatrices (Tregs), des données controversées ont été rapporté. Certains résultats suggèrent une augmentation de l'activité suppressive des Tregs chez les patients (Rosenkranz *et al.*, 2007), alors qu'une diminution globale des Tregs a été montrée chez les patients au stade précoce (Larbi *et al.*, 2009).



De plus, Saresella *et al* rapportent que les Tregs PD1<sup>neg</sup>, une sous-population de Tregs possédant la plus forte capacité immunosuppressive, sont significativement augmentés chez les patients MCI par rapport aux témoins (Saresella *et al.*, 2010). Ces données supportent un possible rôle bénéfique des Tregs PD1<sup>neg</sup> qui est perdu au stade démence.

Dans un modèle murin de la maladie, il a été montré que les Tregs contrôlent de façon critique l'amplitude des réponses LT CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$  en réponse à la vaccination (Toly-Ndour *et al.*, 2011). Par ailleurs notre équipe a montré que la déplétion des Tregs, réalisée par administration d'anticorps anti-CD25 chez les souris APP-PS1, accélère le début des déficits cognitifs chez les souris et altère l'expression génique associée à la maladie, alors que l'amplification des Tregs par injection de l'IL-2 restaure les fonctions cognitives. La déplétion et l'amplification des Tregs ne modulent pas la pathologie amyloïde, mais le recrutement des microglies autour des plaques est affecté. Ainsi, l'amplification des Tregs augmente l'accumulation des microglies autour des plaques (Dansokho *et al.*, 2016).

L'ensemble de ces résultats suggèrent un rôle complexe des cellules T dans la MA, avec des effets potentiellement à la fois bénéfiques et délétères.

## II.6. Inflammation systémique

### II.6.1. Inflammation systémique et neuro-inflammation

Parallèlement à la neuro-inflammation, plusieurs études cliniques ont montré le rôle de l'inflammation systémique au cours des pathologies neuro-dégénératives. L'inflammation systémique est caractérisée par une libération de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$ , l'IL1 $\beta$  et l'IL6, ou d'endotoxine dans le compartiment périphérique.

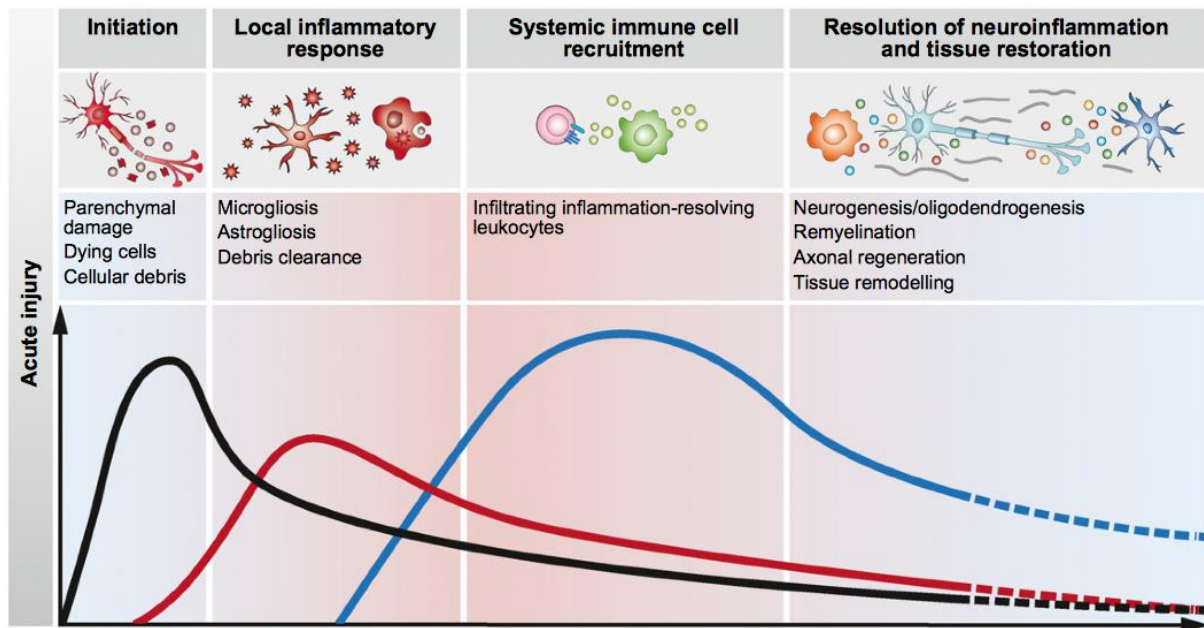


Figure 12 : Recrutement des cellules immunitaires en réponse aux dommages aigus du SNC (Schwartz and Baruch, 2014).

Comme nous l'avons vu, les dommages au niveau du SNC entraînent dans un premier temps l'activation des cellules gliales et des réponses immunitaires locales. En réponse aux dommages aigus du SNC, les leucocytes périphériques (lymphocytes naïfs, lymphocytes T activés en périphérie, cellules NK, PN et macrophages) sont recrutés sous l'influence de cytokines et chimiokines produites par les microglies au niveau des espaces cérébraux. Ces leucocytes périphériques participent à la résolution des réponses immunitaires (**Fig 12**) (Schwartz and Baruch, 2014). Toutefois, une réponse neuro-inflammatoire chronique de bas grade peut s'installer. Ceci a été attribué au fait que la microglie est « primée » et de ce fait hautement réactive à un stimulus. Ce priming peut résulter de la présence de différents activateurs tels que l'exposition chronique aux peptides A $\beta$  et aux débris neuronaux mais également aux cytokines produites par les leucocytes. En effet, les leucocytes sont capables de reconnaître des PAMPs et des DAMPs au niveau du SNC ce qui conduit à leur activation et la libération de cytokines pro-inflammatoires dans le parenchyme. Ceci conduit d'une part à la multiplication de la microglie et d'autre part à sa transformation vers le phénotype pro-inflammatoire. L'exposition à long terme aux cytokines pro-inflammatoires endommage les neurones et induit une inflammation chronique au niveau du SNC (**Fig 13**) (Renaud *et al.*, 2015). Ainsi, il a été rapporté le rôle délétère d'un environnement inflammatoire systémique sur l'aggravation de la dysfonction neuronale et la dégénération au cours de la MA via une exacerbation des réponses des cellules microgliales aux cytokines pro-inflammatoires

produites par les cellules immunitaires périphériques (Perry *et al.*, 2007 ; Perry and Holmes, 2014).

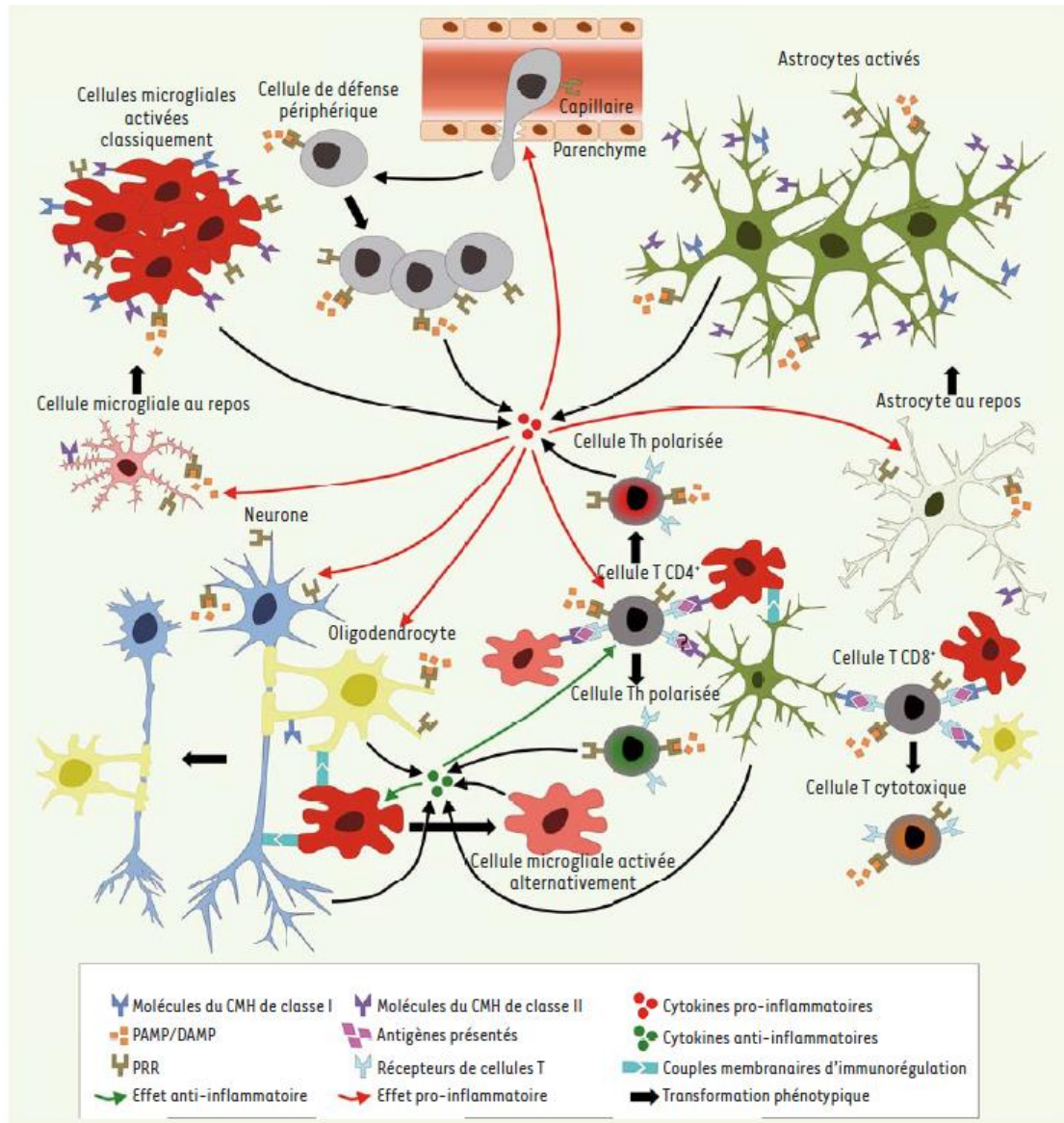


Figure 13 : Dialogues entre les cellules du système immunitaire périphérique et les divers acteurs cellulaires du SNC dans la neuro-inflammation (Renaud *et al.*, 2015).

## II.6.2. Implication de l'inflammation systémique au cours de la MA

Différents arguments soutiennent l'implication de l'inflammation systémique au cours de la MA :

- 1) Des études réalisées chez des personnes âgées ont montré l'association entre inflammation systémique et déclin cognitif (Cunningham *et al.*, 2015). Ainsi, une

inflammation systémique sévère (sepsis sévère) ou prolongée (diabète, athérosclérose, obésité, arthrite) peut avoir des effets délétères sur les fonctions cognitives via l'hyperactivation microgliale et la modification du phénotype des microglies déjà « primées » (Fig 14).

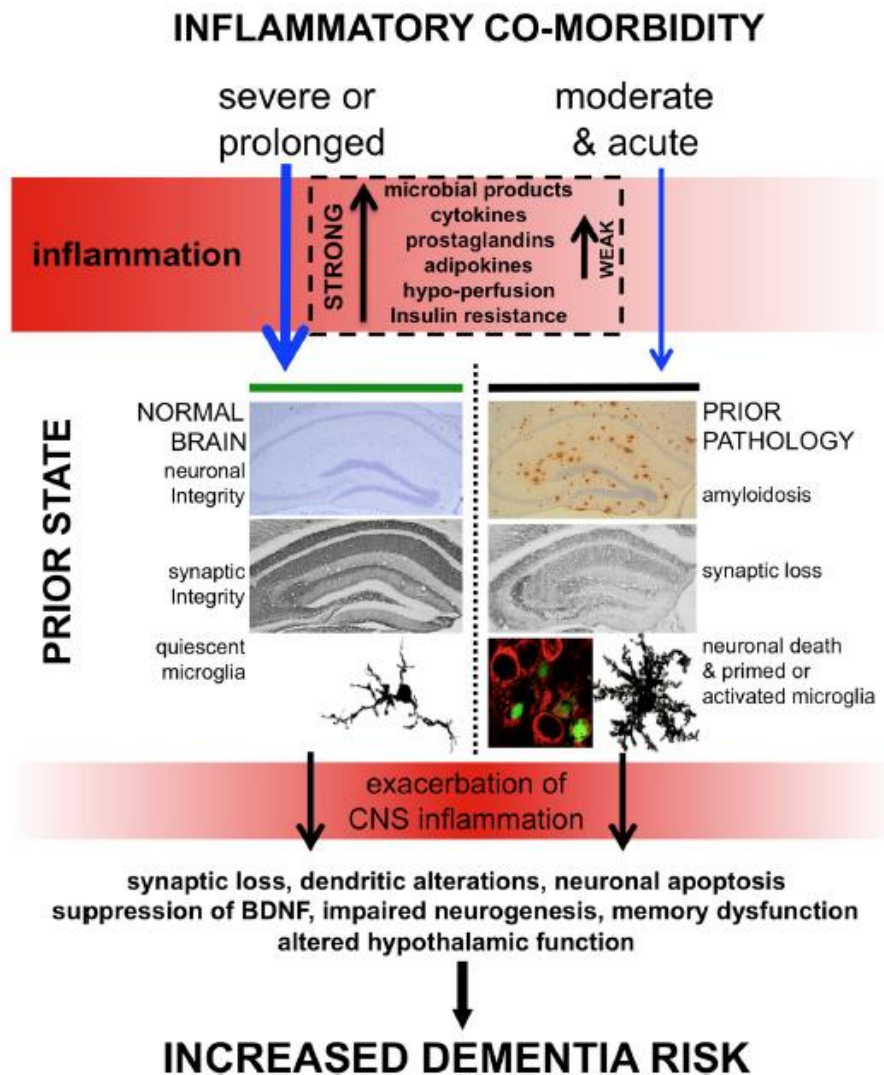


Figure 14 : Co-morbidités inflammatoires au niveau du SNC (Cunningham *et al.*, 2015).

- 2) Une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (comme TNF- $\alpha$ , IL-6) au niveau périphérique a été observée chez les patients atteints de la MA (Holmes *et al.*, 2011). Le TNF- $\alpha$  peut via un certain nombre de voies (les organes circumventriculaires, les afférences vagues et l'endothélium cérébral) changer le phénotype des cellules microgliales et favoriser l'exacerbation de l'inflammation au niveau du SNC. Parallèlement, des études longitudinales réalisées chez des sujets âgés,

ont montré qu'un niveau élevé d'expression des cytokines (comme l'IL-6, TNF- $\alpha$ ) en périphérie augmente la risque de développer une MA (Buchhave *et al.*, 2010).

- 3) Des travaux rétrospectifs ont montré que la prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) chez certains patients MA retarde l'apparition de la maladie et ralentit sa progression.
- 4) Une augmentation de l'expression de la CRP (« C-Reactive Protein ») a également été associée à un risque augmentée de développer une MA (Laurin *et al.*, 2009).
- 5) L'environnement pro-inflammatoire conduit à une altération de la BHE permettant l'extravasation de cellules immunitaires périphériques dans l'espace cérébral. Plusieurs études réalisées chez les modèles murins ont démontré que la perméabilité de la BHE est augmentée après injection de LPS, et qui favorise les symptômes non-cognitifs sans changer le niveau de l'expression du peptide A $\beta$  (Takeda *et al.*, 2013).

De nouvelles approches thérapeutiques ciblant l'inflammation systémique au cours de la MA ont été développées. Ainsi, dans des modèles murins, l'utilisation d'anti-inflammatoires stéroïdiens est capable de réduire la production des cytokines pro-inflammatoires au niveau circulant et d'améliorer certains troubles comportementaux (Murray *et al.*, 2011).

Parmi les cellules de l'immunité, les polynucléaires neutrophiles, cellules clés de l'immunité innée et de la réponse inflammatoire, pourraient jouer un rôle majeur au cours des processus inflammatoires locaux et périphériques associés aux maladies neuro-dégénératives.



### *III. Le polynucléaire neutrophile, au cœur des processus inflammatoires*

Les polynucléaires neutrophiles (PN) également appelés granulocytes neutrophiles constituent 50 à 70% des leucocytes du sang circulant. Ces cellules ont été dénommées initialement “polynucléaire” car il a été longtemps considéré en les observant en microscopie optique qu’elles possédaient plusieurs noyaux, observation qui s’est révélée être fautive. En effet, leur noyau est segmenté en 2 à 5 lobes nucléaires, reliés entre eux par un fil de chromatine. Le noyau est variablement lobé: 95 % des PN ont 2,3 ou 4 lobes nucléaires. La dénomination “polynucléaire” est toutefois encore aujourd’hui majoritairement répandue au sein de la communauté médicale et scientifique française, ce qui a justifié son utilisation dans ce manuscrit.

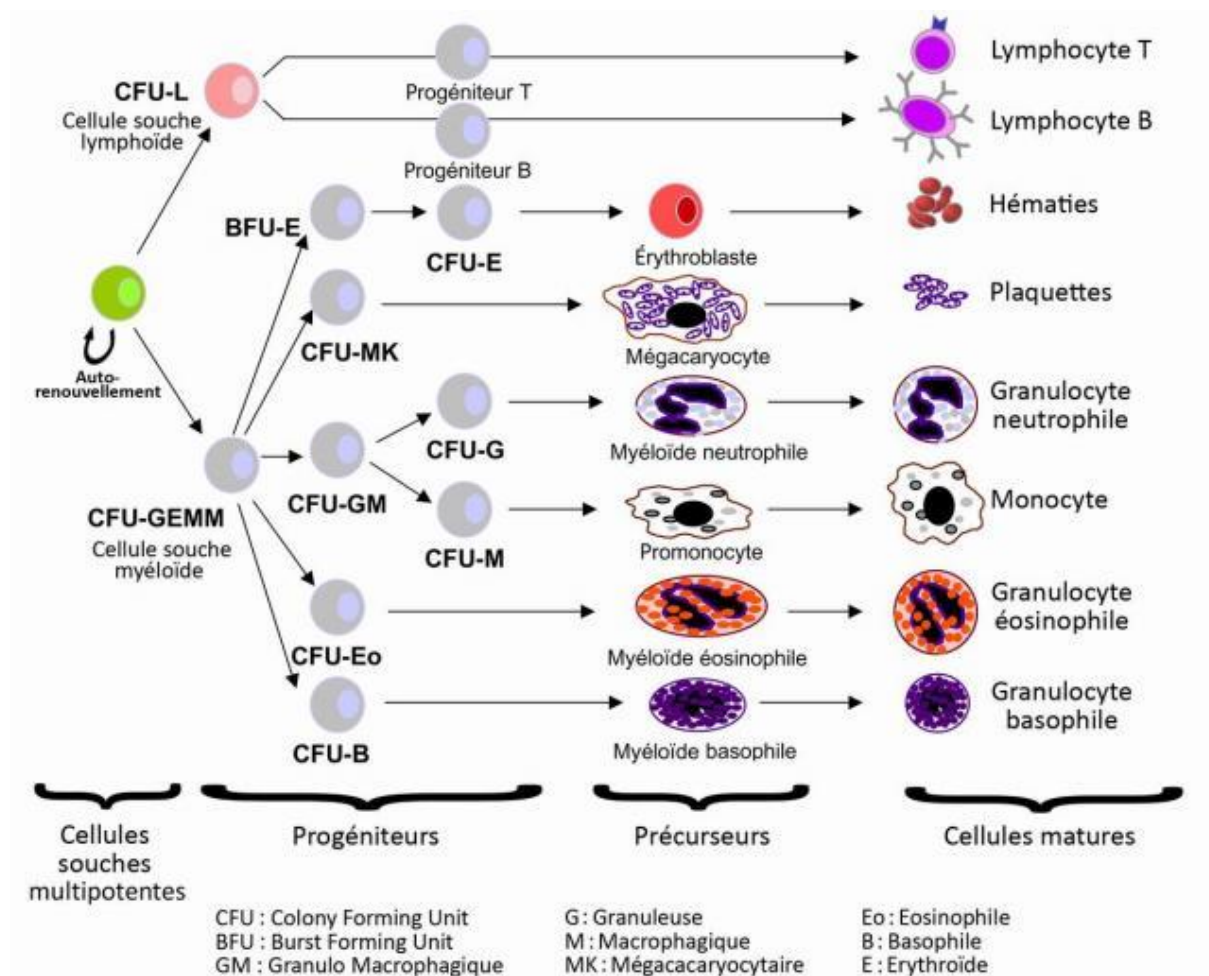
Le qualificatif de « neutrophile » provient également d’une caractéristique visible en microscopie optique: après ajout des colorants vitaux usuels (May-Grünwald Giemsa), ces cellules, fixant mal les colorants acides et basiques, restent neutres. Les autres granulocytes sont les granulocytes éosinophiles et basophiles.

#### **III.1. Origine du polynucléaire neutrophile**

La production des PN ou granulopoïèse a lieu dans la moelle osseuse. Les PN sont formés à partir d’une cellule souche hématopoïétique (« hematopoietic stem cell », HSC). Au début de l’hématopoïèse, cette cellule souche pluripotente, sous l’influence de stimuli, perd sa capacité de renouvellement et se différencie en progéniteur lymphoïde ou progéniteur myéloïde. Les progéniteurs lymphoïdes donnent naissance aux lymphocytes B et lymphocytes T. Parallèlement, les progéniteurs myéloïdes donnent naissance à différents précurseurs capables de se différencier sous l’influence de l’environnement stromal et de facteurs de croissance (**Fig 15**).

Le G-CSF (« Granulocyte Colony Stimulating Factor ») joue un rôle essentiel parmi les facteurs extracellulaires dirigeant la différenciation des HSC en PN. Il est capable d’induire la différenciation myéloïde, la prolifération des précurseurs granulocytaires, et la libération des PN matures de la moelle osseuse (Richards *et al.*, 2003). Les effets du G-CSF

sont médiés via son récepteur, G-CSFR, qui est un membre de la famille des récepteurs aux cytokines de classe I. L'absence ou l'inhibition de ce récepteur se caractérise par une anomalie de formation des PN. D'autres cytokines hématopoïétiques favorisent la différenciation de la lignée myéloïde et contribuent à la production des PN incluant le GM-CSF (« Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor »), l'IL-6 et l'IL-3 (Borregaard, 2010). De plus, plusieurs facteurs de transcription myéloïde, tels que la C/EBP $\alpha$  (« CCAAT-enhancer-binding protein »), la C/EBP $\epsilon$  et le GFI-1 (« Growth factor independent 1 transcription repressor ») interviennent dans la régulation de la granulopoïèse (Ma *et al.*, 2014).



### Compartiments de l'hématopoïèse

Figure 15 : L'hématopoïèse. Elle a lieu dans la moelle osseuse et regroupe l'érythropoïèse, la granulopoïèse et la lymphopoïèse (adapté d'après l'image du forum de Médecins du Maroc)

En outre, il a été récemment montré que le processus d'autophagie est essentiel au cours de la différenciation normale de PN. En effet, la dégradation de gouttelettes lipidiques

et la production d'acides gras libres ont lieu durant l'autophagie, ce qui maintient l'équilibre entre la production d'énergie et le métabolisme et offre suffisamment l'ATP (Adénosine triphosphate) afin de favoriser la différenciation de PN (Riffelmacher *et al.*, 2017).

La différenciation des PN passe par plusieurs étapes : myéloblaste, promyélocyte, myélocyte, métamyélocyte, « band » PN puis PN mature caractéristique par son noyau plurilobé la présence de nombreuses granulations cytoplasmiques. Le PN mature a également une taille inférieure à ces précurseurs. Le temps de maturation est d'environ de 14 jours. La formation des granules des PN débute durant la différenciation du myéloblaste en promyélocyte et dure 4-6 jours (Summers *et al.*, 2010), au cours desquels apparaissent les granules azurophiles (ou primaires). Cette phase est suivie par l'apparition des granules spécifiques (ou secondaires) au stade de myélocytes, puis des granules gélatinases (ou tertiaires) au stade de métamyélocytes ou PN immature (**Fig 16**). A ce stade, la chromatine est plus condensée. La granulopoïèse des PN se termine par le développement de granules riches en Ficolin-1 et de vésicules sécrétoires (Cowland and Borregaard, 2016). Un PN mature est caractérisé par un noyau plurilobé et une diminution de la taille cellulaire.

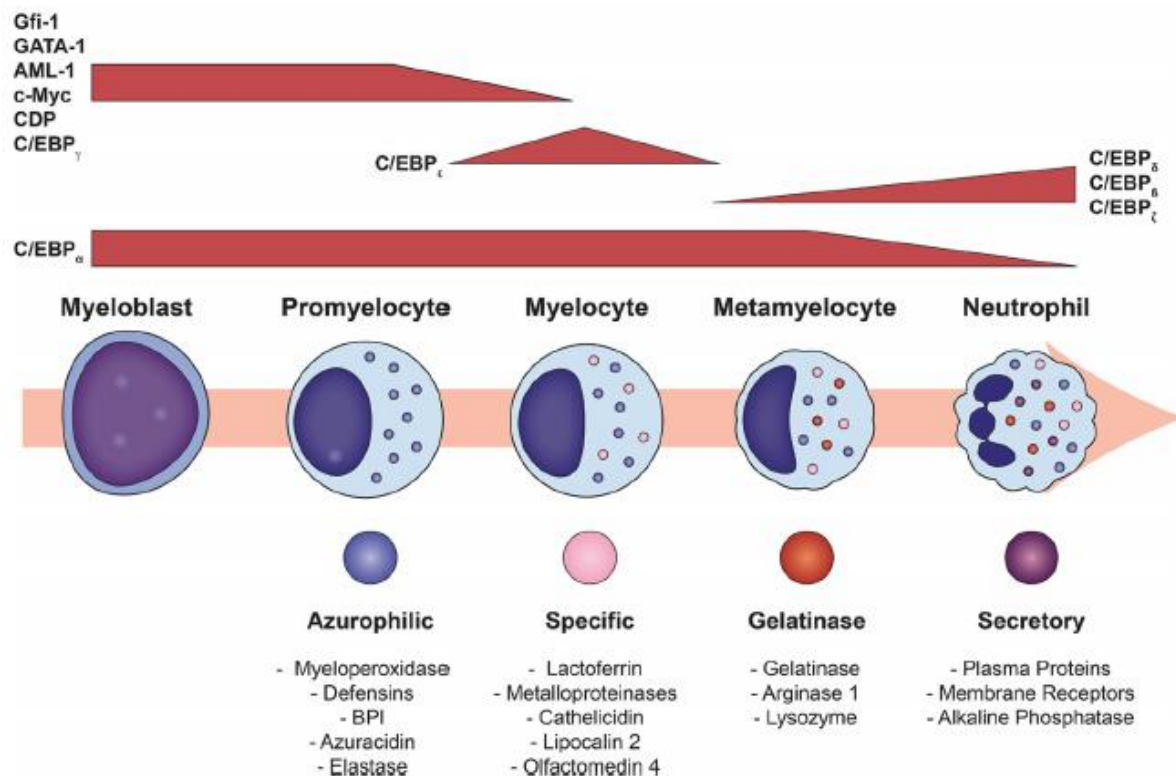


Figure 16 : La granulopoïèse de PN et les facteurs de transcription associés. (Lawrence *et al.*, 2018)



Les PN matures sont prêts à sortir de la moelle osseuse en traversant l'endothélium sinusoidal qui sépare l'environnement hématopoïétique de la circulation. Cette libération des PN matures dans la circulation sanguine dépend de différents médiateurs et l'homéostasie cellulaire est régulée par deux récepteurs de chimiokines majeurs CXCR (« CXC chemokine receptor »)-2 et CXCR-4.

L'expression de CXCR-2 à la surface des PN matures nouvellement formés est élevée et les PN peuvent être facilement mobilisés de la moelle osseuse vers le sang circulant sous l'influence des ligands de CXCR-2 (CXCL-1, GRO- $\alpha$ ) libérés par les cellules endothéliales. A l'inverse, CXCR-4, est exprimé faiblement à la surface cellulaire des PN matures ; son principal ligand est CXCL12 ou SDF-1 (« Stromal-Derived Factor 1 »). Ainsi, les PN sont retenus dans la moelle osseuse sous l'influence de l'interaction entre CXCR-4 et SDF-1 (Kim *et al.*, 2006). Après leur libération dans la circulation sanguine, les PN deviennent sénescents et l'expression de CXCR-4 augmente alors que l'expression de CXCR-2 diminue. Les PN CXCR-4<sup>high</sup> meurent par apoptose ou retournent dans la moelle osseuse où ils sont phagocytés par les macrophages. Durant ce processus, les macrophages ne produisent plus d'IL-23, inhibant ainsi la production d'IL-17 par les cellules Th17, diminuant la production de G-CSF et, par conséquent, le développement et la libération des PN. Cette boucle complexe de régulation permet de maintenir le nombre de PN circulants et tissulaires relativement constant (Stark *et al.*, 2005).

Dans les conditions physiologiques, les PN se trouvent non seulement dans la moelle osseuse ou la circulation sanguine, mais aussi dans certains organes, tels que le poumon, la rate et le foie. Grâce à ces réservoirs de PN matures, ceux-ci peuvent être utilisés immédiatement lors de l'introduction d'un agent pathogène dans l'organisme pathogène (Summers *et al.*, 2010).

L'homéostasie des PN est donc maintenue par une fine balance entre la granulopoïèse, le stockage dans la moelle osseuse, la libération dans la circulation sanguine, la migration intravasculaire, et la clairance phagocytaire.

### III.2. Granules des PN

Historiquement, les PN contiennent trois types distincts de granules : les granules azurophiles ou primaires, les granules spécifiques ou secondaires, les granules à gélatinases ou tertiaires, et les vésicules sécrétaires (**Fig 16**). Une étude récente a rapporté la présence de granules riches en ficoline-1, formées lors de la différenciation du myélocyte en métamyélocyte (Rørvig *et al.*, 2013). La dégranulation de ces différentes granules conduit à la libération de leur contenu dans le milieu extracellulaire et contribue donc aux effets biologiques du PN. Les granulations formées durant les derniers stades de la différenciation terminale sont plus sujettes à la mobilisation que celles formées au cours des premiers stades.

#### III.2.1. Granules azurophiles ou primaires

Les granules azurophiles sont très difficilement mobilisables à la membrane. Elles contiennent des substances jouant un rôle majeur dans la bactéricidie et dans la réponse inflammatoire, notamment :

- La myéloperoxydase (MPO), une enzyme libérée dans la phagolysosome favorisant la production des FROs. La MPO est capable de lier à la surface des PN et des plaquettes, à l'origine d'activités fonctionnelles pro-inflammatoires (Grigorieva *et al.*, 2016). La MPO est également capable de se lier à la membrane plasmique via l'intégrine CD11b/CD18 afin de déclencher la dégranulation des granules primaires et secondaires (Lau *et al.*, 2005).
- Des peptides anti-microbiens, tels que l' $\alpha$ -Défensine et les protéines BPI (« Bactericidal/permeability increasing protein »). En plus de leur propriété microbicide, ces médiateurs participent respectivement à la chimioattraction des cellules T (Yang *et al.*, 2000), et à l'activité antibactérienne vis à vis des bactéries à Gram négatif (Levy *et al.*, 1999).
- Des protéines membranaires (préniline-1, CD63, et CD68).
- De nombreuses sérines protéases (élastase, protéinase 3 et cathepsine G).

#### III.2.2. Granules spécifiques ou secondaires

Les granulations spécifiques ou secondaires sont majoritaires au sein des PN matures. Elles sont caractérisées par l'absence de MPO, la présence de phosphatase alcaline et de lactoferrine qui constitue la protéine majeure de ces granules spécifiques. La lactoferrine participe aux activités microbicides des PN via sa capacité à fixer le fer ; elle est également

capable de diminuer la production des FROs (Legrand *et al.*, 2005) et de moduler la maturation de cellules T (Kruzel *et al.*, 2006).

Ces granulations contiennent également des molécules importantes pour les fonctions des PN, telles que la NGAL (« Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin »), la résistine (cytokine pro-inflammatoire capable de limiter l'accumulation des PN au niveau du foyer inflammatoire), le lysozyme, et la collagénase MMP-8, enzyme capable d'hydrolyser les protéines de la matrice extracellulaire participant ainsi à la migration des PN vers le site inflammatoire.

### III.2.3. Granules gélatinases ou tertiaires

Les granules gélatinases ont été ainsi dénommées du fait de leur contenu riche en gélatinase (ou MMP-9 (« Matrix metalloproteinase 9 »)) et de leur apparition en dernier lors de la maturation des PN.

Les MMPs sont des enzymes protéolytiques caractérisées par la présence d'un ion  $Zn^{2+}$  lié à 3 résidus histidine. L'activation de la MMP-9, déclenchée par la présence des FROs, (Yu *et al.*, 2013), participe à la dégradation la matrice extracellulaire. La MMP-9 activée forme des complexes avec le TIMP-1 (« Tissue inhibitor of metalloproteinase 1»), son inhibiteur spécifique, qui inhibe son activité protéolytique. L'altération de l'équilibre entre eux pourrait donc entraîner des processus pathologiques (Brew *et al.*, 2000).

Les granules gélatinases expriment également à leur surface des protéines membranaires comme la  $\beta 2$ -intégrine CD11b/CD18, le CD67 et le CD177. Elles sont mobilisées lors de l'établissement de contact entre les PN et les cellules endothéliales activées (Kjeldsen *et al.*, 1994).

### III.3. Principales étapes fonctionnelles des PN

Les différentes étapes impliquées dans le fonctionnement des PN sont illustrées par la **figure 17** :

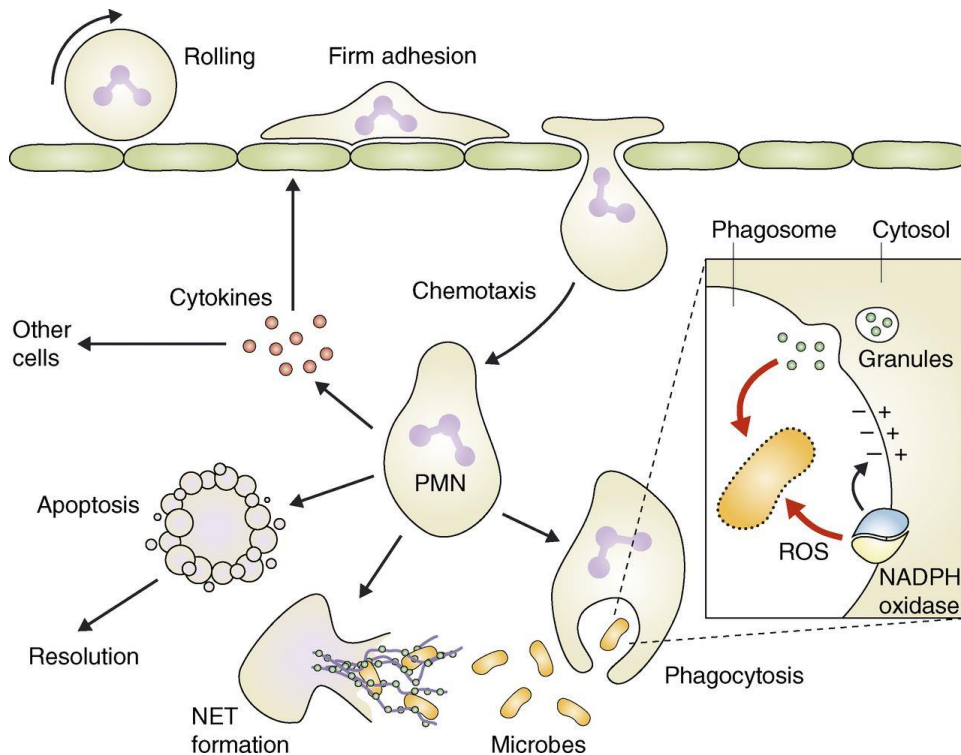


Figure 17 : Illustration schématique du mécanisme d'activation des PN et des étapes menant à leur extravasation durant l'inflammation (Mócsai 2013).

### III.3.1. Adhérence à la cellule endothéliale et migration transendothéliale

En présence d'un processus infectieux, d'un dommage tissulaire ou d'une inflammation, les PN sont les premières cellules à migrer du sang circulant vers le foyer inflammatoire. Les PN adhèrent aux cellules endothéliales, se glissent et se dirigent de façon orientée vers leur cible tissulaire pour l'éliminer au niveau du foyer inflammatoire (**Fig 17**). L'adhérence des PN aux cellules endothéliales est modulée par trois classes de molécules d'adhérence : les sélectines, les intégrines et les molécules d'adhérence de la superfamille des immunoglobulines (Dimasi *et al.*, 2013). Le processus d'extravasation des PN pourrait être divisé en deux étapes successives :

La première étape fait intervenir des molécules de la famille des sélectines : la L-sélectine (CD62L) présente de façon constitutive à la surface des PN, ainsi que les E-, P-sélectines (CD62E et CD62P) et leur ligands (comme l'ESL-1, la PSGL-1) dont l'expression augmente à la surface des cellules endothéliales sous l'influence de médiateurs inflammatoires tels que des cytokines (IL-1, TNF $\alpha$ ) (**Fig 18**). Les interactions entre ces différentes sélectines, sont de faible affinité et induisent un ralentissement des PN en déclenchant un phénomène de roulement (ou « rolling ») du PN le long de l'endothélium.

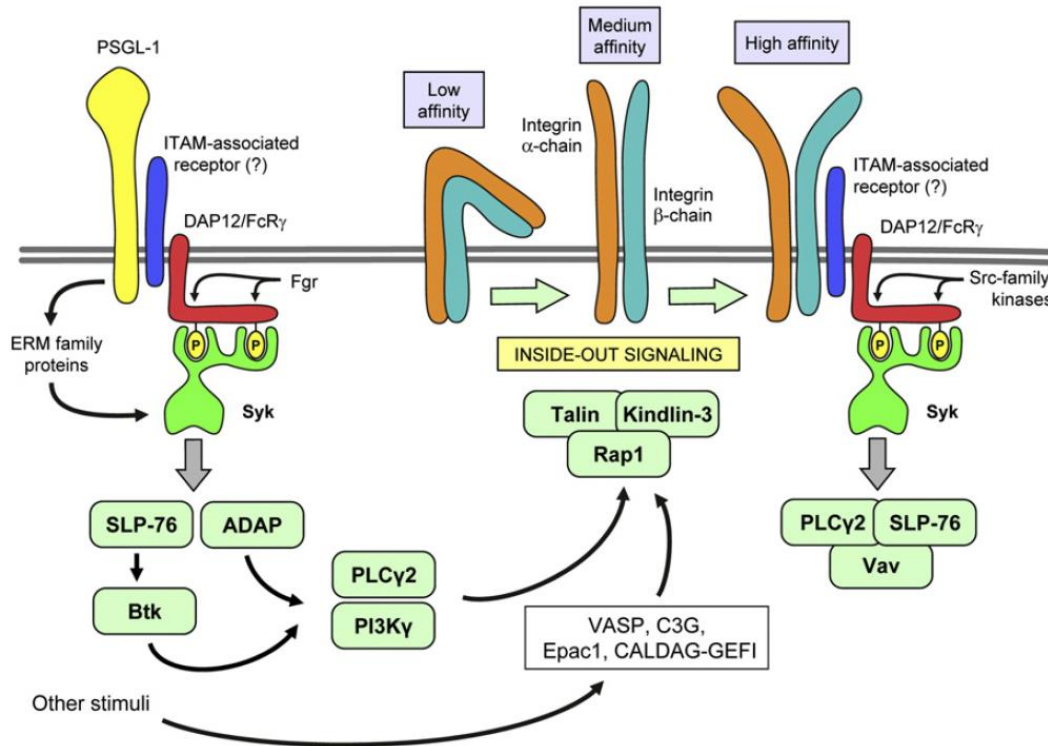


Figure 18 : Les voies de signalisation impliquées dans l'adhérence des PN aux cellules endothéliales (Futosi *et al.*, 2013). La PSGL-1 et les  $\beta$ 2 intégrines se lient aux motifs ITAM associés aux récepteurs afin de déclencher l'adhérence des PN aux cellules endothéliales. Des protéines supplémentaires sont recrutées et impliquées dans la régulation de ce processus via un mécanisme « Inside-Out Signaling ».

Dans un second temps, le ralentissement des PN au niveau de l'endothélium permet l'interaction entre des chimiokines exprimées à la surface des cellules endothéliales, telle que l'IL-8 et leur récepteur exprimé à la surface des PN. Ceci conduit à l'activation du PN aboutissant d'une part au clivage enzymatique de la L-sélectine libérée dans le milieu extracellulaire et d'autre part à une augmentation de l'expression membranaire des  $\beta$ 2 intégrines, notamment la molécule CD11b/CD18, suite à la translocation des granules intracellulaires vers la membrane plasmique. Les  $\beta$ 2 intégrines activées se lient avec une forte affinité aux molécules d'adhérence ICAM (« Intercellular Adhesion Molecules ») exprimées par les cellules endothéliales.

Les PN traversent l'endothélium en utilisant deux voies non mutuellement exclusives. La migration trans-cellulaire (au travers des cellules endothéliales) est utilisée par 5-20% des PN ; cette voie induit la translocation d'ICAM-1 dans les régions riches en actine et

cavéoline, créant une organelle vesiculo-vacuolaire qui forme un canal intracellulaire au travers duquel le PN peut traverser la cellule. La migration paracellulaire (entre les cellules endothéliales) est plus fréquente et fait intervenir plusieurs interactions entre les  $\beta$ 2-intégrines et des molécules d'adhérence endothéliales telles qu'ICAM-1 et -2, PECAM-1, la VE-cadhérine et le CD99. (Dimasi *et al.*, 2013)

Après avoir traversé la barrière endothéliale, les PN migrent dans les tissus vers le site inflammatoire ou infectieux. Cette migration se fait de façon orientée suivant un gradient de substances chimioattractantes dont des dérivés bactériens (notamment le fMLP, « formyl-Methionyl-Leucyl-Phénylalanine »), ou des dérivés du système du complément (comme le C3a et le C5a), des dérivés lipidiques tels que le leucotriène B4 et le « Platelet Activating Factor » (PAF) ou des chimiokines telles que l'IL-8 (Kolaczowska and Kubes, 2013).

### III.3.2. Reconnaissance des agents pathogènes par les PN

Arrivé au niveau du site inflammatoire, les PN reconnaissent les agents pathogènes à l'aide de récepteurs, les PRRs qui reconnaissent des motifs pathogènes conservés au cours de l'évolution, les PAMPs. Les principaux PRRs des PN sont: les TLR (« Toll-like receptors »), les CLR (récepteurs de la lectine de type C) et les NLR (« NOD-like receptors ») (Thomas and Schroder, 2013) (Fig 19).

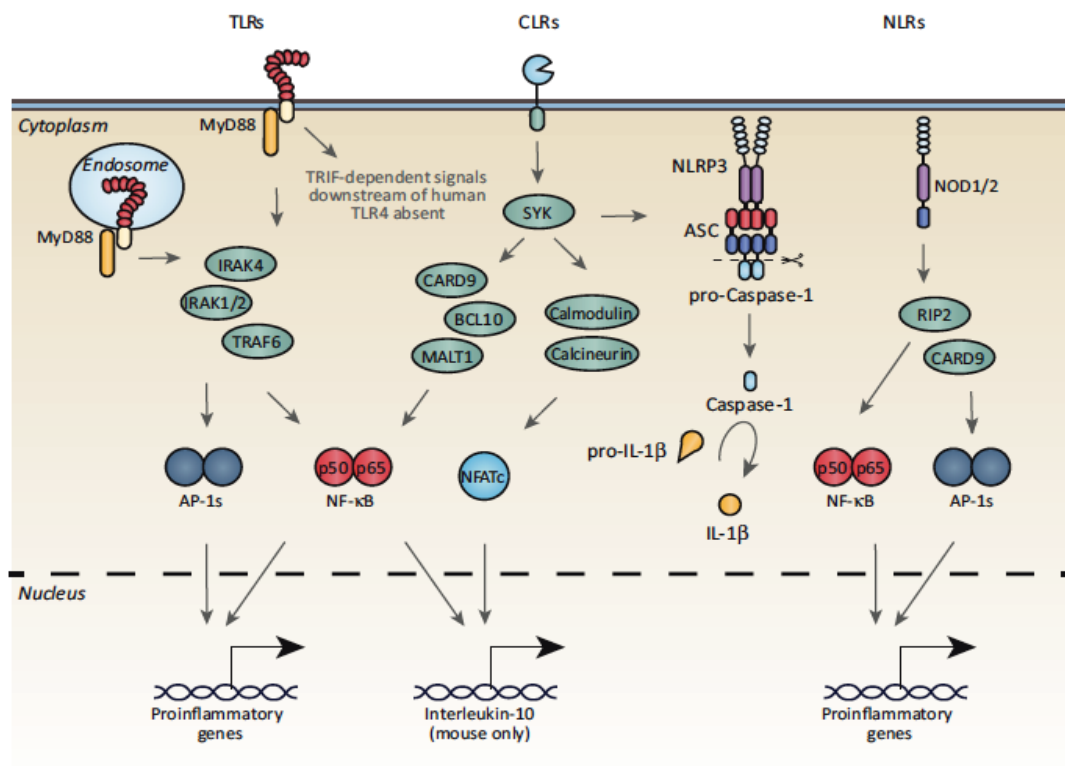


Figure 19 : Voies de signalisation des PRRs exprimés par les PN. Représentation de l'expression des gènes et de la production de cytokines après activation des voies de signalisation des PRR. Ces voies contrôlent également d'autres mécanismes des PN, comme la phagocytose, la dégranulation, la production de formes réactives de l'oxygène et la survie (Thomas and Schroder, 2013).

Les TLR sont des protéines transmembranaires de type I comprenant un domaine extracellulaire riche en leucines (LRR « leucine rich repeat »), responsable de la reconnaissance des PAMPs. De plus, il existe une partie transmembranaire riche en cystéines et un domaine intracellulaire identique à celui du récepteur de l'IL1 (Toll/IL-1R domain = TIR domain) qui permet l'initiation des voies de signalisation intracellulaires (Prince *et al.*, 2011). Les PN humains expriment tous les TLR sauf le TLR3 (Brandes *et al.*, 2013) et le TLR7 (Janke *et al.*, 2009). Les TLRs 1/2/4/5/6 sont des récepteurs transmembranaires de surface reconnaissant des ligands extracellulaires alors que les TLRs 8 et 9 sont des récepteurs endosomaux qui reconnaissent des ligands intracellulaires à l'intérieur de l'endolysosome. Les PRRs les plus exprimés par les PN sont le TLR4, le TLR2 et le TLR9 qui reconnaissent respectivement le LPS, les lipopeptides bactériens et l'ADN bactérien. La voie de signalisation dépendante de MyD88 déclenche l'activation des kinases IRAK (« Interleukin-1 receptor associated kinase ») et de TRAF6 (« TNF receptor associated factor »), induisant la translocation nucléaire de facteurs de transcription de la voie NF- $\kappa$ B aboutissant ainsi à l'expression des cytokines pro-inflammatoires (**Fig 19**). La liaison des ligands aux TLRs exprimés par les PN module également ses activités biologiques, telles que la migration, la phagocytose, l'apoptose, la dégranulation et la production des FROs.

D'autre part, les PN expriment aussi les CLR, famille de protéines qui possèdent des lectines membranaires caractérisées par un domaine de reconnaissance des carbohydrates et essentiels dans la réponse antifongique. La liaison du ligand aux CLR déclenche la phosphorylation du motif ITAM (« Immunoreceptor tyrosine-based activation-like motif ») et l'activation de la SYK (« Spleen Tyrosine Kinase »). Cette dernière est impliquée dans la phagocytose et la production des FROs par l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, et de la voie de la NFAT (« Nuclear factor of activated T cells »), ainsi que de l'inflammasome NLRP3 (**Fig 19**).

Les PRRs cytoplasmiques exprimés par les PN sont les NLRs. Les protéines NOD1 et NOD2 modulent l'activité de la voie NF- $\kappa$ B et celle de la MAPK, alors que NLRP1 et la NLRP3 conduisent à la formation de l'inflammasome et à la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 matures.

Les PN expriment d'autres PRRs, tels que la RIG-1 (« Retinoic-acid-inducible protein 1 »), la MDA-5 (« Melanoma differentiation associated gene 5 »), membres de la famille RLRs, qui reconnaissent l'ARN cytoplasmique (Tamassia *et al.*, 2008), et le TREM-1 qui est impliqué dans la dégranulation et la phagocytose des PN (Bouchon *et al.*, 2000).

### III.3.3. Phagocytose des agents pathogènes par les PN

Les interactions entre les PN et les cibles peuvent être directes, par la reconnaissance de PAMP par les PRR (décrits ci-dessus), mais également par opsonisation. Ce dernier phénomène est mis en place grâce à des récepteurs pour le fragment Fc des IgG (Fc $\gamma$ R) et par les récepteurs du complément présents à la surface des PN (Nordenfelt and Tapper, 2011).

Les Fc $\gamma$ R sont une classe complexe de récepteurs qui varient selon leur ligand, leur expression et leur fonction (Bruhns, 2012). Dans les PN humains, le Fc $\gamma$ RIIa (CD32), le Fc $\gamma$ RIIIb (CD16b) s'expriment de manière constitutive à la surface des neutrophiles. Par contre, l'expression de Fc $\gamma$ RI (CD64) est induite par l'IFN $\gamma$  (Repp *et al.*, 1991). Le CD32 joue un rôle important pour la phagocytose car il possède une queue intra-cytoplasmique avec des motifs activateurs ITAM (Selvaraj *et al.*, 2004). Son engagement induit ainsi l'activation de différentes voies de signalisation impliquées dans la phagocytose.

La phagocytose médiée par le complément est accomplie par la reconnaissance spécifique de la cible recouverte de C3bi par les récepteurs du complément : CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18, Mac1 ou integrin- $\alpha$ M $\beta$ 2) et CR4 (CD11c/CD18 ou integrin- $\alpha$ X $\beta$ 2), présents sur les PN (Tohyama and Yamamura, 2006). Cette phagocytose est peu active et contrairement aux Fc $\gamma$ R, les récepteurs du complément ont besoin de stimuli additionnels pour permettre la phagocytose,

Après reconnaissance et adhérence à la cible, le PN émet des pseudopodes lui permettant d'englober sa cible au sein d'une vacuole de phagocytose intracellulaire nommée comme phagosome. La maturation du phagosome passe par la mobilisation et la fusion des



granulations conduisant à la formation du phagolysosome au sein duquel seront libérées les molécules antimicrobiennes.

### III.3.4 Destruction des agents pathogènes par les PN

Le PN détruit sa cible au sein du phagolysosome par l'intermédiaire de deux grands types de mécanismes coopératifs : le système indépendant de l'oxygène et le système dépendant de l'oxygène. De plus, le PN peut également éliminer le pathogène via des structures extracellulaires.

#### III.3.4.1. Système indépendant de l'oxygène

Ce système correspond au déversement dans le phagosome de substances bactéricides (lysosyme, défensines, cathelicidines, lactoferrine) ainsi que des protéases (élastase, protéinase 3) contenues dans les granulations suite à la mobilisation de ces granulations et à leur fusion avec le phagosome. L'acidification de la vacuole de phagocytose intervenant après sa formation, favorise l'action des enzymes comme la MPO et le lysozyme. Les granulations peuvent également être mobilisées au niveau de la membrane plasmique et fusionnées avec cette dernière conduisant à la libération de leur contenu dans le milieu environnant.

Le processus de dégranulation est déclenché par l'interaction entre les ligands et les récepteurs de phagocytose à la surface des PN. Ceci conduit à la mobilisation des granules du cytosol vers la membrane plasmique ou vers le phagosome formé puis à leur ancrage et leur interaction avec la membrane plasmique ou la membrane du phagosome. L'association entre les molécules SNARE (« Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor ») de la membrane cible et les molécules VAMP (« Vesicle associated Membrane Proteins ») au niveau des granules favorise l'exocytose de leur contenu. (Naegelen *et al.*, 2015).

Ainsi, la libération de molécules microbicides par dégranulation est nécessaire à la réponse immunitaire pour contrôler les pathogènes. Plusieurs de ces protéines granulaires sont appelées « alarmines » car elles participent au recrutement et à l'activation d'autres cellules du système immunitaire et sont impliquées dans la modulation de la réponse adaptative (Yang and Oppenheim, 2009; Yang *et al.*, 2013).

### III.3.4.2. Système dépendant de l'oxygène ou explosion oxydative

L'explosion oxydative consiste en une production rapide et massive de FRO et représente un outil essentiel pour la destruction des agents pathogènes. Les PN se caractérisent par une forte production de FRO.

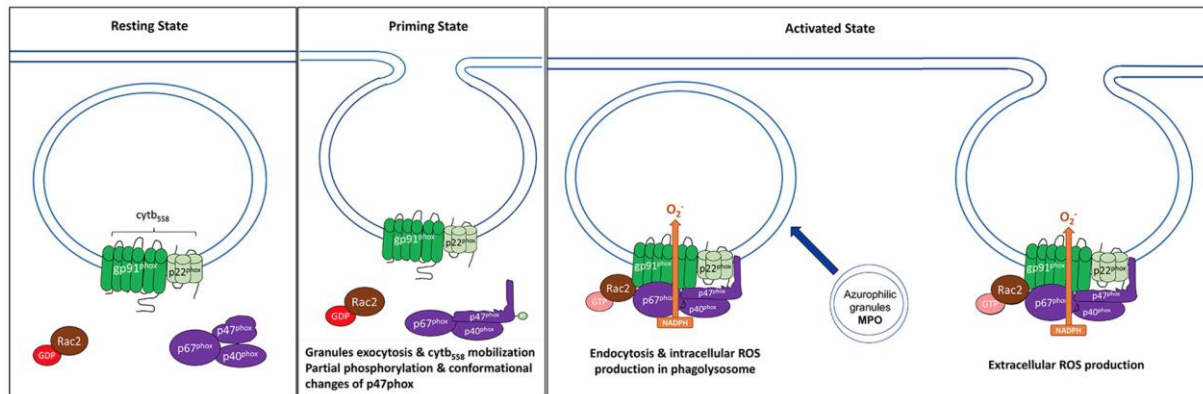


Figure 20 : Représentation schématique du complexe NADPH oxydase au sein des PN au repos et des PN activés (Nguyen *et al.*, 2017).

Cette production de FRO fait intervenir un système enzymatique complexe, la NADPH oxydase. La NADPH-oxydase appartient à la famille des Nox. Actuellement, sept enzymes homologues ont été décrites dans plusieurs types cellulaires et répertoriées en deux familles (Brandes *et al.*, 2013), les protéines de la famille Nox (Nox 1, 2, 3, 4 et 5) et les membres de la famille Duox (Duox 1 et 2).

La Nox2 est la première enzyme de la famille des Nox à avoir été identifiée, et il est un complexe enzymatique constitué de plusieurs composants protéiques, dispersés entre les membranes et le cytosol dans le PN au repos (**Fig 20**). Les composants membranaires sont le cytochrome b<sub>558</sub>, constitué de deux sous-unités, la gp91<sup>phox</sup> (« phagocyte oxidase ») et la p22<sup>phox</sup>. Les trois autres oxydases phagocytaires forment les composants cytosoliques : p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>. Après l'activation du PN sous l'influence de différents stimuli, la p47<sup>phox</sup>, dont l'activité est inactivée dans les PN au repos, est phosphorylée au niveau de plusieurs résidus sérine par différentes kinases ce qui permet un changement de conformation et l'activation de la sous-unité avec d'autres composants. La protéine G monomérique de type Rac2, qui est dans le cytosol dans les PN au repos, est activée et se lie à la gp91<sup>phox</sup> et à la p67<sup>phox</sup> en favorisant l'établissement de cette sous-unité au niveau membranaire (El-Benna *et al.*, 2016). Celle-ci va permettre le transfert d'un électron à partir du NADPH sur l'oxygène

moléculaire donnant naissance l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), précurseur des autres FRO à savoir : le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyde ( $OH^\circ$ ) hautement toxique et l'acide hypochloreux, composé voisin de l'eau de javel puissamment bactéricide.

L'activation de la NADPH oxydase fait intervenir différentes étapes survenant au cours de la migration du PN vers le foyer infectieux. Une 1<sup>ère</sup> étape de « priming » ou amorçage des PN correspond à un état intermédiaire d'activation et augmente la susceptibilité du PN à l'activation par un second stimulus localisé au site même d'infection. Cette étape de « priming » résulte de l'interaction de différents médiateurs tels que des cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-8, IL-6, GM-CSF) ou des agonistes des TLR avec les PN (Elbim *et al.*, 1994). Cette interaction conduit à de nombreux changements au niveau des composants de la NADPH oxydase, incluant la phosphorylation partielle de la  $p47^{phox}$  et son changement de la conformation. En revanche, l'engagement de certains récepteurs tels que les intégrines ou les Fc $\gamma$ R peut activer directement la NADPH oxydase (Nguyen *et al.*, 2017).

Le processus de dégranulation des PN est également impliqué dans la régulation de l'activité de la NADPH oxydase et ce de manière coopérative au sein du phagosome. En effet, la dégranulation conduit à une augmentation de l'expression membranaire de certains composants de la NADPH oxydase, tels que le cytochrome  $b_{558}$  (Uriarte *et al.*, 2011).

Les FRO induisent des altérations lipidiques, protéiques et des atteintes des acides nucléiques et participent ainsi de manière effective à la destruction des agents pathogènes. L'importance de l'explosion oxydative, en tant que mécanisme de défense contre les microbes, est attestée par l'existence d'une maladie liée à une anomalie dans un des gènes codant pour les différents composants de la NADPH-oxydase, la granulomatose septique familiale (CGD) (Kannengiesser *et al.*, 2008). Les deux formes les plus fréquentes sont liées à un défaut dans  $gp91^{phox}$  (liée à l'X, environ 70% des cas) ou un défaut dans  $p47^{phox}$  (autosome récessif, environ 25% des cas). Cette maladie est caractérisée par une diminution profonde ou totale de la production de FRO et en conséquence, la présence d'infections bactériennes et fongiques récurrentes et sévères. (Desjardins *et al.*, 2012). Dans le cas contraire, la production excessive ou inappropriée de FRO dans le milieu extracellulaire peut conduire à la survenue de lésions tissulaires (Mittal *et al.*, 2014) et a été impliquée dans la physiopathologie de nombreuses maladies inflammatoires aiguës ou chroniques.

### III.3.4.3. Système de destruction extracellulaire : la NETose ou production de « Neutrophil extracellular traps » (NETs)

Il a été récemment décrit l'émission par les PN dans le milieu extracellulaire de protéines granulaires bactéricides associées à de la chromatine décondensées et formant des fibres extracellulaires appelées « Neutrophil Extracellular Traps » (NETs) (**Fig 21**). Les NETs immobilisent et tuent les pathogènes extracellulaires (Brinkmann *et al.*, 2004). La formation des NETs est un processus orchestré, appelé la NETose, qui débute par des changements morphologiques du noyau qui perd son intégrité, suivis par la disparition des granules et se termine par la vésicularisation et la rupture de la membrane plasmique qui permet la libération dans le milieu extracellulaire du contenu cytoplasmique. Durant la NETose, la chromatine se déplie, les membranes se désintègrent, permettant ainsi le mélange de la chromatine avec des protéines des granulations, du cytoplasme et issues d'autres compartiments cellulaires. Cette production de NETs est définie comme l'étape ultime d'un processus d'activation des PN pouvant ou pas aboutir à la mort cellulaire (Fuchs *et al.*, 2007).

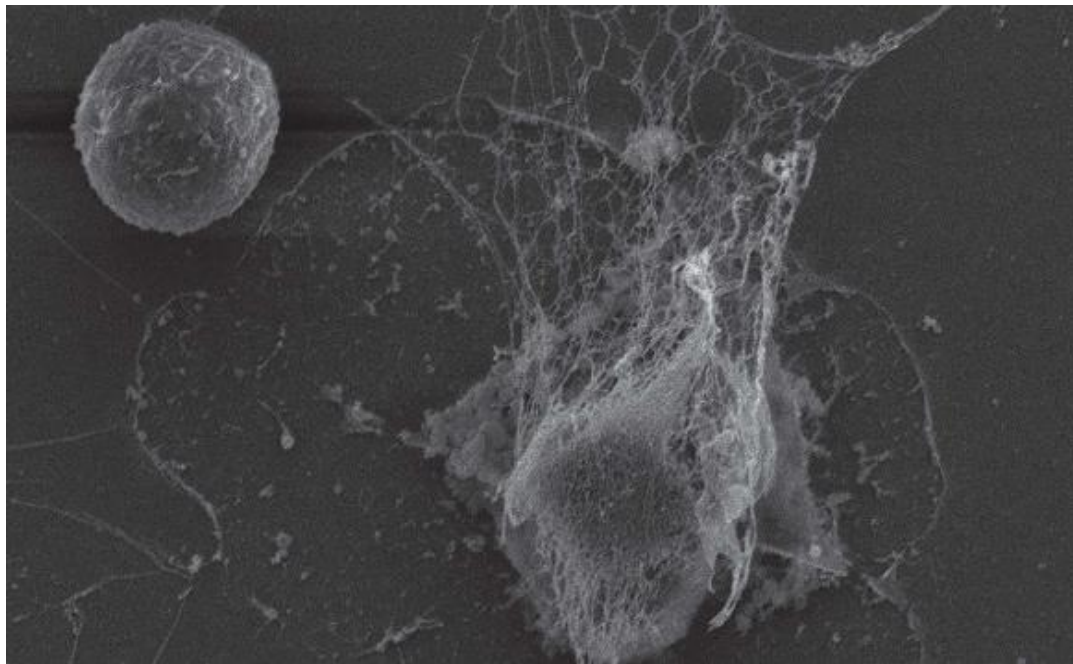


Figure 21 : Formation des NETs par le PN en réponse à une cellule tumorale (Park *et al.*, 2016). Observation en microscopie électronique à balayage de la formation des NETs par un PN (à droite) induite par la présence d'une cellule cancéreuse (à gauche).

Les mécanismes à l'origine de la NETose ne sont pas encore totalement élucidés à ce jour. Divers activateurs des PN induisent le processus de NETose tels que des médiateurs pro-inflammatoires (comme  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-8, PAF), l'association GM-CSF/C5a/LPS, les cellules

endothéliales ou les plaquettes, ainsi que des agents pharmacologiques tels que le PMA *in vitro* (Brinkmann *et al.*, 2004). De façon intéressante, il a été rapporté que l'élastase induite par NETs peut entraîner des fragmentation des fibrilles amyloïdes en oligomères toxiques (Azevedo *et al.*, 2012).

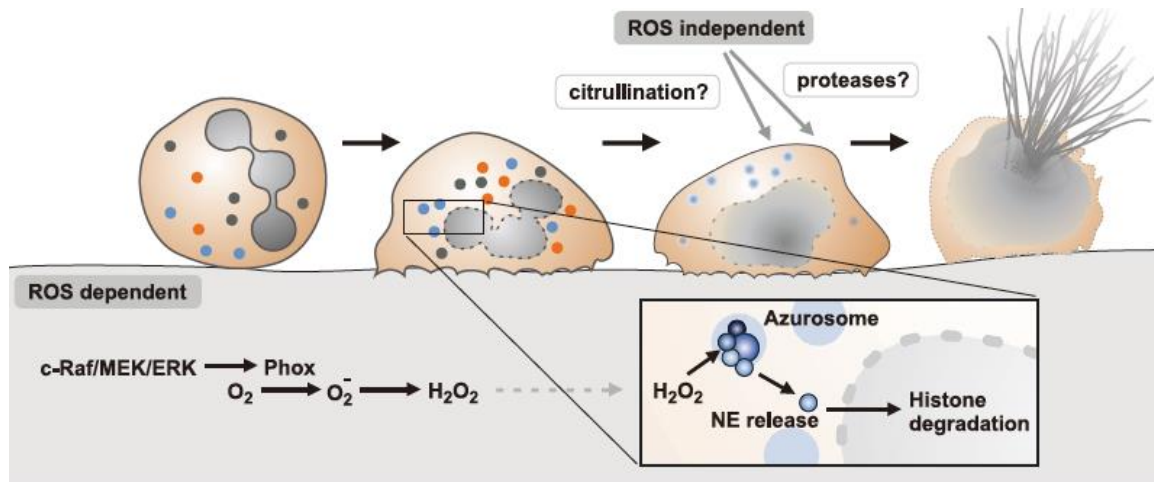


Figure 22: Deux hypothèses sur la formation des NETs (Sollberger *et al.*, 2018).

Les processus moléculaires aboutissant à la libération de NETs sont complexes et variés. Le mécanisme le mieux connu est celui qui est déclenché par le PMA, puissant activateur de la protéine kinase C. Dans ce cas, La NETose est dépendante de la production de FRO comme l'inhibition de la production des NETS en cas de blocage de la NADPH oxydase (Hakkim *et al.*, 2011). La voie de signalisation c-Raf/MEK/ERK, événement précoce en aval de l'activation de l'oxydase, est nécessaire à la NETose induite par le PMA. Le peroxyde d'hydrogène, peut notamment déclencher la dissociation de l'azurosome (un complexe protéinique composé de la MPO) libérant ainsi l'élastase des PN ainsi que des protéases au niveau cytoplasmique (**Fig 22**). Ces protéases facilitent clivage le des histones qui est requis pour la libération des NETs. Par ailleurs, les modifications post-transcriptionnelles des histones telles que la citrullination induite par la PAD4 (« Peptidylarginine deiminases 4 »), est cruciale pour la décondensation de la chromatine, elle-même une étape prérequis de la NETose (Lewis *et al.*, 2015). Enfin, certains auteurs ont suggéré l'existence d'un mécanisme de la NETose indépendant des FRO, mais celui-ci reste à ce jour mal connu (Chen *et al.*, 2012, Parker and Winterbourn, 2013).

De nombreux travaux ont montré le rôle microbicide des NETs, soit en piégeant les agents pathogènes (Brinkmann and Zychlinsky, 2007), soit en inactivant les facteurs de virulence des microorganismes pathogènes (Averhoff *et al.*, 2008). Cependant, l'exposition à

l'extérieur de la cellule de molécules actives, notamment les histones ou les protéases, peut être aussi à l'origine de phénomènes délétères comme une réponse cytotoxique, pro-thrombotique, l'induction d'une réponse auto-immune ou la progression tumorale. L'accumulation de NETs a notamment été associée à certaines pathologies inflammatoires comme la mucoviscidose (Manzenreiter *et al.*, 2012), et l'asthme allergique (Dworski *et al.*, 2011).

### III.3.5. Production de médiateurs par les PN

Les PN ont longtemps été considérés comme de simples agents bactéricides. Toutefois, il a été récemment démontré qu'ils étaient également capables de synthétiser de nombreux médiateurs, majoritairement pro-inflammatoires, qui modulent la réponse immunitaire innée mais également adaptative et interviennent dans l'interaction du PN avec d'autres cellules immunitaires. La liste de ces médiateurs est présentée ci-dessous (**Fig 23**). Le PN produit une faible quantité de médiateurs par rapport aux monocytes/macrophages et aux lymphocytes, mais compte-tenu du nombre très important de PN migrant au niveau des sites inflammatoires, cette production peut devenir importante (Nathan, 2006).

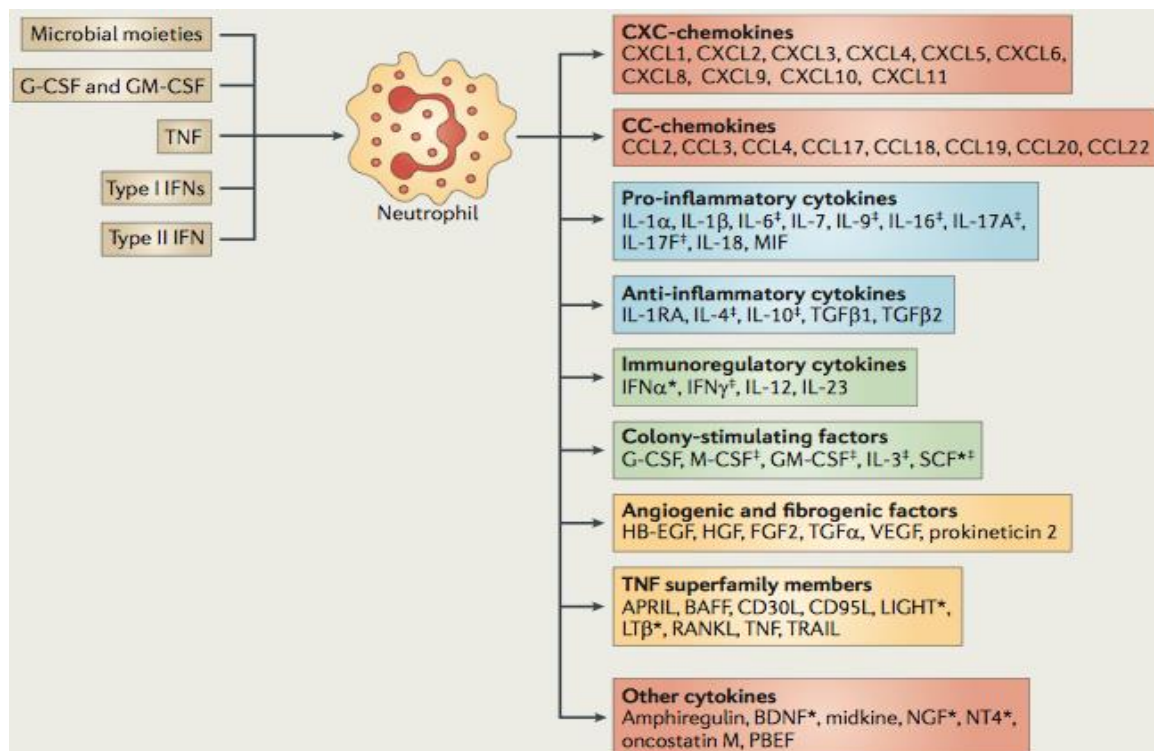


Figure 23 : La liste des médiateurs libérés par les PN activés. L'expression et/ou la production de ces cytokines a été validée par des techniques d'expression des gènes, d'immunohistochimie, par ELISA ou par dosages biologiques spécifiques des cytokines,



réalisées sur des cellules humaines et / ou murines. \* études réalisées au niveau de l'ARNm. ‡ données controversées dans les PN humains (Mantovanni *et al.*, 2011).

Le PN synthétise notamment de nombreux cytokines, soit pro-inflammatoires, soit anti-inflammatoires, ainsi que des facteurs de croissance. La production de cytokines par les PN est contrôlée par des mécanismes de régulation qui agissent à différents niveaux, en particulier au niveau de la transcription de l'ARNm, de sa stabilité, de la traduction ou de la sécrétion de la protéine. Parmi ces cytokines, la production d'IL-8, favorise le recrutement d'autres PN, ainsi que leur dégranulation et l'expression des molécules d'adhérence à leur surface (Tecchio *et al.*, 2014). En outre, l'IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  produits par les PN induisent la production par d'autres cellules d'IL-8 amplifiant ainsi le recrutement de PN (Kasama *et al.*, 2005). Les PN présents au site inflammatoire recrutent également d'autres cellules phagocytaires par la production des chimiokines, comme MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$ .

### III.3.6. Mort des PN

Après avoir exercé son activité bactéricide, le PN meurt principalement par apoptose, mais également par nécrose, autophagie, ou comme mentionné ci-dessus par NETose.

#### III.3.6.1. Apoptose des PN

L'apoptose, contrairement à la nécrose, se caractérise par une conservation de l'intégrité de la membrane plasmique évitant ainsi le relargage du contenu potentiellement toxique du PN dans le milieu extracellulaire. L'apoptose est un facteur essentiel de la régulation homéostatique de nombreux types de populations cellulaires, y compris ceux du système hématopoïétique. En particulier, la mort spontanée des PN par apoptose permet de maintenir un nombre stable de ces cellules dans la circulation sanguine.

L'apoptose induit des modifications morphologiques, et membranaires des PN. Ces modifications incluent notamment une diminution du volume cellulaire, une altération du cytosquelette, une condensation du cytoplasme et de la chromatine, et une dégradation de l'ADN en fragments nucléosomiques. Au niveau membranaire, l'asymétrie de la bicouche lipidique est perdue, l'intégrité des membranes est cependant maintenue. Les PN apoptotiques ne répondent plus aux stimuli extracellulaires suite à la diminution des récepteurs à la surface des PN (Stenberg *et al.*, 2013). Les PN apoptotiques sont principalement éliminés par la reconnaissance des signaux « eat-me » par des macrophages dans le foie, la rate et la moelle

osseuse. Une augmentation de l'expression du CXCR4 est observée sur les PN sénescents, ce qui leur permet de retourner à la moelle osseuse et d'être éliminés par les macrophages du stroma.

Les caspases constituent une famille de protéases à cystéines qui jouent un rôle critique dans le processus de l'apoptose. Elles sont activées à travers soit une voie extrinsèque, soit une voie intrinsèque. La voie extrinsèque surveille l'environnement extracellulaire et elle est induite par des stimuli extracellulaires qui déclenchent les récepteurs de mort (comme Fas, TNFR1, et TRAIL). Les ligands de ces récepteurs déclenchent l'activation de la caspase-8 afin d'activer les caspases effectrices (caspases 3 et 7), induisant la mort cellulaire apoptotique (Galluzzi *et al.*, 2012). La voie intrinsèque ou mitochondriale surveille le microenvironnement intracellulaire et est induite par des stimuli proapoptotiques, tels que l'ADN endommagé et le stress oxydatif. Ces stimuli induisent une perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie ainsi que la libération de facteurs pro-apoptotiques, tels que le cytochrome c qui active la caspase-9, caspase initiateur prédominante de cette voie. Cette voie est modulée par les membres de la famille Bcl-2 («B-cell lymphoma-2») qui contrôlent l'intégrité de la membrane externe de la mitochondrie (Martinou and Youle, 2011). L'équilibre entre l'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 détermine la durée de vie des PN. Les PN expriment constitutivement les molécules pro-apoptotiques (Bax, Bid, Bim, Bak et Bad), et de façon inductible, les molécules anti-apoptotiques A1 et Mcl-1 («Myeloid Cell Leukemia-1»), l'expression de Bcl-XL étant encore discutées. Un des mécanismes expliquant la demi-vie courte des PN, est la destruction progressive de la molécule anti-apoptotique Mcl-1, par la voie du protéasome durant l'apoptose des PN. Des inhibiteurs des CDK («Cyclin-Dependant kinases»), tels que la roscovitine, peuvent notamment accélérer l'apoptose des PN en diminuant l'expression de Mcl-1 (Leitch *et al.*, 2010).

L'entrée en apoptose très rapide des PN est l'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer leur courte durée de vie. De nombreuses molécules pro-inflammatoires, présentes au niveau du site inflammatoire, telles que les cytokines, des facteurs de croissances hématopoïétiques, des chimio-attractants, et des médiateurs dérivés de l'agent pathogène, retardent l'apoptose des PN. Ce retard à l'apoptose est associé à une préservation des fonctions du PN et est essentiel à leur action efficace contre les agents pathogènes. Toutefois, une dysrégulation du retard de l'apoptose des PN peut conduire à leur accumulation au niveau tissulaire dépassant les capacités de clairance par les macrophages et à la libération de leur



contenu granulaire par nécrose (Gabelloni *et al.*, 2013). Cette dysrégulation a ainsi été impliquée dans la physiopathologie de nombreuses maladies inflammatoires telles que le syndrome de détresse respiratoire aigu.

#### III.3.6.2. Nécrose des PN

Contrairement à l'apoptose qui induit une mort cellulaire physiologique non-inflammatoire, la nécrose cellulaire induit le gonflement de la cellule et des organites, particulièrement les mitochondries, une fragmentation de la chromatine nucléaire, la perméabilisation de la membrane plasmique et la libération des composants intracellulaires nuisibles, telles que les protéases, dans le milieu extracellulaire, prolongeant ainsi la réaction inflammatoire et favorisant l'échappement potentielle des agents pathogènes (Geering *et al.*, 2013).

La nécrose peut aussi se dérouler de manière contrôlée comme l'apoptose. Ce processus est appelé la nécroptose ou la nécrose programmée. La nécroptose des PN peut être induite par l'activation du TNFR1, l'activation des cristaux MSU (« Monosodium urate »), et la phagocytose de *S. aureus* (Wang *et al.*, 2018). La nécroptose des PN peut également induire des dommages tissulaires et l'inflammation environnementale de façon similaire comme la nécrose. Elle est donc susceptible de jouer un rôle important dans la pathologie des maladies inflammatoires.

#### III.3.6.3. NETose des PN

De même que la nécrose, la NETose induit la libération extracellulaire de protéases et d'autres constituants nuisibles qui peuvent exacerber les dommages inflammatoires. Comme nous l'avons vu ci-dessus, la NETose est caractérisée par des changements morphologiques différents de ceux observés durant l'apoptose et la nécrose. De plus, les inhibiteurs de l'apoptose ou de la nécrose ne peuvent pas bloquer la formation des NETs (Yousefi *et al.*, 2009).

#### III.3.6.4. Mort associée à l'autophagie des PN

L'autophagie représente un mécanisme majeur dans la régulation des métabolismes tissulaires et cellulaires (Boya *et al.*, 2013). L'autophagie est caractérisée par la formation massive de vésicules à double membrane, appelé autophagosome, sous le contrôle de GTPases et de kinases qui englobent et recyclent les composants intracellulaires. En fonction

des conditions, l'autophagie est impliquée dans la mort cellulaire, mais peut également constituer un mécanisme protecteur permettant de différer la mort des cellules (Kuballa *et al.*, 2012).

L'autophagie du PN est notamment induite après la phagocytose de certaines bactéries, notamment *E.coli*. favorise le recrutement du LC3/GABARAP, une enzyme similaire à l'E3 ubiquitine ligase, et nécessaire à la formation de l'autophagosome au sein des PN. Cette observation montre ainsi le lien entre la phagocytose et l'autophagie au sein des PN (Mitroulis *et al.*, 2010). De plus, la mort induite par la liaison du Siglec-9 («Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 9») à la surface des PN, qui est associée à une vacuolisation cytoplasmique, peut également être considérée comme une mort cellulaire ressemblant à l'autophagie (von Gunten *et al.*, 2005). L'implication du complexe Nox-2 dans l'autophagie a été rapportée dans les PN murins (Huang *et al.*, 2009) et le rôle de l'explosion oxydative dans l'induction de l'autophagie a été confirmé dans les PN humains (Mitroulis *et al.*, 2010).

#### III.4. Rôle des PN dans la résolution de l'inflammation

Après élimination de l'agent pathogène, un processus actif débute afin de limiter le recrutement et l'infiltration des PN, éliminer les cellules apoptotiques au site inflammatoire. et permettre la réparation tissulaire. La résolution de l'inflammation joue un rôle important pour le maintien de l'homéostasie tissulaire et une dysrégulation de ce processus peut être à l'origine de pathologies.

##### III.4.1. Phase de pro-résolution

Elle intervient au cours de la mort par apoptose du PN. En effet, l'expression de signaux « find me » et « eat me » favorise la reconnaissance des PN apoptotiques par les macrophages. Un de ces signaux est représenté par la phosphatidylsérine, caractéristique des cellules apoptotiques, qui apparaît sur le feuillet externe de la membrane plasmique, par perte de l'asymétrie membranaire normale. La reconnaissance et l'ingestion des PN apoptotiques par les macrophages induisent un phénotype M2-like de ces macrophages (IL-10<sup>high</sup>/IL-12<sup>low</sup>) qui régule négativement l'inflammation et stimule la réparation des tissus. (Ariel and Serhan, 2012). Par ailleurs, la biosynthèse de médiateurs pro-résolution est augmentée dans les PN au cours de l'apoptose, tels que des médiateurs lipidiques : la lipoxine (LXA4), la resolvine E1 (RvE1), l'anexine A1, le TRAIL, ainsi que des inhibiteurs de CDK. Ces médiateurs améliorent la phagocytose et l'élimination des PN apoptotiques, mettant ainsi en place une

boucle d'amplification. (El-Kebir and Filep, 2013). Les PN apoptotiques peuvent également phagocyter d'autres PN apoptotiques, contribuant ainsi à la clairance des PN au niveau du site d'infection (Rydell-Tormanen *et al.*, 2006).

L'échec de cette étape entraîne probablement la nécrose secondaire et la libération des substances pro-inflammatoires qui pourrait amplifier l'inflammation au site d'infection. Une diminution de la production des FROs et des cytokines inflammatoires dans les PN apoptotiques est favorable durant la résolution.

#### III.4.2. Phase anti-inflammatoire

Dans cette phase sont principalement impliqués des médiateurs qui modulent et/ ou inhibent le recrutement des PN au site inflammatoire mais aussi des molécules régulatrices de l'activation cellulaire et de l'amplification de la réponse inflammatoire.

Au cours de cette phase vont intervenir à nouveau les médiateurs lipidiques LXA4 et RvE1. LXA4 diminue la migration des PN vers les tissus inflammatoires (Serhan *et al.*, 2008), notamment en inhibant le clivage de la L-sélectine (Filep *et al.*, 1999); RvE1 diminue également la migration des PN et inhibe la production de cytokines (Serhan *et al.*, 2008).

La sous-unité p40<sup>phox</sup> de Nox2, intervient également au cours de cette étape. (Conway *et al.*, 2012) en diminuant l'expression de CCR1. De plus, les FRO libérés *via* Nox2 peuvent augmenter la libération de la cytokine anti-inflammatoire TGF- $\beta$  à partir de fibroblastes cultivés et activer la forme latente de cette cytokine (Sareila *et al.*, 2011). L'oncostatine M libérée rapidement au cours de la phase aiguë de l'inflammation, peut participer à l'inhibition de l'expression et de la libération des cytokines pro-inflammatoires IL-1 et IL-8 par les fibroblastes, diminuant ainsi le recrutement des PN aux sites de l'inflammation (Dumas *et al.*, 2012).

Parallèlement, les PN inhibent l'action de certaines chimiokines et cytokines en s'opposant à leur fixation sur leurs récepteurs spécifiques. Notamment, les PN inhibent l'interaction de l'IL-1 avec son récepteur (IL-1R1) *via* l'expression du « decoy receptor » IL-1R2 qui lie à l'IL-1 de façon compétitive (Bourke *et al.*, 2003). De la même manière, l'IL-10 dont l'expression est induite au sein du PN activé (Bazzoni *et al.*, 2010), augmente

l'expression et la production de molécules anti-inflammatoires, comme l'antagoniste du récepteur de l'IL-1, et inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires, la production des FROs et la phagocytose des PN.

Enfin, les PN activés peuvent aussi libérer rapidement des ectosomes, microparticules produites par bourgeonnement de la membrane plasmique (Gasser and Schifferli, 2004). Ces microparticules exposent la phosphatidylsérine sur le feuillet externe de leur membrane et donc exercent un effet inhibiteur en diminuant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et en induisant la production de TGF- $\beta$  par les monocytes.(Eken *et al.*, 2008; Eken *et al.*, 2010; Gasser and Schifferli, 2004).

### III.4.3. Phase de reconstitution tissulaire

Les PN peuvent également être impliqués dans la reconstitution des tissus, notamment via le processus de l'angiogenèse. En effet, les PN produisent des molécules pro-angiogéniques stockées dans les granules du PN et libérées durant la résolution de l'inflammation. Parmi ces molécules, le facteur de croissance endothélial vasculaire A (VEGF-A) qui joue un rôle essentiel dans la formation des vaisseaux sanguins (Gaudry *et al.*, 1997). De plus, la métalloprotéinase-9 (MMP-9) intervient en induisant la libération de VEGF et d'autres facteurs de croissance, mais également via sa capacité à détruire la matrice extracellulaire permettant ainsi de libérer de l'espace à de nouveaux vaisseaux. Les PN sont les seules cellules capables de libérer la MMP-9 de son inhibiteur endogène, TIMP («Tissue inhibitor of metallopeptidase»), et donc capables de délivrer la MMP-9 active vers les sites angiogéniques (Ardi *et al.*, 2007).

### III.5. Hétérogénéité des PN

Alors que les PN ont longtemps été considérés comme une population cellulaire homogène, plusieurs études récentes rapportent la présence de plusieurs sous-populations de PN notamment au cours de certains processus infectieux, inflammatoires et cancéreux.

#### III.5.1. Sous-populations des PN associées à l'homéostasie

##### III.5.1.1 PN sénescents ou « âgés »

Les PN sénescents se caractérisent par une forte expression de CXCR4 alors que ce marqueur est faiblement exprimé à la surface des PN résidants dans la moelle osseuse (Nagase *et al.*, 2002). Ce processus peut être reproduit *in vitro* par la culture des PN pendant

20h à 37°C qui induit une augmentation de l'expression de CXCR4 à la surface des PN. Les PN sénescents ont une taille diminuée et contiennent des noyaux hyper-segmentés. La clairance des PN sénescents par les macrophages résidents dans la moelle osseuse réduit la production du CXCL12 et induit la migration des cellules progénitrices hématopoïétiques (HSPCs) dans la circulation. De plus, le nombre des PN circulants sénescents et leur clairance dans la moelle osseuse fluctuent ; ce processus contrôle les oscillations circadiennes du nombre des HSPCs dans le sang circulant (Casanova-Acebes *et al.*, 2013).

Les PN sénescents représentent une sous-population hyperactive exprimant fortement le CD11b et produisant de fortes quantités de FRO et de NETs (Zhang *et al.*, 2015) et être impliquée dans des processus inflammatoires. L'augmentation de cette sous-population sénescents pourrait donc altérer l'homéostasie des PN.

Très récemment, plusieurs études ont rapporté que les métabolites produits par le microbiote intestinal sont capables de pénétrer dans la circulation sanguine et de réguler le système immunitaire (Atarashi *et al.*, 2016). L'étude récente de Zhang *et al.* a montré l'implication du microbiote dans l'induction de PN sénescents. Ce processus fait intervenir la voie de signalisation des TLR2/4 et la molécule MyD88 (Zhang *et al.*, 2015).

### III.5.1.2. PN immunosuppresseifs

Au contraire, une sous-population de PN immunosuppressive CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup>, caractérisée par une inhibition de la prolifération des cellules T et une diminution de la production de FRO a été rapportée au cours des états inflammatoires aigus (Pillay *et al.*, 2012) et du vieillissement (Sauce *et al.*, 2016). Cette sous-population présente une expression plus élevée de CD18, CD11c et CD11b activé, une faible expression de L-sélectine ainsi qu'une faible capacité d'adhérence à l'endothélium et de migration au sein des sites inflammatoires.

L'effet inhibiteur exercé par les PN immunosuppresseifs sur les cellules T est contrôlé *via* la voie de signalisation de la molécule CD11b/CD18 (Mac-1). Une surproduction de Mac-1 des PN immunosuppresseifs augmente donc l'efficacité de l'effet inhibiteur, (Pillay *et al.*, 2012). Comme les MDSCs (« Myeloid derived suppressor cells ») décrites chez les souris, les PN immunosuppresseifs migrent préférentiellement aux endroits où sont localisées les cellules T afin de réprimer leur réponse (Wallace and Beverley, 1993).

En raison de l'expression faible de la L-sélectine à leur surface, le processus de « rolling » est perturbé et l'adhérence initiale des PN à l'endothélium activé altéré, ce qui participe à diminuer leur chimiotaxie. Par ailleurs, les PN immunosuppresseifs présentent une faible sensibilité aux chimioattractants, tels que le fMLF (Kamp *et al.*, 2012).

Le pourcentage de cette sous-population augmente au cours du vieillissement. L'expansion des PN immunosuppresseifs est associée à la diminution de la capacité phagocytaire et de la production des FROs chez les sujets âgés ce qui intervient dans la susceptibilité aux infections bactériales ou fongiques (Sauce *et al.*, 2016).

#### III.5.1.3. PN exprimant le marqueur CD177

La sous-population de PN CD177<sup>+</sup> co-exprime à la surface cellulaire la protéinase-3, une protéase souvent localisée dans les granules primaires. Chez l'humain, l'expression du CD177 à la surface des PN module la migration trans-endothéliale par l'interaction avec PECAM-1. L'expression du CD177 est nécessaire pour la présence de la protéinase-3 à la surface des PN, ce qui favorise la migration en traversant les cellules endothéliales (Kuckleburg *et al.*, 2012). L'absence du CD177 n'influence pas la capacité de migration des PN, mais cela entraîne la mort cellulaire chez la souris (Xie *et al.*, 2015). En cas des pathologies inflammatoires, l'expression de cette sous-population est toujours augmentée, mais son rôle fonctionnel est toujours mal connu.

#### III.5.1.4. PN exprimant le récepteur des cellules T (TCR, « T-cell Receptor »)

Une sous-population des PN exprimant de variables TCRs et d'autres composants du complexe TCR a été identifiée. L'expression des TCRs se déroule au niveau transcriptionnel et protéinique, sous la régulation du G-CSF. Cette sous-population TCR<sup>+</sup> pourrait être la première réponse dans l'immunité antigène spécifique, et améliorer les réponses inflammatoires par l'interaction accrue entre les cellules T et les TCRs exprimés à la surface des PN (Puellmann *et al.*, 2006).

#### III.5.1.5. PN exprimant l'olfactoméline-4

L'Olfactomedin-4 (OLFM4) est présente, co-localisée avec la NGAL (« Neutrophil gelatinase-associated lipocalin ») dans les granules spécifiques de 20% à 25% de PN circulants. La libération d'OLFM4 par les PN, faible au cours du processus de dégranulation

ou la transmigration, est particulièrement importante lors de la formation des NETs (Welin *et al.*, 2013).

#### III.5.1.6. PN-DC hybrides

Il a été montré que les PN cultivés en présence GM-CSF peuvent former une cellule hybride qui exprime les marqueurs des PN, ainsi que ceux des cellules dendritiques et présente plusieurs propriétés typiques des cellules dendritiques, telles que la morphologie et la production de l'IL-12 (Matsushima *et al.*, 2013).

### III.5.2. Sous-populations des PN associées à des conditions pathologiques

#### III.5.2.1. Sous-populations de PN associés aux cancers

Au cours de certains cancers, une population de PN associée aux tumeurs a été identifiée : les TANs (Tumor Associated Neutrophil). Selon la présence ou non de TGF $\beta$  local, ces PN peuvent acquérir un phénotype anti-tumoral (N1) ou pro-tumoral (N2) par analogie aux macrophages pro- et anti-inflammatoire (Fridlender *et al.*, 2009).

Les PN N2, comme les macrophages M2, présentent une forte activité arginase conduisant à la déplétion de la L-arginine, ce qui inhibe la prolifération et l'action anti-tumorale des cellules T (Fletcher *et al.*, 2015) et favorise ainsi la croissance tumorale.

#### III.5.2.2. PN pro-angiogéniques

Récemment, il a été suggéré l'existence d'une sous-population de PN avec des propriétés pro-angiogéniques, recrutés dans les tissus greffés par le VEGF-A. Ces PN CXCR4<sup>high</sup> ont la capacité de libérer la MMP-9 pour revasculariser le greffon (Christoffersson *et al.*, 2012).

#### III.5.2.3. « Low Density Granulocytes » (LDG)

Ayant été rapporté pour la première fois chez des patients atteints des maladies auto-immunes, les PN de cette sous-population sont pro-inflammatoires et se caractérisent par une surproduction d'interférons, une faible capacité de la phagocytose (Denny *et al.*, 2010) et une augmentation de leur capacité à former des NETs sans présence des stimuli (Villanueva *et al.*, 2011).



### III.5.3. Migration réverse des PN

Comme nous l'avons vu, la migration des PN de la circulation sanguine vers le site d'inflammation est une étape essentielle pour les fonctions biologiques des PN. Il a été récemment montré que les PN ont en fait un mouvement bi-directionnel leur permettant à partir des tissus de revenir dans la circulation sanguine. Ce processus a été appelé migration réverse. Ce processus pourrait permettre d'éliminer des PN en quantité excessive dans les tissus et ce parallèlement au mécanisme d'apoptose (Silva, 2011).

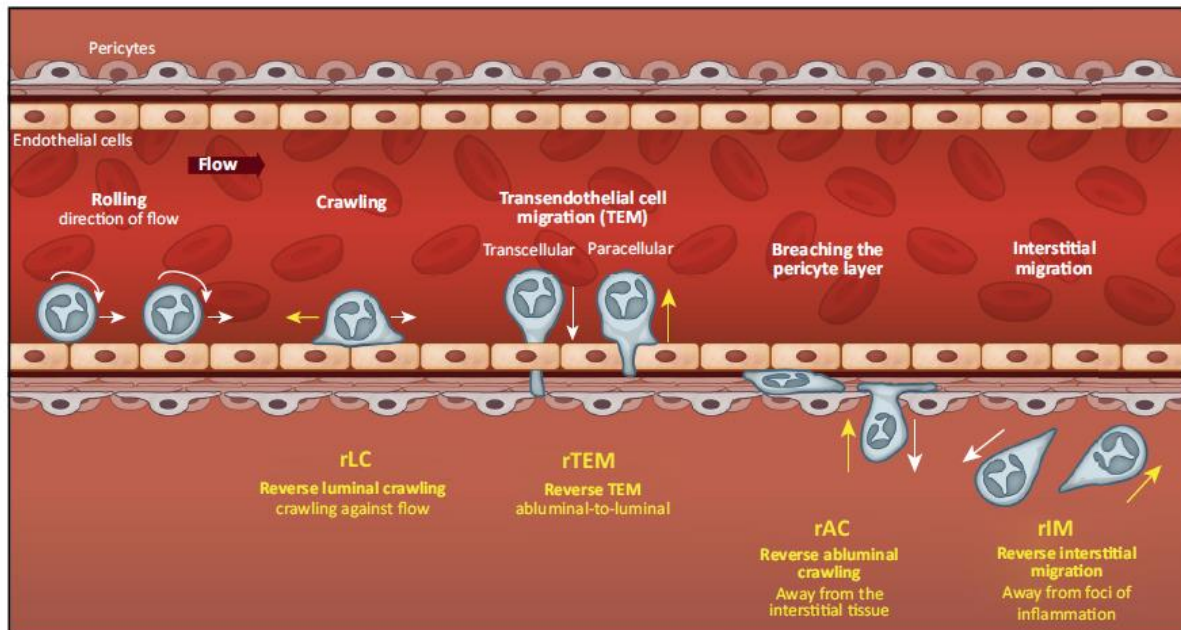


Figure 24 : Représentation schématique de différents types de la migration réverse des PN (Nourshargh *et al.*, 2016).

Il existe 4 types différents de migration réverse des PN : a) la reptation luminale réverse (rLC « reverse Luminal Crawling ») : les PN migrent contre les sens du flux sanguin ; b) la migration trans-endothéliale réverse (rTEM « reverse transendothelial migration ») : les PN se déplacent du milieu tissulaire vers la circulation sanguine systémique en traversant les cellules endothéliales ; c) la reptation abluminale réverse (rAC « reverse Abluminal Crawling ») : la mobilisation des PN au niveau de la couche des péricytes s'opère du tissu interstitiel aux cellules endothéliales ; d) la migration interstitielle réverse (rIM « reverse Interstitial Migration ») : les PN s'éloignent du foyer d'infection dans les tissus interstitiels (Fig 24).

Les PN rTEM constituent une population distincte phénotypiquement, avec de faibles taux des marqueurs CD181 (CXCR1), CD182 (CXCR2), CD62L, et des taux élevés des



marqueurs CD11b, CD54 (ICAM-1) à leur surface. De plus, les rTEM neutrophiles ont une survie prolongée (Buckley *et al.*, 2006).

Les mécanismes de la migration réverse des PN sont encore mal élucidés à ce jour. Dans un modèle murin d'ischémie, il a été montré que le Leucotriène B4 (LTB4) produit par les PN activés induit le clivage de la molécule JAM-C impliquée dans leur migration réverse (du milieu tissulaire vers la circulation sanguine systémique). Ce clivage est sous la dépendance de l'élastase produite localement par les PN circulants activés (Colom *et al.*, 2015). Dans certaines conditions pathologiques, une faible expression de JAM-C aux cellules endothéliales entraîne une diminution de l'interaction entre JAM-C et JAM-B qui influence l'intégrité et la fonction des jonctions serrées des cellules endothéliales (Lamagna *et al.*, 2005). De plus, JAM-C joue un rôle important dans l'assemblage du complexe de polarité cellulaire PAR3/PAR6 (Ebnet *et al.*, 2003). Ainsi, L'expression de JAM-C au niveau des cellules endothéliales est indispensable pour le maintien d'une porte à sens unique au niveau des cellules endothéliales permettant aux PN de migrer de la circulation sanguine au site d'inflammation. Une altération de l'expression de la JAM-C est par conséquent favorable à la migration réverse des PN.

Les Rôles physiopathologiques de la migration reverse sont variés et dépendent du type de migration :

- Les PN en reptation luminale réverse sont des cellules à forte mobilité qui recherchent les sites préférés au niveau des cellules endothéliales afin de s'infiltrer au niveau du foyer inflammatoire (Phillipson *et al.*, 2006).
- Les PN en migration interstitielle réverse pourraient contribuer à la résolution des réponses inflammatoires en inhibant la production l'IL-8 (Tharp *et al.*, 2006).
- Les PN en migration réverse quittent le site de l'inflammation et se répartissent dans l'ensemble de la circulation sanguine. Ils peuvent alors migrer dans d'autres organes contribuant à des lésions organiques additionnelles et une inflammation systémique.

Ainsi, une migration réverse excessive ayant pour objectif la résolution de l'inflammation cérébrale locale pourrait conduire à une inflammation systémique excessive (Fig 25).

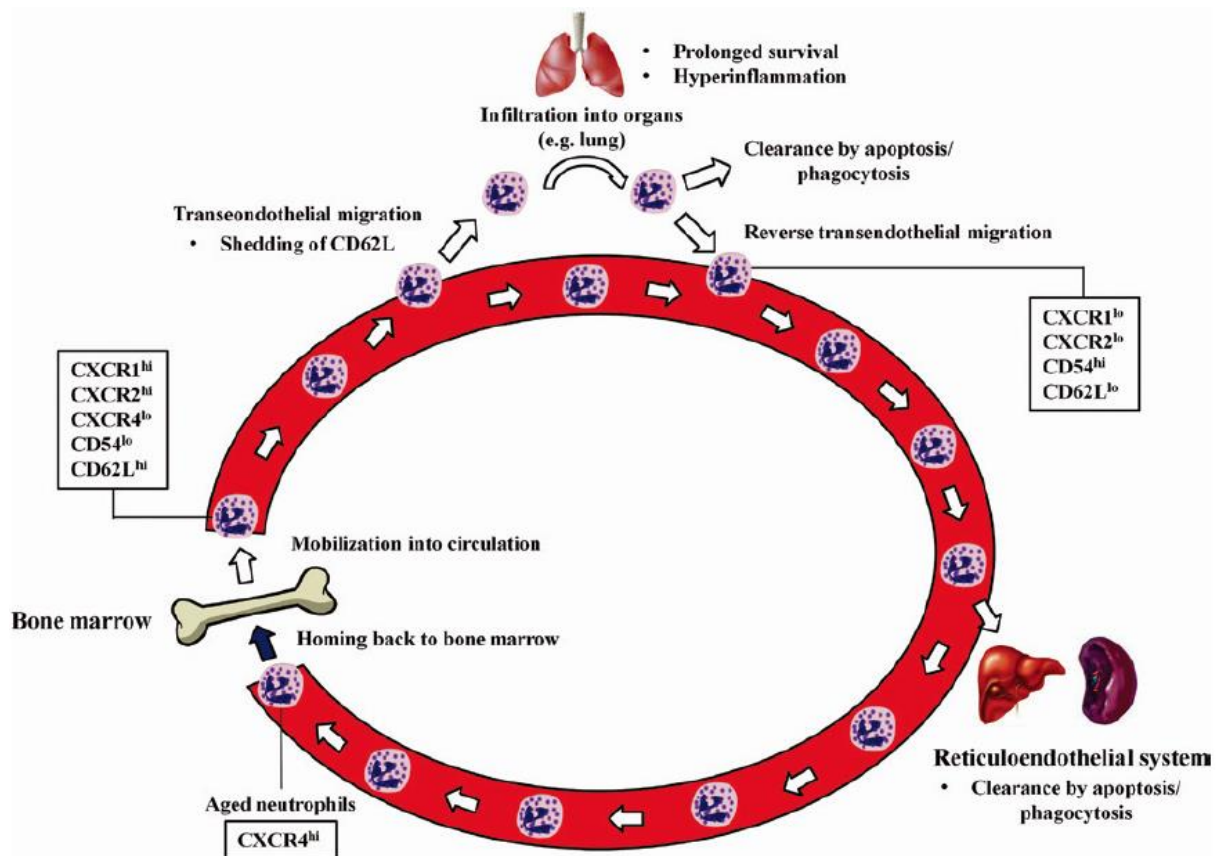


Figure 25 : Représentation schématique d'altérations phénotypiques des PN au cours de l'inflammation (Hirano *et al.*, 2016). Les PN matures quittent la moelle osseuse en réponse à un état infectieux ou inflammatoire. Les PN expriment alors des taux élevés de CXCR-1,-2 et CD62L, et de faibles taux du CXCR-4 et du CD54. Durant la résolution de l'inflammation au niveau tissulaire, certains PN exprimant fortement le CD54, et faiblement CXCR-1,-2 et CD62L, retournent dans la circulation périphérique.

### III.6. Interaction des PN avec les autres acteurs de la réponse immunitaire

Etant une des premières cellules à parvenir au niveau du foyer infectieux, le PN interagit et communique indirectement avec les autres cellules du système immunitaire via la sécrétion des cytokines et des chimiokines, mais également de manière directe.

#### III.6.1. Interaction avec les monocytes/macrophages

Les PN sont capables de recruter au niveau du foyer infectieux les monocytes circulants via l'expression de chimioattractants, tels que CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ) et CCL19 (MIP-3 $\beta$ ) mais également via la libération de certaines protéines granulaires (Soehnlein *et al.*, 2008). De plus, les PN activent les monocytes/macrophages par des protéines des granules afin d'augmenter la production de cytokines (Soehnlein *et al.*,

2009). En retour, les monocytes, recrutés par les PN et différenciés en macrophages, répriment le chimiotactisme des PN et assurent l'élimination appropriée des PN apoptotiques via le mécanisme d'efferocytose.

### III.6.2. Interaction avec des lymphocytes

Les PN modulent les fonctions des lymphocytes indirectement via les cellules dendritiques (DCs) ou via un effet direct.

Les PN activés au site d'inflammation exercent un effet chimioattractant sur les lymphocytes T CD4 Th1 et Th17 par la sécrétion de CCL2, CXCL9, CXCL10 ou de CCL2, CCL20 respectivement. De plus, les PN sécrètent l'IL-12, cytokine cruciale pour la différenciation des cellules Th1 (Scapini *et al.*, 2000). En retour, l'IFN- $\gamma$  sécrété par les lymphocytes T, prolonge la durée de vie des PN, et augmente leur capacité de phagocytose (Ellis and Beaman, 2004). L'IL-17, produite par les th17, est une cytokine clé dans le contrôle de la dynamique des PN, notamment via l'augmentation de la production de CXCL8 (IL-8), G-CSF et TNF- $\alpha$  par les cellules endothéliales et les cellules stromales (Ouyang *et al.*, 2008, Himmel *et al.*, 2011). A l'inverse, les lymphocytes T CD4 régulateurs (Tregs) sont capables d'exercer un effet inhibiteur sur les PN. Les résultats récents suggèrent que les Tregs stimulés augmentant l'expression par les PN de la cytokine anti-inflammatoire, IL-10 et inhibent l'expression de l'IL-6. De plus, l'interaction entre la molécule CTLA-4 (« Cytotoxic T-Lymphocyte antigen-4 », CD152) à la surface des Tregs et la molécule B7 à la surface des PN induit l'expression au sein des PN d'IDO (« Indoleamine 2,3-dioxygénase »), dont les métabolites activent la HO-1 (« Heme Oxygenase-1») qui peut diminuer l'activité fonctionnelle des PN (Freitas *et al.*, 2006). En outre, la présence des Tregs induit l'expression de SOCS-3 (« Suppressir of cytokine signaling 3 molecule ») au sein des PN diminuant la réponse des PN aux médiateurs pro-inflammatoires (Yoshimura *et al.*, 2005).

Les PN modulent également les réponses des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Il a été rapporté *in vivo* la capacité des PN à intervenir en tant que cellules présentatrices d'antigènes (CPA) en cross-présentant les antigènes exogènes via leur molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I (Beauvillain *et al.*, 2007). *In vitro*, les PN activés expriment la molécule CMH de classe II leur permettant de présenter les antigènes aux cellules T CD4<sup>+</sup> *in vitro* (Fanger *et al.*, 1997).

### III.6.3. Interaction avec les cellules dendritiques (DCs)

Les monocytes, recrutés notamment par les PN au niveau du site inflammatoire, pourront se différencier en DCs initiant une réponse Th1 protectrice (Charmoy *et al.*, 2010). Par ailleurs, Les PN activés peuvent induire la maturation et activer les DCs *in vitro* via 1) l'expression des molécules CD11b/CD18 et CEACAM-1 se fixant au DC-SIGN (« Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Nonintegrin ») des DCs, conduisant à la sécrétion locale de TNF- $\alpha$  par DCs matures (van Gisbergen *et al.*, 2005), 2) la libération de médiateurs tels que l' $\alpha$ -défensine et les cathélicidines (Yang *et al.*, 2009).

En retour, l'interaction des DC avec les PN via le DC-SIGN, induit une activation des PN et une prolongation de leur survie (Singer *et al.*, 2005). Les DCs immatures sont également capable de phagocytter les PN apoptotiques ou nécrotiques (Clayton *et al.*, 2003).

### III.6.4. Interaction avec les Cellules NK (Nature Killer)

les PN sont capables de d'induire la survie, la maturation et la prolifération des cellules NK, de même que la production d'IFN- $\gamma$  par ces cellules, par contact direct ou via la production de FRO. Les PN peuvent également moduler l'activation des cellules NK via une coopération avec d'autres cellules. Ainsi, l'IL-12 produite par les DCs activées par les PN induit la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK, cytokine qui en retour activent les PN. (Costantini and Cassatella, 2011).

## III.7. Implication des PN au cours de la MA

Les réactions inflammatoires dans lesquelles les PN sont engagés sont le plus souvent bénéfiques à l'organisme, en participant à l'élimination de l'agent pathogène. Toutefois, en cas de stimulation excessive, le PN peut conduire à des lésions tissulaires majeures liées à la libération de composés toxiques et ont été impliqués dans la physiopathologie de certaines maladies inflammatoires aiguës ou chroniques (Németh and Mócsai, 2012). Ceci conduit à penser que les PN pourraient intervenir dans les processus inflammatoires associés à la MA.

### III.7.1. Arguments en faveur du rôle des PN

1) Des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IFN $\alpha$ ) (Morimoto *et al.*, 2011) connus pour activer les PN ont été rapportés au cours de la MA au niveau circulant et local.

2) Il a été récemment décrit que les PN sont susceptibles d'induire la fragmentation des fibrilles amyloïdes en oligomères toxiques via la structure extracellulaire ou les NETs (Azevedo *et al.*, 2012).

3) Implication des PN au cours de pathologies neurovasculaires et neuro-dégénératives :

- La métalloprotéinase-9 (MMP-9), qui est présente en abondance dans les PN, a été impliquée, dans la perte d'intégrité de la barrière hémato-encéphalique, dans un modèle murin d'ischémie cérébrale (Li *et al.*, 2013). Or, des altérations de la BHE ont été rapportées chez les patients atteints de la MA.
- De plus, il a récemment été rapporté que l'élastase dérivée des PN est impliquée dans les lésions cérébrales au cours de la sclérose en plaques (Rumble *et al.*, 2015).

### III.7.2. Etudes antérieures

#### III.7.2.1. Etudes des PN au niveau cérébral

Il a été récemment décrit, dans des modèles murin de MA (5xFAD, 3xTg-AD), la présence d'une infiltration de PN au sein du parenchyme cérébral (Baik *et al.*, 2014). De plus, l'équipe de Zenaro *et al.* a montré que l'infiltration des PN dans le parenchyme cérébral implique l'engagement de l'intégrine LFA-1 et de son ligand. Le blocage de LFA-1 entraîne l'inhibition du recrutement des PN dans le cerveau et améliore les conditions cognitives chez les souris. Cette étude suggère donc que les PN pourraient contribuer à la pathogenèse de la MA et au déclin cognitif (Zenaro *et al.*, 2015).

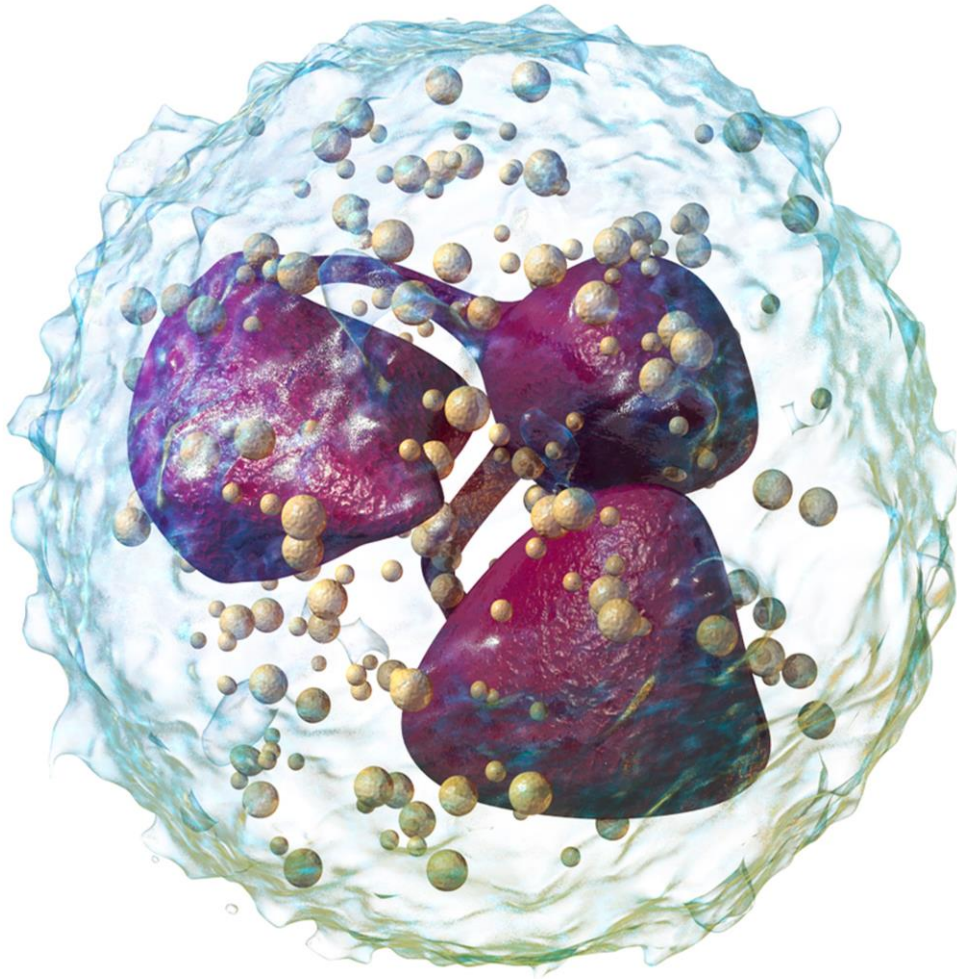
#### III.7.2.2. Etudes des PN circulants

Les résultats rapportés sur l'état d'activation et les réponses fonctionnelles des PN circulants au cours de la MA sont controversés. Certains auteurs rapportent une hyperactivation des PN (Scali *et al.*, 2002) alors que d'autres montrent un déficit fonctionnel (Davydova *et al.*, 2003).

Dans une étude récente, une analyse phénotypique et fonctionnelle des PN circulant a été effectuée dans une cohorte comprenant 13 témoins âgés, 13 patients de la MA au stade MCI, et 15 patients de la MA au stade démence. Ce travail a montré une augmentation de l'expression de CD177, ainsi que des diminutions du taux des récepteurs CD14 et CD16 chez les patients au stade démence. Les PN des patients ont une faible capacité phagocytaire, alors qu'une diminution de la production des FRO. La production de cytokines et de chimiokines

en réponse au LPS est très faible chez les patients au stade MCI et absente chez les patients au stade démence. L'ensemble de ces résultats indique qu'il existait une altération phénotypique et fonctionnelle des PN au cours de la MA (Le Page *et al.*, 2017).

Ces résultats controversés pourraient être liés à l'inclusion de patients à différents stades de la maladie mais également au fait que ces études ont été réalisées à partir de PN isolés de leur environnement par différentes procédures susceptibles de les activer (Pallister *et al.* 2006).



## **Objectifs de travail**



### *Objectifs de travail*

L'implication du système immunitaire local au cours de la MA, attestée par la présence de processus inflammatoires cérébraux, l'activation des astrocytes et des cellules microgliales, le recrutement au niveau cérébral de cellules immunitaires périphériques, la présence au niveau cérébral de composants du système du complément, a été détaillée dans les chapitres précédents. Parallèlement aux processus neuro-inflammatoires, plusieurs études cliniques ont suggéré l'implication de l'inflammation systémique au cours de la MA dans le déclin cognitif chez les patients atteints de la MA.

Les PN représentent les leucocytes les plus abondants dans le sang circulant et constituent un des composants clés de la réponse immunitaire innée. Au niveau du site infectieux, après phagocytose de l'agent pathogène, les PN activés exercent leurs activités effectrices. Celles-ci comprennent la libération de substances bactéricides et de dégradation, la production de FRO dans le cadre de l'explosion oxydative, ainsi que ainsi que la NETose correspondant à la libération par le PN de prolongements extracellulaires ou « Neutrophil Extracellular Traps ».

Les réactions inflammatoires dans lesquelles les PN sont engagés sont le plus souvent bénéfiques à l'organisme, en participant à l'élimination de l'agent pathogène. Toutefois, en cas de stimulation excessive, le PN peut conduire à des lésions tissulaires mais également vasculaires majeures, liées à la libération de composés toxiques telles que les FROs et les NETs. De plus, la survie inappropriée des PN et leur persistance aux sites de l'inflammation conduit à la libération de leur contenu cytotoxique dans le milieu extracellulaire. Ainsi, toute activation excessive et/ou inappropriée des PN peut contribuer à l'amplification des processus inflammatoires systémiques. De plus, à l'issue de la dernière décennie, plusieurs études ont mis en évidence une hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des PN. Ainsi, la sous-population sénescence, caractérisée par un niveau élevé de l'expression du CXCR4, représente une sous-population excessivement activée produisant de fortes quantités de FRO. Inversement, la sous-population immunosuppressive CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> montre un déficit des capacités pro-inflammatoires.

Il a été rapporté, dans des modèles murins transgénique de MA que la déplétion des PN réduit la neuropathologie et restaure les fonctions cognitives. Par ailleurs, les PN sont

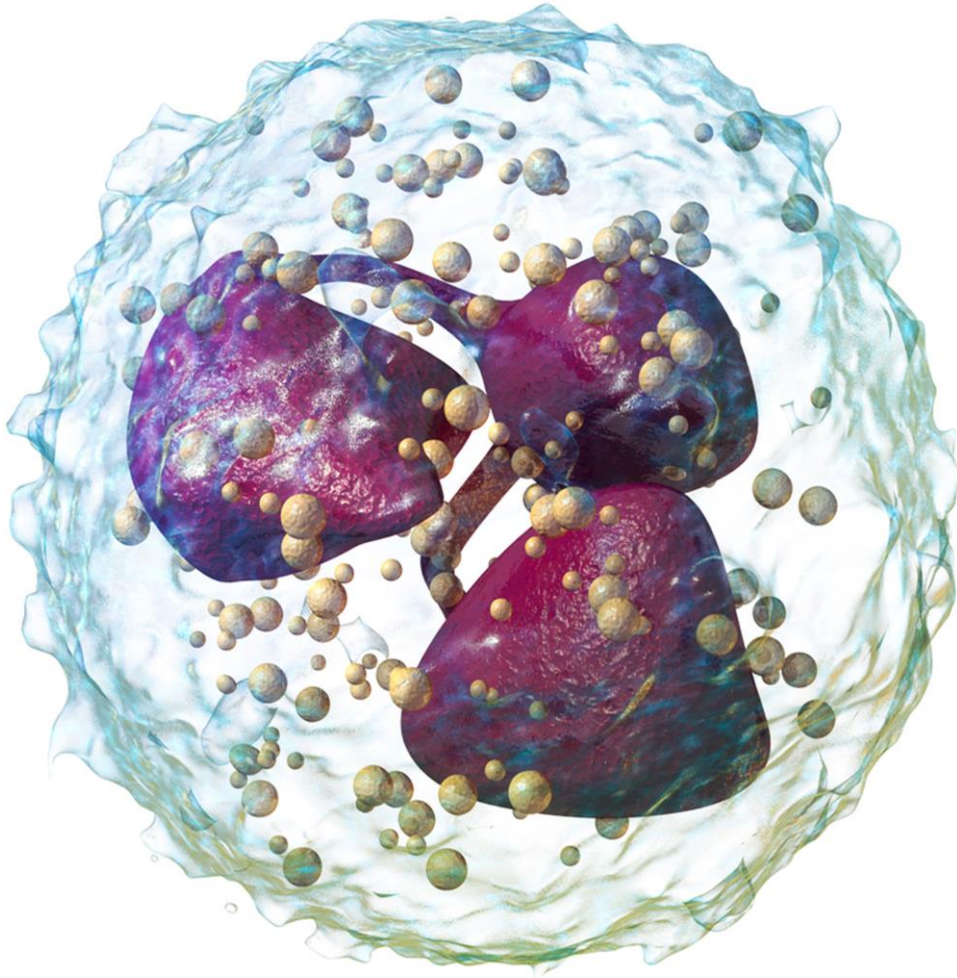


extrêmement sensibles aux stimuli extérieurs tels que les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IFN $\alpha$ ) dont les taux ont été rapportés comme élevés au cours de la MA. Toutefois, peu de données concernant l'état d'activation et les fonctions des PN circulants ont été rapportées et les résultats sont controversés. De même, l'implication potentielle de ces cellules dans la progression de la maladie reste à ce jour mal connue. De plus, la modulation de la NETose ainsi que la distribution de sous-populations des PN n'ont jamais été investiguées chez les patients MA.

**Le premier objectif** de mon travail a été de déterminer les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des PN circulants chez les patients aux différents stades de la MA en comparaison avec des sujets contrôles. Cette étude a été réalisée dans des conditions de sang total afin de minimiser l'activation des PN liée aux différentes procédures d'isolement. Les résultats ont été corrélés avec 1) la progression de la maladie, 2) les réponses neuro-inflammatoires, 3) la charge de l'A $\beta$  et de la protéine Tau au niveau cérébral, 4) les biomarqueurs dans la liquide céphalo-rachidien (LCR).

**Le second objectif** de mon travail a été d'améliorer notre compréhension sur les mécanismes à l'origine de l'implication des PN dans la MA en précisant le rôle du peptide A $\beta$  et de la protéine Tau anormalement phosphorylée dans les altérations des PN circulants. Dans ce but, nous avons évalué dans un premier temps *in vivo* les altérations phénotypiques et fonctionnelles des PN chez des patients atteints de Tauopathies non MA caractérisées par l'absence de plaques séniles et de maladie d'Alzheimer atypique, et ce en comparaison avec des sujets contrôles. Dans un deuxième temps, nous avons étudié *in vitro* l'effet du peptide A $\beta$  sur l'activation et l'homéostasie des PN.

Au cours de ces différentes études, les différentes étapes fonctionnelles des PN, à savoir, l'expression des molécules d'adhérence (CD62L et CD11b) à la surface des PN, la production de FRO, la capacité de phagocytose, mais également la survie des PN, ont été évaluées dans des conditions de sang total et par cytométrie en flux. Ces études ont été réalisées sur des PN à l'état de repos, afin d'évaluer leur niveau d'activation basale ainsi que sur des PN stimulés, afin d'évaluer leur capacité de réponse fonctionnelle à différents stimuli. Parallèlement nous avons évalué la fréquence des sous-populations de PN, pro-inflammatoires et immunosuppressives, et quantifié la NETose intravasculaire.



## Résultats

## Partie I

### Article

# Neutrophil Hyperactivation Correlates With Alzheimer's Disease Progression

### Auteurs :

**Yuan Dong**, Julien Lagarde, Laura Xicota, H  l  ne Corne, Yannick Chantran, Thomas Chaigneau, Bruno Crestani, Michel Bottlaender, Marie-Claude Potier, Pierre Aucouturier, Guillaume Doroth  e\*, Marie Sarazin\*, Carole Elbim

## Contexte

Alors que différentes données suggèrent le rôle potentiel des PN au cours de la MA, l'état d'activation des PN au cours des différents stades de la maladie de même que l'implication potentielle de ces cellules dans la progression de la maladie reste à ce jour mal connus. L'objectif de mon travail a donc été de caractériser le phénotype et les fonctions des PN circulants chez les patients atteints de la MA, et ce à différents stades de la maladie. Une association entre les caractéristiques des PN et les marqueurs cliniques de la progression de la maladie a également été analysée.

## Méthodologie

### Type d'étude, critères d'inclusion, modalité de recrutement et recueil des données

Il s'agit d'une étude ancillaire de l'étude IMABio3 étude prospective, longitudinale sur 2 ans, non-interventionnelle, sans bénéfices directs pour les patients. Le recrutement des patients est effectué au sein de l'Unité de Neurologie de la Mémoire et du Langage de l'hôpital Sainte-Anne (Pr. Marie SARAZIN). Tout patient âgé d'au moins 30 ans présentant un bilan clinique de MA, quelque soit le grade de gravité, peut être inclus. Les critères de non-inclusion comportent les pathologies inflammatoires aiguës ou chroniques, ainsi que les traitements par des médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens ou non stéroïdiens. Dans cette étude, 42 patients ainsi que 22 sujets témoins (CDR=0) ont été inclus

Les patients MA ont été classifiés en 2 groupes en fonction du score clinique : "Clinical Dementia Rating" (CDR) évalué le jour du prélèvement sanguin pour étude des PN:

- 1) patients atteints de MA sporadiques au stade de « mild cognitive impairment » (MCI) (**AD-MCI, CDR=0.5**) (n=16)
- 2) patients au stade de démence (**AD-D, CDR>0.5**) (n=26).
- 3) témoins appariés en âge (HC) se caractérise par un score CDR=0.

Les dépôts  $\beta$ -amyloïde et Tau ainsi que la réponse neuro-inflammatoire ont été étudiés par des analyses TEP séquentielles en  $^{11}\text{C}$ -PiB,  $^{18}\text{F}$ -T807 et  $^{18}\text{F}$ -DPA-714, respectivement (Pr Michel BOTTLANDER, CEA).

### Etude phénotypique des PN

L'expression de différents marqueurs à la surface des PN a été déterminée à l'aide de la cytométrie en flux.

- L'expression des marqueurs CD11b, CD11c, CD16b, CD62L à la surface des PN a permis d'évaluer l'état d'activation des PN.
- L'expression des marqueurs CXCR4, CD62L et CD16b, CD62L à la surface des PN a permis d'identifier les différentes sous-populations des PN (sous-population sénescence CXCR4<sup>high</sup>/CD62<sup>low</sup> et sous-population immunosuppressive CD16b<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup>).
- L'expression des marqueurs CD83 et CTLA4 à la surface des PN a permis de confirmer les résultats obtenus par le séquençage de l'ARN.

#### Etude fonctionnelle des PN

- L'explosion oxydative des PN a été mesurée, dans le sang total, par cytométrie en flux par la technique d'oxydation de la dihydroéthidine (DHE), précédemment adaptée à l'étude dans le sang total (François *et al.*, 2005). La DHE est un composé non fluorescent qui diffuse rapidement à l'intérieur des cellules. En présence d'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>°</sup>, métabolite primaire produit lorsque le PN est stimulé, la DHE est oxydée en éthidium, composé hautement fluorescent. L'éthidium est ensuite séquestré dans le noyau par intercalation dans l'ADN, conduisant à une augmentation de la fluorescence, reliée linéairement à l'intensité de l'explosion oxydative. L'explosion oxydative a été mesurée à l'état basal afin d'évaluer l'état d'activation des PN mais également après stimulation des échantillons de sang total en présence de différents agonistes des TLRs ou du TNF- $\alpha$  afin d'évaluer la capacité de réponse fonctionnelle des PN.
- La capacité des PN à migrer en présence des chimioattractants (IL-8 et fMLP) a été déterminée par cytométrie en flux à l'aide de Transwell.
- La capacité des PN à phagocyter des bactéries opsonisées a été déterminée par cytométrie en flux en utilisant des bactéries *E.Coli* conjuguées à la fluorescéine.
- Le pourcentage de PN apoptotiques a été évalué par cytométrie en flux après 20h d'incubation à 37°C par marquage en présence d'Annexine V, protéine ayant la propriété biologique de se lier, de façon calcium dépendante, à la phosphatidyl-sérine

externalisée au niveau de l'hémicouche lipidique externe à la surface des cellules apoptotiques. Afin de discriminer l'apoptose de la nécrose, les cellules ont également été marquées avec un colorant vital, la 7-amino actinomycine D (7-AAD), qui s'intercale dans l'ADN des cellules nécrotiques.

#### NETose intravasculaire

Elle a été mesurée par une technique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) mise au point au laboratoire à l'aide d'anticorps anti-myéloperoxidase et anti-ADN.

#### Dosages des médiateurs et des cytokines pro-inflammatoires

Les taux sériques de différents médiateurs ou cytokines ont été mesurés par la technique Luminex (Luminex Performance Assays; R&D Systems, Minneapolis, MN).

#### Séquençage d'ARN

L'extraction de l'ARN a été effectuée par traitement au Trizol-Chloroforme de PN isolés à partir du sang total par sédimentation. L'analyse de la séquence d'ARN a été réalisée à l'aide de TapeStation (Agilent Tech, les Ulis, France) et de NextSeq 5000 (Illumina). La base des données sur le séquençage a ensuite été établie, et évaluée par le logiciel R.

### Résultats

#### Hyperactivation des PN circulants chez les des patients MA au stade démence (AD-D)

Nous avons mis en évidence un état d'hyperactivation basal des PN circulants chez les patients AD-D par rapport aux sujets témoins caractérisé par :

- une diminution de l'expression de la L-sélectine (CD62L) et du CD16b (Fc $\gamma$ R, récepteur pour la fraction Fc des Immunoglobulines) et une augmentation de l'expression du CD11b et du CD11c à la surface des PN.
- une augmentation de la production spontanée de FRO (échantillons non stimulés) par les PN.

Par ailleurs, nous observons également chez les patients AD-D par rapport aux sujets témoins:

- une augmentation de la production de FRO après « priming » des échantillons par les agonistes des TLR ou le TNF $\alpha$  puis stimulation par le fMLP, formyl peptide bactérien, témoignant d'une hyperréactivité des PN en réponse à un stimulus.

- une augmentation du taux intravasculaire de NETs.

#### Altération de l'homéostasie des PN circulants chez les patients MA au stade démence (AD-D)

Nous avons observé une expansion de la sous-population des PN sénescents dans les deux groupes des patients avec un pourcentage plus élevé chez les patients AD-D par rapport aux patients au stade modéré AD-MCI. Parallèlement, nous avons constaté une augmentation de la sous-population immunosuppressive chez les patients AD-MCI. A l'opposé, cette sous-population est significativement diminuée chez les patients AD-D par rapport aux témoins et aux patients AD-MCI. Par conséquent, le ratio entre ces deux sous-populations est plus élevé chez les patients AD-D. L'expansion de la sous-population sénescence, associée à la diminution de la sous-population immunosuppressive chez les patients AD-D pourrait expliquer, au moins en partie, la surproduction de FRO, ainsi que l'augmentation de la formation des NETs.

#### Diminution de la survie, de la migration et de la capacité de phagocytose des PN chez les patients de la MA

Nous avons observé une augmentation du pourcentage des PN en apoptose spontanée dans les deux groupes de patients. Concernant le pourcentage des PN en nécrose, une augmentation significative est également observée chez les patients AD-D par rapport aux témoins. Cette diminution de la survie des PN chez les patients AD est associée à une diminution de leur capacité fonctionnelle. Ainsi, nous avons observé chez les patients une diminution de, la migration des PN en réponse à des chimioattractants tels que IL-8 ou le fMLP ainsi qu'une diminution de leur activité de phagocytose des PN.

#### Profil d'expression génique des PN circulants chez les patients de la MA

Nous avons observé au niveau des PN des patients MA une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans les réponses inflammatoires, les réponses immunitaires à médiation cellulaire, ainsi que l'organisation cytoplasmique et du cytosquelette. Cette augmentation est plus importante dans les PN chez les patients AD-D.

L'expression de 18 gènes des PN est notamment significativement accrue chez les patients AD-D par rapport aux témoins alors qu'aucune différence n'a été observée au stade prodromal. Parmi ces 18 gènes, 7 gènes (*TAP-1*, *CD83*, *CTLA-4*, *TMIGD2*, *S100B*, *EDAR*, et

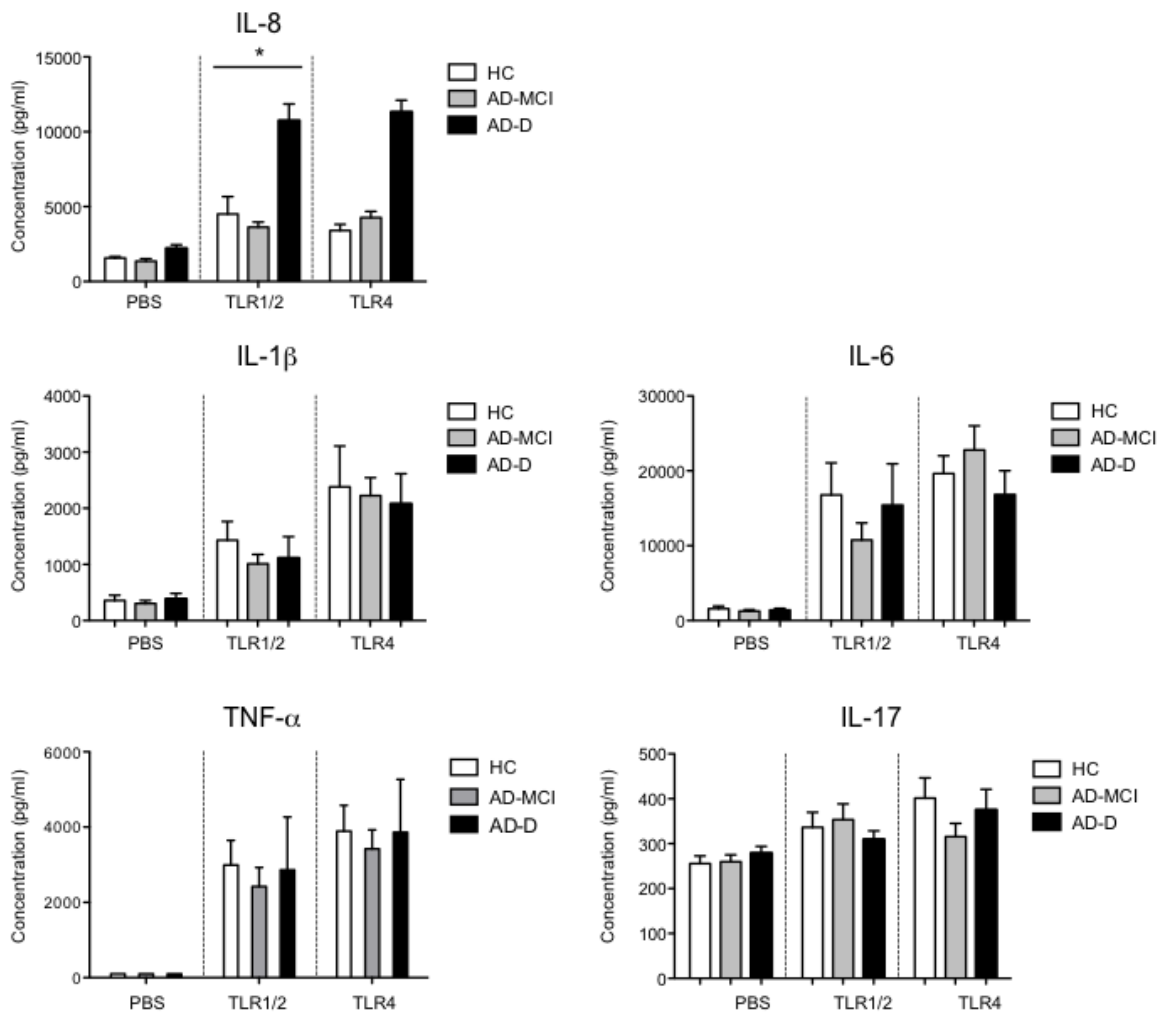
MDS2) participent à l'inflammation et à la défense de l'hôte. Ces résultats qui n'ont pas été inclus dans l'article sont présentés ci-dessous.

	Abbreviations	Log FC AD-D/HC	p
Transporter associated with Antigen Processing 1	TAP1	3.58	0.0024
Salt-inducible kinase 1	SIK1	2.17	0.0065
Adenylate kinase 5	AK5	2.86	0.0094
Beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyltransferase 3	B4GALNT3	2.88	0.010
Deltex E3 Ubiquitin Ligase 1	DTX1	1.54	0.012
Proteasome subunit beta 8	PSMB8	1.56	0.014
Gap junction protein beta 6	GJB6	2.08	0.023
Ectodysplasin A receptor	EDAR	2.15	0.027
Ankyrin repeat domain 9	ANKRD9	1.92	0.027
CD152	CTLA4	2.12	0.032
General Receptor For Phosphoinositides 1 Associated	GRASP	1.81	0.035
Scaffold Protein CD83	CD83	1.73	0.036
ALS2 C-terminal like	ALS2CL	1.80	0.041
Transmembrane and immunoglobulin domain containing 2	TMIGD2	1.74	0.041
Hexokinase Domain Containing 1	HKDC1	2.80	0.042
Myelodysplastic Syndrome 2 Translocation Associated	MDS2	2.77	0.043
S100 calcium binding protein B	S100B	3.09	0.046
Cysteine rich protein 2	CRIP2	1.92	0.047

Tableau 1 : Expression différente de gènes des PN chez les patients AD-D en comparaison de ceux chez sujets témoins. Les résultats sont exprimés en LFC («Log Fold Change »).

Par contre, malgré l'état d'activation des PN circulants observés chez les patients, nous n'avons pas retrouvé d'augmentation de l'expression des gènes de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1, le TNF $\alpha$ , et l'IL-6. Ces données sont associées à une capacité normale des PN à produire des cytokines et des chimiokines que nous avons observé, en accord avec les données récentes (Le Page *et al.*, 2017). Ces résultats qui n'ont pas été inclus dans l'article sont présentés ci-dessous.





**Figure 26 : Absence d’anomalie de la production de cytokines par les PN des patients MA.**

$5 \times 10^6$  PN/ml ont été cultivés en présence de PBS, des agonistes des TLR suivants: Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (TLR1/2 agonist), ou LPS (TLR4 agonist) pendant 24h à 37°C. Les taux de TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , et IL-17 ont été mesurés dans le surnageant des PN stimulés par technique Luminex. Les mesures ont été faites dans les échantillons de sujets (n=4), patients MA-MCI (n=4), et patients MA-D (n=4). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  sem. \*Significativement différent par rapport aux contrôles  $p < 0.05$ ,

### Association des altérations des PN avec la progression de la MA

Nous avons recherché si les anomalies des PN étaient associées à la rapidité d’évolution de la maladie, en étudiant 27 patients suivis pendant 1 an.

Les patients ont été divisés en 2 groupes: “slow decliners” (SD) et patients “fast decliners” (FD) en fonction de la progression du score CDR entre la visite initiale (date de l’étude des PN) et la visite 1 an après. Les patients SD restent stables sans modification de leur score CDR (n = 6 AD-MCI et n = 10 AD-D à la visite initiale), et 11 patients déclinent (FD), avec une augmentation d’au moins 0.5 de leur score CDR (n = 4 AD-MCI and n = 7

AD-D à la visite initiale). Les pourcentages des patients AD-MCI et AD-D ne diffèrent pas significativement entre les groupes SD and FD.

L'activation basale des PN activation est plus importante dans le groupe FD que chez les patients SD (expression plus faible de CD62L et CD16, production basale de FRO plus importante), et la production de FRO par les PN après priming est plus importante chez les patients FD que SD, de même que le taux intravasculaire de NETs. Dans le groupe FD, nous observons un taux plus élevé d'apoptose spontanée.

Ces modifications phénotypiques et fonctionnelles des PN des patients FD sont associées à une augmentation du pourcentage de PN sénescents hyper-réactifs et un plus faible pourcentage de la sous-population immunosuppressive conduisant à une augmentation du ratio entre ces sous-populations.

Ces résultats ont été complétés par la mise en évidence d'une corrélation entre les marqueurs des PN et les variations des scores cliniques, cognitif (MMSE) et fonctionnel (Clinical Dementia Rating Sum of Boxes, CDR-SOB). Ces données qui ne sont pas montrées dans l'article sont regroupées ci-dessous :

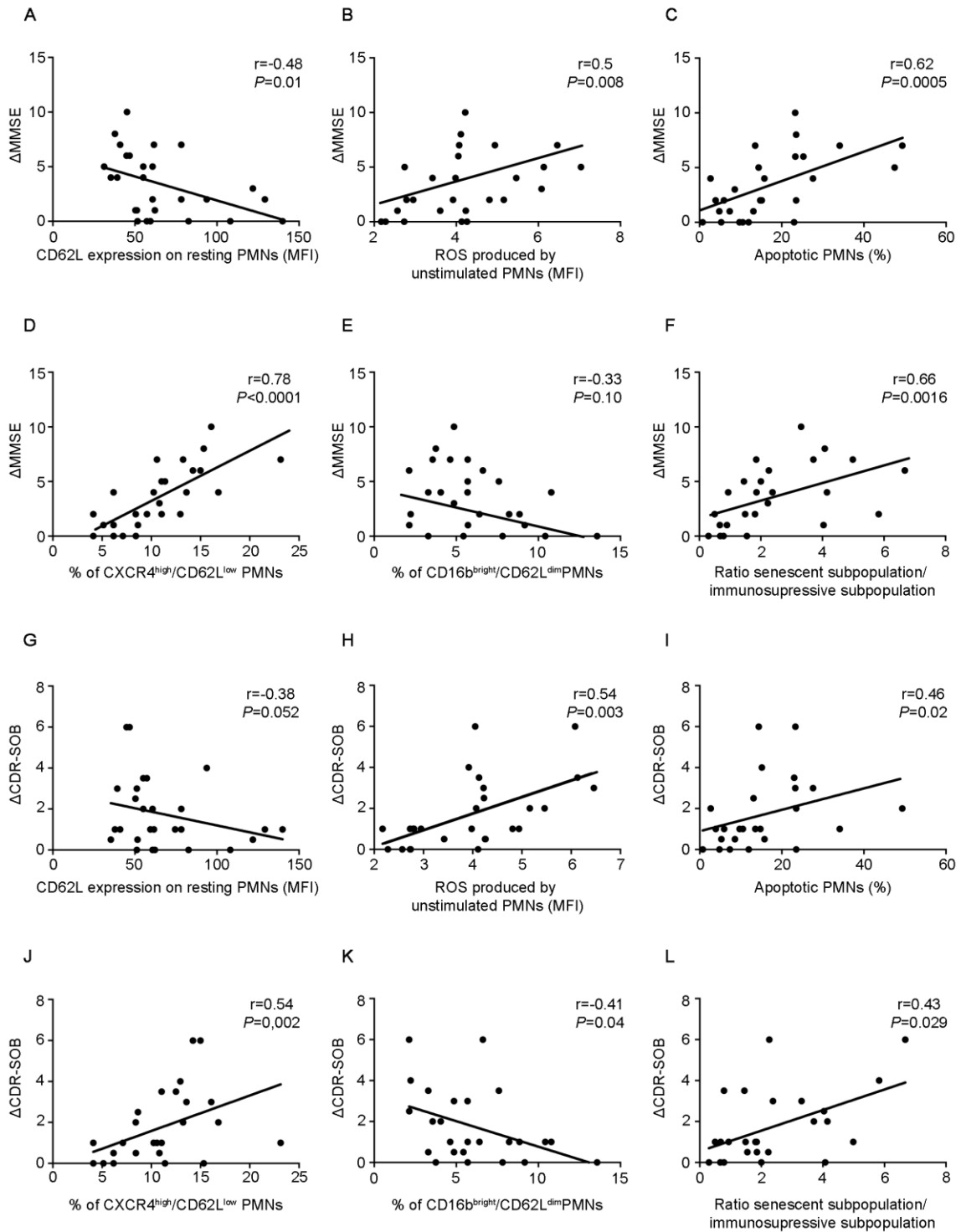


Figure 27 : Corrélation entre les paramètres des PN et les scores MMSE et CDR-SOB.

Ces résultats suggèrent donc fortement que l'altération de l'homéostasie des PN circulants associée à l'hyperactivation des PN soit associée à la rapidité d'évolution de la maladie et constitue donc un marqueur prédictif du déclin cognitif.

### Corrélations entre la production de FRO par les PN circulants et la charge amyloïde cérébrale chez les patients MA

Grâce aux cliniciens de l'Hôpital Saint-Anne, nous avons aussi étudié les paramètres d'imagerie chez les sujets inclus dans le projet. Nous avons ainsi pu rechercher des corrélations entre les altérations des PN et certaines caractéristiques pathologiques des patients AD telles que la charge d'amyloïde au niveau cérébral et l'activation microgliale par des analyses TEP séquentielles en  $^{11}\text{C}$ -PiB,  $^{18}\text{F}$ -T807 et  $^{18}\text{F}$ -DPA-714, respectivement. Nous avons observé une corrélation positive entre la charge d'amyloïde au niveau cérébral et la production des FRO par PN stimulés, ainsi que le pourcentage de la sous-population sénescence.

### Etablissement d'un environnement pro-inflammatoire chez les patients MA

Des taux élevés de cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ ) ou autres médiateurs pro-inflammatoires connus pour activer les PN ont été rapportés au niveau circulant et local chez les patients atteints de la MA. En accord avec ces données, nous avons observé une augmentation des taux sériques de différentes cytokines pro-inflammatoires chez les patients AD par rapport aux témoins. De plus, les taux de IL-8 et de IL-17 sont plus élevés chez les patients AD-D par rapport aux patients AD-MCI. Le taux sérique de l'IL-22, une cytokine bi-fonctionnelle, est plus élevé chez les patients AD-D en comparaison avec les témoins. En parallèle, le taux de l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, est réduit chez les patients AD-D. Aucune différence significative n'a été constatée pour d'autres cytokines (IL-23, G-CSF, MCP-1, TGF- $\beta$ ).

Ces résultats suggèrent que les altérations phénotypiques et fonctionnelles des PN périphériques chez les patients MA pourraient être liés au moins en partie à l'effet des cytokines pro-inflammatoires présentes à un taux élevé dans le sang circulant. En effet, des études antérieures ont montré que les cytokines pro-inflammatoires sont capables d'activer les PN. De plus, nous avons montré *in vitro* que certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  et IL-17) modifient les pourcentages des 2 sous-populations de PN.

Par ailleurs, le taux circulant de la métalloprotéase-9 (MMP-9) ainsi que de TIMP-1, l'inhibiteur naturel de MMP-9, sont diminués chez patients par rapport aux témoins. Le ratio MMP-9/TIMP-1 est plus important dans le sérum des patients AD-D, ce qui signifie une

hausse de l'activité de la MMP-9 chez ces patients, qui pourrait contribuer aux altérations de la BHE décrites au cours de la MA.

### Conclusion

L'ensemble des résultats a permis de montrer chez les patients AD-D en comparaison avec les témoins appariés en âge une hyperactivation des PN circulants associée à une augmentation de la production des FRO, ainsi qu'une élévation de la NETose intravasculaire. Ces altérations qui ne sont pas observées chez les patients AD-MCI, pourraient être liées au déséquilibre des deux sous-populations des PN, pro-inflammatoire et immuno-suppressive. Parallèlement la diminution de la survie des PN associée à un déficit de certaines réponses fonctionnelles des PN pourrait accroître la susceptibilité des patients aux infections bactériennes et fongiques amplifiant les processus inflammatoires. En modifiant l'équilibre inflammatoire systémique et en contribuant à dysfonction de la BHE, les anomalies des PN pourraient contribuer à l'évolution de la maladie. Par ailleurs, le phénotype des PN pourrait constituer un bio-marqueur sanguin pronostic innovant de la rapidité d'évolution de la maladie, permettant de plus d'évaluer l'efficacité des traitements.

# Neutrophil Hyperactivation Correlates With Alzheimer's Disease Progression

Yuan Dong, MS,<sup>1</sup> Julien Lagarde, MD,<sup>2,3</sup> Laura Xicota, PhD,<sup>4</sup> Hélène Corne, MS,<sup>2</sup>  
Yannick Chantran, PharmD,<sup>1</sup> Thomas Chaigneau, MS,<sup>1</sup> Bruno Crestani, MD, PhD,<sup>5</sup>  
Michel Bottlaender, MD, PhD,<sup>3,6</sup> Marie-Claude Potier, PharmD, PhD,<sup>4</sup>  
Pierre Aucouturier, PharmD, PhD,<sup>1</sup> Guillaume Dorothée, PhD,<sup>1\*</sup>  
Marie Sarazin, MD, PhD,<sup>2,3\*</sup> and Carole Elbim, MD, PhD<sup>1</sup>

**Objective:** Recent studies have underlined the effect of systemic inflammation on the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD). Neutrophils are key components of early innate immunity and contribute to uncontrolled systemic inflammation if not tightly regulated. The aim of our study was to fully characterize human circulating neutrophils at different disease stages in AD.

**Methods:** We analyzed neutrophil phenotypes and functions in 42 patients with AD (16 with mild cognitive impairment and 26 with dementia), and compared them to 22 age-matched healthy subjects. This study was performed directly in whole blood to avoid issues with data interpretation related to cell isolation procedures.

**Results:** Blood samples from AD patients with dementia revealed neutrophil hyperactivation associated with increased reactive oxygen species production and increased levels of intravascular neutrophil extravascular traps. The homeostasis of circulating neutrophils in these patients also changed: The ratio between the harmful hyperreactive CXCR4<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup> senescent and the CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> immunosuppressive neutrophil subsets rose in the later stage of the disease. These abnormalities were greater in fast-decliner than in slow-decliner patients.

**Interpretation:** Our results indicate that the inflammatory properties of circulating neutrophils shift as the percentage of aged neutrophils expands in patients with AD—changes that may play an instrumental role in establishing systemic chronic inflammation. Most important, our data strongly suggest that the neutrophil phenotype may be associated with the rate of cognitive decline and may thus constitute an innovative and prognostic blood biomarker in patients with AD.

ANN NEUROL 2018;83:387–405

Alzheimer's disease (AD), the most common form of dementia in the elderly, is characterized by a triad of pathological features: extracellular amyloid deposits predominantly composed of amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptides, intracellular neurofibrillary tangles made of hyperphosphorylated and abnormally phosphorylated Tau protein, and gliosis, consisting of reactive microglia and astrocytes. In view of the

significant variability and overlap in the extent of amyloid- $\beta$  and Tau pathology in AD and nondemented populations, it is clear that other factors influence the progression of cognitive decline. Many clinical studies report that peripheral infections and systemic inflammation may affect the rate of disease progression in patients with AD.<sup>1,2</sup> Emerging evidence supports the concept of microglial priming, that is,

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/ana.25159

Received Jul 19, 2017, and in revised form Jan 23, 2018. Accepted for publication Jan 23, 2018.

Address correspondence to Pr Carole Elbim, INSERM, UMRS 938, CdR Saint-Antoine, Hôpital St-Antoine, F-75012, Paris, France. E-mail: [carole.elbim@upmc.fr](mailto:carole.elbim@upmc.fr)

From the <sup>1</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, team "Immune System, Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases", Hôpital Saint-Antoine, Paris, France; <sup>2</sup>Unit of Neurology of Memory and Language, Centre Hospitalier Sainte Anne, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; <sup>3</sup>Laboratoire Imagerie Moléculaire In Vivo (IMIV), UMR 1023 Inserm/CEA/Université Paris Sud-ERL 9218 CNRS; CEA/I2BM/Service Hospitalier Frédéric Joliot, Orsay, France; <sup>4</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM U1127, CNRS UMR 7225, UMRS 1127, Institut du Cerveau et de la Moelle  pini re, ICM, Paris, France; <sup>5</sup>APHP, Hôpital Bichat, Service de Pneumologie A, Centre de référence des maladies pulmonaires rares, Paris, France; and <sup>6</sup>UNIACT, NeuroSpin, Institut d'Imagerie Biomédicale, Direction des sciences du vivant, Commissariat à l'énergie Atomique, Gif-sur-Yvette, France

\*M.S. and G.D. contributed equally to this article.



that microglia multiply and get activated in response to pathological changes in the central nervous system, thus becoming susceptible to subsequent systemic inflammation that can cause exaggerated responses and contribute to disease progression in several pathological conditions, including neurodegenerative diseases.<sup>3</sup>

Neutrophils act as a first line of host defense and kill pathogens by various strategies, including phagocytosis, degranulation, rapid production of reactive oxygen species (ROS) in oxidative burst, and release of neutrophil extracellular traps (NETs), a process called NETosis.<sup>4</sup> Neutrophils are also important mediators of inflammation-induced vascular and tissue injury, and their improper activation may lead to oxidative stress and exaggerated inflammatory reactions.<sup>5-7</sup> Recent studies of mouse transgenic models of AD report that neutrophil depletion reduces Alzheimer-like neuropathology and improves memory in mice with already established pathology and cognitive impairment.<sup>8</sup> In patients with AD, neutrophils adhere to and spread inside brain venules and have been observed in the parenchyma, along with NETs.<sup>8</sup> It is noteworthy that these cells are exceptionally sensitive to external stimuli, including proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , which are reported to circulate at higher than normal levels in AD.<sup>9</sup> Nonetheless, the few published studies on the activation status and functions of circulating neutrophils in patients with AD have yielded conflicting results. Some researchers reported normal oxidative burst<sup>10,11</sup> and normal phagocytosis<sup>10</sup> in patients with AD, whereas other studies suggested increases in degranulation<sup>12</sup> and ROS production<sup>13</sup> or decreased phagocytosis.<sup>14</sup> An important bias shared by many of these studies is their use of various procedures to analyze neutrophils isolated from their blood environment, which may critically affect their phenotype and/or functional properties.<sup>15,16</sup>

The aim of our study was to fully characterize the phenotypes and functionalities of human circulating neutrophils at different disease stages in AD. This study was performed in whole-blood conditions to minimize any potential bias related to isolation procedures and took the proinflammatory cytokine environment into account. We then assessed the correlations between these phenotypic and functional neutrophil indicators and clinical markers of disease progression, as well as A $\beta$  deposition and extent of brain neuroinflammation.

## Subjects and Methods

### Study Design

All participants were enrolled in the prospective longitudinal IMABio3 study (PHRC-0054-N 2010), which aims to assess neuroinflammation in AD. The Ethics Committee of Salpêtrière Hospital approved the study, and all subjects provided

written informed consent before participating. This research is registered at <http://clinicaltrials.gov/> as number NCT01775696. Exclusion criteria in the control and patient groups included acute or chronic inflammatory conditions and treatment with corticosteroid or nonsteroidal anti-inflammatory drugs.

42 patients with AD met the following inclusion criteria: (1) progressive episodic memory impairment, characterized by low free recall not normalized by semantic cueing<sup>17,18</sup>; (2) absence of extrapyramidal signs; and (3) a cerebrospinal fluid (CSF) profile of AD, when available, defined as a score  $<0.8$ , calculated with the formula  $\text{amyloid-}\beta 42/[240 + (1.18 \times \text{T-tau})]$ .<sup>19</sup> 22 control subjects were recruited if they met the following criteria: (1) Mini-Mental State Examination (MMSE) score  $\geq 27/30$  and normal neuropsychological assessment; (2) Clinical Dementia Rating (CDR) score = 0; (3) no history of neurological or psychiatric disorders; and (4) no memory complaint or cognitive deficit. We did not include subjects with (1) severe cortical or subcortical vascular lesions; (2) history of autoimmune and inflammatory diseases or chronic migraines; or (3) history of psychiatric disorders or drug abuse. CSF biomarker measurements were available for 36 patients with AD. No major abnormality of the absolute numbers of leukocyte subpopulations was detected in our cohort.

Patients with AD were classified in two groups according to disease severity, assessed by the CDR scale on the day blood samples were taken: 16 patients had a score of 0.5, indicative of prodromal AD with isolated episodic memory impairments and only moderate impact on the activities of daily living, and 26 patients had a score  $>0.5$ , considered to demonstrate AD dementia. An extensive review was conducted of each patient's chart (Table). The two groups of patients were similar for age, prevalence of APOE  $\epsilon 4$  carriers, duration and type of treatment, and levels of C-reactive protein. Patients with AD were also dichotomized into slow decliners (SD) or fast decliners (FD), based on the progression of CDR score between the visit at baseline (assessment of neutrophil markers) and 1 year later.<sup>20</sup> There were 16 SD patients who remained stable with no change in their CDR score ( $n = 6$  AD-MCI and  $n = 10$  AD-D at baseline) and 11 patients who declined (FD), with an increase of at least 0.5 of the CDR score ( $n = 4$  AD-MCI and  $n = 7$  AD-D at baseline). Percentages of AD-MCI patients and AD-D patients did not differ significantly between the SD and FD groups ( $p > 0.99$ ).

All participants underwent the same procedure including a complete clinical and neuropsychological assessment, 3 Tesla brain magnetic resonance imaging, and <sup>11</sup>C-Pittsburgh compound B (PiB) and <sup>18</sup>F-DPA-714 = fluorine-18-labeled N,N-diethyl-2-[4-(2-fluoroethoxy)phenyl]-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-acetamide; (<sup>18</sup>F-DPA-714) positron emission tomography (PET) imaging, as described previously.<sup>20</sup> Controls included in our study were defined by a negative PiB-PET. Patients with unavailable CSF biomarkers had a positive PiB-PET.

In order to check the part of recurrent infections occurring in patients with AD, attributed to their way of living (ie, poor ability to care for themselves), in the occurrence of



neutrophil abnormalities, we analyzed in parallel two other groups of patients: (1) patients without dementia and suffering from bronchiectasis who have elevated frequency of lung infections (pneumonia and bronchial infections;  $n = 11$ , aged 64–87 years; mean age, 70.7) and (2) patients with dementia of other types, that is, patients with corticobasal degeneration, progressive supranuclear palsy, or frontotemporal dementia ( $n = 11$ , aged 63–99 years; mean age, 74.2; MMSE, 13–28 mean MMSE, 20.95). The differential diagnosis between non-AD dementia and AD was based on a non-AD CSF biomarker profile defined by an Innostest Amyloid Tau Index (IATI)  $>1.2$  (index IATI: ratio  $A\beta_{1-42}/[240 + (1.18 \times T\text{-tau})]$ ).<sup>21</sup>

Patients and controls were included at a minimal distance of 2 months from an acute infectious episode. Whole blood of controls and patients was sampled, kept on ice, and transported to the laboratory immediately.

### Determination of Surface Molecule Expression on Resting Neutrophils

Surface expression of CD62L, CD16b, CD11b, CD11c, CD83, and CD152 on resting neutrophils was studied on whole-blood samples maintained at 4°C and stained with specific mAbs.<sup>22</sup> To investigate the senescent C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4)<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup> neutrophil subset, samples kept on ice were incubated for 45 minutes with phycoerythrin (PE)/cyanine 7 (Cy7)/antihuman CXCR4 (clone 12G5; Sony Biotech, San Jose, CA), PE/antihuman CD11b (clone ICRF44; BD Biosciences, San Jose, CA), and allophycocyanin (APC)/antihuman CD62L (BD Biosciences). The immunosuppressive CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> neutrophil subset was studied after samples on ice were incubated for 45 minutes with fluorescein isothiocyanate (FITC)/antihuman CD16 (clone 1D3; Beckman Coulter, Brea, CA), PE/antihuman CD11c (clone 3.9; Sony Biotech), PE/Cy7/antihuman CD11b (clone Bear 1; Beckman Coulter), and APC-anti-human CD62L (BD Biosciences). Samples were analyzed by flow cytometry.<sup>22</sup>

### Measurement of Whole-Blood Neutrophil Phagocytosis, Oxidative Burst, and Cell Death

Percentage of neutrophils phagocytosing opsonized FITC-conjugated *Escherichia coli* and mean fluorescence intensity (MFI) were both measured in whole blood with the Phagotest Kit (BD Biosciences). Superoxide anion ( $O_2^-$ ) production by neutrophils was measured with a flow cytometry–based assay derived from the hydroethidine oxidation technique. Neutrophil cell death was quantified with Annexin V and the impermeant nuclear dye, 7-amino-actinomycin D (7-AAD). Samples were then analyzed by flow cytometry.<sup>23</sup>

### Measurement of Neutrophil Chemotactic Activity

Chemotaxis was assessed in transwell plates (Corning Costar, Corning, NY) containing 3- $\mu$ m pore polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate filters.<sup>24</sup> The lower well of each chamber was filled with 600  $\mu$ l of *N*-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) ( $10^{-7}$  M) or of interleukin (IL)-8 (25 ng/ml) diluted in

phosphate-buffered saline (PBS) plus 1% bovine serum albumin (BSA). Spontaneous migration was evaluated with PBS containing 1% BSA. The upper well was filled with 100  $\mu$ l of whole blood from patients or controls diluted 1:10 in PBS. The chambers were incubated for 3 hours at 37°C, and the migration index was evaluated as previously described.<sup>24</sup>

### Measurement of Intravascular NETosis

NETs are composed of a DNA backbone peppered with granule proteins, including myeloperoxidase (MPO), cit-H3, and elastase. To prepare the DNA standard, NETs from a healthy donor were produced and isolated as previously described.<sup>25</sup> Briefly, freshly isolated neutrophils were seeded in 12-well culture plates ( $1.5 \times 10^6$  cells/well) and stimulated with 5 mM of calcium ionophore A23187 for 3 hours at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were carefully washed twice with 1 ml of PBS and then treated for 20 minutes at 37°C with 20 U/ml of restriction enzyme AluI in Hank's buffered salt solution to recover large soluble NET fragments. Supernatants were collected and centrifuged at 300g for 5 minutes at 4°C to remove contaminating cells and debris. NET preparations were then stored at –80°C until use. DNA was quantified in NET samples with PicoGreen (Molecular Probes, Waltham, MA).<sup>25</sup> NET-associated MPO-DNA complexes were then quantified as previously described.<sup>26</sup> In brief, 96-well microtiter plates were coated with 5  $\mu$ g/ml of mouse anti-human MPO antibody (ABD Serotec, Oxford, UK). After blocking with 1% bovine serum albumin (BSA), serum samples were added together with a peroxidase-labeled anti-DNA monoclonal antibody (component 2 of the Cell Death ELISA kit; Roche, Indianapolis, IN) to the wells. After incubation, the peroxidase substrate (ABTS) was added according to the manufacturer's instructions. Optical absorbance was measured at 405 nm in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Bio-Rad 550; Bio-Rad Laboratories, Tokyo, Japan). Samples were compared to the standard curve (from 0.1 to 100 ng/ $\mu$ l) and the results expressed in ng/ $\mu$ l.

### Flow Cytometry Analysis

Cells were analyzed with a Gallios flow cytometer and the data with Kaluza software (Beckman Coulter). To determine neutrophil expression of surface molecules and ROS production, we used forward (FSC)- and side-scatter (SSC) characteristics to identify the neutrophil population and to gate out other cells and debris; 10,000 events were analyzed per sample. To measure neutrophil phagocytosis, a "live" leukocyte gate was set during data acquisition to exclude bacteria, and 10,000 to 15,000 leukocytes were collected per sample, with the granulocyte cluster gated in the software program in the scatter diagram (lin FSC vs lin SSC). To measure cell death in whole blood by flow cytometry, neutrophils were identified as CD15<sup>high</sup> cells and  $2 \times 10^5$  events were analyzed per sample.

### Measurement of Soluble Pro- and Anti-Inflammatory Mediators

Soluble cytokines, chemokines, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and tissue inhibitor of metallo-proteinases-1 (TIMP-1) were detected from serum with Luminex assays (Luminex Performance Assays; R&D Systems, Minneapolis, MN). Whole-blood samples



were centrifuged for 15 minutes at 1,000g within 30 minutes of collection. Assays were performed on cryostored samples frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  and diluted according to manufacturer's instructions (R&D Systems).

### Isolation of Neutrophils

Neutrophils were isolated in lipopolysaccharide (LPS)-free conditions by Dextran sedimentation and Ficoll-Hypaque centrifugation of freshly drawn blood; neutrophils were further purified by negative selection with pan antihuman human leukocyte antigen class II-coated magnetic beads (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) to deplete B lymphocytes, activated T lymphocytes, and monocytes, as previously described.<sup>27</sup> Less than 1% of cells were positive by nonspecific esterase staining, and flow cytometry showed the absence of CD45<sup>+</sup>/CD14<sup>high</sup>, CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>, or CD45<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> cells; this showed that the neutrophils were highly purified, without contaminating monocytes.

### Cytokine Production by Neutrophils

Isolated neutrophils ( $5 \times 10^6/\text{ml}$ ) were cultured for 24 hours at  $37^{\circ}\text{C}$  with 5% CO<sub>2</sub> in 24-well tissue-culture plates (Costar) in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in the presence of PBS tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , or the following Toll-Like Receptor (TLR) agonists: Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (TLR1/2 agonist, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), or LPS (TLR4 agonist, 100ng/ml). Supernatants were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for no longer than 15 days before assay. Interleukin (IL)-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , and IL-17 were detected simultaneously in supernatants with Luminex assays.

### Isolation of RNA

RNA was isolated using Trizol-chloroform, precipitated in isopropanol and cleaned using the RNeasy mini-kit (Qiagenkit, Hilden, Germany), including a DNase digestion step, as previously described.<sup>28</sup> RNA was quantified using a NanoDrop (ND-1000; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) and checked for quality using the Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Total RNA was enriched for mRNA using poly-A selection.

### Library Generation and Sequencing

Libraries were prepared with 500ng of total RNA from each individual using the TruSeq Stranded Total RNA (Illumina, San Diego, CA), according to the manufacturer's instructions. Libraries were analyzed on a TapeStation (Agilent Technologies, Les Ulis, France) and then sequenced on a NextSeq500 (Illumina) as 75-base-pair paired-end reads with a sequencing depth of 30 million reads.<sup>29</sup>

### Read Mapping and Gene Annotation

Sequenced reads passing the quality controls using FastQC and Trimmomatic were aligned to the human reference genome hg19 using Galaxy (<https://usegalaxy.org/>). Gene quantification and normalization were performed using FeatureCounts and EdgeR, and transcripts that had no sequence reads across all samples were discarded from further analysis. A minimum counts per million (CPM) threshold of expression of 20 was applied.

### Bioinformatic Analysis of Neutrophil Transcriptome

All manipulations and statistical analysis were implemented using the R freeware. For each sample, raw data consisting of the CPM were log<sub>2</sub>-transformed and normalized through trimmed mean of M-values under the R freeware (<http://www.r-project.org>). Statistical analysis was performed on these normalized data under the R freeware. Independent samples were compared by two-tailed unpaired Student *t* test filtered at  $p < 0.05$ . These values were used to select the 100 most differentially expressed genes in order to generate a graphical representation of the expression profile in the form of a heatmap depending both on expression levels and differential expression. Functional profiling of the 100 more differentially expressed genes was performed using gProfiler.<sup>30</sup>

### Statistical Analysis

The freely available statistical software, Rstudio 1.0.143 (<http://www.rstudio.com/>), was used to conduct the statistical analysis. All tests were two-tailed, with a significance level of  $\alpha = 0.05$ . When a parametric test was used, normality of distribution was tested with the Shapiro-Wilk test. Differences between groups were assessed with the chi-square test or analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post-hoc test, as appropriate. ANOVA, adjusted for age, was used to compare neutrophil markers between groups of patients and controls (with age as a covariate), and ANOVA with confounding factors (age and initial MMSE score) as covariates, to compare them between fast and slow decliners. Bonferroni correction was used for multiple comparisons. Correlations were performed by linear partial correlation analysis, with adjustment for covariates.

## Results

### Circulating Neutrophils From the Alzheimer Disease Dementia Group Are Highly Activated and Produce Higher Levels of ROS and Intravascular NETs Than Those From Healthy Subjects

We investigated neutrophil phenotype and functions separately in the prodromal Alzheimer's disease group (AD-MCI) and the Alzheimer's disease dementia group (AD-D). We observed lower expression of CD62L and CD16b, together with higher CD11b and CD11c expression, on resting neutrophils from AD-D patients than from healthy controls (HC; Fig 1A), indicating basal hyperactivation of circulating neutrophils from patients.<sup>31–33</sup> Neutrophils from AD-MCI patients expressed normal levels of L-selectin, CD11b, and CD11c, but lower levels of CD16b than those from HC. Basal CD16b expression at the cell surface was modulated more strongly in AD-D than AD-MCI patients (Fig 1A).

Upon activation, neutrophils are reported to trigger microbicidal mechanisms, such as ROS production and release of NETs.<sup>34,35</sup> We observed significantly higher

ROS production in unstimulated neutrophils from AD-D patients than HC (Fig 1B). In contrast, ROS production did not differ significantly between AD-MCI

patients and HC. In addition, ROS production by non-primed neutrophils (sample preincubated with PBS and stimulated with the bacterial formyl peptide, fMLP) was

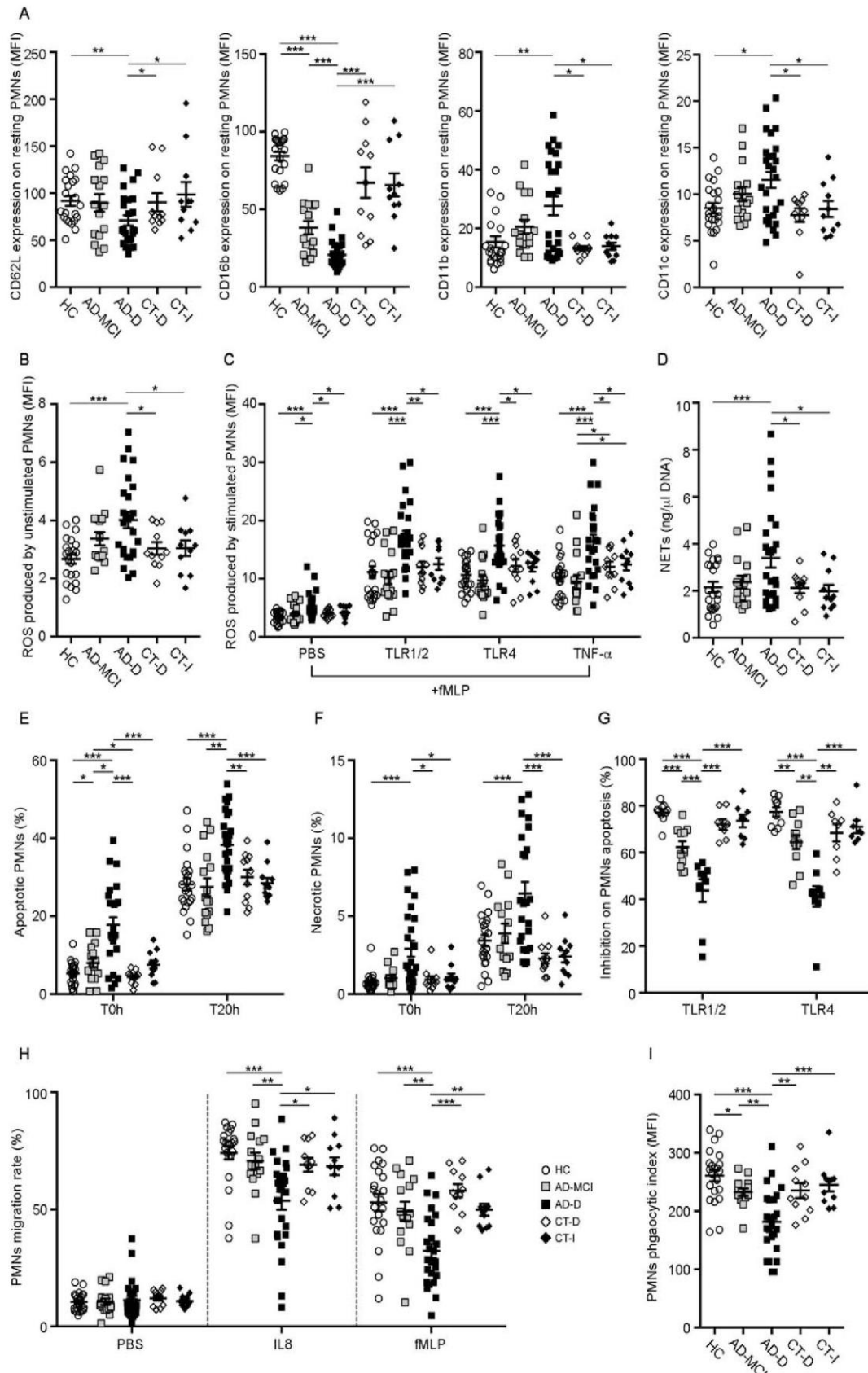


FIGURE 1.



significantly higher in AD-D patients than in either HC or AD-MCI patients (Fig 1C). Moreover, under the different priming conditions, ROS production was significantly higher in AD-D patients than in the HC and AD-MCI groups (Fig 1C), thereby demonstrating the neutrophil hyperreactivity in the AD-D group. In contrast, ROS production by primed neutrophils did not differ significantly between AD-MCI patients and HC. Finally, we found higher levels of circulating NETs in AD-D patients than in HC. In contrast, again, no significant difference was observed between AD-MCI patients and HC (Fig 1D).

Neutrophils from patients without dementia, but with an increased susceptibility to infections, as well as neutrophils from patients with dementia of other types, exhibit normal expression of adhesion molecules, normal ROS production, and normal levels of circulating NETs.

### Impaired Survival, Migration, and Phagocytic Activity of Neutrophils From Patients With AD

Because neutrophil activation can induce apoptosis,<sup>36,37</sup> we measured the percentage of neutrophils undergoing spontaneous apoptosis. Both groups of patients had higher percentages of apoptotic neutrophils (Fig 1E) than HC did. We also observed greater percentages of necrotic neutrophils in AD-D patients than in HC (Fig 1F). Moreover, the capacity of TLR1/2 and TLR4 agonists to increase survival of neutrophils<sup>38</sup> was significantly lower in patients with Alzheimer's diseases (Fig 1G). Importantly, these differences with HC were also greater in AD-D than AD-MCI patients.

Increased neutrophil apoptosis in patients may impair some functional capacities of these cells to respond to various stimuli. Neutrophil chemotaxis toward IL-8 or fMLP was significantly lower in AD-D patients than in either HC or AD-MCI patients (Fig 1H). Similar results were observed in supplemental experiments performed on isolated neutrophils (data not shown), ruling out the influence of dendritic cells and monocytes-derived cytokines and chemokines on chemotaxis of whole-blood neutrophils. As previously reported,<sup>14</sup> we observed a significantly lower phagocytic index in patients with AD (Fig 1I), perhaps related, at least in part, to the decreased CD16b (FcγRIII) expression on neutrophil surfaces<sup>39</sup> (see Fig 1A). Neutrophil phagocytic activity was also significantly lower in the samples from AD-D than AD-MCI patients.

Neutrophils from patients without dementia, but with an increased susceptibility to infections, as well as neutrophils from patients with dementia of other types, exhibit normal survival, migration, and phagocytic activity.

### Homeostasis of the Circulating Neutrophils Differed for Neutrophils From the Prodromal Group and From the Dementia Groups

Evidence over the last decade has demonstrated unexpected phenotypic heterogeneity and functional versatility in the neutrophil population. Differential phenotypic and functional features of neutrophils from AD-MCI and AD-D patients might be related to an imbalance between neutrophils subsets, that is, the overly active subset of senescent CXCR4<sup>high</sup> neutrophils<sup>40</sup> and the immunosuppressive CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> subset of

**FIGURE 1:** Phenotypic and functional characterization of neutrophils from patients with Alzheimer's disease. (A) Surface expression of CD62L, CD16b, CD11b, and CD11c on resting neutrophils (PMNs) was studied on whole-blood samples maintained at 4 °C and stained with specific mAbs. Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI). (B,C,D) ROS production by PMNs was studied with DHE oxidation. (B) ROS production by unstimulated PMNs was studied after treatment of whole-blood samples for 50 minutes with PBS; results are expressed as MFI. (C) ROS production by stimulated PMNs was measured after pretreatment of whole-blood samples for 45 minutes with PBS, or tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , or the following Toll-like receptor (TLR) agonists: Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (TLR1/2 agonist, 1  $\mu$ g/ml), or LPS (TLR4 agonist, 10ng/ml), and incubation for 5 minutes with the formyl-peptide fMLP (10<sup>-6</sup>M); results are expressed as MFI. (D) Quantification of circulating neutrophil-extracellular traps (NETs) was performed by myeloperoxidase (MPO)-DNA complex ELISA; mean optical density was measured by capture ELISA and results are expressed as ng/ $\mu$ l of DNA. (E,F) Spontaneous PMN death was measured immediately after sampling (T0) and after 20-hour incubation at 37 °C (T20h) by staining with Annexin V and 7-AAD. Results are expressed as percentages of apoptotic (E) and necrotic (F) PMNs. (G) Prolongation of PMN survival was analyzed by incubating whole-blood samples with PBS, or TLR1/2 agonist, or TLR4 agonist for 20 hours at 37 °C. Results are expressed as the percentage inhibition of PMN apoptosis [1 - (% of total annexin V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup> PMN in TLR agonist-treated sample/% of total Annexin V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup> PMN in PBS-treated sample)]  $\times$  100. (H) PMN migration was measured in transwell plates; lower wells were treated with PBS-BSA (1%) or IL-8 (25ng/ml) or fMLP (10<sup>-7</sup>M) for 3 hours at 37 °C. Results are expressed as the migration rate. (I) Phagocytosis of PMNs was measured after incubation of whole-blood samples with fluorescently opsonized *E. coli* bacteria for 10 minutes in a water bath at 37 °C. Results are expressed as the PMN phagocytic index (% phagocytic neutrophil  $\times$  MFI). All measurements were made in samples from aged-matched healthy controls (HC; n = 22), the Alzheimer's disease prodromal group (AD-MCI; n = 16), the Alzheimer's disease dementia group (AD-D; n = 26), patients without dementia with recurrent infections (CT-I; n = 11), and patients with dementia of other types (CT-D; n = 11). Values are means  $\pm$  standard error. \*Significantly different from controls  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , adjusted for age and Clinical Dementia Rating score. 7-AAD = 7-amino-actinomycin D; BSA = bovine serum albumin; DHE = dihydroethidium; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; LPS = lipopolysaccharide; mAbs = monoclonal antibodies; PBS = phosphate-buffered saline; PMN = polymorphonuclear neutrophil; ROS = reactive oxygen species.



neutrophils exhibiting decreased proinflammatory properties<sup>22,41,42</sup> We observed an expansion of the senescent CXCR4<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup> subset of neutrophils in both groups of patients, and the percentage of neutrophils in the senescent subset was higher in AD-D than in AD-MCI patients (Fig 2A,C). The percentage of neutrophils in the CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> immunosuppressive subset was higher in AD-MCI patients than in HC, but significantly lower in AD-D patients than in HC (Fig 2B,D). Accordingly, the ratio between the senescent and immunosuppressive subsets was higher in AD-D than in AD-MCI patients (Fig 2E).

Neutrophils from patients without dementia, but with an increased susceptibility to infections, as well as neutrophils from patients with dementia of other types, exhibit normal homeostasis.

### Gene Expression Profile in Neutrophils From Patients With Alzheimer's Disease

Phenotypic changes associated with neutrophil activation involve both molecular rearrangements to change the activity and/or subcellular localisation of pre-existing molecules. Activation also includes increased ability of neutrophils to synthesize de novo proteins such as cytokines and chemokines, although neutrophils possess 10 to 20 times less RNA than other leukocytes. Transcriptome sequencing (RNA sequencing; RNA-Seq) was carried out on mRNA purified from freshly isolated neutrophils from HC and patients with AD. Analysis of RNA isolated from unstimulated neutrophils revealed expression (CPM >20) of 12,289 known genes among a total of 22,675 genes analyzed.

Hierarchical cluster analysis of genes expressed (CPM >20) in neutrophils from healthy controls and AD-D patients was performed, and an expanded heatmap of the top 100 genes differentially expressed between HC and AD-D is shown in Figure 3A. Neutrophils from patients with AD showed different profiles as compared to controls. Interestingly, AD-MCI patients clustered in between controls and AD-D patients. Neutrophils from patients with AD showed upregulation of transcripts with functions mostly associated with inflammatory and cell-mediated immune responses as well as organization of cytoplasm and cytoskeleton. Of note, actin cytoskeleton is required for vesicle trafficking to the plasma membrane and granule exocytosis, allowing the NADPH oxidase cytosolic components to translocate to the membrane and form the catalytically active enzyme complex. Functions associated with cell senescence and death, various signaling pathways, nucleic acid metabolism, lipid and protein metabolism, and regulators of protein synthesis or stability, including ubiquitination

machinery and chaperones, were similarly upregulated (Fig 3A). Neutrophils from AD-D patients showed significant upregulation ( $p < 0.05$ ) of 18 transcripts, including inflammatory and host-defense genes (*TAP1*, *CD83*, *CTLA4*, *TMIGD2*, *S100B*, *EDAR*, and *MDS2*). However, we did not observe any significant upregulation of proinflammatory cytokines and chemokines transcripts, a classical signature of in vitro activated neutrophils.<sup>28</sup> In accord, neutrophil production of the classical proinflammatory cytokines, IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, and TNF $\alpha$ , measured at the protein level by Luminex (data not shown) did not differ between patients with AD and controls, in line with previous data.<sup>43</sup> Upregulation of two host-defense genes, *CD83* and *CTLA4*, shown by RNA-Seq (Fig 3B) was associated with increased expression of these two molecules at the surface of neutrophils from AD-D patients (Fig 3C). *CD83* encodes an immunoglobulin supergene family member, best known as a marker for mature dendritic cells,<sup>44</sup> but has also been identified as a differentially regulated gene in neutrophil-transcription profiles.<sup>45</sup> CD83 surface antigen has been reported previously in neutrophils cultured in vitro with cytokines<sup>46</sup> and bacterial peptides<sup>47</sup> or during acute bacterial infection and chronic inflammatory disease in vivo.<sup>48</sup> Increased expression of CD83 transcript was also associated with upregulation of *TAP1*, involved in the proteolytic steps of major histocompatibility complex class I antigen processing by neutrophils,<sup>49</sup> suggesting that neutrophils from AD-D patients can adapt a function as antigen presenting cell. *CTLA4* encodes cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CD152), which transmits an inhibitory signal to T cells and is also involved in neutrophil regulation.<sup>50</sup> Importantly, in AD-D patients, we observed significant increased expression of four genes (*SIK1*, *CRIP2*, *GRASP*, and *AK5*) involved in regulation of signaling pathways. *SIK1*, a serine/threonine kinase, that belongs to the adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase family,<sup>51</sup> and *CRIP2*, that belongs to the cysteine-rich intestine protein family I,<sup>52</sup> act as transcriptional repressors of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)-mediated transcription induced by neutrophil in response to proinflammatory mediators such as TLR agonists. Upregulation of this negative regulatory circuit might thus be involved, at least in part, in the decreased capacity of activated neutrophils to produce a variety of proteins, such as as cytokines and chemokines, as well as in the decreased TLR-dependent survival of neutrophils.<sup>27</sup> *AK5* is an adenylate kinase that catalyzes the reversible transfer of the  $\gamma$ -phosphate group from a phosphate donor (normally adenosine triphosphate) to AMP, and generates the intracellular second messenger, cyclic AMP (cAMP).<sup>53</sup> Interestingly, cAMP

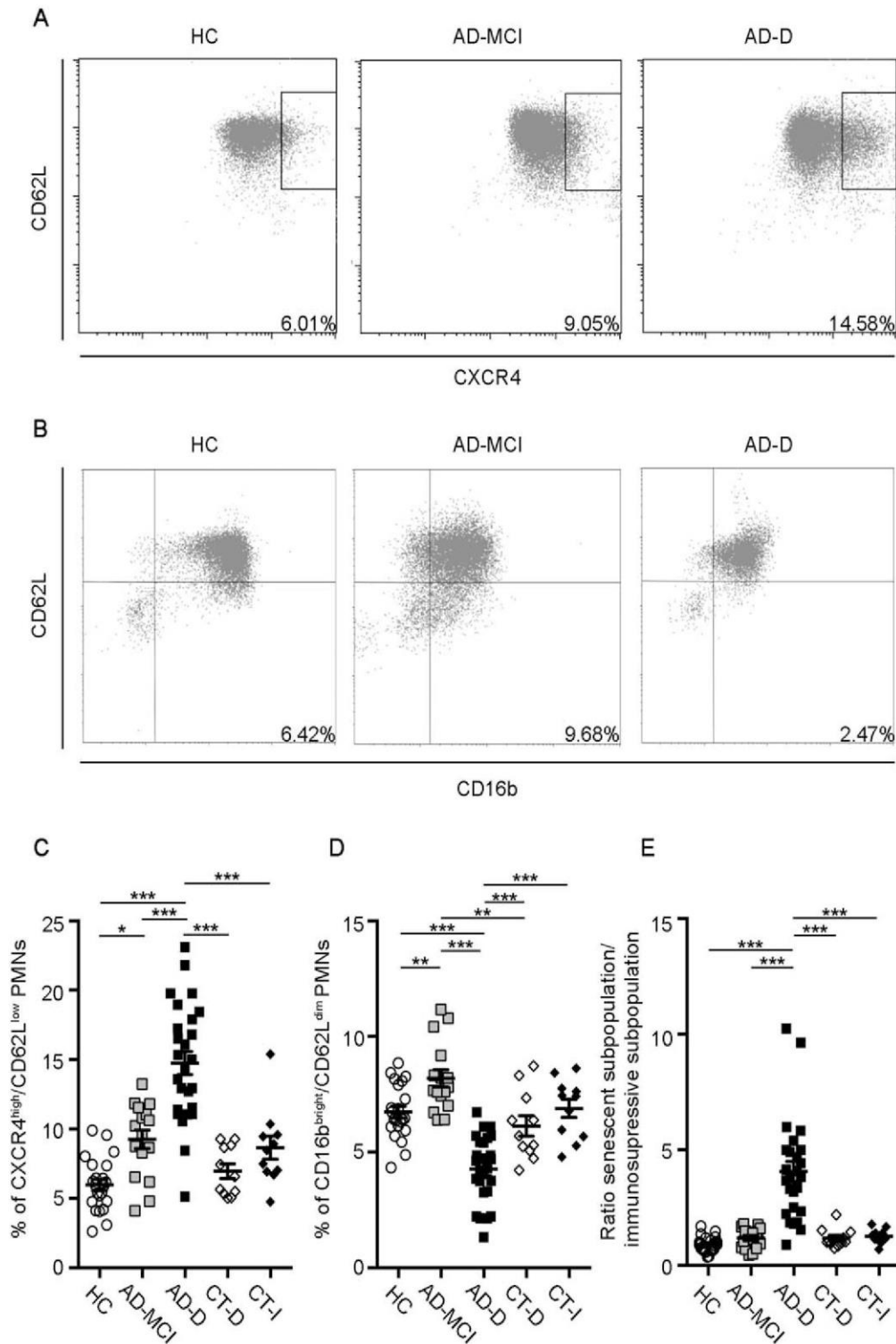
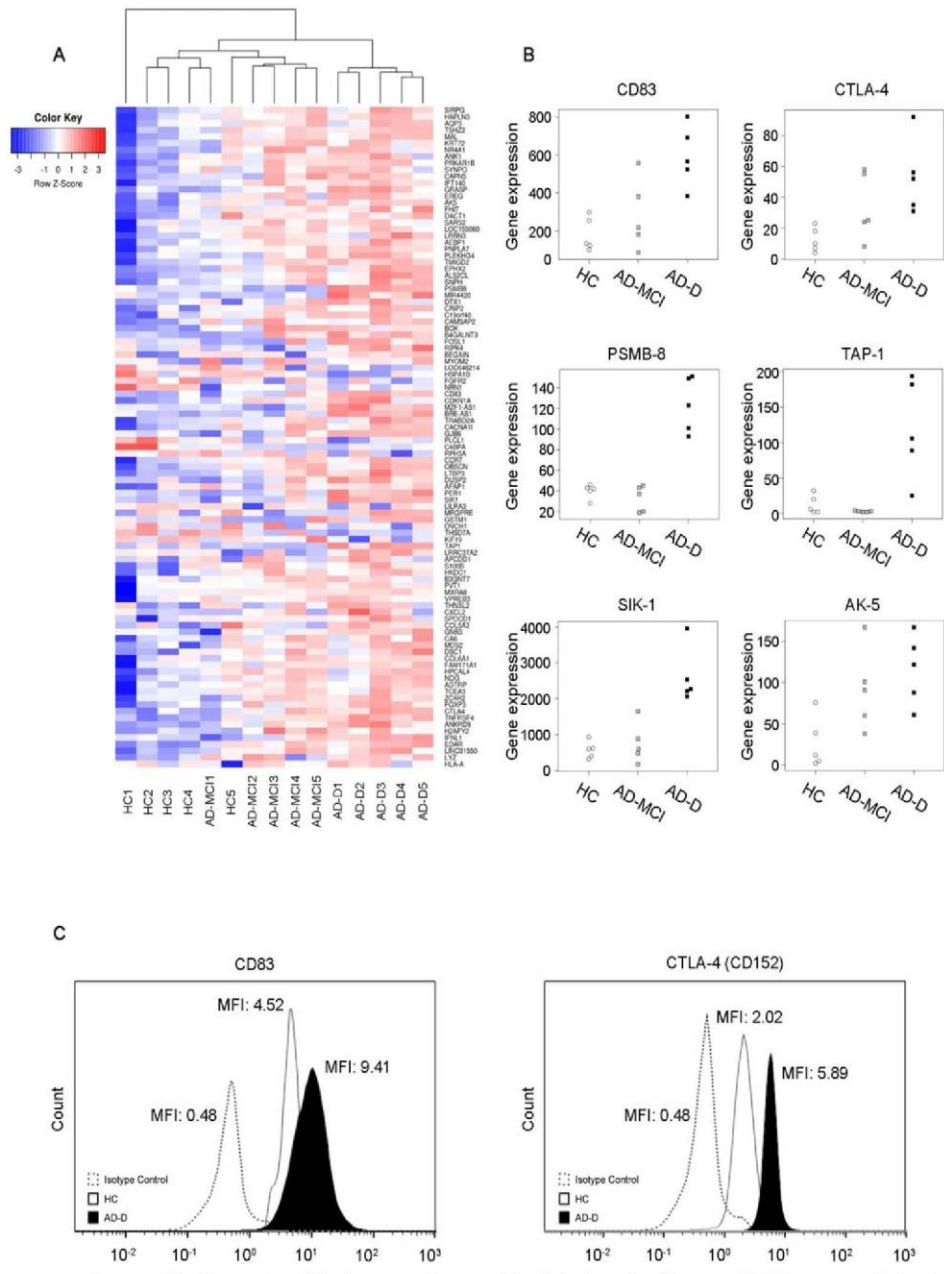


FIGURE 2: Homeostasis of the circulating neutrophils from patients with Alzheimer’s disease is altered. (A–D) Whole-blood samples were incubated for 45 minutes at 4 °C with PE/Cy7/antihuman CXCR4, PE/antihuman CD11b, and APC/antihuman CD62L (A,C) or with FITC/antihuman CD16, PE/antihuman CD11c, PE/Cy7/antihuman CD11b, and APC/antihuman CD62L (B,D). (A) Representative dot plots of the neutrophil (PMN) phenotype according to CXCR4 and CD62L expression in a healthy control (left), a prodromal patient with Alzheimer’s disease (AD-MCI; middle), and an Alzheimer’s disease patient with dementia (AD-D; right). (B) Representative dot plots of the PMN phenotype according to CD16 and CD62L expression in a healthy control (left), a prodromal Alzheimer’s disease patient (AD-MCI; middle), and an Alzheimer’s disease patient with dementia (AD-D; right). (C) Percentages of the CXCR4<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup> senescent PMN subset. (D) Percentages of the CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> immunosuppressive PMN subset. (E) Ratio between the senescent and immunosuppressive subsets. All measurements were made in samples from aged-matched healthy controls (HC; n = 22), Alzheimer’s disease prodromal group (AD-MCI; n = 16), Alzheimer’s disease dementia group (AD-D; n = 26), patients without dementia with recurrent infections (CT-I; n = 11), and patients with dementia of other types (CT-D; n = 11). Values are means ± standard error. \*Significantly different from controls *p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001, adjusted for age and Clinical Dementia Rating score. APC = allophycocyanin; CXCR4 = C-X-C chemokine receptor type 4; Cy7 = cyanine 7; FITC = fluorescein isothiocyanate; PE = phycoerythrin; PMN = polymorphonuclear neutrophil.





**FIGURE 3: Gene expression profile in neutrophils from patients with Alzheimer's disease.** (A) Heatmap of the top 100 differentially expressed genes in neutrophils from Alzheimer's patients with dementia as compared to healthy controls. Each column represents 1 subject and each row an individual probe. Red indicates relative gene upregulation and blue indicates relative gene downregulation. These transcripts include genes that can be categorized as inflammatory and cell-mediated immune responses, organization of cytoplasm and cytoskeleton, cell senescence and death, various signaling pathways, internal biological clock regulation, nucleic acid metabolism, lipid metabolism, carbohydrate metabolism, protein metabolism, regulators of protein synthesis, or stability. (B) *CD83*, *CTLA4*, *PSMB8*, *TAP1*, *SIK1*, and *AK5* mRNA expression levels in healthy controls (HC; n = 5), patients with prodromal Alzheimer's disease (AD-MCI; n = 5), and patients with Alzheimer's disease dementia (AD-D; n = 5). (C) Surface expression of CD83 and CTLA4 analyzed by flow cytometry. Whole-blood samples were incubated for 45 minutes at 4 °C with PE-conjugated isotypic control, PE/antihuman CD83, or PE/antihuman CTLA4. Representative histograms of CD83 and CTLA4 expression in neutrophils from an HC and from a patient with Alzheimer's disease dementia (AD-D). CTLA4 = cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; CXCR4 = C-X-C chemokine receptor type 4; MPO = myeloperoxidase; PE = phycoerythrin.

significantly inhibits ROS production by neutrophils in young subjects, but increases ROS level in 50- to 80-year-old individuals.<sup>54</sup> In the same line, GRASP promotes activation of ADP-ribosylation factor-6, a low-molecular-weight GTPase that regulates key aspects of endocytic recycling pathways and that has been involved

in neutrophil degranulation and oxidative burst.<sup>55</sup> Furthermore, upregulation of functions associated with ubiquitination machinery (*DTX1*, *PSMB8*) in AD-D patients could result in increased neutrophil death by apoptosis<sup>56</sup> as well as by NETosis in these patients.<sup>57</sup> Finally, we observed an increased expression of *PER1* gene

( $p = 0.06$ ). *PER1* encodes for period circadian protein homolog 1 protein, a key regulator of internal biological clock in neutrophils, that has been involved in the mobilization of young neutrophils from the bone marrow and their aging in the peripheral circulation.<sup>58</sup>

### **Fast Decliner Patients Have Greater Neutrophil Hyperactivation and Greater Impairments in Homeostasis Than Slow Decliners Do**

We then investigated whether the neutrophil abnormalities observed in patients with AD might be associated with the rate of disease progression, studying 27 subjects who were followed up over 1 year with a standardized protocol including a CDR score. Patients were dichotomized into slow decliners or fast decliners as described in Subjects and Methods. Basal neutrophil activation at baseline was greater in fast decliner than in slow decliner patients, as shown by their lower expression of CD62L and CD16 (Fig 4A), although their expression of CD11b and CD11c remained similar. Constitutive ROS production (Fig 4B) and ROS production by primed-neutrophils (Fig 4C) were both higher in fast decliner than in slow decliner patients, as was the level of intravascular NETs (Fig 4D). These phenotypic and functional properties of neutrophils from fast decliner patients were associated with a higher percentage of neutrophils in the senescent hyperactive subset (Fig 4E) and a lower percentage in the immunosuppressive subset (Fig 4F) and resulted in a higher ratio between these subsets in the fast decliner group (Fig 4G), as well as a higher rate of spontaneous apoptosis (Fig 4H). In contrast, neutrophil survival did not differ between these two groups, nor did migration capacity or phagocytosis (data not shown). This analysis of the prognostic value of our neutrophil markers also considered the variations of both cognitive (MMSE) and functional (Clinical Dementia Rating Sum of Boxes, CDR-SOB) indicators, which are complementary dimensions. Of note, we observed a negative correlation between  $\Delta$ MMSE and CD62L expression ( $r = -0.48$ ;  $p = 0.01$ ), as well as a positive correlation between  $\Delta$ MMSE and each of the following: level of ROS production by unstimulated neutrophils ( $r = 0.5$ ;  $p = 0.006$ ); percentage of apoptotic ( $r = 0.62$ ;  $p = 0.0005$ ) and senescent neutrophils ( $r = 0.78$ ;  $p < 0.0001$ ); and ratio between senescent and immunosuppressive subsets ( $r = 0.66$ ;  $p = 0.0016$ ). These markers were similarly correlated with the  $\Delta$ CDR-SOB (data not shown).

Of note, neutrophil markers were similarly associated with the overall disease progression profile over a 2-year follow-up period, determined by retrospectively taking into account the clinical scores 1 year before baseline.

We observed that both the neutrophil activation parameters and percentage of the different neutrophil subpopulations were correlated with  $\Delta$ MMSE and  $\Delta$ CDR-SOB (data not shown).

### **ROS Production by Peripheral Neutrophils From Patients With AD Correlates With Brain Amyloid Burden**

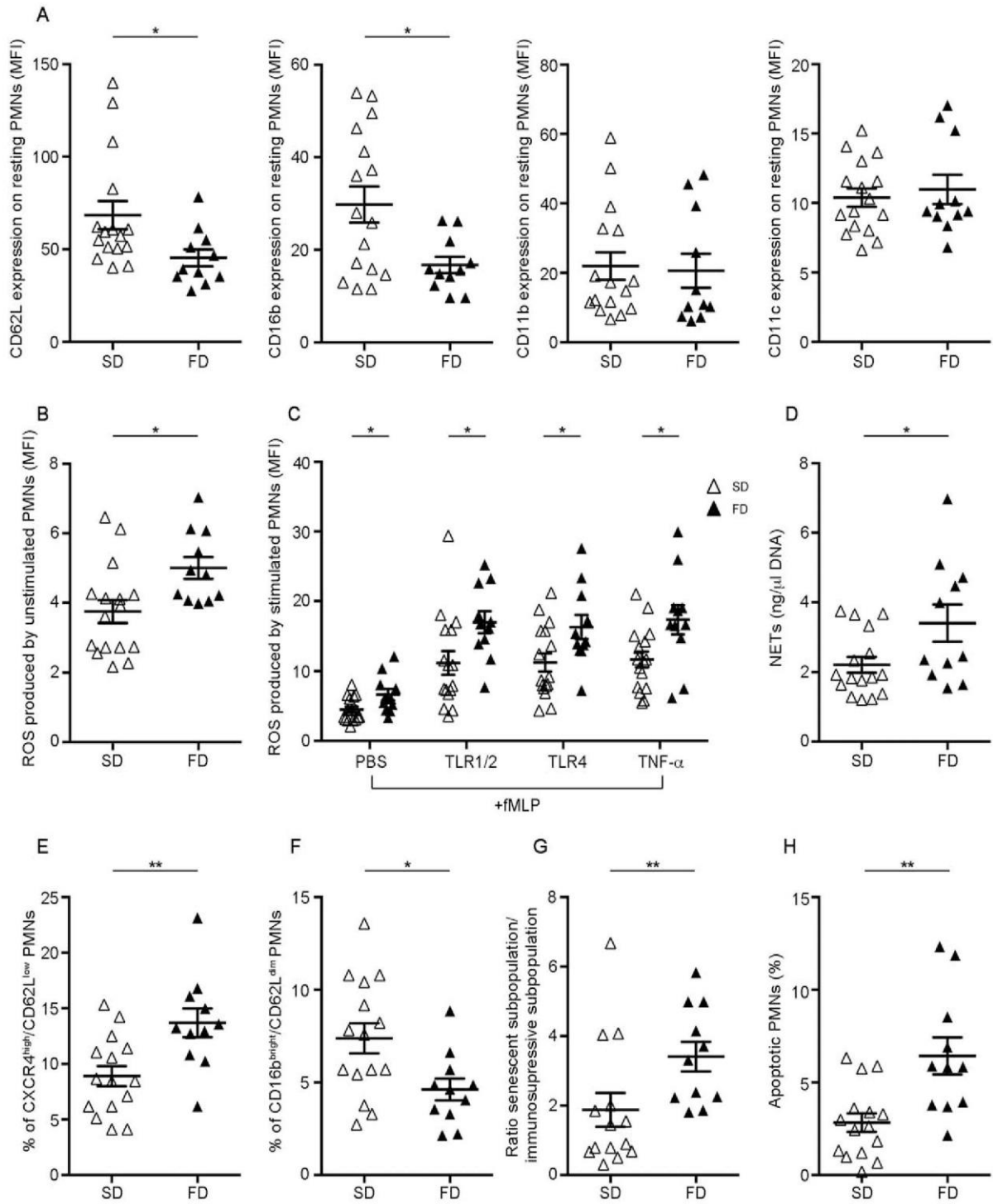
We then investigated correlations between neutrophil abnormalities and pathological features in patients, that is, brain amyloid deposits and microglial activation, as measured by PET imaging, and  $A\beta$  and Tau CSF biomarkers.  $^{11}\text{C}$ -PiB binding was used to quantify brain amyloid burden, and  $^{18}\text{F}$ -DPA-714 binding as a marker of microglial activation, with low-affinity binders excluded from the analysis.<sup>20</sup> We found that PiB binding was positively correlated with ROS production by stimulated neutrophils (Fig 5A) as well as with the percentage of senescent neutrophils (Fig 5B) and the senescent/immunosuppressive subset ratio (Fig 5C). In addition, the latter two were negatively correlated with  $^{18}\text{F}$ -DPA-714 binding (Fig 5D,E). Percentage of senescent neutrophils was positively correlated with CSF phospho-Tau levels (Fig 5F).

ROS appear to be the initial trigger for the activation of MMP-9, which belongs to a family of zinc-containing endopeptidases. MMP-9 degrades components of the extracellular matrix, which is important for normal blood-brain barrier (BBB) function.<sup>59,60</sup> Active MMP-9 forms 1:1 complexes with TIMP-1, which preferentially inhibits it, and the balance between them reflects the net proteolytic activity in several physiological processes.<sup>61</sup> MMP-9 and TIMP-1 levels were significantly lower in both groups of patients than in HC (Fig 5G,H). This led to a higher MMP-9/TIMP-1 ratio, which was moreover significantly different in AD-D patients than in HC (Fig 5I). MMP-9/TIMP-1 ratio also correlated with level of ROS produced by unstimulated and fMLP-stimulated neutrophils (Fig 5J,K).

### **Proinflammatory Environment in Patients With Alzheimer's Disease**

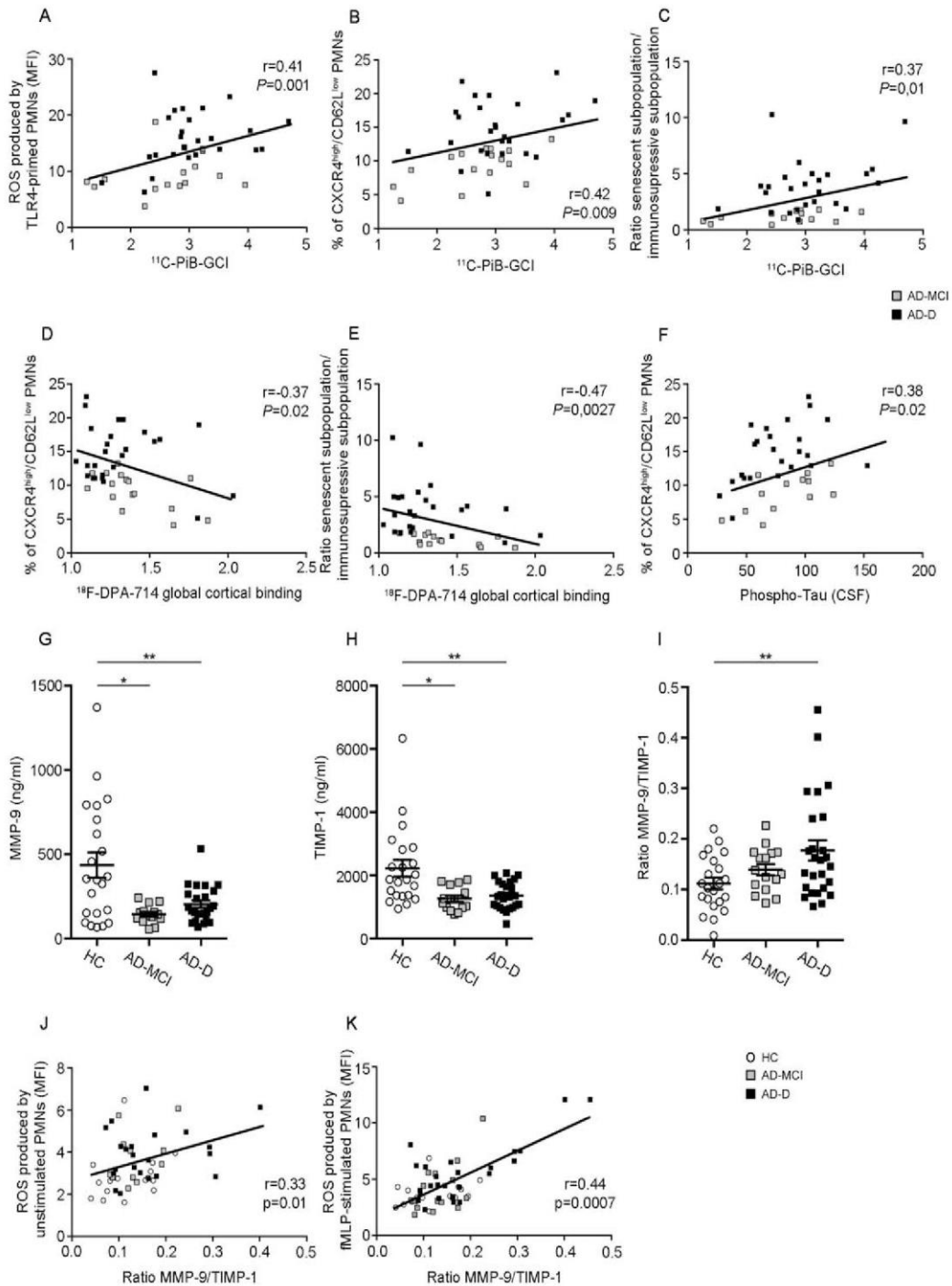
Proinflammatory cytokines have been reported to be overproduced by peripheral blood mononuclear cells from patients with Alzheimer's disease compared to healthy controls<sup>62</sup>. As neutrophil activity is highly regulated by proinflammatory mediators such as cytokines<sup>38,63,64</sup>, we thus investigated the peripheral cytokine environment in patients. Serum levels of the proinflammatory cytokines, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , and IL-18 were significantly higher in both groups of patients than in HC (Fig 6A). Serum levels of IL-8 and IL-17 were also



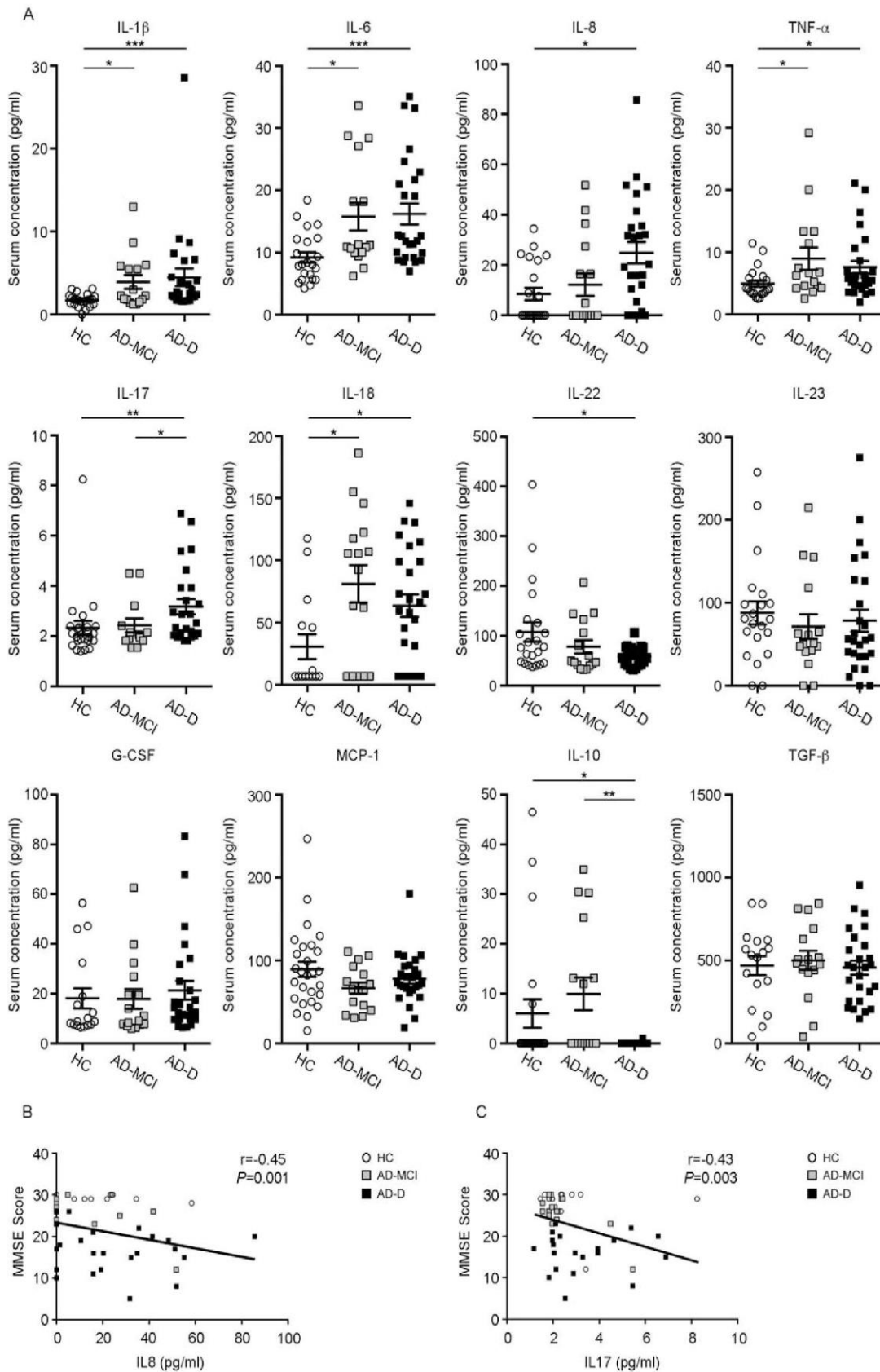


**FIGURE 4:** Fast-decliner patients with Alzheimer's disease have greater neutrophil hyperactivation and greater impairments in homeostasis than slow decliners do. (A) Surface expression of CD62L, CD16b, CD11b, and CD11c on resting neutrophils (PMNs) was studied on whole-blood samples maintained at 4°C and stained with specific mAbs. Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI). Reactive oxygen species (ROS) production by unstimulated (B) and stimulated PMNs (C) was studied by hydroethidine oxidation; results are expressed in MFI. (D) Circulating neutrophil-extracellular traps (NETs) were quantified by MPO-DNA complex ELISA, and results are expressed as ng/ $\mu$ l of DNA. (E) Percentages of the CXCR4<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup> senescent PMN subset. (F) Percentages of the CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> immunosuppressive PMN subset. (G) Ratio between the CXCR4<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup> senescent and the CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> immunosuppressive subsets. (H) Spontaneous PMN death was measured immediately after sampling (T0). Results are expressed as percentages of apoptotic PMNs. All measurements were made in samples from patients with Alzheimer's disease who were either slow decliners (SDs; n = 16) or fast decliners (FDs; n = 11), based on the progression of the Clinical Dementia Rating (CDR) score between the visit at baseline (time of PMN analysis) and the visit 1 year later. Values are means  $\pm$  standard error. \*Significantly different  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , adjusted for age and initial CDR score. CXCR4 = C-X-C chemokine receptor type 4; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; MPO = myeloperoxidase; PMN = polymorphonuclear neutrophil.





**FIGURE 5:** Association of reactive oxygen species (ROS) production by neutrophils with amyloid  $\beta$  deposits and the ratio between matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metallo-proteinases-1 (TIMP-1) in patients with Alzheimer's disease. Correlation between amyloid  $\beta$  deposits measured by  $^{11}\text{C}$ -PiB PET imaging and (A) ROS production by TLR4 agonist-primed neutrophils (PMNs), (B) percentage of the CXCR4<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup> senescent PMN subset, and (C) ratio of the senescent to immunosuppressive subsets. (D) Correlation between percentage of the CXCR4<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup> senescent PMN subset and  $^{18}\text{F}$ -DPA-714 PET imaging. (E) Correlation between ratio of the senescent to immunosuppressive subsets and  $^{18}\text{F}$ -DPA-714 PET imaging. (F) Correlation between percentage of the CXCR4<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> senescent PMN subset and level of phosphoTau in CSF. Correlations were adjusted for age and Clinical Dementia Rating (CDR) score. Circulating levels of MMP-9 (G) and TIMP-1 (H) were measured from serum by Luminex assays. (I) Ratio between MMP-9 and TIMP-1 concentrations. All measurements were made in samples from controls (n = 22), the prodromal Alzheimer's disease group (AD-MCI; n = 16), and the Alzheimer's disease dementia group (AD-D; n = 26). Values are means  $\pm$  standard error. \*Significantly different from controls  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . Correlation between the ratio between MMP-9 and TIMP-1 concentrations and ROS production by (J) unstimulated PMNs (MFI) and (K) fMLP-stimulated PMNs (MFI). Correlations were adjusted for age and initial CDR score. CSF = cerebrospinal fluid; CXCR4 = C-X-C chemokine receptor type 4;  $^{18}\text{F}$ -DPA-714 = fluorine-18-labeled N,N-diethyl-2-[4-(2-fluoroethoxy)phenyl]-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-acetamide; fMLP = N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine; MFI = mean fluorescence intensity; PET = positron emission tomography;  $^{11}\text{C}$ -PiB =  $^{11}\text{C}$ -Pittsburgh compound B; PMN = polymorphonuclear neutrophil; TLR4 = Toll-like receptor 4.



**FIGURE 6:** Cytokine environment in patients with Alzheimer's disease. (A) Circulating levels of pro- and anti-inflammatory cytokines were measured from serum with Luminex assays. All measurements were made in samples from healthy controls (n = 22), the Alzheimer's disease prodromal group (n = 16), and the Alzheimer's disease dementia group (n = 26). Values are means  $\pm$  standard error. \*Significantly different from controls  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , adjusted for age and CDR score. Correlation between MMSE and (B) interleukin (IL)-8 circulating levels, and (C) IL-17 circulating levels. Correlations were adjusted for age and Clinical Dementia Rating score. AD-D = Alzheimer's disease dementia group; AD-MCI = prodromal Alzheimer's disease group; CDR = Clinical Dementia Rating; G-CSF = granulocyte colony-stimulating factor; HC = healthy controls; MCP-1 = monocyte chemoattractant protein-1; MMSE = Mini-Mental State Examination; TGF- $\beta$  = transforming growth factor- $\beta$ ; TNF- $\alpha$  = tumor necrosis factor- $\alpha$ .



significantly higher in the AD-D patients than in HC (Fig 6A) and negatively correlated with the MMSE score (Fig 6B,C). The serum level of IL-22, a bifunctional cytokine with both proinflammatory and protective functions, was significantly lower in the AD-D group than in HC. The serum level of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, was significantly lower in the AD-D group than in either HC or AD-MCI patients (Fig 6A).

We then looked for potential correlations between markers of neutrophil hyperreactivity and levels of proinflammatory cytokines. CD11b expression on resting neutrophils was positively correlated with serum IL-6 level (Fig 7A), as was higher CD11b expression induced by suboptimal stimulation (ie, PBS-stimulated samples) with circulating levels of IL-6 and IL-8 (Fig 7B,C). These findings suggest that these cytokines might possibly preactivate neutrophils *in vivo*. Similarly, the positive correlation between serum levels of IL-8 and the level of ROS production by fMLP-stimulated neutrophils (Fig 7D) indicates that this cytokine might prime neutrophils from patients *in vivo*. Furthermore, the circulating levels of IL-6 and IL-8 were positively correlated with the percentage of senescent neutrophils (Fig 7E,F). We therefore used *in vitro* studies to investigate the effect of proinflammatory cytokines on the percentage of neutrophils in the senescent and immunosuppressive subsets. Incubation of whole samples from young healthy subjects with IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , and IL-17 for 5 hours induced a significant increase in the percentage of senescent neutrophils (Fig 7G), whereas TNF $\alpha$  and IL-17 significantly decreased the percentage of immunosuppressive neutrophils (Fig 7H).

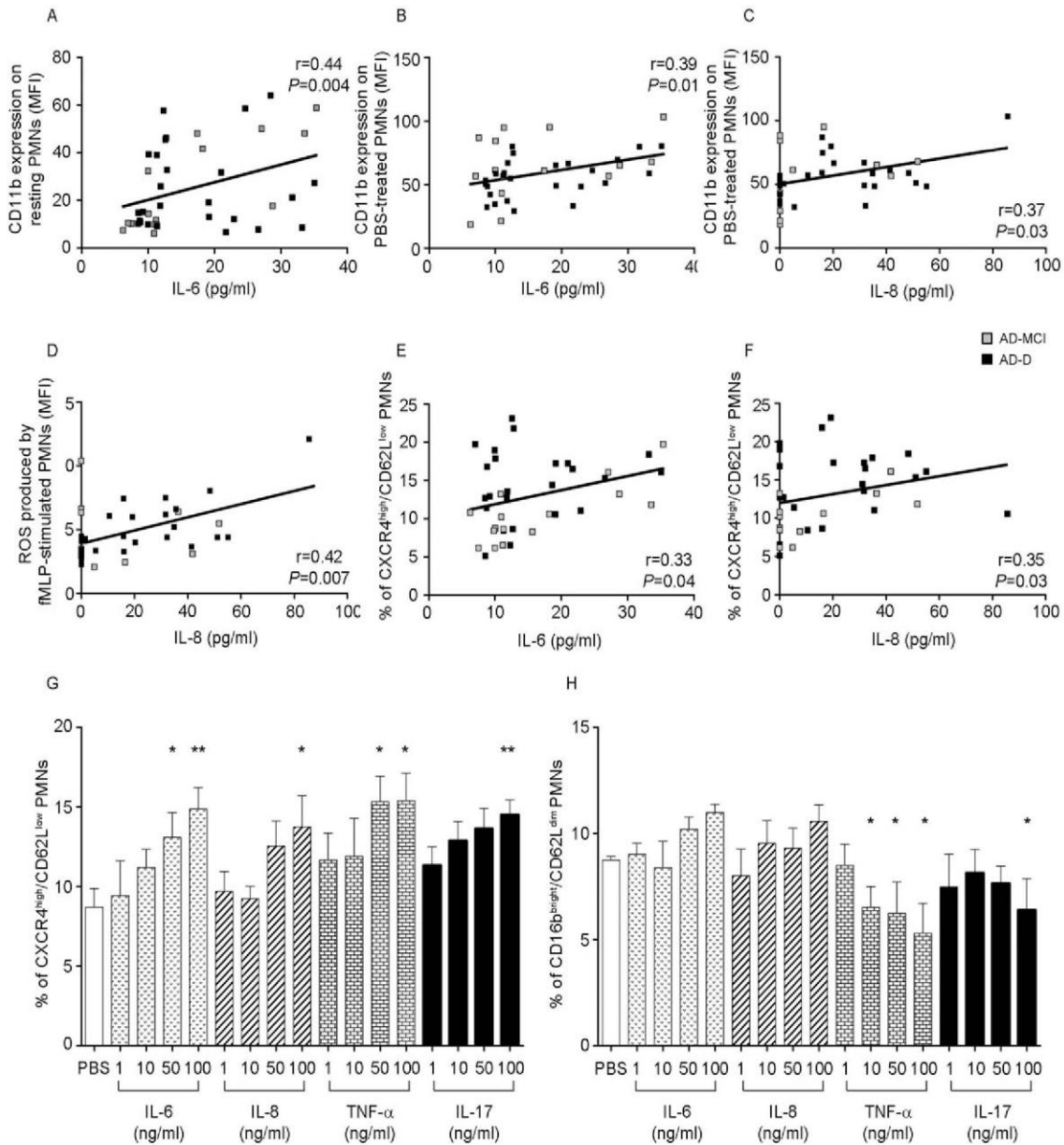
## Discussion

Activated neutrophils in patients with AD might play a role in the acute and chronic systemic inflammation reported to foster cognitive decline and exacerbation of sickness behavior<sup>2</sup> through two mechanisms: (1) enhanced ROS production combined with increased level of intravascular NETs, which have been reported to contribute to various inflammatory diseases,<sup>65</sup> and (2) an increase in the percentage of necrotic neutrophils, which release their harmful intracellular contents.<sup>38</sup> Furthermore, reduced neutrophil survival in response to inflammatory mediators, together with decreased migration and phagocytic activity, may play a role in the enhanced susceptibility to bacterial and fungal infections reported in patients<sup>66,67</sup> and lead to a vicious cycle, further amplifying the inflammatory response. Of note, the strict inclusion criteria, excluding any history of inflammatory or autoimmune diseases, limit the risk that individual neutrophil activation was attributed to factors other than AD. In addition, we demonstrated that neutrophils from

patients suffering from bronchiectasis, as well as neutrophils from patients with dementia of other types, exhibit normal phenotype, functions, and homeostasis, suggesting that alterations of neutrophils observed in patients with AD did not result from the increased susceptibility to having various infections, but may be related to the amyloid pathology.

One particular hypothesis is that activated neutrophils may contribute to vascular inflammation<sup>68</sup> through neutrophil-induced alterations of the BBB. Investigation of the cerebral microvasculature in patients with AD has revealed signs of BBB dysfunction,<sup>69</sup> and the severity of its impairment has been suggested to influence disease progression in these patients.<sup>70</sup> Of note, ROS, including those extracellularly produced by neutrophils,<sup>71</sup> provide a common trigger for many downstream pathways that can contribute directly to BBB dysfunction, including oxidative damage and impairment of tight junction complexes.<sup>7,72</sup> It is important to note that the ROS levels produced by activated neutrophils are typically 100 times higher than those in nonphagocytes.<sup>73</sup> Furthermore, ROS also appear to be the initial trigger for MMP-9 activation, which is thought to be central to BBB impairment, and neutrophil-derived MMP-9 is involved in postischemic BBB breakdown, leukocyte infiltration, and brain damage.<sup>72</sup> We found decreased levels of TIMP-1 in patients, which resulted in a higher MMP/TIMP ratio and a subsequent increase in MMP activity, indicative of BBB dysfunction.<sup>74</sup> In accord with the ROS-induced downregulation of TIMP-1 expression previously reported,<sup>75</sup> we observed that the increased MMP-9/TIMP-1 ratio was correlated with neutrophil oxidative burst activity in patients.

In addition to the indirect involvement of neutrophils through their peripheral immune activity, we cannot rule out the hypothesis that neutrophils play a direct role in AD by affecting the local neuroinflammatory processes associated with it. Neutrophils have recently been detected within the brain parenchyma of patients with AD.<sup>8</sup> Given that senescent neutrophils are supposed to have an elevated tropism for tissues,<sup>68,76</sup> we might postulate that changes in the homeostasis of peripheral neutrophils observed in patients, especially the higher ratio of senescent to immunosuppressive neutrophils, may result in enhanced trafficking of such "aged" neutrophils in the brain. In accord with this possibility, we observed that the percentage of circulating senescent neutrophils and the increased ROS production were positively correlated with amyloid load in patients with AD. This finding suggests the possibility that aged neutrophils affect A $\beta$  deposition. BBB injury, triggered mainly by ROS as discussed above, reduces amyloid- $\beta$  clearance and increases its production from the amyloid- $\beta$  precursor protein, thereby resulting in A $\beta$  accumulation in the brain.<sup>69</sup> In



**FIGURE 7: Involvement of the systemic proinflammatory cytokine environment in the imbalance between senescent and immunosuppressive neutrophil subsets.** (A) Correlation between the interleukin (IL)-6 circulating level and CD11b expression on resting neutrophils (PMNs). (B) Correlation between the IL-6 circulating level and CD11b expression on PBS-treated PMNs. (C) Correlation between the IL-8 circulating level and CD11b expression on PBS-treated PMNs. (D) Correlation between the IL-8 circulating level and reactive oxygen species (ROS) production by fMLP-stimulated PMNs. (E) Correlation between the IL-6 circulating levels and percentage of the CXCR4<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup> senescent PMN subset. (F) Correlation between the IL-8 circulating levels and percentage of the CXCR4<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup> senescent PMN subset. (G,H) Whole-blood samples from young healthy controls were incubated in 24-well tissue culture plates, for 5 hours, at 37 °C with PBS, IL-6 (1–100ng/ml), IL-8 (1–100ng/ml), TNF- $\alpha$  (1–100ng/ml), or IL-17 (1–100ng/ml), and then stained with specific mAbs. (G) Percentage of the CXCR4<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup> senescent neutrophil subset. (H) Percentage of the CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> immunosuppressive neutrophil subset. All measurements were made in samples from young healthy controls (n = 5). Values are means  $\pm$  standard error. The two-way ANOVA test was used to determine whether differences between the different conditions (treatment with PBS or the various cytokines) were significant for each parameter. \*Significantly different from sample incubated with PBS  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . ANOVA = analysis of variance; CXCR4 = C-X-C chemokine receptor type 4; fMLP = N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine; mAbs = monoclonal antibodies; MFI = mean fluorescence intensity; PBS = phosphate-buffered saline; PMN = polymorphonuclear neutrophil; TNF- $\alpha$  = tumor necrosis factor- $\alpha$ .

addition, the increased percentage of aged neutrophils was positively correlated with CSF phospho-Tau level, which reflects neurofibrillary tangle pathology. This result is consistent with previous studies in 3xTg-AD mice demonstrating that systemic inflammation increases Tau pathology<sup>77</sup>

and that neutrophil depletion lowers the amount of Tau phosphorylated on Ser202 or Thr205.<sup>8</sup> Finally, the percentage of aged neutrophils was negatively correlated with the extent of microglial activation, measured by <sup>18</sup>F-DPA-714 binding. Depending on disease stage, microglia activation



TABLE . Characteristics of Patients With Alzheimer's Disease and Healthy Subjects Participating in the Study

	HC (n = 22)	AD-MCI (n = 16)	AD Dementia (n = 26)
Age (mean) [min-max]	71.6 [60–88]	71.0 [53–84]	66.6 [52–83]
Female sex (n) [%]	16 [72.7]	8 [50.0]	18 [69.2]
MMSE (mean) [min-max]	28.7 [27–30]	26.2 [12–30] <sup>o</sup>	17.3 [5–27] <sup>o*</sup>
CDR	CDR = 0	CDR = 0.5	CDR >0.5
Carrier of APOE ε4 (n) [%]	2 [9.1]	10 [62.5] <sup>o</sup>	14 [53.8] <sup>o</sup>
(11)C-PiB PET scan (mean) [min-max]	1.53 [1.13–3.23]	2.65 [1.26–3.95] <sup>o</sup>	3.05 [1.51–4.69] <sup>o</sup>
<sup>18</sup> F-DPA-714 (mean)[min-max]	1.29 [1.02–1.82]	1.42 [1.13–1.87]	1.32 [1.03–2.03]
CRP < 3 μg/mL (n)	n = 18	n = 14	n = 22
CRP ≥ 3 μg/mL (n) (mean)[min-max]	n = 4 4.7 [3.1–9.4]	n = 2 5.1	n = 4 6.6 [4.1–9.2]
Cholinesterase inhibitors (n) [%]	—	14 [87.5]	26 [100]
Memantine (n) [%]	—	2 [12.5]	3 [11.5]

Statistical comparison of female sex, carrier of APOE ε4, subjects with CRP ≥3μg/ml, and type of treatment was performed with the chi<sup>2</sup> test. <sup>o</sup>p < 0.05 compared to healthy controls (HC); \*p < 0.05 compared to AD-MCI. AD-MCI = prodromal Alzheimer's disease group; AD-D = Alzheimer's disease dementia group; CDR = Clinical Dementia Rating; <sup>18</sup>F-DPA-714 = fluorine-18-labeled N,N-diethyl-2-[4-(2-fluoroethoxy)phenyl]-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-acetamide; MMSE = Mini-Mental State Examination; PET = positron emission tomography; PiB = Pittsburgh compound B; n = number.

can have both beneficial and detrimental effects. A protective role in early clinical progression is suggested by the lower level of microglial activation, measured by TSPO PET tracers, in fast compared with slow decliners.<sup>20,78</sup> Furthermore, it has recently been suggested that microglial activation in patients with AD might have an early protective peak, followed later by a proinflammatory peak.<sup>79</sup>

In accord with previous studies,<sup>9,80–82</sup> we observed higher circulating levels of various proinflammatory cytokines in patients than in age-matched healthy subjects. Proinflammatory cytokines are widely known to be critical mediators of neutrophil activation.<sup>4</sup> Accordingly, we observed that plasma levels of IL-6 and IL-8 were positively correlated with both neutrophil activation markers and the percentage of senescent neutrophils in patients. The subset of hyperactive senescent neutrophils may also be instrumental in the phenotypic and functional neutrophil alterations that accompany disease progression. In AD-MCI patients, we observed that the percentage of immunosuppressive neutrophils increased, which may have counteracted the proinflammatory activity of the aged neutrophils. Interestingly, however, at later disease stages, a further increase in the senescent neutrophils subpopulation was associated with a decreased frequency of immunosuppressive neutrophils and led to increased oxidative burst and intravascular NETosis. Furthermore, our in vitro data suggest that various proinflammatory

cytokines directly increase the percentage of senescent neutrophils and decrease the level of immunosuppressive neutrophils. On the whole, our results suggest that the peripheral proinflammatory cytokine environment is instrumental in the alteration of circulating neutrophils homeostasis in AD. Surprisingly, we found that neutrophils from patients produce normal levels of proinflammatory cytokines in response to stimulation, a result that might be attributed, at least in part, to upregulation of *SIK1* and *CRIP2*, acting as negative regulators of the NF-κB pathway. In addition, recent studies performed in mice lacking P-selectin (*Selp2/2*), an adhesion molecule essential for neutrophil recruitment under steady-state conditions, revealed that aged neutrophils did not exhibit enhanced cytokine secretion at the mRNA<sup>40</sup> and protein<sup>76</sup> levels. We might thus postulate that increased circulating levels of cytokines observed in our cohort of AD patients might be related to enhanced cytokine production by activated monocytes and lymphocytes previously reported in patients with AD.<sup>62</sup> Interestingly, among the genes of host defense and inflammatory response, upregulation of *CD83* and *TAP1* suggest that neutrophils from patients with AD dementia can adapt a function as antigen-presenting cells and, in combination with their abundance in the immune system, may have a significant role in influencing antigen-specific T-cell responses, including cytokine production.

Components of oral microbiota have previously been implicated in AD<sup>83</sup> and modulation of the gut microbiota composition have been described.<sup>84</sup> A recent study provides evidence that neutrophil aging is regulated by the microbiota in a TLR-dependent fashion.<sup>40</sup> In addition, in mice with sickle cell disease (SCD; a disease characterized by recurrent episodes of vasoocclusion in which neutrophils play a primary function), the expansion of aged neutrophils was completely abrogated by microbiota depletion, which also reduced vasoocclusive events and significantly improved survival of SCD mice.<sup>40</sup> Alterations in the microbiota could contribute to both expansion of senescent neutrophils and changes in neutrophil homeostasis in patients with AD, and suggest that manipulation of the microbiome may affect disease outcome by rebalancing neutrophil compartment homeostasis and reducing oxidative burst. Further studies must address these questions.

Finally, RNA-Seq of neutrophils suggests that a number of cellular processes are altered at the transcriptional level in patients with AD. Upregulation of various genes, such as *SIK1*, *CRIP2*, *GRASP*, *AK5*, *DTX1*, and *PSMB8* might play a key role in the phenotypic and functional changes of neutrophils in these patients. Interestingly, deregulation of *AK5* gene expression has been previously reported in the brain from patients with AD.<sup>85</sup> Further studies are necessary for investigating the potential association between enhanced expression of *AK5* gene, altered functions of neutrophils and AD progression.

In conclusion, our results demonstrate that the homeostasis of peripheral neutrophils is altered in AD patients, with a shift toward enhanced proinflammatory properties related to expansion of senescent neutrophils at later disease stages. Importantly, these changes were correlated with the rate of cognitive decline in AD patients. By modifying the systemic inflammatory equilibrium and potentially helping to weaken the BBB, this altered neutrophil homeostasis may help to drive disease progression. Our study suggests that detailed neutrophil phenotyping, and particularly the relative ratio of senescent/immunosuppressive peripheral neutrophils, might serve as a prognostic blood biomarker of disease progression in AD. In the same line, similar neutrophil phenotyping could represent a critical blood biomarker for (1) stratifying patients according to their expected rate of disease progression when designing clinical trials of disease-modifying treatments and (2) monitoring the efficacy of these treatments. Finally, our data open new perspectives for the development of innovative immunotherapy strategies based on neutrophil modulation, in particular by rebalancing the ratio of senescent to immunosuppressive

neutrophils and/or decreasing their basal hyperactivation state and their release of proinflammatory cytokines.

---

## Acknowledgment

We thank nursing staff of Service of Neurology of Language and memory in Saint-Anne Hospital for patient management. We gratefully acknowledge Annie Munier from the LUMIC flow cytometry facility.

## Author Contributions

C.E., P.A., G.D., J.L., M.B., and M.S. were responsible for study concept and design. Y.D., Y.C., T.C., H.C., B.C., L.X., and M.C.P. were responsible for data acquisition and analysis. C.E., Y.D., G.D., and P.A. were responsible for drafting manuscript and figures.

## Potential Conflicts of Interest

Nothing to report.

---

## References

1. Holmes C, Cunningham C, Zotova E, et al. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology* 2009; 73:768–774.
2. Cunningham C, Hennessy E. Co-morbidity and systemic inflammation as drivers of cognitive decline: new experimental models adopting a broader paradigm in dementia research. *Alzheimers Res Ther* 2015;7:33.
3. Perry VH, Holmes C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 2014;10:217–224.
4. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol* 2014;15:602–611.
5. Nemeth T, Mocsai A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunol Lett* 2012;143:9–19.
6. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006;6:173–182.
7. Pun PB, Lu J, Moolchala S. Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radic Res* 2009;43:348–364.
8. Zenaro E, Pietronigro E, Della Bianca V, et al. Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nat Med* 2015;21:880–886.
9. Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Culliford D, Perry VH. Proinflammatory cytokines, sickness behavior, and Alzheimer disease. *Neurology* 2011;77:212–218.
10. Song C, Vandewoude M, Stevens W, et al. Alterations in immune functions during normal aging and Alzheimer's disease. *Psychiatry Res* 1999;85:71–80.
11. Vitte J, Michel BF, Bongrand P, Gastaut JL. Oxidative stress level in circulating neutrophils is linked to neurodegenerative diseases. *J Clin Immunol* 2004;24:683–692.
12. Scali C, Prosperi C, Bracco L, et al. Neutrophils CD11b and fibroblasts PGE(2) are elevated in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2002;23:523–530.
13. Licastro F, Morini MC, Davis LJ, et al. Increased chemiluminescence response of neutrophils from the peripheral blood of patients with senile dementia of the Alzheimer's type. *J Neuroimmunol* 1994;51: 21–26.



14. Davydova TV, Fomina VG, Voskresenskaya NI, Doronina OA. Phagocytic activity and state of bactericidal systems in polymorphonuclear leukocytes from patients with Alzheimer's disease. *Bull Exp Biol Med* 2003;136:355–3557.
15. Rebecchi IM, Ferreira Novo N, Julian Y, Campa A. Oxidative metabolism and release of myeloperoxidase from polymorphonuclear leukocytes obtained from blood sedimentation in a Ficoll-Hypaque gradient. *Cell Biochem Funct* 2000;18:127–132.
16. Pallister I, Bhatia R, Katpalli G, et al. Alteration of polymorphonuclear neutrophil surface receptor expression and migratory activity after isolation: comparison of whole blood and isolated PMN preparations from normal and postfracture trauma patients. *J Trauma* 2006;60:844–850.
17. Sarazin M, Berr C, De Rotrou J, et al. Amnesic syndrome of the medial temporal type identifies prodromal AD: a longitudinal study. *Neurology* 2007;69:1859–1867.
18. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol* 2010;9:1118–1127.
19. de Souza LC, Corlier F, Habert MO, et al. Similar amyloid-beta burden in posterior cortical atrophy and Alzheimer's disease. *Brain* 2011;134(pt 7):2036–2043.
20. Hamelin L, Lagarde J, Dorothee G, et al. Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: a prospective study using 18F-DPA-714 PET imaging. *Brain* 2016;139(pt 4):1252–1264.
21. Koric L, Felician O, Ceccaldi M. [Use of CSF biomarkers in the diagnosis of Alzheimer's disease in clinical practice]. *Rev Neurol (Paris)* 2011;167:474–484.
22. Sauce D, Dong Y, Campillo-Gimenez L, et al. Reduced Oxidative Burst by Primed Neutrophils in the Elderly Individuals Is Associated With Increased Levels of the CD16bright/CD62Ldim Immunosuppressive Subset. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2017;72:163–172.
23. Campillo-Gimenez L, Casulli S, Dudoit Y, et al. Neutrophils in anti-retroviral therapy-controlled HIV demonstrate hyperactivation associated with a specific IL-17/IL-22 environment. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:1142–1152 e5.
24. Berthelot F, Fattoum L, Casulli S, et al. The effect of HMGB1, a damage-associated molecular pattern molecule, on polymorphonuclear neutrophil migration depends on its concentration. *J Innate Immun* 2012;4:41–58.
25. Barrientos L, Bignon A, Gueguen C, et al. Neutrophil extracellular traps downregulate lipopolysaccharide-induced activation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2014;193:5689–5698.
26. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonemarker U, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009;15:623–625.
27. Francois S, El Benna J, Dang PM, et al. Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad. *J Immunol* 2005;174:3633–3642.
28. Wright HL, Thomas HB, Moots RJ, Edwards SW. RNA-seq reveals activation of both common and cytokine-specific pathways following neutrophil priming. *PLoS One* 2013;8:e58598.
29. Larson SR, Atif SM, Gibbings SL, et al. Ly6C(+) monocyte efferocytosis and cross-presentation of cell-associated antigens. *Cell Death Differ* 2016;23:997–1003.
30. Reimand J, Arak T, Adler P, et al. g:Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic Acids Res* 2016;44(W1):W83–W89.
31. Moldovan I, Galon J, Maridonneau-Parini I, et al. Regulation of production of soluble Fc gamma receptors type III in normal and pathological conditions. *Immunol Lett* 1999;68:125–134.
32. Venturi GM, Tu L, Kadono T, et al. Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. *Immunity* 2003;19:713–724.
33. Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA, Borregaard N. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *J Clin Invest* 1993;92:1467–1476.
34. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010;33:657–670.
35. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007;176:231–241.
36. Aleman M, de la Barrera SS, Schierloh PL, et al. In tuberculous pleural effusions, activated neutrophils undergo apoptosis and acquire a dendritic cell-like phenotype. *J Infect Dis* 2005;192:399–409.
37. Hsieh SC, Yu HS, Cheng SH, et al. Anti-myeloperoxidase antibodies enhance phagocytosis, IL-8 production, and glucose uptake of polymorphonuclear neutrophils rather than anti-proteinase 3 antibodies leading to activation-induced cell death of the neutrophils. *Clin Rheumatol* 2007;26:216–224.
38. Gabelloni ML, Trevani AS, Sabatte J, Geffner J. Mechanisms regulating neutrophil survival and cell death. *Semin Immunopathol* 2013;35:423–437.
39. Rivas-Fuentes S, Garcia-Garcia E, Nieto-Castaneda G, Rosales C. Fc gamma receptors exhibit different phagocytosis potential in human neutrophils. *Cell Immunol* 2010;263:114–121.
40. Zhang D, Chen G, Manwani D, et al. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature* 2015;525:528–532.
41. Kamp VM, Pillay J, Lammers JW, et al. Human suppressive neutrophils CD16bright/CD62Ldim exhibit decreased adhesion. *J Leukoc Biol* 2012;92:1011–1020.
42. Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest* 2012;122:327–336.
43. Le Page A, Lamoureux J, Bourgade K, et al. Polymorphonuclear Neutrophil Functions are Differentially Altered in Amnesic Mild Cognitive Impairment and Mild Alzheimer's Disease Patients. *J Alzheimers Dis* 2017;60:23–42.
44. te Velde AA, van Kooyk Y, Braat H, et al. Increased expression of DC-SIGN+IL-12+IL-18+ and CD83+IL-12-IL-18- dendritic cell populations in the colonic mucosa of patients with Crohn's disease. *Eur J Immunol* 2003;33:143–151.
45. Kobayashi SD, Voyich JM, Buhl CL, Stahl RM, DeLeo FR. Global changes in gene expression by human polymorphonuclear leukocytes during receptor-mediated phagocytosis: cell fate is regulated at the level of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:6901–6906.
46. Iking-Konert C, Cseko C, Wagner C, et al. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells. *J Mol Med (Berl)* 2001;79:464–474.
47. Zhang X, Kluger Y, Nakayama Y, et al. Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 2004;75:358–372.
48. Iking-Konert C, Wagner C, Deneffle B, et al. Up-regulation of the dendritic cell marker CD83 on polymorphonuclear neutrophils (PMN): divergent expression in acute bacterial infections and chronic inflammatory disease. *Clin Exp Immunol* 2002;130:501–508.
49. Potter NS, Harding CV. Neutrophils process exogenous bacteria via an alternate class I MHC processing pathway for presentation of peptides to T lymphocytes. *J Immunol* 2001;167:2538–2546.
50. Abrams JR, Kelley SL, Hayes E, et al. Blockade of T lymphocyte costimulation with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4-immunoglobulin (CTLA4Ig) reverses the cellular pathology of psoriatic plaques, including the activation of keratinocytes, dendritic cells, and endothelial cells. *J Exp Med* 2000;192:681–694.



51. Yong Kim S, Jeong S, Chah KH, et al. Salt-inducible kinases 1 and 3 negatively regulate Toll-like receptor 4-mediated signal. *Mol Endocrinol* 2013;27:1958–1968.
52. Cheung AK, Ko JM, Lung HL, et al. Cysteine-rich intestinal protein 2 (CRIP2) acts as a repressor of NF-kappaB-mediated proangiogenic cytokine transcription to suppress tumorigenesis and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:8390–8395.
53. Ren H, Wang L, Bennett M, et al. The crystal structure of human adenylate kinase 6: An adenylate kinase localized to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:303–308.
54. Chaves MM, Costa DC, Pereira CC, et al. Role of inositol 1,4,5-triphosphate and p38 mitogen-activated protein kinase in reactive oxygen species generation by granulocytes in a cyclic AMP-dependent manner: an age-related phenomenon. *Gerontology* 2007;53:228–233.
55. El Azreq MA, Garceau V, Harbour D, Pivrot-Pajot C, Bourgoin SG. Cytohesin-1 regulates the Arf6-phospholipase D signaling axis in human neutrophils: impact on superoxide anion production and secretion. *J Immunol* 2010;184:637–649.
56. Derouet M, Thomas L, Cross A, Moots RJ, Edwards SW. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. *J Biol Chem* 2004;279:26915–26921.
57. Pashevina DO, Nagibin VS, Tumanovska LV, Moibenko AA, Dosenko VE. Proteasome Inhibition Diminishes the Formation of Neutrophil Extracellular Traps and Prevents the Death of Cardiomyocytes in Coculture with Activated Neutrophils during Anoxia-Reoxygenation. *Pathobiology* 2015;82:290–298.
58. Ella K, Csepanyi-Komi R, Kaldi K. Circadian regulation of human peripheral neutrophils. *Brain Behav Immun* 2016;57:209–221.
59. Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:502–511.
60. Lehner C, Gehwolf R, Tempfer H, et al. Oxidative stress and blood-brain barrier dysfunction under particular consideration of matrix metalloproteinases. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:1305–1323.
61. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477:267–283.
62. Pellicano M, Bulati M, Buffa S, et al. Systemic immune responses in Alzheimer's disease: in vitro mononuclear cell activation and cytokine production. *J Alzheimers Dis* 2010;21:181–192.
63. Elbim C, Chollet-Martin S, Bailly S, Hakim J, Gougerot-Pocidal MA. Priming of polymorphonuclear neutrophils by tumor necrosis factor alpha in whole blood: identification of two polymorphonuclear neutrophil subpopulations in response to formyl-peptides. *Blood* 1993;82:633–640.
64. Elbim C, Bailly S, Chollet-Martin S, Hakim J, Gougerot-Pocidal MA. Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides. *Infect Immun* 1994;62:2195–2201.
65. Pinegin B, Vorobjeva N, Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2015;14:633–640.
66. Bu XL, Yao XQ, Jiao SS, et al. A study on the association between infectious burden and Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 2015;22:1519–1525.
67. Alonso R, Pisa D, Marina AI, et al. Fungal infection in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2014;41:301–311.
68. Adrover AM. Answer to the Letter to the Editor of L. P. Ardigo et al. concerning "Validity and reliability of photographic measures to evaluate waistline asymmetry in idiopathic scoliosis" by Matamalas A, Bago J, D Agata E, Pellise F (2016) *Eur Spine J*; 2016 Mar 14 [Epub ahead of print]. *Eur Spine J* 2016;25:3019–3020.
69. van de Haar HJ, Burgmans S, Hofman PA, et al. Blood-brain barrier impairment in dementia: current and future in vivo assessments. *Neurosci Biobehav Rev* 2015;49:71–81.
70. Bowman GL, Kaye JA, Moore M, et al. Blood-brain barrier impairment in Alzheimer disease: stability and functional significance. *Neurology* 2007;68:1809–1814.
71. Ullen A, Singewald E, Konya V, et al. Myeloperoxidase-derived oxidants induce blood-brain barrier dysfunction in vitro and in vivo. *PLoS One* 2013;8:e64034.
72. Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, et al. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H558–H568.
73. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004;4:181–189.
74. Agrawal SM, Lau L, Yong VW. MMPs in the central nervous system: where the good guys go bad. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19:42–51.
75. Haorah J, Ramirez SH, Schall K, Smith D, Pandya R, Persidsky Y. Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J Neurochem* 2007;101:566–576.
76. Uhl B, Vadlani Y, Zuchtriegel G, et al. Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood* 2016;128:2327–2337.
77. Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2005;25:8843–8853.
78. Ramanan VK, Risacher SL, Nho K, et al. GWAS of longitudinal amyloid accumulation on 18F-florbetapir PET in Alzheimer's disease implicates microglial activation gene IL1RAP. *Brain* 2015;138(pt 10):3076–3088.
79. Fan Z, Brooks DJ, Okello A, Edison P. An early and late peak in microglial activation in Alzheimer's disease trajectory. *Brain* 2017;140:792–803.
80. Zuliani G, Guerra G, Ranzini M, et al. High interleukin-6 plasma levels are associated with functional impairment in older patients with vascular dementia. *Int J Geriatr Psychiatry* 2007;22:305–311.
81. Motta M, Imbesi R, Di Rosa M, Stivala F, Malaguamera L. Altered plasma cytokine levels in Alzheimer's disease: correlation with the disease progression. *Immunol Lett* 2007;114:46–51.
82. Chen JM, Jiang GX, Li QW, Zhou ZM, Cheng Q. Increased serum levels of interleukin-18, -23 and -17 in Chinese patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2014;38:321–329.
83. Shoemark DK, Allen SJ. The microbiome and disease: reviewing the links between the oral microbiome, aging, and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2015;43:725–738.
84. Cattaneo A, Cattaneo N, Galluzzi S, et al. Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiol Aging* 2017;49:60–68.
85. Ansoleaga B, Jove M, Schluter A, et al. Deregulation of purine metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2015;36:68–80.

## Partie II

**Etude phénotypique et fonctionnelle des polynucléaires neutrophiles (PN) chez les patients atteints de Tauopathies en l'absence de plaque séniles et de Maladie d'Alzheimer atypique**

## Contexte

Les résultats précédents montrent un état d'hyperactivation basale des PN chez les patients atteints de MA associé à une augmentation significative de la production de FRO et des NETs par rapport aux sujets sains appariés en âge. De plus, les patients présentent une altération de l'homéostasie des PN. Ces altérations sont plus importantes chez les patients présentant une progression rapide de la maladie par rapport aux patients évoluant lentement suggérant pour la première fois le rôle prédictif des PN dans l'évolution de la maladie. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que les anomalies des PN observées pourraient être liées au moins en partie aux taux circulants élevés de cytokines pro-inflammatoires. Ces anomalies pourraient également être liées à la présence du peptide amyloïde A $\beta$  et/ou de la protéine Tau dans le sang circulant des patients (Nakamura *et al.*, 2018 ; Mattsson *et al.*, 2016). Parallèlement à l'étude de l'effet de ces médiateurs *in vitro* sur les PN de sujets témoins, cette question nous a conduit à caractériser le phénotype et les fonctions des PN circulants chez les patients atteints d'une part de MA atypique (MA-A) et d'autre part de Tauopathies non MA.

## Méthodologie

### Inclusion des patients

Cette étude a été réalisée dans le cadre du projet «ShaTau-7» (D14-P010). Le recrutement des patients atteints de MA atypique (n=19, MMSE=22,38 $\pm$ 0,9776), ou de Tauopathie non MA (PSP, DCB, FTDP) (n=19, MMSE=20,96 $\pm$ 1,057) a été effectué au sein de l'Unité de Neurologie de la Mémoire et du Langage de l'hôpital Sainte-Anne (Pr. Marie SARAZIN). Les patients ont été inclus au stade de démence (CDR 1 ou 2) et en l'absence d'épisode infectieux ou inflammatoire aigu. Par ailleurs, les patients présentant des pathologies altérant potentiellement les fonctions des PN de même que les patients traités par corticostéroïdes au cours des 3 mois précédant le prélèvement seront exclus.

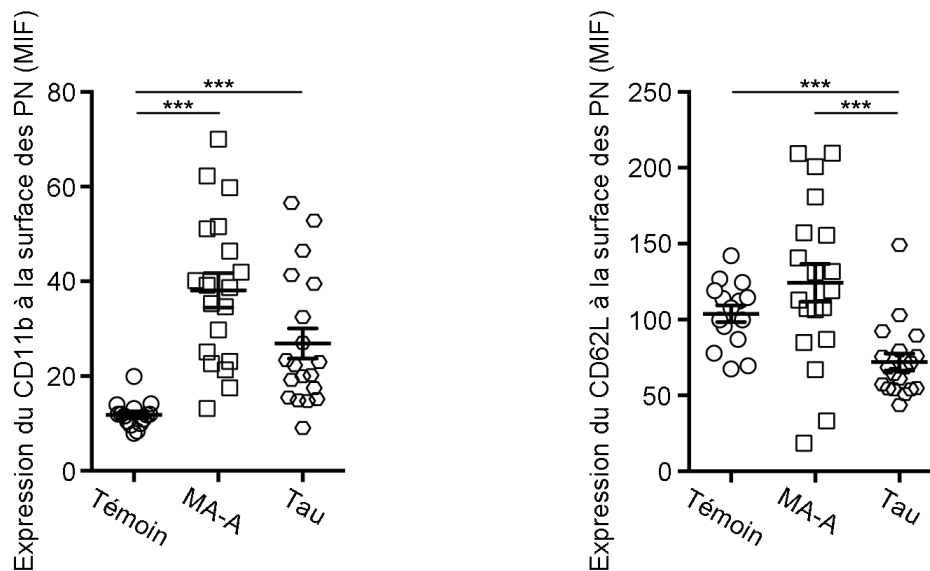
### Etude phénotypique et fonctionnelle des PN circulants

L'expression des molécules d'adhérence à la surface des PN, la production des FRO, l'hémostasie, la survie des PN ainsi que la capacité phagocytaires ont été évaluées en cytométrie de flux en utilisant les mêmes techniques que précédemment décrites.

## Résultats

### I. Evaluation du phénotype et des fonctions des PN circulants chez les patients atteints de MA atypique et de Tauopathies non-MA

Altérations de l'expression des molécules d'adhérence CD11b et CD62L chez les patients atteints de MA atypiques et de Tauopathies non MA



**Figure 28: Expression du CD11b et du CD62L à la surface des PN.**

Les échantillons de sang total conservés à 4°C ont été incubés en présence d'anticorps monoclonal dirigé contre CD11b et CD62L pendant 45 min à 4°C. Les résultats sont exprimés en moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) et les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM pour les témoins ( $n=15$ ) et les patients (MA-A,  $n=19$ ; Tauopathies,  $n=19$ ).

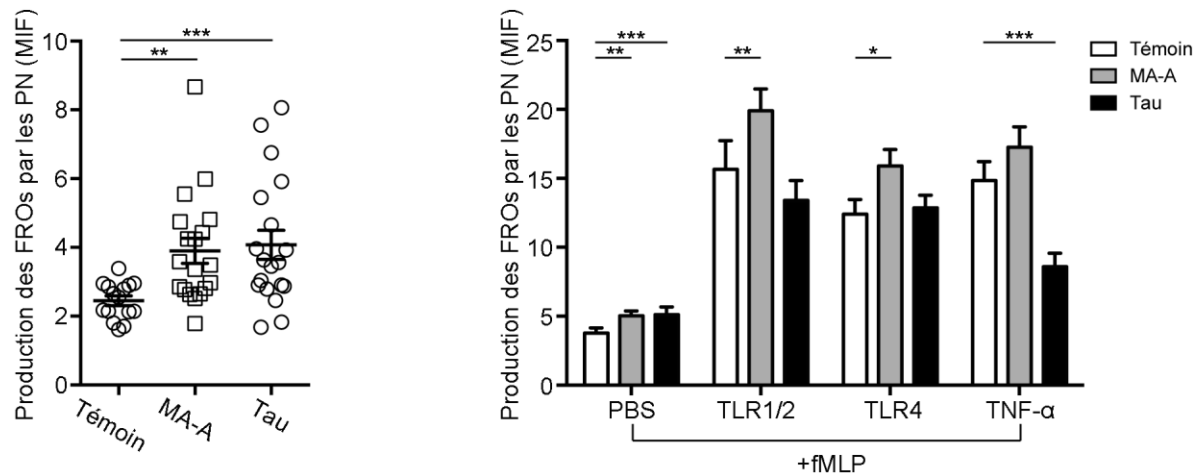
\* :  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . \*\*\*  $p < 0,001$ .

A la surface des PN à l'état basal, nous avons observé pour les deux groupes de patients (MA atypique, Tauopathie non MA) en comparaison aux sujets témoins une augmentation significative de l'expression de la molécule CD11b associée à une diminution significative de l'expression du CD62L seulement chez les patients des Tauopathies. Ces résultats reflètent d'une part, le clivage enzymatique de la L-sélectine et d'une autre part, la translocation vers la surface cellulaire du CD11b, témoignant d'un état d'hyperactivation basale des PN.

### Surproduction de FROs par les PN à l'état basal chez les patients atteints de MA atypique et de Tauopathies non MA

Nous avons observé une augmentation significative de la production des FROs par les PN à l'état basal pour les deux groupes de patients (MA atypique, Tauopathie) corroborant l'hyperactivation des PN circulants.

Par contre, une augmentation de la capacité des PN à produire des FRO en réponse à une stimulation (agoniste du TLR2 ou du TLR4) n'a été constatée que chez les patients de la MA atypique. Cette augmentation significative a témoigné d'une hyperréactivité des PN en réponse à la stimulation chez les patients de la MA atypique. A l'inverse, on observe une diminution de la production de FRO en réponse au TNF $\alpha$  chez les patients atteints de Tauopathie non-MA.



**Figure 29 : Etude de l'explosion oxydative des PN.**

Après incubation avec de la dihydroéthidine, les échantillons de sang total ont été prétraités à 37°C en présence de PBS ou des agonistes du TLR4 (LPS) et du TLR2 (PAM) pendant 45 minutes puis incubés en présence de PBS ou de fMLP pendant 5 minutes à 37°C. Les résultats sont exprimés en moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) et les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM pour les témoins (n= 15) et les patients (MA-A, n=19 ; Tauopathies, n=19).

\*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . \*\*\*  $p < 0,001$ .

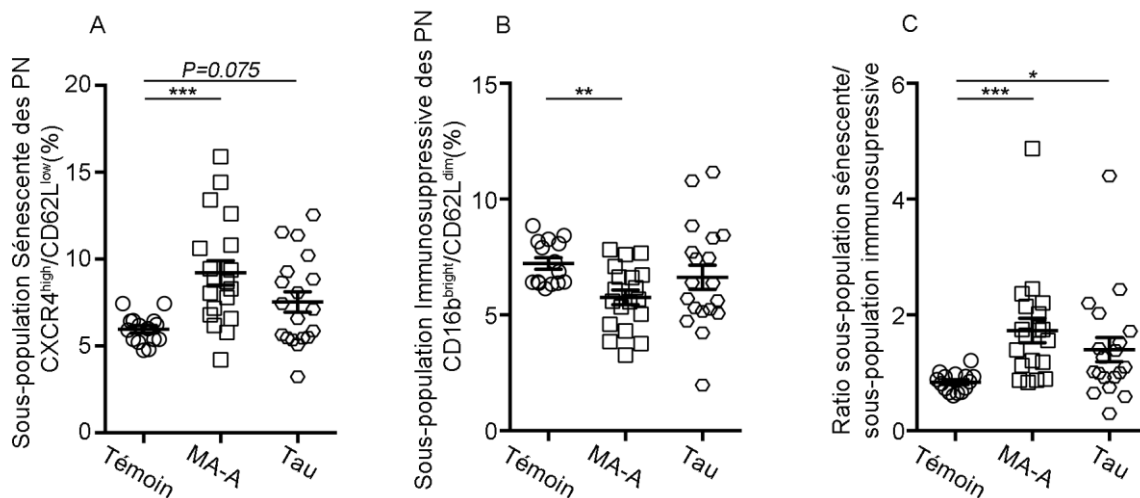
### Altérations de la homéostasie des PN chez les patients atteints de MA atypique et de Tauopathies non MA

Chez les patients atteints de MA atypique, nous avons observé par rapport aux témoins, une augmentation significative du pourcentage de la sous-population sénescence associée à une diminution significative de la sous-population immunosuppressive conduisant à une augmentation du ratio entre ces 2 sous-populations.

Chez les patients atteints de Tauopathie non MA, l'augmentation du pourcentage de la sous-population sénescence est à la limite de la significativité et conduit malgré l'absence de modification de la sous-population immunosuppressive à une augmentation significative du ratio entre ces 2 sous-populations.



En outre, ces données pourraient en partie expliquer l'augmentation de la production de FRO par les PN à l'état basal observée chez les patients (**Fig 29**).



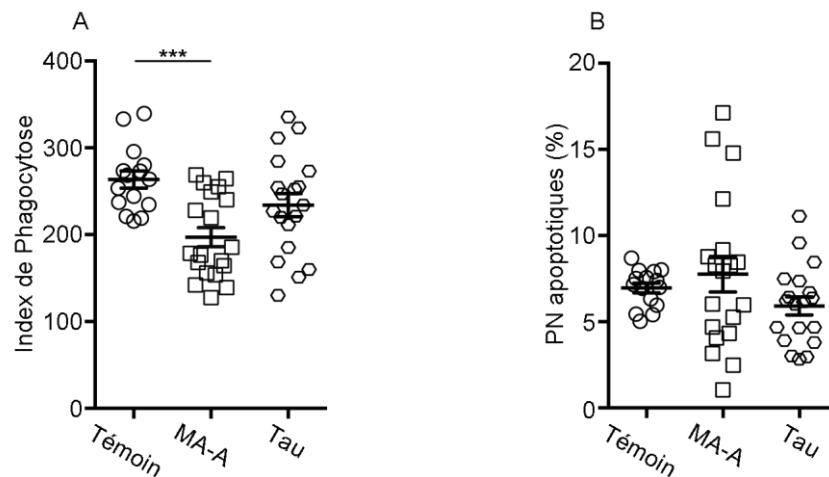
**Figure 30 : Expression des sous-populations de PN sénescence et immunosuppressive.**

(A,B) Les échantillons de sang total ont été incubés à 4°C en présence d'anticorps anti-CXCR4, et CD62L (A) ou en présence d'anticorps anti-CD62L et CD16b (B). Les résultats sont exprimés en pourcentage. (C) Ratio entre la sous-population sénescence et la sous-population immunosuppressive. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM pour les témoins (n=15) et les patients (MA-A, n=19 ; Tauopathies=19).

\* :  $p < 0,05$ . \*\* :  $p < 0,01$ . \*\*\* :  $p < 0,001$ .

### Déficit de la capacité de phagocytose chez les patients atteints de MA atypique

La phagocytose est une étape cruciale dans la défense de l'hôte contre les pathogènes. Nous avons évalué la capacité intrinsèque de phagocytose des PN en utilisant un kit commercial contenant des bactéries opsonisées. Chez les patients MA-A, nous avons observé une diminution significative de l'index de phagocytose comparativement aux témoins, reflétant un déficit intrinsèque de la capacité de phagocytose des PN. Ce résultat n'est pas observé chez les patients atteints de Tauopathies non MA. De plus, ce résultat n'est pas en rapport avec une augmentation du pourcentage de PN apoptotiques, contrairement à ce que nous avons observé chez les patients atteints de MA typique.



**Figure 31 : Evaluation de la capacité de phagocytose et de l'apoptose spontanée des PN circulants.**

(A) La phagocytose des PN a été mesurée après incubation des échantillons de sang total avec des bactéries *E.Coli* fluorescentes pendant 10 minutes à 37°C. Les résultats sont exprimés en index de phagocytose (% de PN ayant phagocyté des bactéries x MIF) et les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. (B) Les pourcentages des PN apoptotiques ont été mesurés immédiatement après le prélèvement par double marquage annexine-V/7-AAD chez les témoins (n=15) et les patients (MA-A, n=19 ; Tauopathies=19).

\* :  $p < 0,05$ . \*\* :  $p < 0,01$ . \*\*\* :  $p < 0,001$ .

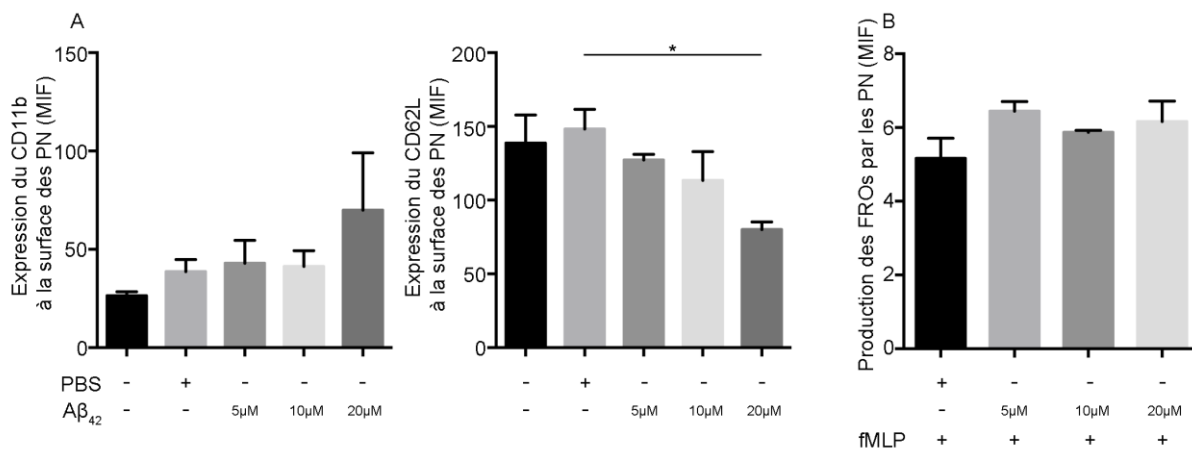
## II. Etude *ex vivo*, de l'effet du peptide Aβ<sub>42</sub> sur l'activation et l'homéostasie des PN de sujets contrôlés

À l'aide d'une technique établie au laboratoire, le peptide Aβ est préparé sous forme fibrillaire. Des aliquotes de peptide Aβ (soit 450 μg) ont été soniquées pendant 3 minutes à puissance 20% après la reprise dans 10 μL de DMSO. Les aliquotes ont ensuite été incubées à 37°C pendant 72 heures en rajoutant 90 μL de HCl (0,01N).

### Effet du peptide Aβ<sub>42</sub> fibrillaire sur les molécules d'adhérence et la production des FROs des PN circulants

Nous avons étudié l'effet de différentes concentrations du peptide Aβ<sub>42</sub> fibrillaire (5μM, 10μM, 20μM) sur l'état d'activation des PN. Nous avons constaté qu'à forte concentration (20μM), le peptide Aβ<sub>42</sub> semble exercer un effet activateur sur les PN. En effet, une tendance à l'augmentation de l'expression du CD11b ainsi qu'une diminution significative de l'expression du CD62L ont été observés par rapport aux échantillons incubés en présence de PBS. Ces résultats reflètent d'une part, le clivage protéique du CD62L de la surface des PN et d'une part, la translocation des stocks intracellulaires du CD11b vers la membrane plasmique. Cependant, le peptide Aβ<sub>42</sub> fibrillaire n'exerce aucun effet sur la

production de FRO par les PN.



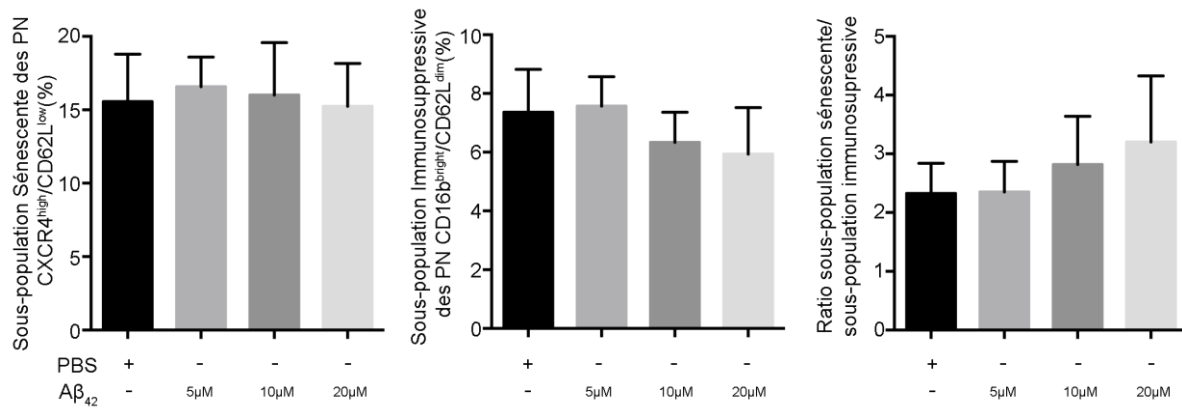
**Figure 32 : Effet du peptide Aβ<sub>42</sub> fibrillaire sur le niveau d'expression du CD11b, CD62L à la surface des PN et la production des FROs.**

(A) Les échantillons de sang total ont été soit conservés à 4°C, soit incubés à 37°C en présence de PBS ou de différentes concentrations du peptide Aβ<sub>42</sub> fibrillaire. (B) Après charge par la DHE, les échantillons de sang total ont été prétraités à 37°C en présence de PBS ou de de différentes concentrations du peptide Aβ<sub>42</sub> fibrillaire pendant 45 min à 37°C puis incubés en présence de fMLP pendant 5 min. Les résultats sont exprimés en moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) et les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. La mesure a été réalisée chez des témoins (n=3).

### Effet du peptide Aβ<sub>42</sub> fibrillaire sur l'homéostasie des PN circulants

Afin de vérifier si le peptide Aβ<sub>42</sub> fibrillaire altère l'homéostasie des PN circulants, nous avons déterminé le pourcentage des sous-populations sénescence et immunosuppressive des PN dans les échantillons de sang total après incubation des échantillons de sang total en présence de différentes concentrations de Aβ<sub>42</sub> fibrillaire.

Le pourcentage de sous-populations des PN n'est pas significativement différent comparativement aux échantillons de sang total incubés en présence de PBS. Par conséquent, le peptide Aβ<sub>42</sub> fibrillaire n'a aucun effet sur l'équilibre de ces deux sous-populations des PN circulant dans les conditions expérimentales utilisées.



**Figure 33 : Effet du peptide Aβ<sub>42</sub> sur les sous-populations des PN.**

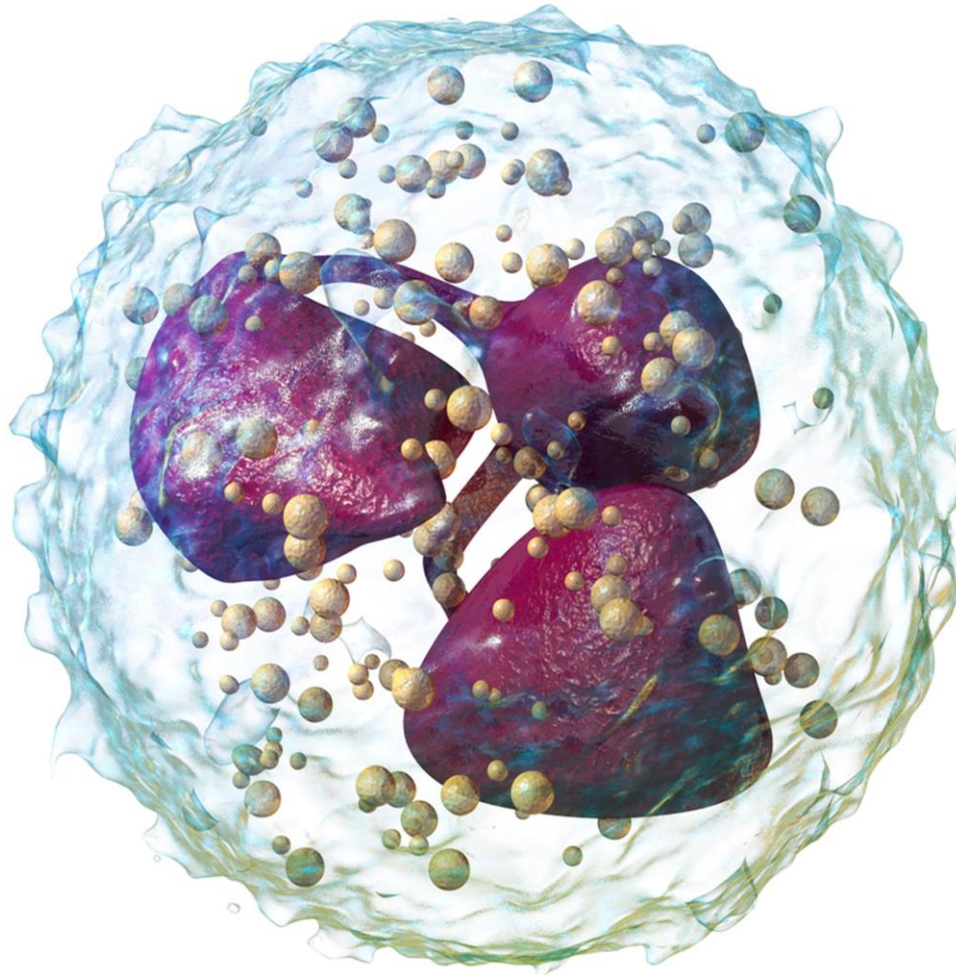
Les échantillons de sang total ont été incubés en présence de PBS ou de différentes concentrations du peptide Aβ<sub>42</sub> pendant 5 heures à 37°C. Les résultats sont exprimés en moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) et les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. La mesure a été réalisée chez des témoins (n=4).

### Conclusion

L'étude *in vivo* réalisée à partir de prélèvements effectués chez 38 patients et 15 témoins, nous a permis de mettre en évidence chez les patients des modifications phénotypiques et fonctionnelles des PN différentielles en fonction du type de pathologie:

- 1) Pour les deux groupes de patients (MA atypique ou Tauopathie non MA), nous observons :
  - un état d'hyperactivation basale des PN caractérisé par une augmentation de l'expression de la molécule CD11b, une diminution de l'expression du CD62L et une augmentation de la production basale de FRO.
  - une altération de l'homéostasie associée à une augmentation du ratio de la population sénéscente et de la population immunosuppressive.
- 2) Pour les patients atteints de MA atypique, nous observons de plus :
  - une hyperréactivité des PN en termes de production de FRO.
  - une réduction de la capacité de phagocytose.

Les expériences effectuées *ex vivo* ont montré que le peptide Aβ<sub>42</sub> module l'expression des molécules d'adhérence mais n'exerce aucun effet sur la production de FRO par les PN ni sur l'équilibre des sous-populations de PN sénéscente et immunosuppressive.



## **Discussions et perspectives**



## *Discussions et perspectives*

### **I. Altérations phénotypiques et fonctionnelles des PN circulants chez les patients atteints de Maladie d'Alzheimer**

Nos résultats montrent chez les patients atteints de MA au stade de démence en comparaison avec les témoins appariés en âge une hyperactivation des PN circulants caractérisée par une modulation de l'expression des molécules d'adhérence à la surface des PN à l'état de repos associée à une augmentation de la production des FRO par les PN à l'état basal. De plus, nous avons observé chez ces patients une augmentation de la capacité des PN à produire des FRO en réponse à une stimulation ainsi qu'une augmentation de la NETose intravasculaire et une augmentation de la mort des PN par apoptose et nécrose. Ces altérations, qui ne sont pas observées chez les patients atteints de MA au stade prodromal, sont associées à une altération de l'homéostasie des PN caractérisée par une augmentation du ratio entre la sous-population hyperactive sénescence et la sous-population immunosuppressive. De telles altérations des PN pourraient jouer un rôle important dans les processus pro-inflammatoires systémiques et pourraient favoriser la progression de la maladie. Dans ce cadre, nous avons observé de façon importante, que l'hyperactivation basale et l'altération de l'homéostasie des PN circulants sont plus importantes chez les patients MA évoluant rapidement par rapport aux patients évoluant lentement.

#### **I.1. Hyperactivation des PN circulants**

Nos résultats démontrant un état d'hyperactivation basale des PN sont en accord avec des données publiées antérieurement rapportant une augmentation de l'expression au niveau des PN des patients du CD11b (Scali *et al.*, 2002), HLA-DR et COX2 (Fiala *et al.*, 2005) et des sous-unités p47phox et gp91phox de la NADPH oxydase (Bruce-Keller *et al.*, 2010) ainsi qu'une diminution de l'expression du CD16 (Le Page *et al.*, 2017). De plus, des taux élevés de lipocaline associée à la gélatinase (un composant pro-inflammatoire des granules azurophiles) (Nauté *et al.*, 2015).

L'hyperactivation des PN chez les patients AD pourrait jouer un rôle dans l'inflammation aiguë et chronique systémique, rapportée comme impliquée dans le déclin cognitif au cours de la MA, et ce via 3 mécanismes majeurs:

### 1) L'augmentation de la production de FRO combinée à l'augmentation de la NETose intravasculaire.

Les FRO induisent des altérations lipidiques, protéiques, et des atteintes des acides nucléiques qui sont nécessaires en cas d'infection à la destruction du pathogène mais qui également peuvent entraîner des lésions tissulaires et vasculaires. Ainsi, une production excessive et/ou inappropriée de FRO a été impliquée dans la physiopathologie de nombreuses maladies inflammatoires chroniques, telles que les maladies cardiovasculaires (Iqbal *et al.*, 2013). La surproduction de FRO par les PN circulants pourrait également contribuer à la perte d'intégrité de la BHE ; en effet, l'étude de la micro-vasculature cérébrale chez les patients AD montre une dysfonction de la BHE et la sévérité de cette altération a été associée à la progression de la maladie (Bowman *et al.*, 2007). En effet, les FRO peuvent modifier les protéines des jonctions serrées de la barrière hémato-encéphalique, telles que ZO-1 et Claudine-5 (Abdul-Muneer *et al.*, 2013). Les FRO constituent par ailleurs un signal déclenchant majeur dans l'activation de la MMP-9. La MMP-9 a notamment été rapportée comme jouant un rôle important dans l'altération de la BHE dans le cadre de l'ischémie cérébrale (Gridday *et al.*, 2005). Dans notre travail, nous avons observé une diminution de l'expression de TIMP-1, inhibiteur spécifique de la MMP-9 ; Celle-ci pourrait être expliquée par la production excessive des FRO qui est capable d'activer la MMP-9 et inhiber l'expression de TIMP-1 de manière dépendante de la protéine-tyrosine kinase (Haorah *et al.*, 2007). Cette diminution est associée à une augmentation du ratio MMP-9/TIMP-1, ce qui reflète une augmentation de l'activité de la MMP-9. Ce ratio est de plus positivement corrélé avec la production des FRO chez les patients MA. La production excessive des FROs observée chez les patients AD-D pourrait donc altérer l'intégrité de la BHE de manière directe, ou de manière indirecte via la MMP-9, qui augmenterait la perméabilité de la BHE et favoriserait les processus inflammatoires au niveau cérébral.

Parallèlement, l'hyperproduction de FRO pourrait participer à l'augmentation de la formation des NETs et expliquer en partie l'augmentation de la NETose intravasculaire observée dans notre étude. En effet, le rôle des FRO dans la NETose est admis (Hakkim *et al.*, 2011). Les NETs peuvent en cas d'infection, assiéger les pathogènes et les détruire, mais ils peuvent aussi induire des réponses cytotoxiques, pro-thrombotiques, ou auto-immunitaires qui amplifierait l'inflammation systémique chez ces patients. Par exemple, la quantité de NETs est importante dans les expectorations de patients atteints de la mucoviscidose contribuant à leur viscosité (Manzenreiter *et al.*, 2012). Une infiltration des NETs a également été observée

dans le tissu synovial de patients atteints de la polyarthrite rhumatoïde, et ces NETs pourraient induire la production des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 et l'IL-8 (Khandpur *et al.*, 2013)

### **2) L'augmentation de la mort des PN par apoptose et par nécrose.**

L'entrée des PN en apoptose est fondamentale pour la résolution efficace de l'inflammation alors que la mort par nécrose induit la libération excessive du contenu intracellulaire cytotoxique des PN conduisant aux lésions tissulaires responsables des dysfonctionnements des organes (Savill *et al.*, 2002). Nous avons observé dans notre étude une augmentation de l'apoptose spontanée des PN circulants ainsi qu'une diminution de leur survie en réponse à la simulation. Ces résultats pourraient être liés à l'hyperactivation des PN capable d'induire leur entrée en apoptose (Aleman *et al.*, 2005). La survie diminuée des PN induite par les différents stimuli pro-inflammatoires que nous observons chez les patients atteints de la MA pourrait être liée à des anomalies dans les voies de signalisation, notamment les voies NF- $\kappa$ B et PI3-K (McCracken and Allen, 2014). Il serait donc intéressant d'analyser ces différentes voies de signalisation chez les patients. L'apoptose accrue des PN chez les patients de la MA pourrait expliquer les déficits fonctionnels des PN que nous avons observé chez les patients. La chimiotaxie des PN est diminuée chez les patients notamment au stade démence, ce, qui pourrait réduire leur capacité de migration en réponse à un agent infectieux. De plus, nous avons observé chez les patients une diminution de la phagocytose des PN, processus crucial dans la défense de l'hôte contre les pathogènes qui fait intervenir un grand nombre de récepteurs membranaires de reconnaissance. L'étude ayant été réalisée avec des bactéries opsonisées, ce résultat indique un défaut intrinsèque de la capacité de phagocytose qui pourrait être lié à une altération de la signalisation des récepteurs au complément CR1 et CR3 ou des récepteurs Fc $\gamma$ , notamment le CD16 comme nous le discuterons ci-dessous (Amoras *et al.*, 2003). Ces déficits fonctionnels des PN chez les patients MA pourraient augmenter la susceptibilité aux infections bactériennes et fongiques, et ainsi participer à l'amplification des processus inflammatoires chez ces patients. L'augmentation du pourcentage de PN nécrotiques, qui libèrent leur contenu intracellulaire toxique dans le milieu environnant, contribuerait également à ces processus.

### **3) La diminution de l'expression du CD16b à la surface des PN**

Le CD16b est un récepteur aux fragments Fc des IgG associé à une GPI (« Glycosyl Phosphatidyl inositol »). En accord avec les données rapportées par l'équipe de Tamas Fülöp

(Le Page *et al.*, 2017), nous avons observé une diminution de l'expression du CD16b à la surface des PN circulants. Cette diminution est à rapporter à un clivage protéolytique liée à l'activation des PN. Ce clivage fait notamment intervenir l'activation de la MMP-9, ce qui est en accord avec nos résultats (Moldovan *et al.*, 1999).

La diminution de l'expression du CD16b chez les patients pourrait participer à :

- la diminution de la capacité de phagocytose des PN, intervenant dans la diminution des signaux d'activation induite par ces récepteurs (Rivas-Fuente *et al.*, 2010). Outre le fait d'augmenter la susceptibilité des patients aux infections cette diminution de la phagocytose pourrait être impliquée dans la diminution de l'élimination de débris cellulaires nécrotiques et de ce fait dans l'amplification de la réponse inflammatoire (Gabelloni *et al.*, 2013).
- la diminution d'élimination des complexes immuns de la circulation ce qui contribuerait à amplifier l'activation des PN (Chen *et al.*, 2012).
- l'augmentation de l'apoptose des PN. Le CD16b inhibe en effet l'entrée des PN en apoptose en altérant l'expression de cytokines (comme PTPN-11, « Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 ») au niveau des radeaux lipidiques (Yang *et al.*, 2018).

Afin de déterminer le rôle du clivage excessif du CD16b dans les processus inflammatoires au cours de la MA, il serait intéressant de doser le CD16b soluble dans le sérum des patients et de l'associer aux différents paramètres étudiés.

En accord avec une étude précédente (Holmes *et al.*, 2011), nous constatons des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires, telles que IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 et TNF $\alpha$ , connues pour activer les PN, ainsi qu'une diminution de cytokines anti-inflammatoires, tels que IL-10 au niveau plasmatique. De plus, les taux de l'IL-6 et de l'IL-8 sont positivement corrélés avec les marqueurs d'activation des PN. Ces résultats suggèrent l'établissement d'un environnement pro-inflammatoire, influençant l'état d'activation des PN et aussi leur homéostasie.

### I.2. Altération de l'homéostasie des PN circulants

Nous avons observé une altération de l'homéostasie des PN circulant chez les patients AD-D, caractérisée par un ratio augmenté entre la sous-population de PN sénescents hyperactifs et la sous-population de PN immunosuppresseurs.

L'expansion de la population de PN sénescents pourrait être liée en partie à l'environnement inflammatoire systémique au cours de la MA et notamment la présence de taux élevés des cytokines pro-inflammatoires périphériques. Nous avons notamment observé une corrélation entre les taux circulants d'IL-6 et d'IL-8 et le pourcentage de la sous-population sénescence chez les patients MA, Cette expansion de la population sénescence pourrait être impliquée dans la physiopathologie de la MA via les mécanismes suivants :

- Implication dans l'augmentation de la production de FRO par les PN circulants et de la NETose intravasculaire, dont nous avons discuté les conséquences précédemment. Comme nous l'avons vu, une des conséquences majeures de la surproduction de FRO par les PN dans le cadre de la MA impliquerait des altérations de la BHE. Il serait particulièrement intéressant *in vitro* d'étudier l'effet de différentes populations de PN, dont la population sénescence, purifiées à partir de prélèvement sanguin de témoins et de patients sur l'intégrité de la BHE grâce à un modèle *in vitro* intégré (culture organotypique d'hippocampe de rat) (Morin-Brureau *et al.*, 2011).
- Implication dans l'infiltration de PN au niveau cérébral. Les PN sénescents sont supposés avoir un tropisme élevé pour les tissus (Uhl *et al.*, 2016). Ainsi, les modifications de l'homéostasie des PN circulants que nous observons pourraient expliquer l'infiltration de PN au niveau cérébral récemment rapportée et être impliquées dans les processus neuro-inflammatoires (Zenaro *et al.*, 2015).
- Implication dans les dépôts de peptide amyloïde cérébral. Nous avons observé chez les patients atteints de la MA une corrélation positive entre la charge amyloïde (PiB) et le pourcentage de la sous-population sénescence ainsi que la surproduction de FRO par les PN. Les résultats obtenus suggèrent que la sous-population sénescence puisse moduler le dépôt du peptide amyloïde au niveau cérébral. Comme nous l'avons discuté ci-dessus, les FRO constituent un élément clé dans les altérations de la BHE ; or la perte d'intégrité de la BHE a été impliquée dans la production du peptide amyloïde à partir de son précurseur et la réduction de sa clairance ce qui aboutirait à l'accumulation du peptide amyloïde dans le cerveau (van de Haar *et al.*, 2015). De plus, le pourcentage de la sous-population sénescence est positivement corrélé avec le taux de la protéine Tau phosphorylée au niveau du LCR. Cette observation est conforme à une étude antérieure qui a démontré que l'inflammation systémique favorise la pathologie de la protéine Tau dans un modèle murin 3xTg-AD. La déplétion des PN dans ce modèle réduit la quantité de protéines Tau phosphorylées (Zenaro *et al.*, 2015).

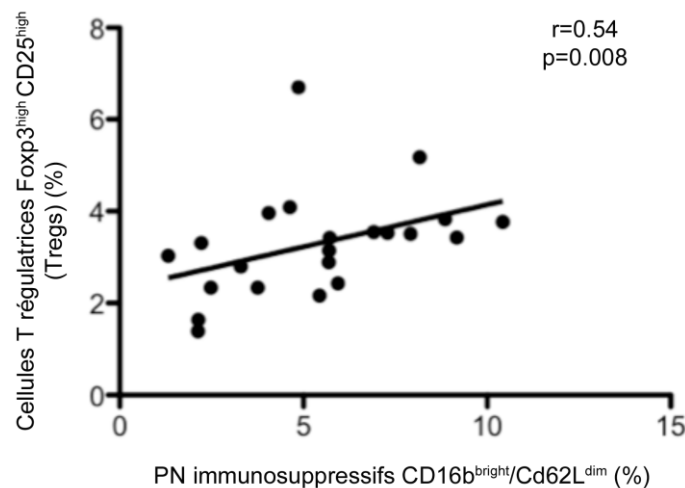


- Implication dans la modulation de l'activation microgliale. De façon intéressante, le pourcentage de la sous-population sénescence est négativement corrélé avec l'activation microgliale, mesurée par le traceur  $^{18}\text{F}$ -DPA-714. Le rôle de l'activation des microglies varie en fonction du stade de la maladie. Il a été rapporté que l'activation des cellules microgliales pourrait jouer un rôle protecteur chez les patients MA au stade précoce (Fan *et al.*, 2017). La corrélation négative suggère que la sous-population sénescence pourrait favoriser la progression de la maladie, et son rôle délétère a été confirmé par une expansion de cette sous-population chez les patients FD (Fast Decliner).

Parallèlement nous avons observé une modification du pourcentage de la sous-population immunosuppressive qui diffère en fonction du stade de la maladie : ce pourcentage est augmenté au stade prodromal alors qu'il est diminué au stade de démence. Cette population est caractérisée par de faibles propriétés pro-inflammatoires caractérisées par une diminution de la production des FRO et de la phagocytose des PN. L'augmentation des PN immunosuppressifs chez les patients MCI pourrait expliquer la diminution de la production des FRO chez ces patients en réponse aux stimuli différents. A l'inverse, le faible pourcentage de PN immunosuppressifs chez les patients au stade démence entraîne une augmentation du ratio et participerait donc à l'augmentation de la production de FRO et donc à l'inflammation systémique.

Récemment, il a été montré dans un modèle murin de la MA, un effet bénéfique des Tregs sur la progression de la maladie (Dansokho *et al.*, 2016). Or, de manière intéressante, il a été suggéré que la sous-population de PN immunosuppressifs  $\text{IL}10^+$  favorise la différenciation des Tregs (Perobelli *et al.*, 2016). Il serait intéressant d'évaluer la production d'IL-10 au sein de la sous-population de PN  $\text{CD}16\text{b}^{\text{bright}}/\text{CD}62\text{L}^{\text{dim}}$  étudiée lors de notre travail et étudier son action sur la différenciation des Tregs. Nous pouvons en effet spéculer que la diminution de cette sous-population pourrait alors intervenir en diminuant la différenciation des Tregs participant ainsi à la progression de la maladie. Des résultats préliminaires chez 20 patients MA nous ont notamment permis de mettre en évidence une corrélation positive entre la diminution du pourcentage de PN immunosupresseurs et la diminution du pourcentage de Tregs (**Fig 33**). Ces données suggèrent que l'altération de l'homéostasie des PN circulants pourrait entraîner une diminution de la fréquence des cellules

Tregs, pour lesquelles nos travaux récents ont montré un rôle bénéfique sur la progression de la maladie (Dansokho *et al.*, 2016).



**Figure 34 : Corrélation positive entre le pourcentage de PN immunosuppresseurs et le pourcentage de cellules T régulatrices.**

Le pourcentage de PN immunosuppresseurs  $CD16b^{bright}/CD62L^{dim}$  et le pourcentage de Tregs  $Foxp3^{high} CD25^{high}$  ont été déterminés par cytométrie en flux après marquage avec des anticorps monoclonaux spécifiques. La corrélation a été réalisée par une analyse de corrélation partielle linéaire et ajustée à l'âge et au score CDR (Clinical Dementia Rating).

Parallèlement, les Tregs sont capables d'inhiber les fonctions des PN et d'induire leur apoptose. La balance des interactions entre PN et Tregs pourrait ainsi constituer un élément critique déterminant le rôle des PN dans la physiopathologie de la MA. Ceci nous conduira à rechercher chez ces patients MA une éventuelle corrélation entre le phénotype des PN circulants, notamment l'augmentation du ratio PN sénescents/PN immunosuppresseurs et le pourcentage des Tregs.

Enfin, la sous-population de PN immunosuppresseur est caractérisée par une forte expression du CD16b. Il serait donc intéressant d'étudier son implication dans la voie de signalisation du CD16b et la diminution de la phagocytose observée chez les patients.

## II. Anomalies de l'expression génique des PN au cours de la MA

Les modifications phénotypiques associées à l'activation des PN impliquent des réarrangements de localisation subcellulaires de molécules pré-existantes. Par exemple,

l'activation des PN conduit au regroupement des différents composants de la NADPH oxydase, épars dans le PN au repos, au niveau de la membrane plasmique afin de permettre son activité. L'activation augmente également la capacité des PN à synthétiser *de novo* des protéines telles que des cytokines ou des chimiokines bien que les PN possèdent 10–20 fois moins d'ARN que les autres leucocytes. Le séquençage transcriptomique a donc été effectué sur les échantillons d'ARN de sujets sains et de patients MA.

Nous avons observé que les PN des patients MA présentent une up-régulation de transcripts dont les fonctions sont associées à des réponses immunes et inflammatoires mais également à l'organisation du cytoplasme et du cytosquelette. Dans ce cadre, le cytosquelette d'actine est nécessaire pour la translocation de vésicules à la membrane plasmique impliquée notamment dans la formation du complexe NADPH oxydase actif. Des fonctions associées à la sénescence et la mort cellulaire, des voies de signalisation, les métabolismes des acides nucléiques, des lipides et des protéines, au processus d'ubiquitination sont également augmentées.

L'expression de 18 gènes des PN est notamment significativement accrue chez les patients AD-D par rapport aux témoins alors qu'aucune différence n'a été observée au stade prodromal. Parmi ces 18 gènes, 7 gènes (*TAP-1*, *CD83*, *CTLA-4*, *TMIGD2*, *S100B*, *EDAR*, et *MDS2*) participent à l'inflammation et à la défense de l'hôte. L'augmentation de l'expression des gènes *CD83* et *CTLA-4*, montrée par le séquençage de l'ARN, est associée à l'expression augmentée de ces molécules à la surface des PN chez les patients AD-D. Le *CD83*, marqueur des cellules dendritiques matures, est impliqué dans l'activation des cellules T. La présence de cytokines et de peptides bactériales peuvent également induire l'expression du *CD83* au sein des PN *in vitro*, et cette expression est élevée chez les patients présentant des maladies inflammatoires chroniques (Iking-Konert *et al.*, 2002). Etant donné que le *TNF- $\alpha$*  induit préférentiellement la synthèse du *CD83* (Berkow and Dodson, 1988), l'augmentation de son expression au sein des PN pourrait être liée à l'augmentation des taux de *TNF- $\alpha$*  circulant observée chez les patients AD-D. L'expression élevée du *CD83*, ainsi que l'augmentation de l'expression de *TAP-1* (« Transporter associated with Antigen Processing-1), impliqués dans les étapes protéolytiques du processing, par les PN, des antigènes dépendants des molécules CMH-I (Potter and Harding, 2001), suggèrent que les PN des patients AD-D pourraient fonctionner comme des cellules présentatrices d'antigènes, et donc avoir un impact important sur les cellules T. Le gène *CTLA-4* code pour la molécule « Cytotoxic T-Lymphocyte

Associated Protein 4 » (CD152) qui transmet des signaux inhibiteurs aux cellules T et a été impliquée dans la régulation des PN (Abrams *et al.*, 2000). Il aurait été intéressant d'étudier l'interaction entre les PN et les cellules T via la voie de signalisation du CTLA-4.

Nous avons également mis en évidence une augmentation de l'expression de 4 gènes (*SIK-1*, *CRIP2*, *GRASP* et *AK-5*) qui sont impliqués dans la régulation des voies de signalisation. Les molécules *SIK-1* (« Salt-inducible kinase 1 ») et *CRIP2* (« Cysteine rich protein 2 ») inhibent la voie de signalisation NF-κB induite par les PN en réponse aux médiateurs pro-inflammatoires, tels que les agonistes du TLR (Yong Kim *et al.*, 2013 ; Cheung *et al.*, 2011) L'augmentation de la transcription de ces molécules chez les patients AD-D pourrait expliquer la diminution de la capacité des PN à produire des cytokines et des chimiokines que nous avons observée, en accord avec les données récentes ( Le Page *et al.*, 2017), et ce malgré l'état d'activation des PN. Ceci pourrait également intervenir dans la diminution de la survie des PN après stimulation par les agonistes des TLR qui implique l'activation de la voie NF-κB (François *et al.*, 2005). La molécule *GRASP* (« General receptor for Phosphoinositides 1 associated ») induit l'activation de la GTP-ase ARF-6 (« ADP-ribosylation factor-6 ») qui a été impliquée dans la dégranulation et l'explosion oxydative des PN (El Azreq *et al.*, 2010). L'expression augmentée de *GRASP* pourrait donc intervenir dans l'augmentation de la production de FRO par les PN observée chez les patients AD-D. De façon identique, *AK5* est une adénylate kinase qui permet la génération d'AMP cyclique (cAMP). De façon intéressante, alors que le cAMP inhibe la production de FRO par les PN chez les sujets jeunes, il augmente cette production chez les sujets âgés (Chaves *et al.*, 2007). A l'inverse, il a été rapporté une diminution de l'expression d'*AK-5* au niveau cérébral chez les patients MA (Ansoleaga *et al.*, 2015). Il serait intéressant de rechercher d'éventuelles associations entre l'augmentation de l'expression du gène *AK5* au sein des PN, l'altération des fonctions de ces cellules et la progression de la MA.

De plus, nous avons observé chez les patients AD-D une augmentation de l'expression des gènes *DTX-1* et *PSMB-8* qui codent pour des molécules impliquées dans le processus d'ubiquitination nécessaire à la dégradation des protéines par le protéasome. Or, la dégradation de protéines par le protéasome a été impliquée dans la mort des PN par apoptose ou par NETose (Pashavin *et al.*, 2015 ; Derouet *et al.*, 2004).

Enfin, la B4GALNT3 (« Beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyltransferase-3 ») transforme la N-acétylgalactosamine en LDN («N,N-prime-diacetyllactosediamine»), une partie de la structure terminale des N-glycanes à la surface (Ikehara *et al.*, 2006), qui pourraient influencer l'état d'activation des PN (Patras *et al.*, 2017).

### **III. Les altérations phénotypiques et fonctionnelles des PN sont associées à la rapidité d'évolution de la maladie : implications en clinique**

Nous avons observé que l'hyperactivation et les altérations de l'homéostasie des PN étaient plus importantes chez les patients MA évoluant rapidement par rapport aux patients évoluant plus lentement. Ces résultats suggèrent pour la 1ère fois que le phénotype des PN pourrait être associé à la rapidité du déclin cognitive au cours de la MA (Patent EP17305342.2).

Ainsi le phénotype des PN et notamment le ratio des sous-populations de PN périphériques senescents/immunosuppresseurs pourrait servir de biomarqueur sanguin pronostique innovant de la progression de la MA. De même, le phénotype des PN pourrait représenter un biomarqueur sanguin important pour 1) classifier les patients en fonction de leur taux attendu de progression de la maladie lors des essais thérapeutiques, et 2) suivre l'efficacité de ces traitements.

Enfin, notre travail ouvre de nouvelles perspectives pour le développement de nouvelles stratégies d'immunothérapie au cours de la MA basées sur la modulation des PN, en particulier en ré-équilibrant le ratio PN sénescents/PN immunosuppresseurs ou en diminuant l'activation des PN.

En effet, certains inhibiteurs de la NADPH oxydase (comme NOX-1 et -4), ciblant à diminuer l'état d'activation des PN, ont déjà été mis en place dans les modèles animaux et aussi chez les patients atteints de cancer (Bonner and Arbiser, 2012).

### **IV. Anomalies phénotypiques et fonctionnelles des PN circulants chez les patients atteints de MA atypique ou de Tauopathie non MA.**

Le peptide amyloïde A $\beta$ <sub>42</sub> et/ou la protéine Tau pourraient jouer un rôle instrumental direct dans les altérations phénotypiques et fonctionnelles des PN circulants que nous avons

montré chez les patients MA, ce qui nous a conduit à poursuivre l'étude en incluant des patients atteints de MA atypique et des patients atteints de Tauopathie non MA.

Notre étude a permis de mettre en évidence chez les patients atteints de MA atypique ou de Tauopathie non MA des modifications similaires à celles observées chez les patients MA à savoir : 1) un état d'hyperactivation basale des PN caractérisé par une augmentation de l'expression de la molécule CD11b, une diminution de l'expression du CD62L et une augmentation de la production basale de FRO ; 2) une altération de l'homéostasie des PN caractérisée par une augmentation du pourcentage de la population sénescence conduisant à une augmentation du ratio PN sénescents/PN immunosuppresseurs et de la population immunosuppressive .

Par contre, certaines anomalies mises en évidence chez les patients MA n'ont été retrouvées que chez les patients atteints de MA atypique, à savoir :1) une hyperréactivité des PN en termes de production de FRO, 2) une réduction de la capacité de phagocytose, 3) une diminution de la sous-population de PN immunosuppresseurs. Les conséquences physiopathologiques de ces anomalies ont été précédemment discutées. Ces anomalies qui apparaissent comme spécifiques de la pathologie amyloïde, pourraient être utiles dans le diagnostic différentiel entre MA et Tauopathies non MA. Notre étude devra donc être poursuivie à une plus large échelle afin de confirmer les résultats obtenus.

Par ailleurs, les expériences effectuées *ex vivo* ont montré que le peptide A $\beta$ <sub>42</sub> module l'expression des molécules d'adhérence mais n'exerce aucun effet sur la production de FRO par les PN ni sur l'équilibre des sous-populations de PN sénescence et immunosuppressive.

D'autres expériences *in vitro* devront être réalisées en modifiant les conditions expérimentales notamment le temps d'incubation. Par ailleurs, nous avons montré que certaines cytokines pro-inflammatoires modulent *in vitro* la fréquence des sous-populations de PN. Il sera intéressant de définir si un éventuel « priming » des PN par le peptide amyloïde A $\beta$  constitue un signal initiateur de la modulation de l'homéostasie des PN en synergie avec certaines cytokines pro-inflammatoires. Enfin, l'effet modulateur potentiel de la protéine Tau phosphorylée ou non sera à définir.



### V. Etude de la Migration réverse des PN au cours de la MA

Il a été découvert l'existence d'une sous-population de PN ayant une capacité de migration réverse du milieu tissulaire vers le milieu endovasculaire et qui aurait pour but d'éliminer les PN en excès dans le tissu et ainsi de limiter les dommages tissulaires. Une molécule actuellement très étudiée est JAM-C (« Junctional Adhesion Molecule-C ») qui est exprimée de façon ubiquitaire à la surface des cellules endothéliales (Colom *et al.*, 2015) et qui est impliquée dans les phénomènes d'infiltration leucocytaire dans les tissus. Ce phénomène de migration réverse pourrait transformer une inflammation locale stérile en une inflammation systémique et a notamment été impliqué au cours de l'ischémie cérébrale aiguë aggravant le pronostic fonctionnel et vital des patients (Hirano *et al.*, 2016). En effet, les PN en migration réverse quittent le site de l'inflammation et se répartissent dans l'ensemble de la circulation sanguine ; ils peuvent alors migrer dans d'autres organes contribuant à des lésions organiques additionnelles et une inflammation systémique.

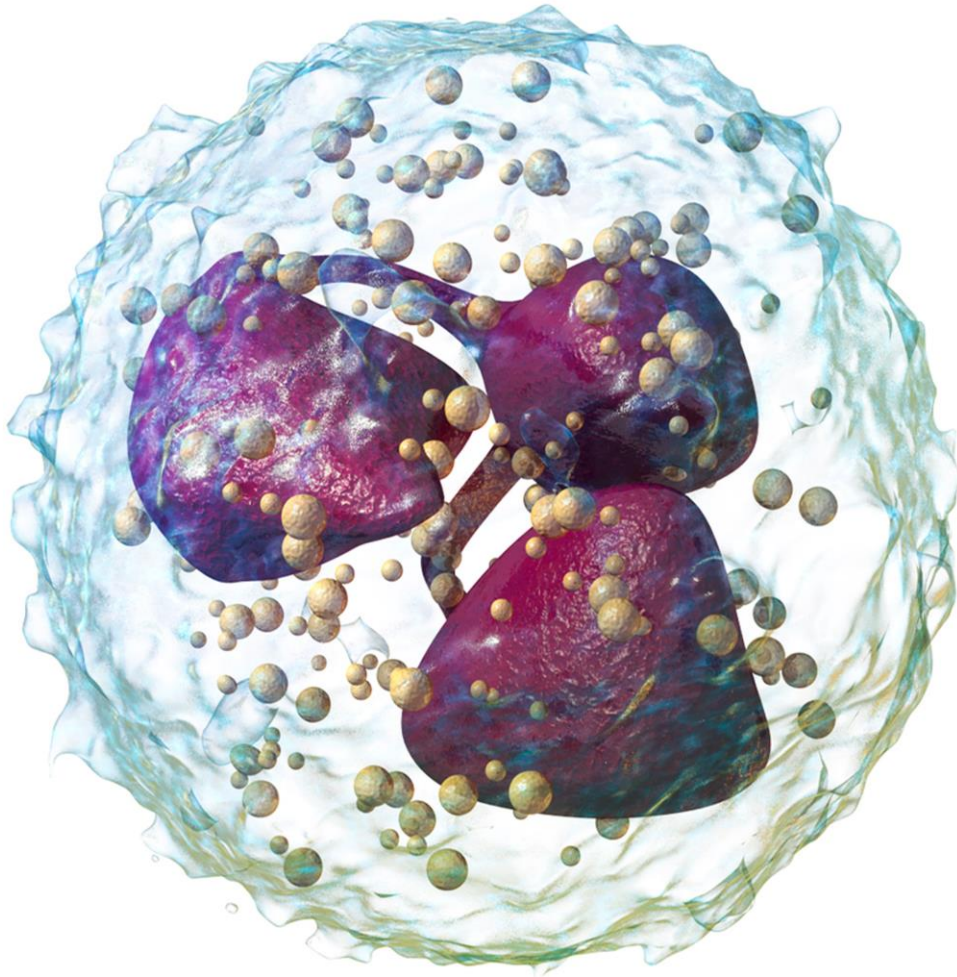
Il serait intéressant de doser chez les patients MA, le taux circulant de la molécule JAM-C et d'étudier la sous-population de PN exprimant fortement ICAM-1<sup>high</sup> (CD54) marqueur associé à la migration reverse.

### VI. Implication du Microbiote intestinal dans les altérations des PN chez les patients MA

Les composants du microbiote oral ont été impliqués dans la MA (Shoemark and Allen., 2015), et la modulation du microbiote intestinal a aussi été décrite (Cattaneo *et al.*, 2017). Le microbiote intestinal favorise l'inflammation au niveau cérébral par sa propriété inflammatoire et son implication au cours de l'inflammation systémique. De plus, il a récemment été rapporté que l'adhésion des bactéries filamenteuses segmentées, appartenant à la Flore commensale, aux cellules épithéliales intestinales jouait un rôle clé dans l'induction des cellules Th17 (Atarashi *et al.*, 2016).

Parallèlement, une étude récente a montré que la sénescence des PN est régulée par le microbiote ; cette régulation implique la voie des TLR. De plus, dans un modèle murin de drépanocytose, une pathologie caractérisée par des épisodes répétés de vaso-occlusion dans laquelle les PN jouent un rôle clé, l'expansion de la sous-population de PN sénescents est contre-carrée par la déplétion du microbiote qui réduit également les crises vaso-occlusives et améliore significativement la survie des souris (Zhang *et al.*, 2015). Les altérations du

microbiote pourraient donc contribuer à l'expansion des PN sénescents chez les patients MA. La manipulation du microbiote pourrait donc influencer la progression de la maladie en modulant l'homéostasie des PN et diminuant le stress oxydatif. Des études ultérieures dans ce domaine sont nécessaires. Nous pourrions donc utiliser un modèle murin afin de déterminer le rôle du microbiote au cours des processus inflammatoires associés à la MA, et aussi définir son impact sur l'état d'activation des PN ainsi que ses sous-populations en termes de symptomatologie de la MA.



## **Conclusions générales**

### *Conclusions générales*

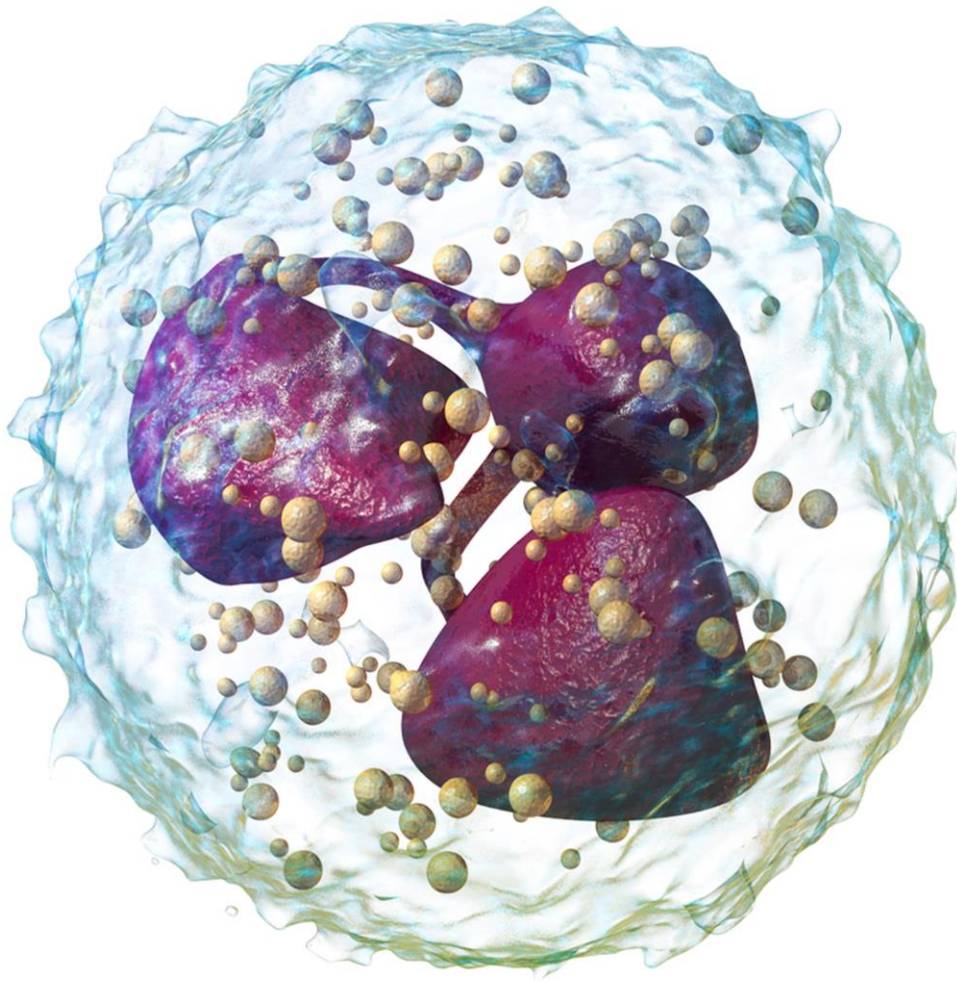
La 1<sup>ère</sup> partie de mon travail a permis de montrer chez les patients atteints de MA au stade de démence en comparaison avec les témoins appariés en âge une hyperactivation des PN circulants caractérisée par une modulation de l'expression des molécules d'adhérence à la surface des PN à l'état de repos associée à une augmentation de la production des FRO par les PN à l'état basal. De plus, nous avons observé chez ces patients une augmentation de la capacité des PN à produire des FRO en réponse à une stimulation ainsi qu'une augmentation de la NETose intravasculaire et une augmentation de la mort des PN par apoptose et nécrose. Ces altérations, qui ne sont pas observées chez les patients atteints de MA au stade prodromal, sont associées à une altération de l'homéostasie des PN caractérisée par une augmentation du ratio entre la sous-population hyperactive sénescence et la sous-population immunosuppressive PMN. De telles altérations des PN pourraient jouer un rôle important dans les processus pro-inflammatoires systémiques et pourraient favoriser la progression de la maladie notamment via des altérations de la BHE. Il serait particulièrement intéressant *in vitro* l'effet de différentes populations de PN, dont la population sénescence, purifiées à partir de prélèvement sanguin de témoins et de patients sur l'intégrité de la BHE grâce à un modèle *in vitro* intégré. Nous avons également observé de façon importante, que l'hyperactivation basale et l'altération de l'homéostasie des PN circulants sont plus importantes chez les patients MA évoluant rapidement par rapport aux patients évoluant lentement. Le phénotype des PN pourrait donc représenter un bio-marqueur prédictif sanguin innovant. Par ailleurs, nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour le développement de nouvelles stratégies d'immunothérapie au cours de la MA basées sur la modulation des PN, en particulier en ré-équilibrant le ratio PN sénescents/PN immunosuppressifs ou en diminuant l'activation des PN.

Le peptide amyloïde A $\beta_{42}$  et/ou la protéine Tau pourraient jouer un rôle instrumental direct dans les altérations phénotypiques et fonctionnelles des PN circulants que nous avons montré chez les patients MA, ce qui nous a conduit à poursuivre l'étude en incluant des patients atteints de MA atypique et des patients atteints de Tauopathie non MA. Notre étude a permis de mettre en évidence chez les patients atteints de MA atypique ou de Tauopathie non MA des modifications similaires à celles observées chez les patients MA à savoir : 1) un état d'hyperactivation basale des PN 2) une augmentation du pourcentage de la population sénescence conduisant à une augmentation du ratio PN sénescents/PN immunosuppressifs. Par contre, certaines anomalies mises en évidence chez les patients MA n'ont été retrouvées que

## **Conclusions générales**

---

chez les patients atteints de MA atypique, à savoir :1) une hyperréactivité des PN en termes de production de FRO, 2) une réduction de la capacité de phagocytose, 3) une diminution de la sous-population de PN immunosuppresseifs. Ces anomalies qui apparaissent comme spécifiques de la pathologie amyloïde, pourraient être utiles dans le diagnostic différentiel entre MA et Tauopathies non MA. Notre étude devra donc être poursuivie à une plus large échelle afin de confirmer les résultats obtenus. Par ailleurs, les expériences effectuées *ex vivo* ont montré que le peptide A $\beta$ <sub>42</sub> module l'expression des molécules d'adhérence mais n'exerce aucun effet sur la production de FRO par les PN ni sur l'équilibre des sous-populations de PN sénescence et immunosuppressive. D'autres expériences *in vitro* devront être réalisées et il sera intéressant de définir si un éventuel « priming » des PN par le peptide amyloïde A $\beta$  constitue un signal initiateur de la modulation de l'homéostasie des PN en synergie avec certaines cytokines pro-inflammatoires. Enfin, l'effet modulateur potentiel de la protéine Tau phosphorylée ou non sera à définir.



## **Références bibliographiques**



## Références bibliographiques

Abdul-Muneer, P.M., Schuetz, H., Wang, F., Skotak, M., Jones, J., Gorantla, S., Zimmerman, M.C., Chandra, N., and Haorah, J. (2013). Induction of oxidative and nitrosative damage leads to cerebrovascular inflammation in an animal model of mild traumatic brain injury induced by primary blast. *Free Radic. Biol. Med.* *60*, 282–291.

Abrams, J.R., Kelley, S.L., Hayes, E., Kikuchi, T., Brown, M.J., Kang, S., Lebwohl, M.G., Guzzo, C.A., Jegasothy, B.V., Linsley, P.S., et al. (2000). Blockade of T lymphocyte costimulation with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4-immunoglobulin (CTLA4Ig) reverses the cellular pathology of psoriatic plaques, including the activation of keratinocytes, dendritic cells, and endothelial cells. *J. Exp. Med.* *192*, 681–694.

Aerts-Toegaert, C., Heirman, C., Tuyaerts, S., Corthals, J., Aerts, J.L., Bonehill, A., Thielemans, K., and Breckpot, K. (2007). CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur. J. Immunol.* *37*, 686–695.

Aleman, M., de la Barrera, S.S., Schierloh, P.L., Alves, L., Yokobori, N., Baldini, M., Abbate, E., and Sasiain, M.C. (2005). In tuberculous pleural effusions, activated neutrophils undergo apoptosis and acquire a dendritic cell-like phenotype. *J. Infect. Dis.* *192*, 399–409.

Alonso, A. del C., Mederlyova, A., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2004). Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *J. Biol. Chem.* *279*, 34873–34881.

Amoras, A.L., Kanegane, H., Miyawaki, T., and Vilela, M.M. (2003). Defective Fc-, CR1- and CR3-mediated monocyte phagocytosis and chemotaxis in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinemia patients. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* *13*, 181–188.

Ansoleaga, B., Jové, M., Schlüter, A., Garcia-Esparcia, P., Moreno, J., Pujol, A., Pamplona, R., Portero-Otín, M., and Ferrer, I. (2015). Deregulation of purine metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *36*, 68–80.

Ardi, V.C., Kupriyanova, T.A., Deryugina, E.I., and Quigley, J.P. (2007). Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 20262–20267.

Arendt, T., Stieler, J.T., and Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain Res. Bull.* *126*, 238–292.

Ariel, A., and Serhan, C.N. (2012). New Lives Given by Cell Death: Macrophage Differentiation Following Their Encounter with Apoptotic Leukocytes during the Resolution of Inflammation. *Front Immunol* *3*, 4.

Atarashi, K., Tanoue, T., Ando, M., Kamada, N., Nagano, Y., Narushima, S., Suda, W., Imaoka, A., Setoyama, H., Nagamori, T., et al. (2015). Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* *163*, 367–380.

- Averhoff, P., Kolbe, M., Zychlinsky, A., and Weinrauch, Y. (2008). Single residue determines the specificity of neutrophil elastase for *Shigella* virulence factors. *J. Mol. Biol.* *377*, 1053–1066.
- Azevedo, E.P.C., Guimarães-Costa, A.B., Torezani, G.S., Braga, C.A., Palhano, F.L., Kelly, J.W., Saraiva, E.M., and Foguel, D. (2012). Amyloid fibrils trigger the release of neutrophil extracellular traps (NETs), causing fibril fragmentation by NET-associated elastase. *J. Biol. Chem.* *287*, 37206–37218.
- Baerresen, K.M., Miller, K.J., Hanson, E.R., Miller, J.S., Dye, R.V., Hartman, R.E., Vermeersch, D., and Small, G.W. (2015). Neuropsychological tests for predicting cognitive decline in older adults. *Neurodegener Dis Manag* *5*, 191–201.
- Baik, S.H., Cha, M.-Y., Hyun, Y.-M., Cho, H., Hamza, B., Kim, D.K., Han, S.-H., Choi, H., Kim, K.H., Moon, M., et al. (2014). Migration of neutrophils targeting amyloid plaques in Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol. Aging* *35*, 1286–1292.
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., and Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. *The Lancet* *377*, 1019–1031.
- Ballatore, C., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 663–672.
- Bateman, R.J., Xiong, C., Benzinger, T.L.S., Fagan, A.M., Goate, A., Fox, N.C., Marcus, D.S., Cairns, N.J., Xie, X., Blazey, T.M., et al. (2012). Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* *367*, 795–804.
- Baudier, J., and Cole, R.D. (1987). Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids. *J. Biol. Chem.* *262*, 17577–17583.
- Bazzoni, F., Tamassia, N., Rossato, M., and Cassatella, M.A. (2010). Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils. *Eur. J. Immunol.* *40*, 2360–2368.
- Beauvillain, C., Delneste, Y., Scotet, M., Peres, A., Gascan, H., Guermonprez, P., Barnaba, V., and Jeannin, P. (2007). Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood* *110*, 2965–2973.
- Beheshti, I., Demirel, H., Matsuda, H., and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2017). Classification of Alzheimer's disease and prediction of mild cognitive impairment-to-Alzheimer's conversion from structural magnetic resource imaging using feature ranking and a genetic algorithm. *Comput. Biol. Med.* *83*, 109–119.
- Berkow, R.L., and Dodson, M.R. (1988). Biochemical mechanisms involved in the priming of neutrophils by tumor necrosis factor. *J. Leukoc. Biol.* *44*, 345–352.
- Bobinski, M., de Leon, M.J., Wegiel, J., Desanti, S., Convit, A., Saint Louis, L.A., Rusinek, H., and Wisniewski, H.M. (2000). The histological validation of post mortem magnetic resonance imaging-determined hippocampal volume in Alzheimer's disease. *Neuroscience* *95*, 721–725.

- Boche, D., Perry, V.H., and Nicoll, J. a. R. (2013). Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *39*, 3–18.
- Bonner, M.Y., and Arbiser, J.L. (2012). Targeting NADPH oxidases for the treatment of cancer and inflammation. *Cellular and Molecular Life Sciences* *69*, 2435–2442.
- Bordji, K., Becerril-Ortega, J., Nicole, O., and Buisson, A. (2010). Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid- $\beta$  production. *J. Neurosci.* *30*, 15927–15942.
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* *33*, 657–670.
- Bouchon, A., Dietrich, J., and Colonna, M. (2000). Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J. Immunol.* *164*, 4991–4995.
- Bourke, E., Casseti, A., Villa, A., Fadlon, E., Colotta, F., and Mantovani, A. (2003). IL-1 beta scavenging by the type II IL-1 decoy receptor in human neutrophils. *J. Immunol.* *170*, 5999–6005.
- Bowman, G.L., Kaye, J.A., Moore, M., Waichunas, D., Carlson, N.E., and Quinn, J.F. (2007). Blood-brain barrier impairment in Alzheimer disease: stability and functional significance. *Neurology* *68*, 1809–1814.
- Boya, P., Reggiori, F., and Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat. Cell Biol.* *15*, 713–720.
- Brandes, M., Klauschen, F., Kuchen, S., and Germain, R.N. (2013). A systems analysis identifies a feedforward inflammatory circuit leading to lethal influenza infection. *Cell* *154*, 197–212.
- Brew, K., Dinakarpanthian, D., and Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* *1477*, 267–283.
- Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007). Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 577–582.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* *303*, 1532–1535.
- Browne, T.C., McQuillan, K., McManus, R.M., O'Reilly, J.-A., Mills, K.H.G., and Lynch, M.A. (2013). IFN- $\gamma$  Production by amyloid  $\beta$ -specific Th1 cells promotes microglial activation and increases plaque burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Immunol.* *190*, 2241–2251.
- Bruce-Keller, A.J., Gupta, S., Parrino, T.E., Knight, A.G., Ebenezer, P.J., Weidner, A.M., LeVine, H., Keller, J.N., and Markesbery, W.R. (2010). NOX activity is increased in mild cognitive impairment. *Antioxid. Redox Signal.* *12*, 1371–1382.

## Références bibliographiques

---

- Bruhns, P. (2012). Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* 119, 5640–5649.
- Buchhave, P., Zetterberg, H., Blennow, K., Minthon, L., Janciauskiene, S., and Hansson, O. (2010). Soluble TNF receptors are associated with A $\beta$  metabolism and conversion to dementia in subjects with mild cognitive impairment. *Neurobiol. Aging* 31, 1877–1884.
- Buckley, C.D., Ross, E.A., McGettrick, H.M., Osborne, C.E., Haworth, O., Schmutz, C., Stone, P.C.W., Salmon, M., Matharu, N.M., Vohra, R.K., et al. (2006). Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J. Leukoc. Biol.* 79, 303–311.
- Bulic, B., Ness, J., Hahn, S., Rennhack, A., Jumpertz, T., and Weggen, S. (2011). Chemical Biology, Molecular Mechanism and Clinical Perspective of  $\gamma$ -Secretase Modulators in Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol* 9, 598–622.
- Bullmann, T., Holzer, M., Mori, H., and Arendt, T. (2009). Pattern of tau isoforms expression during development in vivo. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 591–597.
- Burns, A., Byrne, J., Ballard, C., and Holmes, C. (2002). Sensory stimulation in dementia. *BMJ* 325, 1312–1313.
- Cantegreil-Kallen, I., Lieberherr, D., Garcia, A., Cadilhac, M., Rigaud, A.-S., and Flahault, A. (2004). Detection of Alzheimer's disease in general medicine: preliminary results of a Sentinelles general practitioner's network survey. *Rev Med Interne* 25, 548–555.
- Cao, C., Arendash, G.W., Dickson, A., Mamcarz, M.B., Lin, X., and Ethell, D.W. (2009). Abeta-specific Th2 cells provide cognitive and pathological benefits to Alzheimer's mice without infiltrating the CNS. *Neurobiol. Dis.* 34, 63–70.
- Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L.A., Nombela-Arrieta, C., Chèvre, R., A-González, N., Kunisaki, Y., Zhang, D., van Rooijen, N., Silberstein, L.E., et al. (2013). Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* 153, 1025–1035.
- Cattaneo, A., Cattane, N., Galluzzi, S., Provasi, S., Lopizzo, N., Festari, C., Ferrari, C., Guerra, U.P., Paghera, B., Muscio, C., et al. (2017). Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiol. Aging* 49, 60–68.
- Cedarbaum, J.M., Jaros, M., Hernandez, C., Coley, N., Andrieu, S., Grundman, M., Vellas, B., and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2013). Rationale for use of the Clinical Dementia Rating Sum of Boxes as a primary outcome measure for Alzheimer's disease clinical trials. *Alzheimers Dement* 9, S45–55.
- Chakrabarty, P., Li, A., Ceballos-Diaz, C., Eddy, J.A., Funk, C.C., Moore, B., DiNunno, N., Rosario, A.M., Cruz, P.E., Verbeeck, C., et al. (2015). IL-10 alters immunoproteostasis in APP mice, increasing plaque burden and worsening cognitive behavior. *Neuron* 85, 519–533.
- Charidimou, A., Friedrich, J.O., Greenberg, S.M., and Viswanathan, A. (2018). Core

## Références bibliographiques

---

cerebrospinal fluid biomarker profile in cerebral amyloid angiopathy: A meta-analysis. *Neurology* 90, e754–e762.

Charmoy, M., Brunner-Agten, S., Aebischer, D., Auderset, F., Launois, P., Milon, G., Proudfoot, A.E.I., and Tacchini-Cottier, F. (2010). Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog.* 6, e1000755.

Chaves, M.M., Costa, D.C., Pereira, C.C.T., Andrade, T.R., Horta, B.C., and Nogueira-Machado, J.A. (2007). Role of inositol 1,4,5-triphosphate and p38 mitogen-activated protein kinase in reactive oxygen species generation by granulocytes in a cyclic AMP-dependent manner: an age-related phenomenon. *Gerontology* 53, 228–233.

Chen, K., Nishi, H., Travers, R., Tsuboi, N., Martinod, K., Wagner, D.D., Stan, R., Croce, K., and Mayadas, T.N. (2012). Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA in vivo. *Blood* 120, 4421–4431.

Cheung, A.K.L., Ko, J.M.Y., Lung, H.L., Chan, K.W., Stanbridge, E.J., Zabarovsky, E., Tokino, T., Kashima, L., Suzuki, T., Kwong, D.L.-W., et al. (2011). Cysteine-rich intestinal protein 2 (CRIP2) acts as a repressor of NF-kappaB-mediated proangiogenic cytokine transcription to suppress tumorigenesis and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 8390–8395.

Chouraki, V., and Seshadri, S. (2014). Genetics of Alzheimer's disease. *Adv. Genet.* 87, 245–294.

Christoffersson, G., Vågesjö, E., Vandooren, J., Lidén, M., Massena, S., Reinert, R.B., Brissova, M., Powers, A.C., Opdenakker, G., and Phillipson, M. (2012). VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood* 120, 4653–4662.

Clayton, A.R., Prue, R.L., Harper, L., Drayson, M.T., and Savage, C.O.S. (2003). Dendritic cell uptake of human apoptotic and necrotic neutrophils inhibits CD40, CD80, and CD86 expression and reduces allogeneic T cell responses: relevance to systemic vasculitis. *Arthritis Rheum.* 48, 2362–2374.

Cockrell, J.R., and Folstein, M.F. (1988). Mini-Mental State Examination (MMSE). *Psychopharmacol Bull* 24, 689–692.

Colom, B., Bodkin, J.V., Beyrau, M., Woodfin, A., Ody, C., Rourke, C., Chavakis, T., Brohi, K., Imhof, B.A., and Nourshargh, S. (2015). Leukotriene B4-Neutrophil Elastase Axis Drives Neutrophil Reverse Transendothelial Cell Migration In Vivo. *Immunity* 42, 1075–1086.

Conway, K.L., Goel, G., Sokol, H., Manocha, M., Mizoguchi, E., Terhorst, C., Bhan, A.K., Gardet, A., and Xavier, R.J. (2012). p40phox expression regulates neutrophil recruitment and function during the resolution phase of intestinal inflammation. *J. Immunol.* 189, 3631–3640.

Costantini, C., and Cassatella, M.A. (2011). The defensive alliance between neutrophils and NK cells as a novel arm of innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* 89, 221–233.

- Cowan, C.M., and Mudher, A. (2013). Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies? *Front Neurol* 4, 114.
- Cowland, J.B., and Borregaard, N. (2016). Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol. Rev.* 273, 11–28.
- Cunningham, C., and Hennessy, E. (2015). Co-morbidity and systemic inflammation as drivers of cognitive decline: new experimental models adopting a broader paradigm in dementia research. *Alzheimer's Research & Therapy* 7, 33.
- Dansokho, C., Ait Ahmed, D., Aid, S., Toly-Ndour, C., Chaigneau, T., Calle, V., Cagnard, N., Holzenberger, M., Piaggio, E., Aucouturier, P., et al. (2016). Regulatory T cells delay disease progression in Alzheimer-like pathology. *Brain* 139, 1237–1251.
- Davydova, T.V., Fomina, V.G., Voskresenskaya, N.I., and Doronina, O.A. (2003). Phagocytic activity and state of bactericidal systems in polymorphonuclear leukocytes from patients with Alzheimer's disease. *Bull. Exp. Biol. Med.* 136, 355–357.
- Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M.B., Holtzman, D.M., and Zlokovic, B.V. (2008). apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J. Clin. Invest.* 118, 4002–4013.
- Decker, J.M., Krüger, L., Sydow, A., Zhao, S., Frotscher, M., Mandelkow, E., and Mandelkow, E.-M. (2015). Pro-aggregant Tau impairs mossy fiber plasticity due to structural changes and Ca<sup>++</sup> dysregulation. *Acta Neuropathologica Communications* 3.
- Deng, Y., Wang, Z., Wang, R., Zhang, X., Zhang, S., Wu, Y., Staufenbiel, M., Cai, F., and Song, W. (2013). Amyloid- $\beta$  protein (A $\beta$ ) Glu11 is the major  $\beta$ -secretase site of  $\beta$ -site amyloid- $\beta$  precursor protein-cleaving enzyme 1(BACE1), and shifting the cleavage site to A $\beta$  Asp1 contributes to Alzheimer pathogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 37, 1962–1969.
- Denny, M.F., Yalavarthi, S., Zhao, W., Thacker, S.G., Anderson, M., Sandy, A.R., McCune, W.J., and Kaplan, M.J. (2010). A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J. Immunol.* 184, 3284–3297.
- Derouesne, C., Poitreneau, J., Hugonot, L., Kalafat, M., Dubois, B., and Laurent, B. (1999). Mini-Mental State Examination: a useful method for the evaluation of the cognitive status of patients by the clinician. *Presse Med* 28, 1141–1148.
- Derouet, M., Thomas, L., Cross, A., Moots, R.J., and Edwards, S.W. (2004). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. *J. Biol. Chem.* 279, 26915–26921.
- Desjardins, A., Coignard-Biehler, H., Mahlaoui, N., Frange, P., Bougnoux, M.-E., Blanche, S., Fischer, A., Blumental, S., and Lortholary, O. (2012). Infections fongiques et granulomatose septique chronique: De la physiopathologie aux nouvelles perspectives thérapeutiques. *Médecine/sciences* 28, 963–969.



- Dimasi, D., Sun, W.Y., and Bonder, C.S. (2013). Neutrophil interactions with the vascular endothelium. *Int. Immunopharmacol.* *17*, 1167–1175.
- Dong, Y., Lagarde, J., Xicota, L., Corne, H., Chantran, Y., Chaigneau, T., Crestani, B., Bottlaender, M., Potier, M.-C., Aucouturier, P., et al. (2018). Neutrophil hyperactivation correlates with Alzheimer's disease progression: Neutrophil Hyperactivation in Alzheimer's Disease. *Annals of Neurology* *83*, 387–405.
- Dubois, B., Touchon, J., Portet, F., Ousset, P.J., Vellas, B., and Michel, B. (2002). “The 5 words”: a simple and sensitive test for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Presse Med* *31*, 1696–1699.
- Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Dekosky, S.T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., et al. (2007). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* *6*, 734–746.
- Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Hampel, H., Molinuevo, J.L., Blennow, K., DeKosky, S.T., Gauthier, S., Selkoe, D., Bateman, R., et al. (2014). Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol* *13*, 614–629.
- Dumas, A., Lagarde, S., Laflamme, C., and Pouliot, M. (2012). Oncostatin M decreases interleukin-1  $\beta$  secretion by human synovial fibroblasts and attenuates an acute inflammatory reaction in vivo. *J. Cell. Mol. Med.* *16*, 1274–1285.
- Dumurgier, J., Hugon, J., and Paquet, C. (2014). Biomarqueurs du liquide céphalo-rachidien dans la maladie d'Alzheimer. *Neuro-Gériatrie* 49–54.
- Dworski, R., Simon, H.-U., Hoskins, A., and Yousefi, S. (2011). Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *J. Allergy Clin. Immunol.* *127*, 1260–1266.
- Ebnet, K. (2004). Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *Journal of Cell Science* *117*, 19–29.
- Eken, C., Gasser, O., Zenhausern, G., Oehri, I., Hess, C., and Schifferli, J.A. (2008). Polymorphonuclear neutrophil-derived ectosomes interfere with the maturation of monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* *180*, 817–824.
- Eken, C., Martin, P.J., Sadallah, S., Treves, S., Schaller, M., and Schifferli, J.A. (2010). Ectosomes released by polymorphonuclear neutrophils induce a MerTK-dependent anti-inflammatory pathway in macrophages. *J. Biol. Chem.* *285*, 39914–39921.
- El Azreq, M.-A., Garceau, V., Harbour, D., Pivot-Pajot, C., and Bourgoin, S.G. (2010). Cytohesin-1 regulates the Arf6-phospholipase D signaling axis in human neutrophils: impact on superoxide anion production and secretion. *J. Immunol.* *184*, 637–649.
- El Kebir, D., and Filep, J.G. (2013). Targeting neutrophil apoptosis for enhancing the resolution of inflammation. *Cells* *2*, 330–348.

- El-Benna, J., Hurtado-Nedelec, M., Marzaioli, V., Marie, J.-C., Gougerot-Pocidalò, M.-A., and Dang, P.M.-C. (2016). Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol. Rev.* 273, 180–193.
- Elbim, C., Bailly, S., Chollet-Martin, S., Hakim, J., and Gougerot-Pocidalò, M.A. (1994). Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides. *Infect. Immun.* 62, 2195–2201.
- Ellis, T.N., and Beaman, B.L. (2004). Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunology* 112, 2–12.
- Esparza, T.J., Zhao, H., Cirrito, J.R., Cairns, N.J., Bateman, R.J., Holtzman, D.M., and Brody, D.L. (2013). Amyloid- $\beta$  oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. *Ann. Neurol.* 73, 104–119.
- Fan, Z., Brooks, D.J., Okello, A., and Edison, P. (2017). An early and late peak in microglial activation in Alzheimer’s disease trajectory. *Brain* 140, 792–803.
- Fanger, N.A., Liu, C., Guyre, P.M., Wardwell, K., O’Neil, J., Guo, T.L., Christian, T.P., Mudzinski, S.P., and Gosselin, E.J. (1997). Activation of human T cells by major histocompatibility complex class II expressing neutrophils: proliferation in the presence of superantigen, but not tetanus toxoid. *Blood* 89, 4128–4135.
- Farina, M., Avila, D.S., da Rocha, J.B.T., and Aschner, M. (2013). Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry International* 62, 575–594.
- Fiala, M., Lin, J., Ringman, J., Kermani-Arab, V., Tsao, G., Patel, A., Lossinsky, A.S., Graves, M.C., Gustavson, A., Sayre, J., et al. (2005). Ineffective phagocytosis of amyloid-beta by macrophages of Alzheimer’s disease patients. *J. Alzheimers Dis.* 7, 221–232; discussion 255–262.
- Filep, J.G., Zouki, C., Petasis, N.A., Hachicha, M., and Serhan, C.N. (1999). Anti-inflammatory actions of lipoxin A(4) stable analogs are demonstrable in human whole blood: modulation of leukocyte adhesion molecules and inhibition of neutrophil-endothelial interactions. *Blood* 94, 4132–4142.
- Fisher, Y., Nemirovsky, A., Baron, R., and Monsonego, A. (2010). T Cells Specifically Targeted to Amyloid Plaques Enhance Plaque Clearance in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *PLoS ONE* 5, e10830.
- Fletcher, M., Ramirez, M.E., Sierra, R.A., Raber, P., Thevenot, P., Al-Khami, A.A., Sanchez-Pino, D., Hernandez, C., Wyczechowska, D.D., Ochoa, A.C., et al. (2015). l-Arginine depletion blunts antitumor T-cell responses by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 75, 275–283.
- Folstein, M.F., Folstein, S.E., and McHugh, P.R. (1975). “Mini-mental state”. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12, 189–198.
- François, S., El Benna, J., Dang, P.M.C., Pedruzzi, E., Gougerot-Pocidalò, M.-A., and Elbim,

- C. (2005). Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad. *J. Immunol.* *174*, 3633–3642.
- Freitas, A., Alves-Filho, J.C., Secco, D.D., Neto, A.F., Ferreira, S.H., Barja-Fidalgo, C., and Cunha, F.Q. (2006). Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. *Br. J. Pharmacol.* *149*, 345–354.
- Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., and Albelda, S.M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* *16*, 183–194.
- Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* *176*, 231–241.
- Furman, J.L., Sama, D.M., Gant, J.C., Beckett, T.L., Murphy, M.P., Bachstetter, A.D., Van Eldik, L.J., and Norris, C.M. (2012). Targeting Astrocytes Ameliorates Neurologic Changes in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Journal of Neuroscience* *32*, 16129–16140.
- Futosi, K., Fodor, S., and Mócsai, A. (2013). Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int. Immunopharmacol.* *17*, 638–650.
- Gabelloni, M.L., Trevani, A.S., Sabatté, J., and Geffner, J. (2013). Mechanisms regulating neutrophil survival and cell death. *Semin Immunopathol* *35*, 423–437.
- Galea, I., Bechmann, I., and Perry, V.H. (2007). What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* *28*, 12–18.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C., and Kroemer, G. (2012). Non-apoptotic functions of apoptosis-regulatory proteins. *EMBO Rep.* *13*, 322–330.
- Gasser, O., and Schifferli, J.A. (2004). Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* *104*, 2543–2548.
- Gaudry, M., Brégerie, O., Andrieu, V., El Benna, J., Pocardalo, M.A., and Hakim, J. (1997). Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood* *90*, 4153–4161.
- Gauthier-Kemper, A., Weissmann, C., Golovyashkina, N., Sebö-Lemke, Z., Drewes, G., Gerke, V., Heinisch, J.J., and Brandt, R. (2011). The frontotemporal dementia mutation R406W blocks tau’s interaction with the membrane in an annexin A2-dependent manner. *J. Cell Biol.* *192*, 647–661.
- Geering, B., Stoeckle, C., Conus, S., and Simon, H.-U. (2013). Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol.* *34*, 398–409.
- Giddy, J.M., Gasche, Y.G., Copin, J.-C., Shah, A.R., Perez, R.S., Shapiro, S.D., Chan, P.H., and Park, T.S. (2005). Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am. J.*

Physiol. Heart Circ. Physiol. 289, H558–568.

Gimsa, U., Mitchison, N.A., and Brunner-Weinzierl, M.C. (2013). Immune Privilege as an Intrinsic CNS Property: Astrocytes Protect the CNS against T-Cell-Mediated Neuroinflammation. *Mediators of Inflammation* 2013, 1–11.

Van Gisbergen, K.P.J.M., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T.B.H., and van Kooyk, Y. (2005). Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J. Exp. Med.* 201, 1281–1292.

Glenner, G.G., and Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885–890.

Godefroy, E., Alameddine, J., Montassier, E., Mathé, J., Desfrancois-Noël, J., Marec, N., Bossard, C., Jarry, A., Bridonneau, C., Le Roy, A., et al. (2018). Expression of CCR6 and CXCR6 by Gut-derived CD4+/CD8alpha+ T-regulatory Cells Which are Decreased in Blood Samples From Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*.

Godyń, J., Jończyk, J., Panek, D., and Malawska, B. (2016). Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. *Pharmacol Rep* 68, 127–138.

Gómez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J.H., Petersen, R.C., Parisi, J.E., and Hyman, B.T. (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 41, 17–24.

Green, K.N., and LaFerla, F.M. (2008). Linking calcium to Aβeta and Alzheimer's disease. *Neuron* 59, 190–194.

Griciuc, A., Serrano-Pozo, A., Parrado, A.R., Lesinski, A.N., Asselin, C.N., Mullin, K., Hooli, B., Choi, S.H., Hyman, B.T., and Tanzi, R.E. (2013). Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron* 78, 631–643.

Grigorieva, D.V., Gorudko, I.V., Sokolov, A.V., Kostevich, V.A., Vasilyev, V.B., Cherenkevich, S.N., and Panasenko, O.M. (2016). Myeloperoxidase Stimulates Neutrophil Degranulation. *Bull. Exp. Biol. Med.* 161, 495–500.

Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J.S.K., Younkin, S., et al. (2013). TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 117–127.

Guillot-Sestier, M.-V., Doty, K.R., Gate, D., Rodriguez, J., Leung, B.P., Rezai-Zadeh, K., and Town, T. (2015). Il10 deficiency rebalances innate immunity to mitigate Alzheimer-like pathology. *Neuron* 85, 534–548.

Von Gunten, S., Yousefi, S., Seitz, M., Jakob, S.M., Schaffner, T., Seger, R., Takala, J., Villiger, P.M., and Simon, H.-U. (2005). Siglec-9 transduces apoptotic and nonapoptotic death signals into neutrophils depending on the proinflammatory cytokine environment. *Blood* 106, 1423–1431.

- Van de Haar, H.J., Burgmans, S., Hofman, P.A.M., Verhey, F.R.J., Jansen, J.F.A., and Backes, W.H. (2015). Blood-brain barrier impairment in dementia: current and future in vivo assessments. *Neurosci Biobehav Rev* 49, 71–81.
- Haass, C., Hung, A.Y., and Selkoe, D.J. (1991). Processing of beta-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *J. Neurosci.* 11, 3783–3793.
- Hakkim, A., Fuchs, T.A., Martinez, N.E., Hess, S., Prinz, H., Zychlinsky, A., and Waldmann, H. (2011). Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat. Chem. Biol.* 7, 75–77.
- Hanamsagar, R., Hanke, M.L., and Kielian, T. (2012). Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system. *Trends Immunol.* 33, 333–342.
- Haorah, J., Ramirez, S.H., Schall, K., Smith, D., Pandya, R., and Persidsky, Y. (2007). Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J. Neurochem.* 101, 566–576.
- Hatterer, E., Touret, M., Belin, M.-F., Honnorat, J., and Nataf, S. (2008). Cerebrospinal Fluid Dendritic Cells Infiltrate the Brain Parenchyma and Target the Cervical Lymph Nodes under Neuroinflammatory Conditions. *PLoS ONE* 3, e3321.
- Hawkes, N. (2017). Merck ends trial of potential Alzheimer’s drug verubecestat. *BMJ* 356, j845.
- Hebert, L.E., Bienias, J.L., Aggarwal, N.T., Wilson, R.S., Bennett, D.A., Shah, R.C., and Evans, D.A. (2010). Change in risk of Alzheimer disease over time. *Neurology* 75, 786–791.
- Heneka, M.T., Kummer, M.P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T.-C., et al. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer’s disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 493, 674–678.
- Heneka, M.T., Golenbock, D.T., and Latz, E. (2015). Innate immunity in Alzheimer’s disease. *Nat. Immunol.* 16, 229–236.
- Hickman, S.E., Allison, E.K., and El Khoury, J. (2008). Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer’s disease mice. *J. Neurosci.* 28, 8354–8360.
- Himmel, M.E., Crome, S.Q., Ivison, S., Piccirillo, C., Steiner, T.S., and Levings, M.K. (2011). Human CD4+ FOXP3+ regulatory T cells produce CXCL8 and recruit neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 41, 306–312.
- Himmler, A., Drechsel, D., Kirschner, M.W., and Martin, D.W. (1989). Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1381–1388.
- Hirano, Y., Aziz, M., and Wang, P. (2016). Role of reverse transendothelial migration of neutrophils in inflammation. *Biological Chemistry* 397.

## Références bibliographiques

---

- Holmes, C., Boche, D., Wilkinson, D., Yadegarfar, G., Hopkins, V., Bayer, A., Jones, R.W., Bullock, R., Love, S., Neal, J.W., et al. (2008). Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* 372, 216–223.
- Holmes, C., Cunningham, C., Zotova, E., Culliford, D., and Perry, V.H. (2011). Proinflammatory cytokines, sickness behavior, and Alzheimer disease. *Neurology* 77, 212–218.
- Hong, X.-P., Peng, C.-X., Wei, W., Tian, Q., Liu, Y.-H., Cao, F.-Y., Wang, Q., and Wang, J.-Z. (2011). Relationship of adult neurogenesis with tau phosphorylation and GSK-3 $\beta$  activity in subventricular zone. *Neurochem. Res.* 36, 288–296.
- Honig, L.S., Vellas, B., Woodward, M., Boada, M., Bullock, R., Borrie, M., Hager, K., Andreasen, N., Scarpini, E., Liu-Seifert, H., et al. (2018). Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 378, 321–330.
- Huang, J., Canadien, V., Lam, G.Y., Steinberg, B.E., Dinauer, M.C., Magalhaes, M.A.O., Glogauer, M., Grinstein, S., and Brumell, J.H. (2009). Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 6226–6231.
- Hugon, J., Paquet, C., and Chang, R.C.-C. (2009). Could PKR inhibition modulate human neurodegeneration? *Expert Rev Neurother* 9, 1455–1457.
- Ikehara, Y., Sato, T., Niwa, T., Nakamura, S., Gotoh, M., Ikehara, S.K., Kiyohara, K., Aoki, C., Iwai, T., Nakanishi, H., et al. (2006). Apical Golgi localization of N,N'-diacetyllactosylamine synthase, beta4GalNAc-T3, is responsible for LacdiNAc expression on gastric mucosa. *Glycobiology* 16, 777–785.
- Iking-Konert, C., Wagner, C., Deneffle, B., Hug, F., Schneider, M., Andrassy, K., and Hansch, G.M. (2002). Up-regulation of the dendritic cell marker CD83 on polymorphonuclear neutrophils (PMN): divergent expression in acute bacterial infections and chronic inflammatory disease. *Clin. Exp. Immunol.* 130, 501–508.
- Ingelsson, M., Fukumoto, H., Newell, K.L., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., Frosch, M.P., Albert, M.S., Hyman, B.T., and Irizarry, M.C. (2004). Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* 62, 925–931.
- Iqbal, N., Choudhary, R., Chan, J., Wentworth, B., Higginbotham, E., and Maisel, A.S. (2013). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as diagnostic and prognostic tool for cardiovascular disease and heart failure. *Expert Opin Med Diagn* 7, 209–220.
- Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wölfing, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I.A., et al. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142, 387–397.
- Janke, M., Poth, J., Wimmenauer, V., Giese, T., Coch, C., Barchet, W., Schlee, M., and Hartmann, G. (2009). Selective and direct activation of human neutrophils but not eosinophils by Toll-like receptor 8. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 1026–1033.



## Références bibliographiques

---

- Jeynes, B., and Provias, J. (2008). Evidence for altered LRP/RAGE expression in Alzheimer lesion pathogenesis. *Curr Alzheimer Res* 5, 432–437.
- Jucker, M., and Walker, L.C. (2013). Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 501, 45–51.
- Kadavath, H., Hofele, R.V., Biernat, J., Kumar, S., Tepper, K., Urlaub, H., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2015). Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 7501–7506.
- Kamp, V.M., Pillay, J., Lammers, J.-W.J., Pickkers, P., Ulfman, L.H., and Koenderman, L. (2012). Human suppressive neutrophils CD16bright/CD62Ldim exhibit decreased adhesion. *J. Leukoc. Biol.* 92, 1011–1020.
- Kannengiesser, C., Gérard, B., El Benna, J., Henri, D., Kroviarski, Y., Chollet-Martin, S., Gougerot-Pocidalo, M.-A., Elbim, C., and Grandchamp, B. (2008). Molecular epidemiology of chronic granulomatous disease in a series of 80 kindreds: identification of 31 novel mutations. *Hum. Mutat.* 29, E132–149.
- Karman, J., Ling, C., Sandor, M., and Fabry, Z. (2004). Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *J. Immunol.* 173, 2353–2361.
- Kasama, T., Miwa, Y., Isozaki, T., Odai, T., Adachi, M., and Kunkel, S.L. (2005). Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4, 273–279.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* 91, 461–553.
- Khandpur, R., Carmona-Rivera, C., Vivekanandan-Giri, A., Gizinski, A., Yalavarthi, S., Knight, J.S., Friday, S., Li, S., Patel, R.M., Subramanian, V., et al. (2013). NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* 5, 178ra40.
- Kim, J., Mori, T., Chen, S.L., Amersi, F.F., Martinez, S.R., Kuo, C., Turner, R.R., Ye, X., Bilchik, A.J., Morton, D.L., et al. (2006). Chemokine Receptor CXCR4 Expression in Patients With Melanoma and Colorectal Cancer Liver Metastases and the Association With Disease Outcome: *Annals of Surgery* 244, 113–120.
- Kjeldsen, L., Bainton, D.F., Sengeløv, H., and Borregaard, N. (1994). Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Blood* 83, 799–807.
- Klunk, W.E., Engler, H., Nordberg, A., Bacskai, B.J., Wang, Y., Price, J.C., Bergström, M., Hyman, B.T., Långström, B., and Mathis, C.A. (2003). Imaging the pathology of Alzheimer's disease: amyloid-imaging with positron emission tomography. *Neuroimaging Clin. N. Am.* 13, 781–789, ix.
- Kolaczowska, E., and Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 159–175.

- Kruzel, M.L., Actor, J.K., Boldogh, I., and Zimecki, M. (2007). Lactoferrin in health and disease. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* *61*, 261–267.
- Kuballa, P., Nolte, W.M., Castoreno, A.B., and Xavier, R.J. (2012). Autophagy and the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 611–646.
- Kuckleburg, C.J., Tilkens, S.B., Santoso, S., and Newman, P.J. (2012). Proteinase 3 contributes to transendothelial migration of NB1-positive neutrophils. *J. Immunol.* *188*, 2419–2426.
- Kuret, J., Congdon, E.E., Li, G., Yin, H., Yu, X., and Zhong, Q. (2005). Evaluating triggers and enhancers of tau fibrillization. *Microsc. Res. Tech.* *67*, 141–155.
- Lacor, P.N., Buniel, M.C., Furlow, P.W., Clemente, A.S., Velasco, P.T., Wood, M., Viola, K.L., and Klein, W.L. (2007). Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* *27*, 796–807.
- Lamagna, C., Meda, P., Mandicourt, G., Brown, J., Gilbert, R.J.C., Jones, E.Y., Kiefer, F., Ruga, P., Imhof, B.A., and Aurrand-Lions, M. (2005). Dual interaction of JAM-C with JAM-B and alpha(M)beta2 integrin: function in junctional complexes and leukocyte adhesion. *Mol. Biol. Cell* *16*, 4992–5003.
- Lamb, T.M., Knecht, A.K., Smith, W.C., Stachel, S.E., Economides, A.N., Stahl, N., Yancopolous, G.D., and Harland, R.M. (1993). Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* *262*, 713–718.
- Lambert, J.-C., Schraen-Maschke, S., Richard, F., Fievet, N., Rouaud, O., Berr, C., Dartigues, J.-F., Tzourio, C., Alpérovitch, A., Buée, L., et al. (2009). Association of plasma amyloid beta with risk of dementia: the prospective Three-City Study. *Neurology* *73*, 847–853.
- Lambert, J.C., Ibrahim-Verbaas, C.A., Harold, D., Naj, A.C., Sims, R., Bellenguez, C., DeStafano, A.L., Bis, J.C., Beecham, G.W., Grenier-Boley, B., et al. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* *45*, 1452–1458.
- Lampron, A., Elali, A., and Rivest, S. (2013). Innate immunity in the CNS: redefining the relationship between the CNS and Its environment. *Neuron* *78*, 214–232.
- Larbi, A., Pawelec, G., Witkowski, J.M., Schipper, H.M., Derhovanessian, E., Goldeck, D., and Fulop, T. (2009). Dramatic shifts in circulating CD4 but not CD8 T cell subsets in mild Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* *17*, 91–103.
- Lau, D., Mollnau, H., Eiserich, J.P., Freeman, B.A., Daiber, A., Gehling, U.M., Brummer, J., Rudolph, V., Munzel, T., Heitzer, T., et al. (2005). Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *102*, 431–436.
- Laurin, D., David Curb, J., Masaki, K.H., White, L.R., and Launer, L.J. (2009). Midlife C-reactive protein and risk of cognitive decline: a 31-year follow-up. *Neurobiol. Aging* *30*,

1724–1727.

Lawrence, S.M., Corriden, R., and Nizet, V. (2018). The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 82, e00057–17.

Lee, C.Y.D., and Landreth, G.E. (2010). The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm (Vienna)* 117, 949–960.

Legrand, D., Ellass, E., Carpentier, M., and Mazurier, J. (2005). Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2549–2559.

Leitch, A.E., Riley, N.A., Sheldrake, T.A., Festa, M., Fox, S., Duffin, R., Haslett, C., and Rossi, A.G. (2010). The cyclin-dependent kinase inhibitor R-roscovitine down-regulates Mcl-1 to override pro-inflammatory signalling and drive neutrophil apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 40, 1127–1138.

Levy, O., Martin, S., Eichenwald, E., Ganz, T., Valore, E., Carroll, S.F., Lee, K., Goldmann, D., and Thorne, G.M. (1999). Impaired innate immunity in the newborn: newborn neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein. *Pediatrics* 104, 1327–1333.

Lewis, H.D., Liddle, J., Coote, J.E., Atkinson, S.J., Barker, M.D., Bax, B.D., Bicker, K.L., Bingham, R.P., Campbell, M., Chen, Y.H., et al. (2015). Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nat. Chem. Biol.* 11, 189–191.

Lewis, J., Dickson, D.W., Lin, W.L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S.H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., et al. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293, 1487–1491.

Li, M., Ma, R.N., Li, L.H., Qu, Y.Z., and Gao, G.D. (2013). Astragaloside IV reduces cerebral edema post-ischemia/reperfusion correlating the suppression of MMP-9 and AQP4. *Eur. J. Pharmacol.* 715, 189–195.

Lima, A.P.V., Castilhos, R., and Chaves, M.L.F. (2017). The Use of the Clinical Dementia Rating Scale Sum of Boxes Scores in Detecting and Staging Cognitive Impairment/Dementia in Brazilian Patients With Low Educational Attainment. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 31, 322–327.

Liu, X., Wang, Z., Wu, Y., Wang, J., and Song, W. (2013). BACE2 degradation mediated by the macroautophagy-lysosome pathway. *Eur. J. Neurosci.* 37, 1970–1977.

London, A., Cohen, M., and Schwartz, M. (2013). Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7.

López-Toledano, M.A., and Shelanski, M.L. (2004). Neurogenic effect of beta-amyloid peptide in the development of neural stem cells. *J. Neurosci.* 24, 5439–5444.

Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T.J., Eccles, J.D., Rouhani, S.J., Peske, J.D., Derecki, N.C., Castle, D., Mandell, J.W., Lee, K.S., et al. (2015). Structural and functional features of central

nervous system lymphatic vessels. *Nature* 523, 337–341.

Loy, C.T., Schofield, P.R., Turner, A.M., and Kwok, J.B.J. (2014). Genetics of dementia. *Lancet* 383, 828–840.

Lueg, G., Gross, C.C., Lohmann, H., Johnen, A., Kemmling, A., Deppe, M., Groger, J., Minnerup, J., Wiendl, H., Meuth, S.G., et al. (2015). Clinical relevance of specific T-cell activation in the blood and cerebrospinal fluid of patients with mild Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 36, 81–89.

Ly, P.T.T., Wu, Y., Zou, H., Wang, R., Zhou, W., Kinoshita, A., Zhang, M., Yang, Y., Cai, F., Woodgett, J., et al. (2013). Inhibition of GSK3 $\beta$ -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes. *J. Clin. Invest.* 123, 224–235.

Ma, O., Hong, S., Guo, H., Ghiaur, G., and Friedman, A.D. (2014). Granulopoiesis requires increased C/EBP $\alpha$  compared to monopoiesis, correlated with elevated Cebpa in immature G-CSF receptor versus M-CSF receptor expressing cells. *PLoS ONE* 9, e95784.

Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., and Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 519–531.

Manzenreiter, R., Kienberger, F., Marcos, V., Schilcher, K., Krautgartner, W.D., Obermayer, A., Huml, M., Stoiber, W., Hector, A., Griese, M., et al. (2012). Ultrastructural characterization of cystic fibrosis sputum using atomic force and scanning electron microscopy. *J. Cyst. Fibros.* 11, 84–92.

Martinou, J.-C., and Youle, R.J. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev. Cell* 21, 92–101.

Masuda, T., Tsuda, M., Yoshinaga, R., Tozaki-Saitoh, H., Ozato, K., Tamura, T., and Inoue, K. (2012). IRF8 is a critical transcription factor for transforming microglia into a reactive phenotype. *Cell Rep* 1, 334–340.

Matsushima, H., Geng, S., Lu, R., Okamoto, T., Yao, Y., Mayuzumi, N., Kotol, P.F., Chojnacki, B.J., Miyazaki, T., Gallo, R.L., et al. (2013). Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood* 121, 1677–1689.

Mattsson, N., Zetterberg, H., Janelidze, S., Insel, P.S., Andreasson, U., Stomrud, E., Palmqvist, S., Baker, D., Tan Hehir, C.A., Jeromin, A., et al. (2016). Plasma tau in Alzheimer disease. *Neurology* 87, 1827–1835.

Mattsson, N., Smith, R., Strandberg, O., Palmqvist, S., Schöll, M., Insel, P.S., Hägerström, D., Ohlsson, T., Zetterberg, H., Blennow, K., et al. (2018). Comparing 18F-AV-1451 with CSF t-tau and p-tau for diagnosis of Alzheimer disease. *Neurology* 90, e388–e395.

McCracken, J.M., and Allen, L.-A.H. (2014). Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease. *J Cell Death* 7, 15–23.

Medawar, P.B. (1948). Tests by tissue culture methods on the nature of immunity to

transplanted skin. *Q J Microsc Sci* 89, 239–252.

Medeiros, R., Kitazawa, M., Passos, G.F., Baglietto-Vargas, D., Cheng, D., Cribbs, D.H., and LaFerla, F.M. (2013). Aspirin-triggered lipoxin A4 stimulates alternative activation of microglia and reduces Alzheimer disease-like pathology in mice. *Am. J. Pathol.* 182, 1780–1789.

Mitchell, A.J. (2009). A meta-analysis of the accuracy of the mini-mental state examination in the detection of dementia and mild cognitive impairment. *J Psychiatr Res* 43, 411–431.

Mitroulis, I., Kourtzelis, I., Kambas, K., Rafail, S., Chrysanthopoulou, A., Speletas, M., and Ritis, K. (2010). Regulation of the autophagic machinery in human neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 40, 1461–1472.

Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., and Malik, A.B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 1126–1167.

Mócsai, A. (2013). Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *The Journal of Experimental Medicine* 210, 1283–1299.

Moldovan, I., Galon, J., Maridonneau-Parini, I., Roman Roman, S., Mathiot, C., Fridman, W.H., and Sautès-Fridman, C. (1999). Regulation of production of soluble Fc gamma receptors type III in normal and pathological conditions. *Immunol. Lett.* 68, 125–134.

Monsonogo, A., Imitola, J., Petrovic, S., Zota, V., Nemirovsky, A., Baron, R., Fisher, Y., Owens, T., and Weiner, H.L. (2006). Abeta-induced meningoencephalitis is IFN-gamma-dependent and is associated with T cell-dependent clearance of Abeta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 5048–5053.

Moore, S., Evans, L.D.B., Andersson, T., Portelius, E., Smith, J., Dias, T.B., Saurat, N., McGlade, A., Kirwan, P., Blennow, K., et al. (2015). APP Metabolism Regulates Tau Proteostasis in Human Cerebral Cortex Neurons. *Cell Reports* 11, 689–696.

Morimoto, K., Horio, J., Satoh, H., Sue, L., Beach, T., Arita, S., Tooyama, I., and Konishi, Y. (2011). Expression profiles of cytokines in the brains of Alzheimer's disease (AD) patients compared to the brains of non-demented patients with and without increasing AD pathology. *J. Alzheimers Dis.* 25, 59–76.

Morin-Brureau, M., Lebrun, A., Rousset, M.-C., Fagni, L., Bockaert, J., de Bock, F., and Lerner-Natoli, M. (2011). Epileptiform activity induces vascular remodeling and zonula occludens 1 downregulation in organotypic hippocampal cultures: role of VEGF signaling pathways. *J. Neurosci.* 31, 10677–10688.

Morris, M., Maeda, S., Vessel, K., and Mucke, L. (2011). The many faces of tau. *Neuron* 70, 410–426.

Müller, F.-J., Snyder, E.Y., and Loring, J.F. (2006). Gene therapy: can neural stem cells deliver? *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 75–84.

Muresan, V., and Ladescu Muresan, Z. (2015). Amyloid- $\beta$  precursor protein: Multiple

fragments, numerous transport routes and mechanisms. *Exp. Cell Res.* 334, 45–53.

Murphy, J.B., and Sturm, E. (1923). CONDITIONS DETERMINING THE TRANSPLANTABILITY OF TISSUES IN THE BRAIN. *J. Exp. Med.* 38, 183–197.

Murray, M.E., Graff-Radford, N.R., Ross, O.A., Petersen, R.C., Duara, R., and Dickson, D.W. (2011). Neuropathologically defined subtypes of Alzheimer's disease with distinct clinical characteristics: a retrospective study. *Lancet Neurol* 10, 785–796.

Naegelen, I., Plançon, S., Nicot, N., Kaoma, T., Muller, A., Vallar, L., Tschirhart, E.J., and Bréchar, S. (2015). An essential role of syntaxin 3 protein for granule exocytosis and secretion of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12b, and CCL4 from differentiated HL-60 cells. *J. Leukoc. Biol.* 97, 557–571.

Nagase, H., Miyamasu, M., Yamaguchi, M., Imanishi, M., Tsuno, N.H., Matsushima, K., Yamamoto, K., Morita, Y., and Hirai, K. (2002). Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 71, 711–717.

Nagyoszi, P., Wilhelm, I., Farkas, A.E., Fazakas, C., Dung, N.T.K., Haskó, J., and Krizbai, I.A. (2010). Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochem. Int.* 57, 556–564.

Nakamura, A., Kaneko, N., Villemagne, V.L., Kato, T., Doecke, J., Doré, V., Fowler, C., Li, Q.-X., Martins, R., Rowe, C., et al. (2018). High performance plasma amyloid- $\beta$  biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature* 554, 249–254.

Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 173–182.

Naudé, P.J.W., Dekker, A.D., Coppus, A.M.W., Vermeiren, Y., Eisel, U.L.M., van Duijn, C.M., Van Dam, D., and De Deyn, P.P. (2015). Serum NGAL is Associated with Distinct Plasma Amyloid- $\beta$  Peptides According to the Clinical Diagnosis of Dementia in Down Syndrome. *J. Alzheimers Dis.* 45, 733–743.

Németh, T., and Mócsai, A. (2012). The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunol. Lett.* 143, 9–19.

Nguyen, G.T., Green, E.R., and Meccas, J. (2017). Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 373.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314–1318.

Nordenfelt, P., and Tapper, H. (2011). Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 90, 271–284.

Nourshargh, S., Renshaw, S.A., and Imhof, B.A. (2016). Reverse Migration of Neutrophils: Where, When, How, and Why? *Trends Immunol.* 37, 273–286.

O'Bryant, S.E., Mielke, M.M., Rissman, R.A., Lista, S., Vanderstichele, H., Zetterberg, H.,



## Références bibliographiques

---

- Lewczuk, P., Posner, H., Hall, J., Johnson, L., et al. (2017). Blood-based biomarkers in Alzheimer disease: Current state of the science and a novel collaborative paradigm for advancing from discovery to clinic. *Alzheimers Dement* 13, 45–58.
- Olsson, B., Lautner, R., Andreasson, U., Öhrfelt, A., Portelius, E., Bjerke, M., Hölttä, M., Rosén, C., Olsson, C., Strobel, G., et al. (2016). CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 15, 673–684.
- Orgogozo, J.-M., Gilman, S., Dartigues, J.-F., Laurent, B., Puel, M., Kirby, L.C., Jouanny, P., Dubois, B., Eisner, L., Flitman, S., et al. (2003). Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 61, 46–54.
- Ouyang, W., Kolls, J.K., and Zheng, Y. (2008). The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28, 454–467.
- Le Page, A., Lamoureux, J., Bourgade, K., Frost, E.H., Pawelec, G., Witkowski, J.M., Larbi, A., Dupuis, G., and Fülöp, T. (2017). Polymorphonuclear Neutrophil Functions are Differentially Altered in Amnesic Mild Cognitive Impairment and Mild Alzheimer's Disease Patients. *J. Alzheimers Dis.* 60, 23–42.
- Pallister, I., Bhatia, R., Katpalli, G., Allison, D., Parker, C., and Topley, N. (2006). Alteration of polymorphonuclear neutrophil surface receptor expression and migratory activity after isolation: comparison of whole blood and isolated PMN preparations from normal and postfracture trauma patients. *J Trauma* 60, 844–850.
- Palop, J.J., and Mucke, L. (2010). Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat. Neurosci.* 13, 812–818.
- Pankratz, V.S., Roberts, R.O., Mielke, M.M., Knopman, D.S., Jack, C.R., Geda, Y.E., Rocca, W.A., and Petersen, R.C. (2015). Predicting the risk of mild cognitive impairment in the Mayo Clinic Study of Aging. *Neurology* 84, 1433–1442.
- Panza, F., Solfrizzi, V., Imbimbo, B.P., and Logroscino, G. (2014). Amyloid-directed monoclonal antibodies for the treatment of Alzheimer's disease: the point of no return? *Expert Opin Biol Ther* 14, 1465–1476.
- Panza, F., Solfrizzi, V., Seripa, D., Imbimbo, B.P., Lozupone, M., Santamato, A., Zecca, C., Barulli, M.R., Bellomo, A., Pilotto, A., et al. (2016). Tau-Centric Targets and Drugs in Clinical Development for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int* 2016, 3245935.
- Park, J., Wysocki, R.W., Amoozgar, Z., Maiorino, L., Fein, M.R., Jorns, J., Schott, A.F., Kinugasa-Katayama, Y., Lee, Y., Won, N.H., et al. (2016). Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Sci Transl Med* 8, 361ra138.
- Parker, H., and Winterbourn, C.C. (2012). Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Front Immunol* 3, 424.
- Pashevin, D.O., Nagibin, V.S., Tumanovska, L.V., Moibenko, A.A., and Dosenko, V.E. (2015). Proteasome Inhibition Diminishes the Formation of Neutrophil Extracellular Traps and Prevents the Death of Cardiomyocytes in Coculture with Activated Neutrophils during

Anoxia-Reoxygenation. *Pathobiology* 82, 290–298.

Perdiguero, E.G., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., et al. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547–551.

Perobelli, S.M., Mercadante, A.C.T., Galvani, R.G., Gonçalves-Silva, T., Alves, A.P.G., Pereira-Neves, A., Benchimol, M., Nóbrega, A., and Bonomo, A. (2016). G-CSF-Induced Suppressor IL-10+ Neutrophils Promote Regulatory T Cells That Inhibit Graft-Versus-Host Disease in a Long-Lasting and Specific Way. *J. Immunol.* 197, 3725–3734.

Perry, V.H., and Holmes, C. (2014). Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 10, 217–224.

Petersen, R.C., Caracciolo, B., Brayne, C., Gauthier, S., Jelic, V., and Fratiglioni, L. (2014). Mild cognitive impairment: a concept in evolution. *J. Intern. Med.* 275, 214–228.

Phillipson, M., Heit, B., Colarusso, P., Liu, L., Ballantyne, C.M., and Kubes, P. (2006). Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J. Exp. Med.* 203, 2569–2575.

Pihlaja, R., Koistinaho, J., Kauppinen, R., Sandholm, J., Tanila, H., and Koistinaho, M. (2011). Multiple cellular and molecular mechanisms are involved in human A $\beta$  clearance by transplanted adult astrocytes. *Glia* 59, 1643–1657.

Pillay, J., Kamp, V.M., van Hoffen, E., Visser, T., Tak, T., Lammers, J.-W., Ulfman, L.H., Leenen, L.P., Pickkers, P., and Koenderman, L. (2012). A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.* 122, 327–336.

Plant, L.D., Boyle, J.P., Smith, I.F., Peers, C., and Pearson, H.A. (2003). The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J. Neurosci.* 23, 5531–5535.

Porrini, V., Lanzillotta, A., Branca, C., Benarese, M., Parrella, E., Lorenzini, L., Calzà, L., Flaibani, R., Spano, P.F., Imbimbo, B.P., et al. (2015). CHF5074 (CSP-1103) induces microglia alternative activation in plaque-free Tg2576 mice and primary glial cultures exposed to beta-amyloid. *Neuroscience* 302, 112–120.

Potter, N.S., and Harding, C.V. (2001). Neutrophils process exogenous bacteria via an alternate class I MHC processing pathway for presentation of peptides to T lymphocytes. *J. Immunol.* 167, 2538–2546.

Prince, L.R., Whyte, M.K., Sabroe, I., and Parker, L.C. (2011). The role of TLRs in neutrophil activation. *Curr Opin Pharmacol* 11, 397–403.

Proding, C., Bunse, J., Krüger, M., Schiefenhövel, F., Brandt, C., Laman, J.D., Greter, M., Immig, K., Heppner, F., Becher, B., et al. (2011). CD11c-expressing cells reside in the juxtavascular parenchyma and extend processes into the glia limitans of the mouse nervous system. *Acta Neuropathol.* 121, 445–458.

## Références bibliographiques

---

- Puellmann, K., Kaminski, W.E., Vogel, M., Nebe, C.T., Schroeder, J., Wolf, H., and Beham, A.W. (2006). A variable immunoreceptor in a subpopulation of human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 14441–14446.
- Ransohoff, R.M., and Engelhardt, B. (2012). The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 623–635.
- Rebecchi, I.M., Ferreira Novo, N., Julian, Y., and Campa, A. (2000). Oxidative metabolism and release of myeloperoxidase from polymorphonuclear leukocytes obtained from blood sedimentation in a Ficoll-Hypaque gradient. *Cell Biochem. Funct.* *18*, 127–132.
- Renaud, J., Thérien, H.-M., Plouffe, M., and Martinoli, M.-G. (2015). Neuroinflammation: Dr Jekyll or Mr Hyde? *Med Sci (Paris)* *31*, 979–988.
- Repp, R., Valerius, T., Sandler, A., Gramatzki, M., Iro, H., Kalden, J.R., and Platzer, E. (1991). Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* *78*, 885–889.
- Richards, M.K., Liu, F., Iwasaki, H., Akashi, K., and Link, D.C. (2003). Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway. *Blood* *102*, 3562–3568.
- Riffelmacher, T., Clarke, A., Richter, F.C., Stranks, A., Pandey, S., Danielli, S., Hublitz, P., Yu, Z., Johnson, E., Schwerd, T., et al. (2017). Autophagy-Dependent Generation of Free Fatty Acids Is Critical for Normal Neutrophil Differentiation. *Immunity* *47*, 466–480.e5.
- Rivas-Fuentes, S., García-García, E., Nieto-Castañeda, G., and Rosales, C. (2010). Fc gamma receptors exhibit different phagocytosis potential in human neutrophils. *Cell. Immunol.* *263*, 114–121.
- Roberson, E.D., Halabisky, B., Yoo, J.W., Yao, J., Chin, J., Yan, F., Wu, T., Hamto, P., Devidze, N., Yu, G.-Q., et al. (2011). Amyloid- $\beta$ /Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* *31*, 700–711.
- Rørvig, S., Østergaard, O., Heegaard, N.H.H., and Borregaard, N. (2013). Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. *J. Leukoc. Biol.* *94*, 711–721.
- Rosenkranz, D., Weyer, S., Tolosa, E., Gaenslen, A., Berg, D., Leyhe, T., Gasser, T., and Stoltze, L. (2007). Higher frequency of regulatory T cells in the elderly and increased suppressive activity in neurodegeneration. *J. Neuroimmunol.* *188*, 117–127.
- Rossi, G., and Tagliavini, F. (2015). Frontotemporal lobar degeneration: old knowledge and new insight into the pathogenetic mechanisms of tau mutations. *Frontiers in Aging Neuroscience* *7*.
- Rumble, J.M., Huber, A.K., Krishnamoorthy, G., Srinivasan, A., Giles, D.A., Zhang, X., Wang, L., and Segal, B.M. (2015). Neutrophil-related factors as biomarkers in EAE and MS. *J. Exp. Med.* *212*, 23–35.

- Rydell-Törmänen, K., Uller, L., and Erjefält, J.S. (2006). Neutrophil cannibalism--a back up when the macrophage clearance system is insufficient. *Respir. Res.* 7, 143.
- Sachdev, P.S., Blacker, D., Blazer, D.G., Ganguli, M., Jeste, D.V., Paulsen, J.S., and Petersen, R.C. (2014). Classifying neurocognitive disorders: the DSM-5 approach. *Nat Rev Neurol* 10, 634–642.
- Saffarzadeh, M., Juenemann, C., Queisser, M.A., Lochnit, G., Barreto, G., Galuska, S.P., Lohmeyer, J., and Preissner, K.T. (2012). Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS ONE* 7, e32366.
- Sareila, O., Kelkka, T., Pizzolla, A., Hultqvist, M., and Holmdahl, R. (2011). NOX2 complex-derived ROS as immune regulators. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 2197–2208.
- Saresella, M., Calabrese, E., Marventano, I., Piancone, F., Gatti, A., Calvo, M.G., Nemni, R., and Clerici, M. (2010). PD1 negative and PD1 positive CD4+ T regulatory cells in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 21, 927–938.
- Sauce, D., Dong, Y., Campillo-Gimenez, L., Casulli, S., Bayard, C., Autran, B., Boddaert, J., Appay, V., and Elbim, C. (2017). Reduced Oxidative Burst by Primed Neutrophils in the Elderly Individuals Is Associated With Increased Levels of the CD16bright/CD62Ldim Immunosuppressive Subset. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 72, 163–172.
- Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C., and Haslett, C. (2002). A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 965–975.
- Scali, C., Prosperi, C., Bracco, L., Piccini, C., Baronti, R., Ginestroni, A., Sorbi, S., Pepeu, G., and Casamenti, F. (2002). Neutrophils CD11b and fibroblasts PGE(2) are elevated in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 23, 523–530.
- Scapini, P., Lapinet-Vera, J.A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F., and Cassatella, M.A. (2000). The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol. Rev.* 177, 195–203.
- Schwalbe, M., Kadavath, H., Biernat, J., Ozenne, V., Blackledge, M., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2015). Structural Impact of Tau Phosphorylation at Threonine 231. *Structure* 23, 1448–1458.
- Schwartz, M., and Baruch, K. (2014). The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: leukocyte recruitment via the choroid plexus. *EMBO J.* 33, 7–22.
- Schwartz, M., and Shechter, R. (2010). Systemic inflammatory cells fight off neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 6, 405–410.
- Selkoe, D.J. (2011). Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics. *Nat. Med.* 17, 1060–1065.
- Selvaraj, P., Fifadara, N., Nagarajan, S., Cimino, A., and Wang, G. (2004). Functional regulation of human neutrophil Fc gamma receptors. *Immunol. Res.* 29, 219–230.
- Serhan, C.N., Chiang, N., and Van Dyke, T.E. (2008). Resolving inflammation: dual anti-

inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 349–361.

Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., and Hyman, B.T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1, a006189.

Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., et al. (2008). Amyloid- $\beta$  protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine* 14, 837–842.

Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R.A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Dang, V.D., Jaimes, Y., Daridon, C., et al. (2014). IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* 507, 366–370.

Shoemark, D.K., and Allen, S.J. (2015). The microbiome and disease: reviewing the links between the oral microbiome, aging, and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 43, 725–738.

Silva, M.T. (2011). Macrophage phagocytosis of neutrophils at inflammatory/infectious foci: a cooperative mechanism in the control of infection and infectious inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 89, 675–683.

Simpson, J.R. (2014). DSM-5 and neurocognitive disorders. *J. Am. Acad. Psychiatry Law* 42, 159–164.

Singer, B.B., Klaile, E., Scheffrahn, I., Müller, M.M., Kammerer, R., Reutter, W., Obrink, B., and Lucka, L. (2005). CEACAM1 (CD66a) mediates delay of spontaneous and Fas ligand-induced apoptosis in granulocytes. *Eur. J. Immunol.* 35, 1949–1959.

Sisodia, S.S. (1992). Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 6075–6079.

Soehnlein, O., Kai-Larsen, Y., Frithiof, R., Sorensen, O.E., Kenne, E., Scharffetter-Kochanek, K., Eriksson, E.E., Herwald, H., Agerberth, B., and Lindbom, L. (2008). Neutrophil primary granule proteins HBP and HNP1-3 boost bacterial phagocytosis by human and murine macrophages. *J. Clin. Invest.* 118, 3491–3502.

Soehnlein, O., Weber, C., and Lindbom, L. (2009). Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol.* 30, 538–546.

Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 7–35.

Sogorb-Esteve, A., García-Ayllón, M.-S., Fortea, J., Sánchez-Valle, R., Lleó, A., Molinuevo, J.-L., and Sáez-Valero, J. (2016). Cerebrospinal fluid Presenilin-1 increases at asymptomatic stage in genetically determined Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration* 11.

Del Sole, A., Malaspina, S., and Magenta Biasina, A. (2016). Magnetic resonance imaging and positron emission tomography in the diagnosis of neurodegenerative dementias. *Funct. Neurol.* 31, 205–215.

- Sollberger, G., Tilley, D.O., and Zychlinsky, A. (2018). Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. *Dev. Cell* 44, 542–553.
- Sondag, C.M., Dhawan, G., and Combs, C.K. (2009). Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia. *J Neuroinflammation* 6, 1.
- Sontag, J.-M., Wasek, B., Taleski, G., Smith, J., Arning, E., Sontag, E., and Bottiglieri, T. (2014). Altered protein phosphatase 2A methylation and Tau phosphorylation in the young and aged brain of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) deficient mice. *Frontiers in Aging Neuroscience* 6.
- Sperling, R.A., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Bennett, D.A., Craft, S., Fagan, A.M., Iwatsubo, T., Jack, C.R., Kaye, J., Montine, T.J., et al. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7, 280–292.
- Spinney, L. (2014). Alzheimer's disease: The forgetting gene. *Nature* 510, 26–28.
- Stark, M.A., Huo, Y., Burcin, T.L., Morris, M.A., Olson, T.S., and Ley, K. (2005). Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 22, 285–294.
- Stein, T.D., Alvarez, V.E., and McKee, A.C. (2014). Chronic traumatic encephalopathy: a spectrum of neuropathological changes following repetitive brain trauma in athletes and military personnel. *Alzheimers Res Ther* 6, 4.
- Steinberg, S., Stefansson, H., Jonsson, T., Johannsdottir, H., Ingason, A., Helgason, H., Sulem, P., Magnusson, O.T., Gudjonsson, S.A., Unnsteinsdottir, U., et al. (2015). Loss-of-function variants in ABCA7 confer risk of Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 47, 445–447.
- Stenberg, A., Sehlin, J., and Oldenborg, P.-A. (2013). Neutrophil apoptosis is associated with loss of signal regulatory protein alpha (SIRP $\alpha$ ) from the cell surface. *J. Leukoc. Biol.* 93, 403–412.
- Streit, W.J. (2005). Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 48, 234–239.
- Stroopinsky, D., Katz, T., Rowe, J.M., Melamed, D., and Avivi, I. (2012). Rituximab-induced direct inhibition of T-cell activation. *Cancer Immunol. Immunother.* 61, 1233–1241.
- Summers, C., Rankin, S.M., Condliffe, A.M., Singh, N., Peters, A.M., and Chilvers, E.R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 31, 318–324.
- Takeda, S., Hashimoto, T., Roe, A.D., Hori, Y., Spires-Jones, T.L., and Hyman, B.T. (2013). Brain interstitial oligomeric amyloid  $\beta$  increases with age and is resistant to clearance from brain in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 27, 3239–3248.
- Tamassia, N., Le Moigne, V., Rossato, M., Donini, M., McCartney, S., Calzetti, F., Colonna, M., Bazzoni, F., and Cassatella, M.A. (2008). Activation of an immunoregulatory and



## Références bibliographiques

---

antiviral gene expression program in poly(I:C)-transfected human neutrophils. *J. Immunol.* *181*, 6563–6573.

Tanaka, S., Nakamura, S., Ueda, K., Kameyama, M., Shiojiri, S., Takahashi, Y., Kitaguchi, N., and Ito, H. (1988). Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: Their differential expression in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *157*, 472–479.

Taylor, A.L., Bonventre, J.V., Uliasz, T.F., Hewett, J.A., and Hewett, S.J. (2008). Cytosolic phospholipase A2a inhibition prevents neuronal NMDA receptor-stimulated arachidonic acid mobilization and prostaglandin production but not subsequent cell death. *Journal of Neurochemistry*.

Taylor, A.M.W., Castonguay, A., Taylor, A.J., Murphy, N.P., Ghogha, A., Cook, C., Xue, L., Olmstead, M.C., De Koninck, Y., Evans, C.J., et al. (2015). Microglia disrupt mesolimbic reward circuitry in chronic pain. *J. Neurosci.* *35*, 8442–8450.

Tecchio, C., Micheletti, A., and Cassatella, M.A. (2014). Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front Immunol* *5*, 508.

Teipel, S., Drzezga, A., Grothe, M.J., Barthel, H., Chételat, G., Schuff, N., Skudlarski, P., Cavado, E., Frisoni, G.B., Hoffmann, W., et al. (2015). Multimodal imaging in Alzheimer's disease: validity and usefulness for early detection. *Lancet Neurol* *14*, 1037–1053.

Tharp, W.G., Yadav, R., Irimia, D., Upadhyaya, A., Samadani, A., Hurtado, O., Liu, S.-Y., Munisamy, S., Brainard, D.M., Mahon, M.J., et al. (2006). Neutrophil chemorepulsion in defined interleukin-8 gradients in vitro and in vivo. *J. Leukoc. Biol.* *79*, 539–554.

Thomas, C.J., and Schroder, K. (2013). Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends Immunol.* *34*, 317–328.

Tietz, S., and Engelhardt, B. (2015). Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *J. Cell Biol.* *209*, 493–506.

Tohyama, Y., and Yamamura, H. (2006). Complement-mediated phagocytosis--the role of Syk. *IUBMB Life* *58*, 304–308.

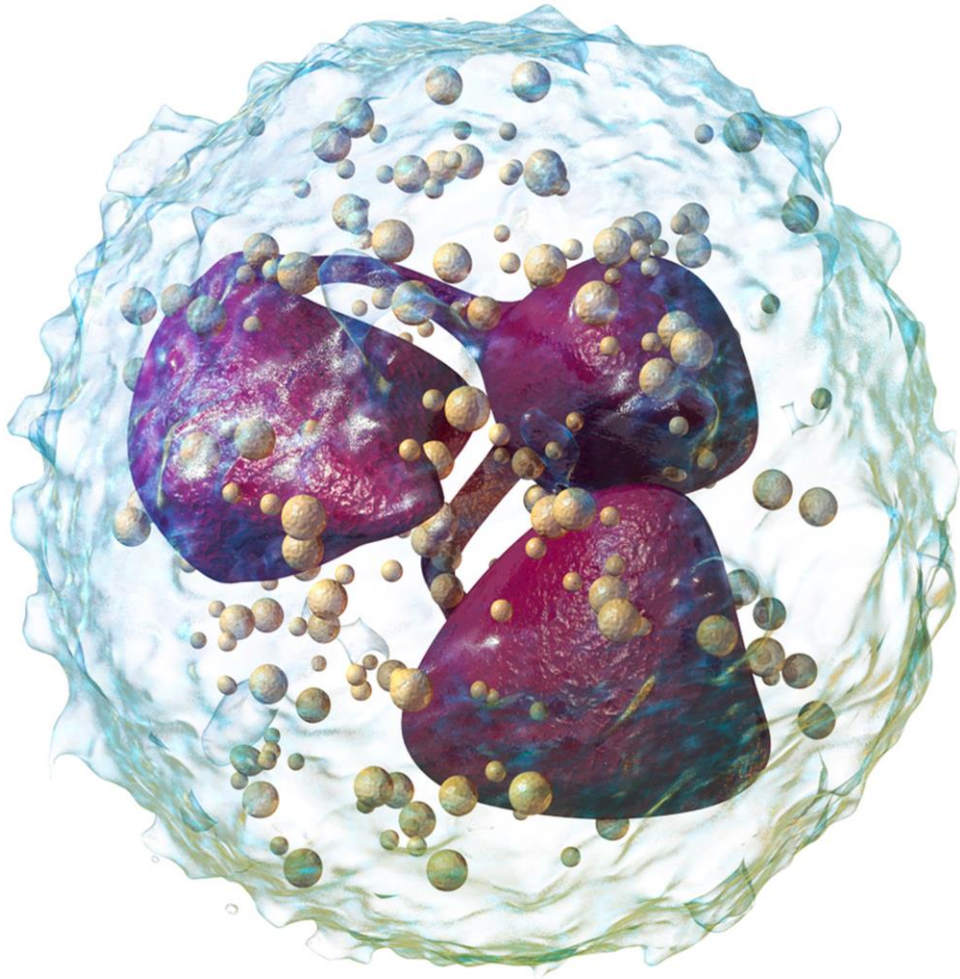
Toly-Ndour, C., Lui, G., Nunes, M.M., Bruley-Rosset, M., Aucouturier, P., and Dorothée, G. (2011). MHC-independent genetic factors control the magnitude of CD4<sup>+</sup> T cell responses to amyloid- $\beta$  peptide in mice through regulatory T cell-mediated inhibition. *J. Immunol.* *187*, 4492–4500.

Uhl, B., Vadlau, Y., Zuchtriegel, G., Nekolla, K., Sharaf, K., Gaertner, F., Massberg, S., Krombach, F., and Reichel, C.A. (2016). Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood* *128*, 2327–2337.

Urban, C.F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P.R., and Zychlinsky, A. (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* *5*, e1000639.

- Uriarte, S.M., Rane, M.J., Luerman, G.C., Barati, M.T., Ward, R.A., Nauseef, W.M., and McLeish, K.R. (2011). Granule exocytosis contributes to priming and activation of the human neutrophil respiratory burst. *J. Immunol.* *187*, 391–400.
- Venneri, A., Gorgoglione, G., Toraci, C., Nocetti, L., Panzetti, P., and Nichelli, P. (2011). Combining neuropsychological and structural neuroimaging indicators of conversion to Alzheimer's disease in amnesic mild cognitive impairment. *Curr Alzheimer Res* *8*, 789–797.
- Vidal, R., Calero, M., Piccardo, P., Farlow, M.R., Unverzagt, F.W., Méndez, E., Jiménez-Huete, A., Beavis, R., Gallo, G., Gomez-Tortosa, E., et al. (2000). Senile dementia associated with amyloid beta protein angiopathy and tau perivascular pathology but not neuritic plaques in patients homozygous for the APOE-epsilon4 allele. *Acta Neuropathol.* *100*, 1–12.
- Villanueva, E., Yalavarthi, S., Berthier, C.C., Hodgins, J.B., Khandpur, R., Lin, A.M., Rubin, C.J., Zhao, W., Olsen, S.H., Klinker, M., et al. (2011). Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* *187*, 538–552.
- Vlassenko, A.G., and Raichle, M.E. (2015). Brain aerobic glycolysis functions and Alzheimer's disease. *Clin Transl Imaging* *3*, 27–37.
- Wake, H., Lee, P.R., and Fields, R.D. (2011). Control of local protein synthesis and initial events in myelination by action potentials. *Science* *333*, 1647–1651.
- Wallace, D.L., and Beverley, P.C. (1993). Characterization of a novel subset of T cells from human spleen that lacks L-selectin. *Immunology* *78*, 623–628.
- Wang, X., Zhou, X., Li, G., Zhang, Y., Wu, Y., and Song, W. (2017). Modifications and Trafficking of APP in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience* *10*.
- Wang, X., Thompson, C.D., Weidenmaier, C., and Lee, J.C. (2018). Release of *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles and their application as a vaccine platform. *Nat Commun* *9*, 1379.
- Welin, A., Amirbeagi, F., Christenson, K., Björkman, L., Björnsdóttir, H., Forsman, H., Dahlgren, C., Karlsson, A., and Bylund, J. (2013). The human neutrophil subsets defined by the presence or absence of OLFM4 both transmigrate into tissue in vivo and give rise to distinct NETs in vitro. *PLoS ONE* *8*, e69575.
- Xie, Q., Klesney-Tait, J., Keck, K., Parlet, C., Borchering, N., Kolb, R., Li, W., Tygrett, L., Waldschmidt, T., Olivier, A., et al. (2015). Characterization of a novel mouse model with genetic deletion of CD177. *Protein Cell* *6*, 117–126.
- Yang, D., and Oppenheim, J.J. (2009). Alarmins and antimicrobial immunity. *Med. Mycol.* *47 Suppl 1*, S146–153.
- Yang, D., Chen, Q., Chertov, O., and Oppenheim, J.J. (2000). Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* *68*, 9–14.

- Yang, D., de la Rosa, G., Tewary, P., and Oppenheim, J.J. (2009). Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol.* *30*, 531–537.
- Yang, D., Wei, F., Tewary, P., Howard, O.M.Z., and Oppenheim, J.J. (2013). Alarmin-induced cell migration. *Eur. J. Immunol.* *43*, 1412–1418.
- Yang, H., Jiang, H., Song, Y., Chen, D.J., Shen, X.J., and Chen, J.H. (2018). Neutrophil CD16b crosslinking induces lipid raft-mediated activation of SHP-2 and affects cytokine expression and retarded neutrophil apoptosis. *Exp. Cell Res.* *362*, 121–131.
- Yong Kim, S., Jeong, S., Chah, K.-H., Jung, E., Baek, K.-H., Kim, S.-T., Shim, J.-H., Chun, E., and Lee, K.-Y. (2013). Salt-inducible kinases 1 and 3 negatively regulate Toll-like receptor 4-mediated signal. *Mol. Endocrinol.* *27*, 1958–1968.
- Yoshimura, A., Nishinakamura, H., Matsumura, Y., and Hanada, T. (2005). Negative regulation of cytokine signaling and immune responses by SOCS proteins. *Arthritis Res. Ther.* *7*, 100–110.
- Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., and Simon, H.U. (2009). Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* *16*, 1438–1444.
- Yu, H., Huang, J., Wang, S., Zhao, G., Jiao, X., and Zhu, L. (2013). Overexpression of Smad7 suppressed ROS/MMP9-dependent collagen synthesis through regulation of heme oxygenase-1. *Mol. Biol. Rep.* *40*, 5307–5314.
- Zenaro, E., Pietronigro, E., Bianca, V.D., Piacentino, G., Marongiu, L., Budui, S., Turano, E., Rossi, B., Angiari, S., Dusi, S., et al. (2015). Neutrophils promote Alzheimer’s disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nature Medicine* *21*, 880–886.
- Zhang, D., Chen, G., Manwani, D., Mortha, A., Xu, C., Faith, J.J., Burk, R.D., Kunisaki, Y., Jang, J.-E., Scheiermann, C., et al. (2015). Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature* *525*, 528–532.
- Zhao, Z., Sagare, A.P., Ma, Q., Halliday, M.R., Kong, P., Kisler, K., Winkler, E.A., Ramanathan, A., Kanekiyo, T., Bu, G., et al. (2015). Central role for PICALM in amyloid- $\beta$  blood-brain barrier transcytosis and clearance. *Nat. Neurosci.* *18*, 978–987.
- Zotova, E., Bharambe, V., Cheaveau, M., Morgan, W., Holmes, C., Harris, S., Neal, J.W., Love, S., Nicoll, J.A.R., and Boche, D. (2013). Inflammatory components in human Alzheimer’s disease and after active amyloid- $\beta$ 42 immunization. *Brain* *136*, 2677–2696.
- Zou, W., and Restifo, N.P. (2010). T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 248–256.



## **Annexes**

Article I

**Reduced Oxidative Burst by Primed Neutrophils in the Elderly  
Individuals Is Associated With Increased Levels of the  
CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> Immunosuppressive Subset**

Auteurs :

Delphine Sauce, **Yuan Dong**, Laure Campillo-Gimenez, Sarah Casulli, Charles Bayard,  
Brigitte Autran, Jacques Boddaert, Victor Appay, Carole Elbim

Publié dans le journal « Journals of Gerontology: Biological Sciences », 2017 Feb;72(2):163-172

Original Article

# Reduced Oxidative Burst by Primed Neutrophils in the Elderly Individuals Is Associated With Increased Levels of the CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> Immunosuppressive Subset

Delphine Sauce,<sup>1,2</sup> Yuan Dong,<sup>1,3</sup> Laure Campillo-Gimenez,<sup>1,2</sup> Sarah Casulli,<sup>1,2</sup> Charles Bayard,<sup>1,2</sup> Brigitte Autran,<sup>2,4</sup> Jacques Boddart,<sup>5</sup> Victor Appay,<sup>1,2</sup> and Carole Elbim<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, DHU FAST, CR7, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), France. <sup>2</sup>INSERM, U1135, CIMI-Paris, France. <sup>3</sup>INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris, France. <sup>4</sup>AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Tissulaire, Paris, France. <sup>5</sup>AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service de Gériatrie, Paris, France.

Address correspondence to Carole Elbim, MD, PhD, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, DHU FAST, CR7, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Paris, France. E-mail: [carole.elbim@upmc.fr](mailto:carole.elbim@upmc.fr)

Received November 9, 2015; Accepted March 16, 2016

**Decision Editor:** Rafael de Cabo, PhD

## Abstract

The aim of our study was to analyze polymorphonuclear neutrophil (PMN) functions in elderly individuals compared with those in healthy young participants, directly in whole blood to avoid issues with data interpretation related to cell isolation procedures. Despite the presence of increased circulating levels of proinflammatory cytokines, resting PMNs from the elderly individuals were not activated as shown by normal CD62L and CD11b expression at the PMN surface and normal constitutive reactive oxygen species (ROS) production. However, suboptimal stimulation induced modulations of CD62L and CD11b expression, which positively correlated with the interleukin-6 circulating level, suggesting a possible *in vivo* preactivation of old PMNs by this cytokine. In addition, PMN phagocytosis of opsonized *Escherichia Coli* was decreased in elderly individuals. Furthermore, upon preincubation of elderly whole-blood samples with tumor necrosis factor- $\alpha$  or Toll Receptor agonists, we observed a reduced PMN oxidative burst in response to formyl peptides. Elderly participants also exhibited an increased percentage of the immunosuppressive CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> PMN subpopulation, which was characterized by a lower phagocytic index and a reduced ROS production compared with the CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>bright</sup> subset. Thus, the reduced phagocytosis and ROS production associated with an expansion of immunosuppressive CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> PMN subpopulation might be involved in the increased susceptibility to bacterial and fungal infections with old age.

**Keywords:** Biology of aging—Human aging—Immunosenescence—Reactive oxygen species

The decline of immune competence is a well-established consequence of aging. This decline, also referred to as immunosenescence, is reflected by deregulation of the immune system, characterized by changes in cellular phenotype and function, and alterations of whole organs. These changes are believed to contribute to the increased susceptibility to and severity of infectious diseases, cancer, and autoimmune diseases, which characterize the individual of advanced age (1). In addition, the establishment of a chronic subclinical systemic inflammatory state, termed inflammaging, is thought to participate in accelerated immune aging (2).

The impact of aging on immunity has been mainly addressed within the context of the acquired arm of the immune system, generally referring to the altered functions of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (3). In contrast, knowledge concerning age-related defects of the innate immune system is scarce (4,5). Among the cells of the innate response, polymorphonuclear neutrophils (PMNs) play a very important role in combating bacterial and fungal infections and also potentiate inflammatory reactions in case of excessive or misdirected responses. In response to pathogens, PMNs rapidly migrate from the blood to inflamed tissues where their activation triggers microbicidal



mechanisms, such as the release of proteolytic enzymes and antimicrobial peptides and the rapid production of reactive oxygen species (ROS) in oxidative burst. After killing of microbes, PMNs die spontaneously, mainly by apoptosis (6). PMNs are exceptionally sensitive to external stimuli such as proinflammatory cytokines, of which the increased circulating levels have been described as a characteristic of the inflammaging process. In particular, the priming effect of various proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-8, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), is critical for triggering the polymorphonuclear neutrophil (PMN) oxidative burst in response to bacterial formyl peptides (7,8). In addition, PMN activation by circulating microbial products as well as proinflammatory cytokines promotes their survival and is a critical mechanism in their effectiveness against pathogens (9). Finally, IL-17 is a critical mediator in PMN recruitment, migration, and activation (10).

Over the past few years, it has been demonstrated that PMN chemotaxis (11), phagocytosis (12,13), extracellular trap formation (14,15), and rescue from apoptosis induced by proinflammatory mediators (16–19) are altered with aging. However, there has been a number of controversies related to some functions of old PMNs, especially ROS production; in fact, some authors reported a decreased ROS production with aging (17,20,21), whereas others demonstrated normal (22) or increased (12,23,24) PMN oxidative burst in the elderly individuals. Importantly, an issue raised by many of these studies is the analysis of PMNs isolated from their blood environment through various procedures that may differently modulate cell responses (25,26). In addition, the modulation through aging of the immunosuppressive PMN subset CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup>, which has been recently reported during severe injury (27,28), has never been investigated.

The aim of the present study was to re-examine, in the elderly individuals, PMN status such as the immunosuppressive CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> subpopulation and PMN functions including adhesion molecule expression, phagocytosis, ROS production, and survival. This study was performed in whole-blood conditions in order to minimize activation due to isolation procedures. This presents the advantage of taking into account the proinflammatory cytokine environment.

## Materials and Methods

### Study Design and Patients

This cross-sectional study was performed in a cohort of 20 elderly individuals, aged 70–91 years (mean age = 83 years;  $n = 8$  men,  $n = 12$  women), from the Geriatrics Department of the Pitié Salpêtrière Hospital (Paris, France). Elderly individuals with malignancies, acute diseases, or advanced stages of severe chronic diseases, such as chronic inflammatory disease, atherosclerotic disease, congestive heart failure, poorly controlled diabetes mellitus, renal or hepatic disease, or chronic obstructive pulmonary disease, as well as individuals under immunosuppressive therapy were excluded from the study. For comparison, peripheral blood from 20 young healthy control participants (7 men and 13 women), aged 23–35 years (mean age = 31 years), was collected at the Etablissement Français du Sang (EFS, Pitié salpêtrière Hospital, Paris, France) after ethical approval for the use of such material by the institutional review committees of INSERM and EFS (convention 12/EFS/079). The study was approved by the local institutional ethics committee (Comité de Protection des Personnes of the Pitié Salpêtrière Hospital). After written informed consent had been obtained from the patients and the controls, whole blood was sampled, kept on ice, and transported immediately to

the laboratory. From fresh ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) blood, the determination of absolute neutrophil count was performed using the Sysmex XE-500 Hematology Analyzer; absolute T-cell counts were determined using CYTOSTAT tetraCHROME kits on a FC500 cytometer (Beckman Coulter, Pasadena, CA) and analyzed with FlowCount Single Platform Method (Beckman Coulter).

### Immunophenotyping of T Cells

The expression of cell surface molecules in the T-cell subpopulations was assessed by 10-color flow cytometry (Gallios flow cytometer, Beckman Coulter). The following fluorochrome-conjugated monoclonal anti human antibodies were used: CD45RA-FITC (clone 2H4), CD27-PE (clone 1A4CD27), CD28-ECD (clone CD28.2), CD38-PC5.5 (clone T16), CCR7-PC7 (clone 3D12), CD8-AF700 (clone B9.11), CD3-AF750 (clone UCHT1), CD57-Pacific Blue (clone NC1), and CD4-Krome Orange (clone 13B8.2). All antibodies were purchased from Beckman Coulter except for CCR7, which was obtained from BD Biosciences (San Jose, CA). Samples of 100  $\mu$ L of fresh whole blood collected in EDTA tubes were labeled for 30 minutes at 4°C with a cocktail of antibodies. The blood was then lysed with BD FACS lysing, and cells were then resuspended with Cell Fix 1X (BD Biosciences) (29).

### Determination of Surface Molecule Expression on Resting and Stimulated PMNs

Heparin whole-blood samples (500  $\mu$ L) were either kept on ice or incubated with phosphate-buffered saline (PBS), TNF- $\alpha$  (5 ng/mL) or the following toll-like receptor (TLR) agonists: Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (TLR1/2 agonist, 1  $\mu$ g/mL, Invivogen, San Diego, CA), lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia Coli* serotype R515 (TLR4 agonist, 10 ng/mL, Alexis Biochemicals, San Diego, CA) or CL097 (TLR7/8 agonist, 5  $\mu$ g/mL, Invivogen) for 45 minutes at 37°C. Samples were stained with PE-anti-human CD11b (clone 2LPM19c, Dakopatts, Glostrup, Denmark) and APC-anti-human CD62L (clone DREG-56, BD Biosciences) as previously reported (29). In order to investigate the immunosuppressive CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> PMN subset, samples kept on ice were incubated for 30 minutes with FITC-anti-human CD16 (clone 1D3, Beckman Coulter, Brea, CA), PE-anti-human CD11c (clone 3.9, Sony Biotech, San Jose, CA), PE-Cy7-anti-human CD11b (clone Bear 1, Beckman Coulter), and APC-anti-human CD62L (BD Biosciences) antibodies. The blood was then lysed with BD FACS lysing, and cells were then resuspended with Cell Fix 1X (BD Biosciences).

### Measurement of Phagocytosis

The percentage of PMN phagocytosing opsonized *E. coli* as well as the mean fluorescence intensity (MFI) was measured in whole blood by using the Phagotest Kit (GlycoTope Biotechnology). Whole-blood samples (100  $\mu$ L) were incubated with opsonized fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated *E. coli* bacteria ( $2 \times 10^7$  per 20  $\mu$ L) for 10 minutes in a water bath at 37°C, the phagocytosis was then stopped in ice and erythrocytes are lysed before analysis by flow cytometry (30). In some experiments, samples were stained with PE-Cy7-anti-human CD16 (clone 3G8, BD Biosciences) and APC-anti-human CD62L before erythrocytes lysis.

### Measurement of the Oxidative Burst of PMNs

Superoxide anion ( $O_2^{\cdot -}$ ) production by PMNs was measured using a flow cytometry-based assay derived from the hydroethidine (HE) oxidation technique, as previously described (29). Heparin whole-blood samples (500  $\mu$ L) were loaded for 15 minutes with 1,500 ng/



mL HE (Fluka, Buchs, Switzerland) at 37°C and then incubated for 45 minutes with PBS or various stimuli, as described earlier. Samples were then treated with PBS or 10<sup>-6</sup> M formyl-methionine-leucine-phenylalanine (fMLP; Sigma Chemical, St. Louis, MO) for 5 minutes. In some experiments, samples were stained with FITC-anti-human CD16 and APC-anti-human CD62L before erythrocyte lysis.

### Measurement of PMN Apoptosis/Necrosis

PMN cell death in whole blood was quantified with annexin V and the impermeant nuclear dye 7-amino-actinomycin D (7-AAD). Whole-blood samples (500 µL) were incubated in 24-well tissue culture plates, for 20 hours, at 37°C with PBS or various stimuli as described earlier. Samples were incubated with APC-anti-CD15 antibodies (clone HI98, BD Biosciences), FITC-annexin V, and 7-AAD (BD Biosciences) as previously described (29) and analyzed by flow cytometry.

### Cytokine Assays

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparin coagulated peripheral blood (4 mL) by density gradient centrifugation using LymphoPrep (PAA Laboratories, Pasching, Austria). 500,000 PBMCs were then cultured overnight in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 1% glutamine, 1% pyruvate, 1% antibiotics (Invitrogen GIBCO), and 5 µg/mL of Brefeldin A (BFA, Sigma-Aldrich). For stimulated conditions, staphylococcal enterotoxin B (SEB, 2 µg/mL, Sigma-Aldrich) was added 30 minutes before BFA. PBMCs were first stained with anti-human CD14-ECD, CD8-AF700, CD3-AF750, and CD4-Krome Orange antibodies (Beckman Coulter), and eFluor 450 Fixable Viability Dye (eBioscience, San Diego, CA). For intracellular analyses, cells were fixed and permeabilized for 45 minutes at 4°C with the Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) and incubated with anti-human IL-17A-eFluor 660 (clone eBio64DEC17) and anti-human IL-22-PerCP eFluor 710 (clone 22URTI) antibodies (eBioscience) for 30 minutes at 4°C (29). Cells were then washed and fixed with BD Cell Fix 1X. Soluble cytokines (IL-6, TNF-α, IL-β) and chemokines (IL-8, IP-10, GROαetoxin) were also detected from plasma using Luminex assays (Luminex Performance Assays, R&D systems (Abingdon, UK); EDTA whole-blood samples were centrifuged for 15 minutes at 1,000g within 30 minutes of collection. Assays were performed on cryostored samples and diluted according to manufacturer's instructions (R&D systems).

### Flow Cytometry Analysis

Cells were acquired with a Gallios flow cytometer and analyzed with Kaluza software. To determine the expression of cell surface molecules in the T-cell subpopulations, at least 50,000 events corresponding to lymphocytes according to their forward- and side-scatter characteristics were counted per sample; results were expressed as the percentage of memory CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> or CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells that express CD38 or CD57 markers. To determine the expression of surface molecules on PMN, and ROS production by PMNs, forward- and side-scatter characteristics were used to identify the PMN population and to gate out other cells and debris, and 10,000 events were counted per sample. Results were expressed as MFI. To measure PMN phagocytosis, a "live" gate on leukocyte was set during data acquisition allowing excluding of bacteria. 10,000 to 15,000 leukocytes were collected per sample, and the granulocyte cluster was gated in the software program in the scatter diagram (lin FSC vs lin SSC). The MFI of FITC correlates with the number of bacteria per individual leukocyte. Data were expressed as the PMN phagocytic

index: % Phagocytic PMNs × MFI. To measure cell death in whole blood by flow cytometry, PMNs were identified as CD15<sup>high</sup> cells, and 2 × 10<sup>5</sup> events were counted per sample. Results were expressed as the percentage of apoptotic (AnnexinV<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>) and necrotic PMNs (AnnexinV<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>). To determine the percentages of IL-17<sup>+</sup> and IL-22<sup>+</sup> cells, 250,000 events were acquired per sample. PBMCs were gated on the basis of forward- and side-scatter characteristics. Then, only singlets and live cells (defined by the Fixable Viability marker, eF450, eBioscience) were included in the analysis.

### Statistical Analysis

Data are reported as means ± SEM. The Mann-Whitney *U* test or two-way ANOVA tests with a Tukey posttest were used to determine whether differences were significant between groups, and the Spearman correlation to examine the associations between T-cell activation, neutrophil activation, and cytokine production. We used the Shapiro-Wilk normality test to ensure the normality of distributions in compared groups when using a parametric test. The significance level was set at *p* < .05. All analyses were performed with GraphPad Prism 5.

## Results

### Immune Characteristics of Study Participants

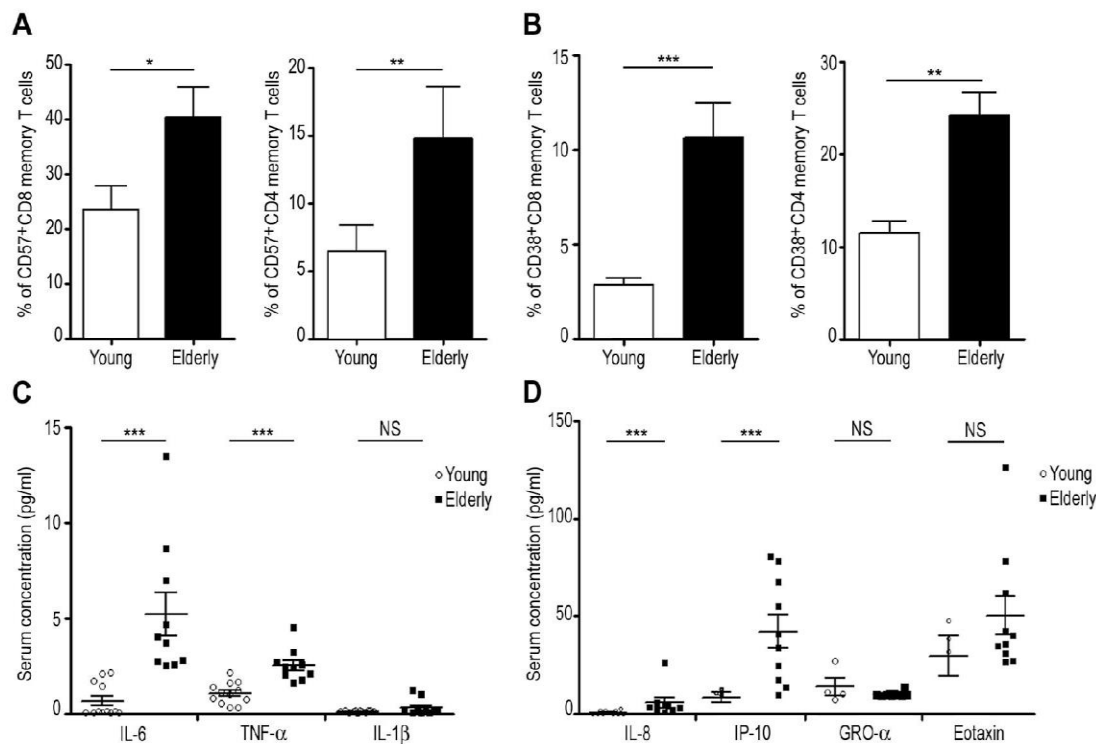
We first addressed the global characteristics of the participants included in our study. Elderly individuals exhibited normal absolute neutrophil count (median: 5,415 [3,090–8,200]) (31), CD4<sup>+</sup> T-cell count (median: 616 [278–1,009]), and CD4/CD8 ratio (median: 1.97 [0.84–3.8]). As expected (32–34), they displayed standard evidence of age-related immune alterations illustrated by the accumulation of highly differentiated CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> memory cells (Tem: CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> and Tcm: CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) expressing increased levels of CD57, a marker that has been associated with a state of replicative senescence (35,36) (Figure 1A). We also analyzed the expression of activation marker (CD38) on memory CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell subpopulations, which revealed that elderly individuals had higher percentages of CD38<sup>+</sup> memory T cells than did young participants (Figure 1B), indicating increased immune activation levels.

The median of CRP levels was 5 ng/mL (5–48), which is standard for this age range and highlights the status of systemic inflammation of the elderly person. In addition, we investigated the cytokine environment in the elderly participants. Serum levels of proinflammatory cytokines (IL-6, TNF-α; Figure 1C) and chemokines (IL-8, IP-10; Figure 1D) were significantly higher in old individuals compared with those in young individuals; in contrast, levels of various other proinflammatory cytokines were similar (IL-1β, GROαetoxin) in elderly and young participants (Figure 1C and D).

### Circulating PMNs From Elderly Individuals Are Not Activated

As proinflammatory cytokines are known to modulate PMN functions, we investigated the levels of activated markers in the PMN population. PMN activation is commonly associated with modulations of surface adhesion molecules, specifically a decreased and an increased expression in l-selectin (CD62L) and in β2 integrins (CD11b/CD18), respectively, through either stimulus-induced shedding (37) or translocation from intracellular granules (38). Nonetheless, as illustrated in Figure 2A and B, the expression of CD62L and CD11b on resting PMNs (samples maintained at 4°C) did not differ between elderly and young participants.





**Figure 1.** Immune characteristics of study participants. (A) Percentage of memory CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> or CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells that express the CD57 marker. (B) Percentage of memory CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> or CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> that express the CD38 marker. Memory cells were defined by Boolean gate (Kaluza Software) (CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>) and (not naive cells). Quantification of serum (C) cytokines and (D) chemokines from young and elderly participants. All measurements were performed in young ( $n = 15$ ) and elderly ( $n = 12$ ) participants. Values are means  $\pm$  SEM. Statistical significance as determined by the nonparametric Mann-Whitney test is indicated. \*Significantly different from young participants  $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ .

Because PMNs are reported to trigger microbicidal mechanisms upon activation (39), we measured ROS production in unstimulated whole-blood samples. Of note, unstimulated whole-blood PMNs did not produce ROS at higher rates in elderly compared with young participants (Figure 2C). Moreover, as PMNs can undergo activation-induced apoptosis (40,41), we measured the percentage of PMNs undergoing spontaneous apoptosis. Immediately after sampling (T0h), the percentage of circulating apoptotic PMNs from young participants was less than 2%. Although cultured whole-blood PMNs died rapidly, mainly by apoptosis (40%) or by necrosis (1.9%), the percentages of apoptotic (Figure 2D) and necrotic (annexin V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>; Figure 2E) PMNs did not differ between elderly and young participants. Overall, these data indicate that, despite evidence of systemic inflammation and increased circulating levels of proinflammatory cytokines such as IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-8, circulating PMNs from elderly individuals appear mostly resting.

#### Adhesion Molecules' Expression and Survival of Stimulated PMNs From Elderly Individuals

We next analyzed the responsiveness of PMNs to various stimuli, for example, TNF- $\alpha$  and TLR agonists. After incubation of whole-blood samples with PBS at 37°C for 45 min, we observed lower expression of CD62L (Figure 3A) associated with higher CD11b expression (Figure 3B) on PMNs from elderly compared with young participants. These results suggest the hyperreactivity of circulating PMNs from elderly individuals to a suboptimal stimulus. Of note, stimulation with TNF- $\alpha$  as well as TLR agonists induced a normal maximal capacity of PMNs from elderly people to shed I-selectin (Figure 3A) and to translocate CD11b (Figure 3B), in accordance with the preservation of adhesion functions of PMNs (42). As the PMN activity is highly regulated by proinflammatory mediators, we

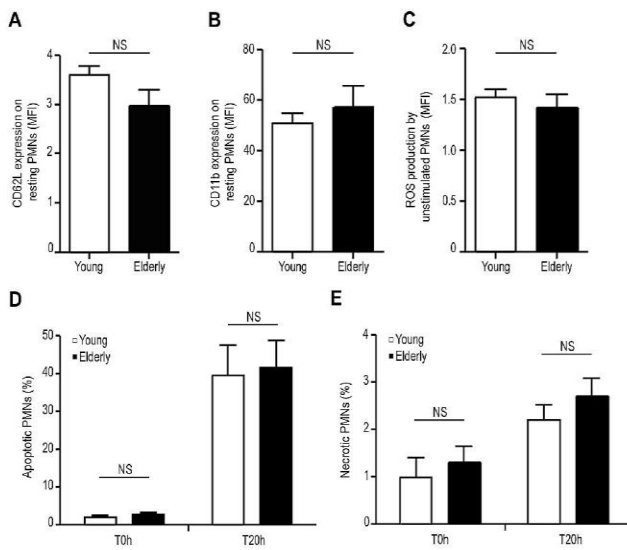
looked for potential association between this hyperreactivity and levels of proinflammatory cytokines. The IL-6 circulating level was negatively correlated with CD62L expression and positively correlated with CD11b expression on PBS-treated PMNs (Figure 3C and D). In addition, in accordance with previous data (43), we demonstrated that treatment of whole-blood samples from young participants with IL-6 decreases CD62L expression and increases CD11b expression in a dose-dependent manner (Supplementary Figure 1). Thus, our results suggest a possible *in vivo* preactivation of PMNs by this cytokine in the elderly individuals. Apart from IL-6, no correlation was found between CD62L and CD11b expression and the levels of cytokines (data not shown).

As expected (44), incubation of whole-blood samples from young participants with TLR agonists, compared with PBS as a control, significantly decreased the percentage of apoptotic PMNs from young participants. However, in contrast with previous data reported on isolated PMNs cultured in the presence of GM-CSF (16–19), the capacity of TLR1/2, TLR4, or TLR7/8 agonists to increase PMN survival was not altered in elderly individuals (Figure 3E and F).

#### Reduced Phagocytosis and Oxidative Burst Responses of PMNs From Elderly Individuals

Phagocytosis is a crucial part of host defense against invading extracellular micro-organisms. We studied the intrinsic capacity of PMN phagocytosis using opsonized bacteria. As previously reported (12,13), we observed that the phagocytic index was significantly lower in elderly individuals reflecting an intrinsic defect in the capacity of PMN phagocytosis (Figure 4B).

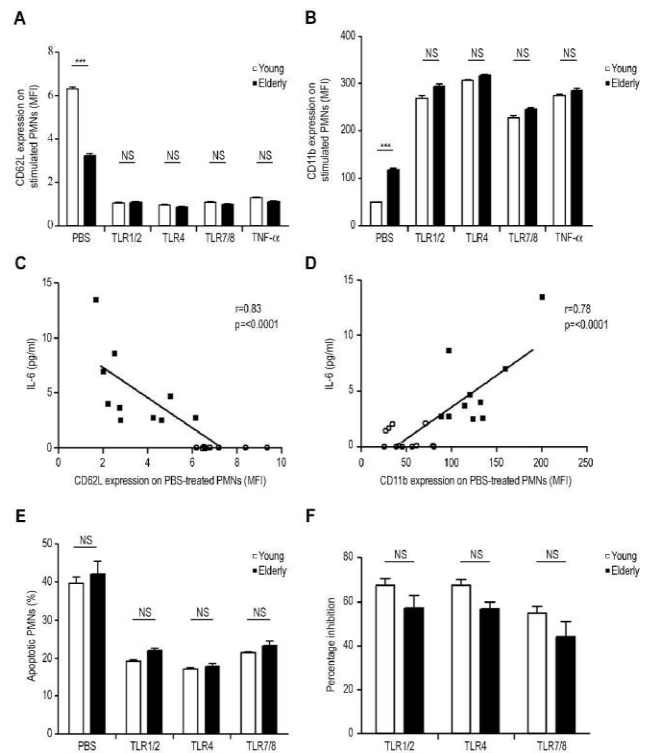
We have previously reported that, in whole blood, a single stimulus gives rise to minimal ROS production by PMNs (7,8). We therefore studied PMN oxidative burst in response to bacterial



**Figure 2.** Phenotypic and functional characterization of resting polymorphonuclear neutrophils (PMNs) from elderly individuals. Surface expression of (A) CD62L and (B) CD11b on resting PMNs was studied on whole blood samples maintained at 4°C. Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI). (C) Production of reactive oxygen species by unstimulated PMNs was studied by using di-hydroethidine oxidation; results are expressed as MFI. (D, E) Spontaneous PMN death was measured immediately after sampling by staining with annexin V and 7-amino-actinomycin D. Results are expressed as the percentages of (D) apoptotic and (E) necrotic PMNs. All measurements were performed in young ( $n = 20$ ) and elderly ( $n = 20$ ) participants. Values are means  $\pm$  SEM. The Mann–Whitney U test was used to determine whether differences were significant between groups. NS = not significant.

formyl peptides (fMLP) after priming with TNF- $\alpha$  or TLR agonists. ROS production by control PMNs (sample preincubated with PBS and stimulated with fMLP) did not differ between elderly and young participants suggesting the absence of priming in vivo by proinflammatory mediators, such as circulating cytokines, through aging. After pretreatment of whole blood with TNF- $\alpha$  or TLR agonists followed by fMLP stimulation, ROS production by PMNs from young and elderly participants was significantly increased compared with sample incubated with PBS alone. Interestingly, ROS production by PMNs from elderly individuals was significantly decreased after priming of whole blood with TNF- $\alpha$  or TLR agonists followed by fMLP stimulation (Figure 4C and D). A similar impairment was observed after PMA stimulation (Figure 4E).

No correlation was found between levels of proinflammatory cytokines and ROS production by PMNs suggesting the absence of an in vivo desensitization process. Because IL-17, which plays a critical role in PMN biology (10), was not detected in the serum of elderly individuals, we completed this analysis by studying intracellular production by PBMCs of this cytokine as well as of IL-22, usually produced at the same time as IL-17 (10). In the absence of any stimulation, although the percentage of IL-17<sup>+</sup> cells in elderly participants did not differ from that observed in young participants (Figure 5A), the percentage of cell producing IL-22 was significantly higher in old people (Figure 5B). After SEB stimulation, PBMCs from elderly individuals showed a decreased capacity for intracellular production of IL-17 (Figure 5A). In addition, we found that the decreased percentage of IL-17<sup>+</sup> cells after SEB stimulation correlated with the decreased ROS production after priming with TLR4 agonist (Figure 5C) as well as with TLR1/2 agonist (Figure 5D). Nevertheless, we did not observe any priming effect of IL-17 on oxidative burst of PMNs from young participants in response to fMLP (Supplementary Figure 2). Altogether, these data suggest that the decrease of intracellular IL-17



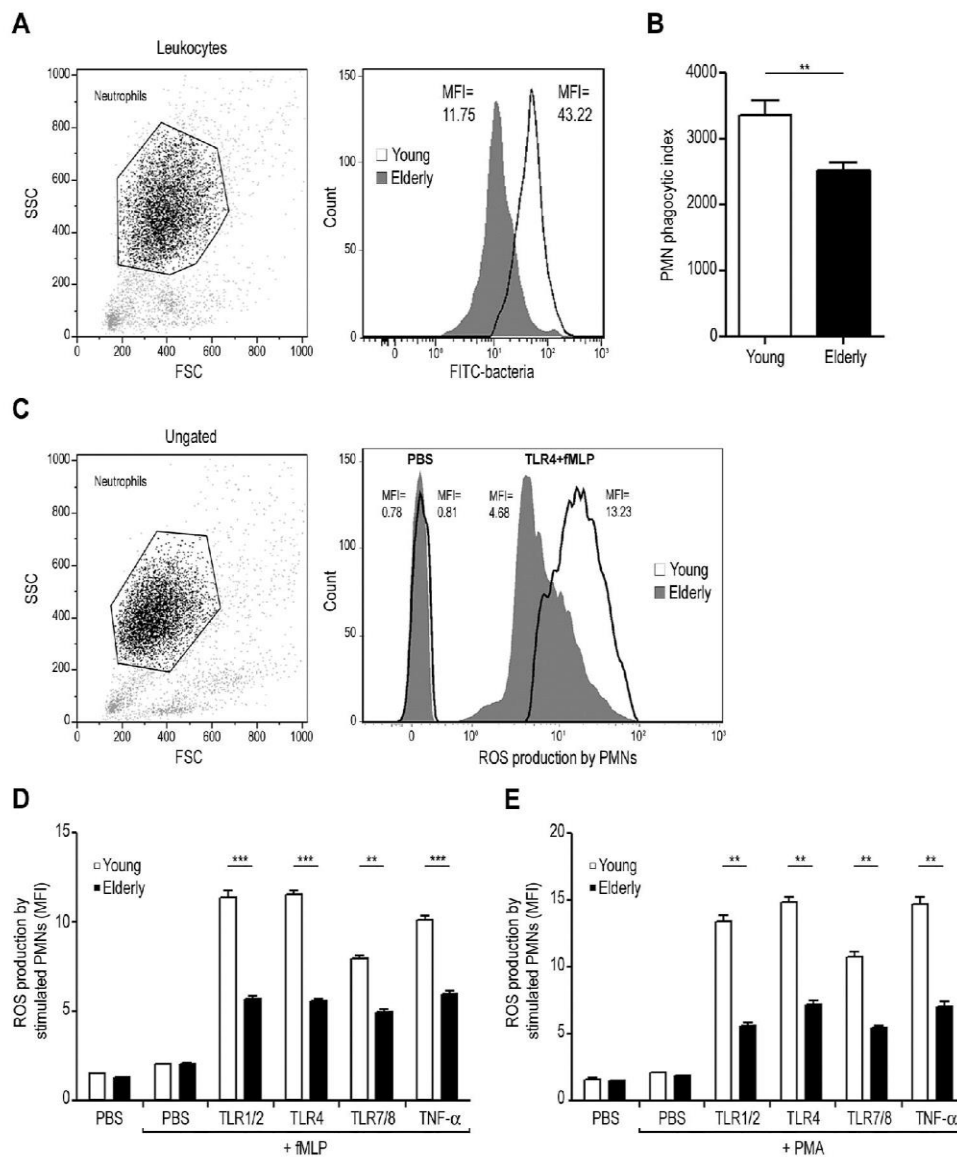
**Figure 3.** Adhesion molecules expression and survival of stimulated polymorphonuclear neutrophils (PMNs) from elderly individuals. (A) CD62L and (B) CD11b expression on PMN surface were measured after incubation of whole-blood samples for 45 minutes with phosphate-buffered saline (PBS), or Pam3CSK4 (toll-like receptor [TLR]1/2 agonist, 1  $\mu$ g/mL), or lipopolysaccharide (LPS; TLR4 agonist, 10 ng/mL), or CL097 (TLR7/8 agonist, 5  $\mu$ g/mL), or tumor necrosis factor- $\alpha$  (5 ng/mL); results are expressed as mean fluorescence intensity. Correlation between the level of circulating interleukin-6 and (C) CD62L or (D) CD11b expression on PBS-treated PMNs. (E, F) Prolongation of PMN survival was analyzed by incubating whole-blood samples with PBS, or TLR1/2 agonist, or TLR4 agonist, or TLR7/8 agonist for 20 hours at 37°C. Results are expressed (E) as the percentages of apoptotic PMNs or (F) as the percentage inhibition of PMN apoptosis [1 – (% of total annexin V + PMN in TLR agonist-treated sample/% of total annexin V + PMN in PBS-treated sample)]  $\times$  100. All measurements were performed in young ( $n = 20$ ) and elderly ( $n = 20$ ) participants. Values are means  $\pm$  SEM. Statistical significance as determined by the nonparametric Mann–Whitney test is indicated. \*\*\*Significantly different from young participants  $p < .001$ . NS = not significant. The two-way ANOVA test was used to determine whether differences were significant between the different conditions (treatment with PBS or the various stimuli) for each group (young and elderly participants). For each parameter, samples stimulated with the different agonists were significantly different from sample incubated with PBS  $p < .001$  (not shown).

production and the reduced PMN oxidative burst observed in our study might be independently associated.

### Expansion of the Immunosuppressive CD62L<sup>dim</sup>/CD16<sup>bright</sup> PMN Subset in Elderly Individuals

An immunosuppressive CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> PMN subset, which inhibits T-cell responses, has been recently reported during injury-induced systemic inflammation (28). Thus, we analyzed this immunosuppressive PMN subset through aging, a physiological condition associated with a chronic subclinical systemic inflammatory state. As shown in Figure 6A, the CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>bright</sup> subset constitutes the large majority of PMNs from the young participants, whereas the CD16<sup>dim</sup>/CD62L<sup>bright</sup> and CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> subpopulations were barely detectable. Among PMNs from the elderly individuals, the percentage of the CD16<sup>dim</sup>/CD62L<sup>bright</sup> PMN subset did not exceed 3.5% (Figure 6A); in contrast, we observed an expansion of





**Figure 4.** Defective phagocytosis and oxidative burst responses of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) from the elderly individuals. (A, B) Phagocytosis of PMNs was measured after incubation of whole blood samples with fluorescent opsonized *Escherichia coli* bacteria for 10 minutes in a water bath at 37°C. Forward- (FSC) and side-scatter characteristics (SSC) were used to identify the PMN population. (A) One histogram representative of PMN phagocytosis in young (white) and elderly participants (gray). (B) Results of PMN phagocytosis are expressed as the PMN phagocytic index. (C) Reactive oxygen species (ROS) production by PMNs was measured after pretreatment of whole-blood samples for 45 minutes with phosphate-buffered saline (PBS) or toll-like receptor (TLR)4 agonist and incubation for 5 minutes with PBS or fMLP (10-6M). On the left panel, PMNs were gated on the basis of FSC and SSC characteristics. On the right panel, one histogram representative of ROS production by PMNs from young (white) and elderly participants (gray) after incubation with PBS (control PMNs) or TLR4 agonist + fMLP (stimulated PMNs). (D, E) ROS production was measured after pretreatment of whole-blood samples for 45 minutes with PBS, or TLR1/2 agonist, or TLR4 agonist, or TLR7/8 agonist or tumor necrosis factor- $\alpha$  and stimulation for 5 minutes with either (D) fMLP (10-6M) or (E) PMA (100 ng/mL); results are expressed as mean fluorescence intensity. All measurements were performed in young ( $n = 20$ ) and elderly ( $n = 20$ ) participants. Values are means  $\pm$  SEM. Statistical significance as determined by the nonparametric Mann-Whitney test is indicated. \*\*Significantly different from young participants  $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ . The two-way ANOVA test was used to determine whether differences were significant between the different conditions (treatment with PBS or the various stimuli) for each group (young and elderly participants). For each parameter, samples stimulated with the different agonists were significantly different from sample incubated with PBS  $p < .001$  (not shown).

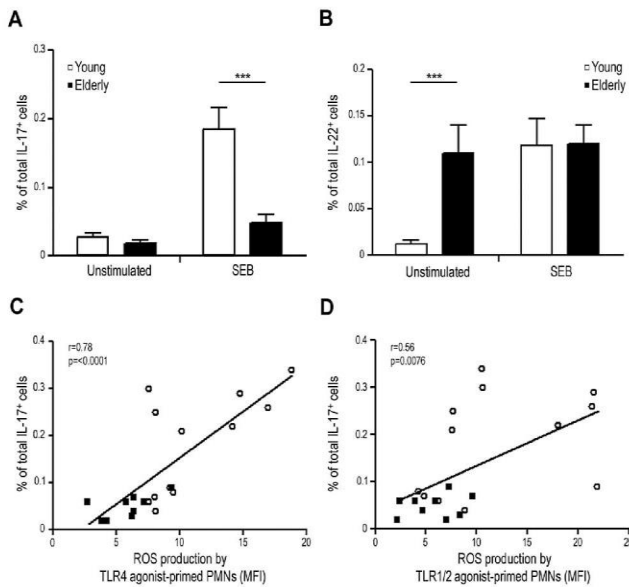
the CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> immunosuppressive subset reaching 14% (Figure 6A and B). As previously described (27,28), the CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> immunosuppressive subpopulation showed an increased expression of CD11b and CD11c compared with that of the CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>bright</sup> PMN subset (Figure 6C).

We then analyzed phagocytosis and ROS production by PMNs from the elderly individuals; PMNs were stained for CD16 and CD62L to discriminate between the subsets. We observed that CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> PMNs exhibit a lower phagocytic index as well as a lower oxidative burst than CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>bright</sup> PMNs

(Figure 6D and E). In addition, we found that the increased percentage of CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> PMNs correlated with the decreased phagocytosis (Figure 6F) and the decreased ROS production after priming with TLR4 agonist (Figure 6G).

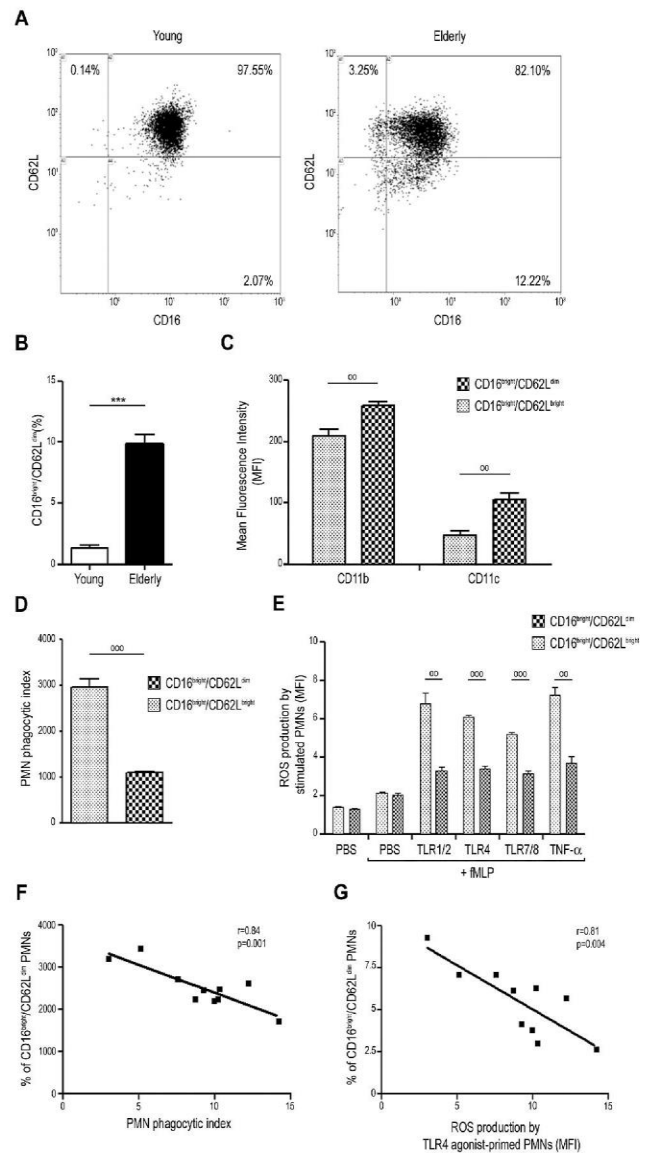
## Discussion

A key phenomenon that occurs with age and frailty is the increase in circulating products related to chronic low-grade inflammation commonly associated with the process of “inflammaging” (45–48). In



**Figure 5.** Decreased interleukin (IL)-17 production by stimulated peripheral blood mononuclear cells. The percentage of total (A) IL-17<sup>+</sup> and (B) IL-22<sup>+</sup> cells was evaluated by flow cytometry upon staphylococcal enterotoxin B stimulation and after gating on lived peripheral blood mononuclear cells. Correlations between the percentage of total IL-17<sup>+</sup> cells and reactive oxygen species production by (C) toll-like receptor (TLR)4 agonist-primed or (D) TLR1/2 agonist-primed polymorphonuclear neutrophils. All measurements were performed in young (*n* = 15) and elderly (*n* = 12) participants. Values are means ± SEM. Statistical significance as determined by the nonparametric Mann–Whitney test is indicated. \*\*\*Significantly different from young participants *p* < .001. The two-way ANOVA test was used to determine whether differences were significant between the different conditions (treatment with phosphate-buffered saline [PBS] or the various stimuli) for each group (young and elderly participants). For each parameter, samples stimulated with the different agonists were significantly different from sample incubated with PBS *p* < .001 (not shown).

accordance with these findings, our results show increased levels of the classical proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, and IP-10 in elderly individuals. Despite this proinflammatory environment, our results demonstrate the absence of a basal PMN hyperactivation state in the elderly individuals as shown by normal expression of CD62L and CD11b at the surface of resting PMNs and normal constitutive ROS production. In addition, we observed that the percentages of PMNs undergoing spontaneously apoptosis and necrosis did not differ between elderly and young participants. Control of PMN death by apoptosis and subsequent clearance of the apoptotic cells is paramount for effective resolution of inflammation for it enables safe PMN removal and promotes anti-inflammatory responses. In contrast, PMN death by necrosis induces the release of harmful intracellular contents and thus promotes proinflammatory responses (9). These results suggest that proinflammatory circulating molecules did not contribute to alterations in blood PMNs. Conversely, the normal apoptosis/necrosis equilibrium, combined with the absence of a basal PMN hyperactivation, suggests that PMNs might not be a key determinant in establishing chronic low-grade inflammation in the elderly individuals. Nevertheless, we observed modulations of CD62L and CD11b expression on PBS-treated PMNs from elderly compared with young participants demonstrating an hyperreactivity of circulating PMNs during aging. This hyperreactivity, which might be related at least in part to increased IL-6 circulating levels, could modulate local and systemic inflammatory-immune responses. In a recent study, increased serum levels of a neutrophil proteinase-specific fibrinogen



**Figure 6.** Expansion of the immunosuppressive CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> polymorphonuclear neutrophil (PMN) subset in the elderly participants. (A,B,C) Whole-blood samples from elderly and young participants were incubated for 45 minutes at 4°C with FITC-anti-human CD16, PE-anti-human CD11c, Pe-Cy7-anti-human CD11b, and APC-anti-human CD62L (BD Biosciences). (A) Representative dot plots of the PMN phenotype according to CD16 and CD62L expression in young adult (left) and in elderly (right) participants. (B) Percentages of the CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> PMN subset. The measurement was performed in young adults (*n* = 10) and elderly (*n* = 10) participants. Values are means ± SEM. Statistical significance as determined by the nonparametric Mann–Whitney test is indicated. \*\*\*Significantly different from young participants *p* < .001. (C) Expression of CD11b and CD11c in the CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> and CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>bright</sup> PMN subsets; results are expressed in MFI. (D) PMN phagocytosis was measured as described in the legend of Figure 4A; PMNs were stained for CD16 and CD62L to discriminate between the subsets; results are expressed as the PMN phagocytic index for both CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> and CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>bright</sup> PMN subsets. (E) ROS production by PMNs was measured after pretreatment of whole-blood samples with PBS, or TLR1/2 agonist, or TLR4 agonist, or TLR7/8 agonist or TNF- $\alpha$  and stimulation with fMLP. PMNs were stained for CD16 and CD62L to discriminate between the subsets; results are expressed in MFI for both CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> and CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>bright</sup> PMN subsets. Correlations between the percentage of the CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> PMN subset and (F) the PMN phagocytic index or (G) ROS production by TLR4-agonist-primed PMNs. The measurements were performed in the elderly participants (*n* = 10). Values are means ± SEM. Statistical significance as determined by the nonparametric Mann–Whitney test is indicated. °Significantly different from the CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>bright</sup> PMN subset *p* < .01, °°°*p* < .001.



degradation product, consistent with PMN elastase activity, were reported in older donors (11). In contrast, another study demonstrated similar elastase activity of unstimulated PMNs from elderly and young participants (49). Further studies are necessary to investigate the release of potentially harmful proteins contained in specific and gelatinase granules.

The anti-apoptotic effect of TLR ligands requires NF- $\kappa$ B and phosphoinositide-3 kinase (PI3K) activation (44). The protective effect of GM-CSF against apoptosis results from the activation of Lyn (19), as well as the activation of the MAPK/ERK (18) and the Jak/STAT (50) pathways, and decreased GM-CSF-induced rescue from apoptosis of elderly PMNs has been related to a failure of GM-CSF to activate these pathways in PMNs. These findings might explain the discrepancies between normal TLR agonists-induced PMN survival in the elderly individuals reported in the present study and previous results concerning the defective effect of GM-CSF on PMN survival (50).

Our results show a reduced ROS production in response to bacterial formyl peptides by whole-blood PMNs after priming with TNF- $\alpha$  or TLR agonists. Decreased ROS production by primed PMNs is associated with a decreased production of IL-17 by stimulated T cells. Contradictory results have been previously reported on the effect of aging on Th17. Some authors reported an increased percentage of IL-17-producing cells in the population of activated CD4<sup>+</sup> T cells (51), whereas others demonstrated a decreased frequency of Th17 cells in the peripheral blood (52–54). IL-17 is widely documented as a critical mediator in PMN recruitment, migration, and activation (10) including a direct effect on PMN oxidative burst (55). Because we did not observe any priming effect of IL-17 on PMN oxidative burst in response to fMLP, we can not affirm that the decreased intracellular IL-17 in PBMCs and the reduced oxidative burst are causally related. It is likely that our results reflect two distinct processes indirectly associated. Nevertheless, the decreased frequency of Th17 cells could contribute to increased risk of infections with extracellular pathogens (56,57). In parallel, we detected for the first time a basal IL-22 hyperproduction in healthy elderly participants. IL-22 exerts proinflammatory effects; it is present in systemic and local inflammation and exerts an important role in the antimicrobial defense (58). Interestingly, increased IL-22 circulating levels have been previously reported in healthy centenarians (59). It is likely that IL-22 has a protective role against infection, promoting the longevity of centenarians. One could speculate that the activity of IL-22 against infection in healthy centenarians may be more relevant for survival than its potentially negative impact on inflammation. Nevertheless, the mechanisms involved in basal IL-22 hyperproduction in elderly participants and its consequence in terms of protection against infection or establishment of chronic inflammation remain to be elucidated.

Reduced ROS production might be related at least in part to changes in the membrane microdomains named lipid rafts, whose integrity is necessary to the assembly of the NADPH oxidase (17,60). In contrast to other cells, the fluidity of the PMN membrane increases with aging, due to alterations in the membrane cholesterol/phospholipid composition (61). The cholesterol content does not change, but the phospholipid content increases. These changes affect the integrity of lipid rafts that is necessary for the assembly of the NADPH oxidase (17,60). In addition, reduced levels of TLR4 in lipid rafts as well as impairment of TLR4 signaling in response to LPS in PMNs from elderly donors have been reported (17). These results cannot explain why in our study LPS

was efficient for CD62L shedding, CD11b translocation, and rescue for apoptosis of PMN with aging. We can only speculate that these functions are mediated through different signaling pathways. Alteration of the human fMLP receptor signaling in PMNs from elderly individuals, associated with a decrease of Erk and p38 tyrosine phosphorylation after fMLP stimulation (62), might also play a role in the reduced oxidative burst.

Several studies support the hypothesis that PMNs are not a homogenous population (63). In particular, Pillay and colleagues (28) have reported the identification of a subset of mature human PMNs (CD11c<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup>/CD11b<sup>bright</sup>/CD16<sup>bright</sup>). This subpopulation is capable of suppressing human T-cell proliferation. These cells were observed in humans during in vivo acute systemic inflammation induced by endotoxin challenge or severe injury. Kamp and colleagues (27) reported that the PMN CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> PMN subset exhibits decreased adhesion to activated endothelium under flow conditions. We observed an increased percentage of this subpopulation in the elderly compared with that in the young participants. In addition, CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> PMNs exhibit a decreased ROS production and a decreased phagocytosis compared with the CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>bright</sup> PMN subpopulation. Altogether these data highlight the expansion of the immunosuppressive mature PMN subpopulation in the elderly individuals, a process that can be explained at least in part by the decreased ROS production and the decreased phagocytosis. Further studies are necessary to investigate the mechanisms involved in the expansion of the immunosuppressive PMN subpopulation in the elderly individuals, especially the contribution of the inflammaging process.

Finally, other immune-related changes occurring during aging could impact PMN functions, including oxidative burst. In particular, aging is associated with a gradual loss of the CD56<sup>bright</sup> natural killer cell subset, an impairment that can be responsible of the defective production of cytokines and chemokines by natural killer cells observed in elderly individuals (64). Of note, PMN activation, including priming of ROS production in response to fMLP, is modulated by interaction with natural killer cells through the production of cytokines (65). In addition, primed PMNs can also be activated by T cells through IL-2 production (66), but a decrease in IL-2 production by T cells occurs with aging (1). Conversely, it will be interesting to investigate the potential role of expanded immunosuppressive PMNs in participating to the decline of the T-cell competence or immunosenescence with advanced age.

Taken together, the present study of PMNs from the elderly individuals demonstrates on the one hand the absence of a basal PMN hyperactivation state despite a chronic low-grade inflammation state, and on the other hand a reduced phagocytosis and oxidative burst responses of PMNs from the elderly individuals associated with the expansion of the immunosuppressive CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> subset. These alterations might be involved in the increased susceptibility to bacterial and fungal infections through aging.

## Supplementary Material

Supplementary material can be found at: <http://biomedgerontology.oxfordjournals.org/>

## Funding

This work was supported by the “Fondation pour la Recherche Médicale” (Project DEQ20120323690).



## References

1. Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E, Signer RA. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat Rev Immunol*. 2009;9:57–62. doi:10.1038/nri2471
2. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann NY Acad Sci*. 2000;908:244–254.
3. Montecino-Rodriguez E, Berent-Maoz B, Dorshkind K. Causes, consequences, and reversal of immune system aging. *J Clin Invest*. 2013;123:958–965. doi:10.1172/JCI64096
4. Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:875–887. doi:10.1038/nri3547
5. Hazeldine J, Lord JM. Innate immunosenescence: underlying mechanisms and clinical relevance. *Biogerontology*. 2015;16:187–201. doi:10.1007/s10522-014-9514-3
6. Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol*. 1997;61:375–380.
7. Elbim C, Chollet-Martin S, Bailly S, Hakim J, Gougerot-Pocidal MA. Priming of polymorphonuclear neutrophils by tumor necrosis factor alpha in whole blood: identification of two polymorphonuclear neutrophil subpopulations in response to formyl-peptides. *Blood*. 1993;82:633–640.
8. Elbim C, Bailly S, Chollet-Martin S, Hakim J, Gougerot-Pocidal MA. Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides. *Infect Immun*. 1994;62:2195–2201.
9. Gabelloni ML, Trevani AS, Sabatté J, Geffner J. Mechanisms regulating neutrophil survival and cell death. *Semin Immunopathol*. 2013;35:423–437. doi:10.1007/s00281-013-0364-x
10. Eyerich S, Eyerich K, Cavani A, Schmidt-Weber C. IL-17 and IL-22: siblings, not twins. *Trends Immunol*. 2010;31:354–361. doi:10.1016/j.it.2010.06.004
11. Sapay E, Greenwood H, Walton G, et al. Phosphoinositide 3-kinase inhibition restores neutrophil accuracy in the elderly: toward targeted treatments for immunosenescence. *Blood*. 2014;123:239–248. doi:10.1182/blood-2013-08-519520
12. Butcher SK, Chahal H, Nayak L, et al. Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. *J Leukoc Biol*. 2001;70:881–886.
13. Chiu CH, Yeh KM, Siu LK, Fung CP, Lin JC, Chang FY. Impact of age on neutrophil phagocytic reaction with different capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2011;44:333–337. doi:10.1016/j.jmii.2010.08.013
14. Tseng CW, Kyme PA, Arruda A, Ramanujan VK, Tawackoli W, Liu GY. Innate immune dysfunctions in aged mice facilitate the systemic dissemination of methicillin-resistant *S. aureus*. *PLoS One*. 2012;7:e41454. doi:10.1371/journal.pone.0041454
15. Hazeldine J, Harris P, Chapple IL, et al. Impaired neutrophil extracellular trap formation: a novel defect in the innate immune system of aged individuals. *Aging Cell*. 2014;13:690–698. doi:10.1111/acer.12222
16. Tortorella C, Piazzolla G, Spaccavento F, Pece S, Jirillo E, Antonaci S. Spontaneous and Fas-induced apoptotic cell death in aged neutrophils. *J Clin Immunol*. 1998;18:321–329.
17. Fulop T, Larbi A, Douzich N, et al. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell*. 2004;3:217–226.
18. Larbi A, Douzich N, Fortin C, Linteau A, Dupuis G, Fulop T Jr. The role of the MAPK pathway alterations in GM-CSF modulated human neutrophil apoptosis with aging. *Immun Ageing*. 2005;2:6.
19. Fortin CF, Larbi A, Lesur O, Douzich N, Fulop T Jr. Impairment of SHP-1 down-regulation in the lipid rafts of human neutrophils under GM-CSF stimulation contributes to their age-related, altered functions. *J Leukoc Biol*. 2006;79:1061–1072.
20. Tortorella C, Ottolenghi A, Pugliese P, Jirillo E, Antonaci S. Relationship between respiratory burst and adhesiveness capacity in elderly polymorphonuclear cells. *Mech Ageing Dev*. 1993;69:53–63.
21. Tortorella C, Piazzolla G, Spaccavento F, Jirillo E, Antonaci S. Age-related effects of oxidative metabolism and cyclic AMP signaling on neutrophil apoptosis. *Mech Ageing Dev*. 1999;110:195–205.
22. Wenisch C, Patruta S, Daxböck F, Krause R, Hörl W. Effect of age on human neutrophil function. *J Leukoc Biol*. 2000;67:40–45.
23. Chaves MM, Costa DC, de Oliveira BE, Rocha MI, Nogueira-Machado JA. Role PKA and p38 MAPK on ROS production in neutrophil age-related: lack of IL-10 effect in older subjects. *Mech Ageing Dev*. 2009;130:588–591. doi:10.1016/j.mad.2009.07.001.
24. Verschoor CP, Loukov D, Naidoo A, et al. Circulating TNF and mitochondrial DNA are major determinants of neutrophil phenotype in the advanced-age, frail elderly. *Mol Immunol*. 2015;65:148–156. doi:10.1016/j.molimm.2015.01.015.
25. Rebecchi IM, Ferreira Novo N, Julian Y, Campa A. Oxidative metabolism and release of myeloperoxidase from polymorphonuclear leukocytes obtained from blood sedimentation in a Ficoll-Hypaque gradient. *Cell Biochem Funct*. 2000;18:127–132.
26. Pallister I, Bhatia R, Katpalli G, Allison D, Parker C, Topley N. Alteration of polymorphonuclear neutrophil surface receptor expression and migratory activity after isolation: comparison of whole blood and isolated PMN preparations from normal and postfracture trauma patients. *J Trauma*. 2006;60:844–850.
27. Kamp VM, Pillay J, Lammers JW, Pickkers P, Ulfman LH, Koenderman L. Human suppressive neutrophils CD16bright/CD62Ldim exhibit decreased adhesion. *J Leukoc Biol*. 2012;92:1011–1020. doi:10.1189/jlb.0612273.
28. Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest*. 2012;122:327–336. doi:10.1172/JCI57990
29. Campillo-Gimenez L, Casulli S, Dudoit Y, et al. Neutrophils in antiretroviral therapy-controlled HIV demonstrate hyperactivation associated with a specific IL-17/IL-22 environment. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134:1142–1152. doi:10.1016/j.jaci.2014.05.040
30. Casulli S, Coignard H, Amazzough K, et al. Defective functions of polymorphonuclear neutrophils in patients with common variable immunodeficiency. *Immunol Res*. 2014;60:69–76. doi:10.1007/s12026-014-8555-7
31. Tseng CW, Liu GY. Expanding roles of neutrophils in aging hosts. *Curr Opin Immunol*. 2014;29:43–48. doi:10.1016/j.coi.2014.03.009
32. Larbi A, Franceschi C, Mazzatti D, Solana R, Wikby A, Pawelec G. Aging of the immune system as a prognostic factor for human longevity. *Physiology*. 2008;23:64–74. doi:10.1152/physiol.00040.2007
33. Appay V, Fastenackels S, Katlama C, et al. Old age and anti-cytomegalovirus immunity are associated with altered T-cell reconstitution in HIV-1-infected patients. *AIDS*. 2011;25:1813–1822. doi:10.1097/QAD.0b013e32834640e6
34. Larbi A, Fulop T. From “truly naïve” to “exhausted senescent” T cells: when markers predict functionality. *Cytometry A*. 2014;85:25–35. doi:10.1002/cyto.a.22351
35. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood*. 2003;101:2711–2720.
36. Papagno L, Spina CA, Marchant A, et al. Immune activation and CD8<sup>+</sup> T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biol*. 2004;2: E20.
37. Venturi GM, Tu L, Kadono T, et al. Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. *Immunity*. 2003;19:713–724.
38. Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA, Borregaard N. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *J Clin Invest*. 1993;92:1467–1476.
39. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33:657–670. doi:10.1016/j.immuni.2010.11.011
40. Aleman M, de la Barrera SS, Schierloh PL, et al. In tuberculous pleural effusions, activated neutrophils undergo apoptosis and acquire a dendritic cell-like phenotype. *J Infect Dis*. 2005;192:399–409.
41. Hsieh SC, Yu HS, Cheng SH, et al. Anti-myeloperoxidase antibodies enhance phagocytosis, IL-8 production, and glucose uptake of polymorphonuclear

- neutrophils rather than anti-proteinase 3 antibodies leading to activation-induced cell death of the neutrophils. *Clin Rheumatol*. 2007;26:216–224.
42. Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T. Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Semin Immunol*. 2012;24:331–341. doi:10.1016/j.smim.2012.04.008
  43. Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR. *Infectious Diseases*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
  44. François S, El Benna J, Dang PM, Pedruzzi E, Gougerot-Pocidallo MA, Elbim C. Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad. *J Immunol*. 2005;174:3633–3642.
  45. Shurin GV, Yurkovetsky ZR, Chatta GS, Tourkova IL, Shurin MR, Lokshin AE. Dynamic alteration of soluble serum biomarkers in healthy aging. *Cytokine*. 2007;39:123–129.
  46. Leng SX, Tian X, Matteini A, et al. IL-6-independent association of elevated serum neopterin levels with prevalent frailty in community-dwelling older adults. *Age Ageing*. 2011;40:475–481. doi:10.1093/ageing/afq047
  47. Bartlett DB, Firth CM, Phillips AC, et al. The age-related increase in low-grade systemic inflammation (Inflammaging) is not driven by cytomegalovirus infection. *Aging Cell*. 2012;11:912–915. doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00849.x
  48. Jenny NS, French B, Arnold AM, et al. Long-term assessment of inflammation and healthy aging in late life: the Cardiovascular Health Study All Stars. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012;67:970–976. doi:10.1093/gerona/glr261
  49. Dalboni TM, Abe AE, de Oliveira CE, et al. Activation profile of CXCL8-stimulated neutrophils and aging. *Cytokine*. 2013;61:716–719. doi:10.1016/j.cyto.2013.01.016
  50. Fortin CF, Larbi A, Dupuis G, Lesur O, Fülöp T Jr. GM-CSF activates the Jak/STAT pathway to rescue polymorphonuclear neutrophils from spontaneous apoptosis in young but not elderly individuals. *Biogerontology*. 2007;8:173–187.
  51. Ouyang X, Yang Z, Zhang R, et al. Potentiation of Th17 cytokines in aging process contributes to the development of colitis. *Cell Immunol*. 2011;266:208–217. doi:10.1016/j.cellimm.2010.10.007
  52. Lee JS, Lee WW, Kim SH, et al. Age-associated alteration in naive and memory Th17 cell response in humans. *Clin Immunol*. 2011;140:84–91. doi:10.1016/j.clim.2011.03.018.
  53. Alvarez-Rodríguez L, López-Hoyos M, Muñoz-Cacho P, Martínez-Taboada VM. Aging is associated with circulating cytokine dysregulation. *Cell Immunol*. 2012;273:124–132. doi:10.1016/j.cellimm.2012.01.001
  54. Schmitt V, Rink L, Uciechowski P. The Th17/Treg balance is disturbed during aging. *Exp Gerontol*. 2013;48:1379–1386. doi:10.1016/j.exger.2013.09.003
  55. Taylor PR, Roy S, Leal SM Jr, et al. Activation of neutrophils by auto-crine IL-17A-IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, RORgammat and dectin-2. *Nat Immunol*. 2014;15:143–151. doi:10.1038/ni.2797
  56. Donowitz GR, Cox HL. Bacterial community-acquired pneumonia in older patients. *Clin Geriatr Med*. 2007;23:515–534.
  57. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis*. 2009;48:1695–1703. doi:10.1086/599039
  58. Aujla SJ, Kolls JK. IL-22: a critical mediator in mucosal host defense. *J Mol Med*. 2009;87:451–454. doi:10.1007/s00109-009-0448-1
  59. Basile G, Paffumi I, D'Angelo AG, Figliomeni P, Cucinotta MD, Pace E. Healthy centenarians show high levels of circulating interleukin-22 (IL-22). *Arch Gerontol Geriatr*. 2012;54:459–461. doi:10.1016/j.archger.2011.05.004
  60. Guichard C, Pedruzzi E, Dewas C, et al. Interleukin-8-induced priming of neutrophil oxidative burst requires sequential recruitment of NADPH oxidase components into lipid rafts. *J Biol Chem*. 2005;280:37021–37032.
  61. Alvarez E, Ruiz-Gutiérrez V, Sobrino F, Santa-María C. Age-related changes in membrane lipid composition, fluidity and respiratory burst in rat peritoneal neutrophils. *Clin Exp Immunol*. 2001;124:95–102.
  62. Fortin CF, Larbi A, Dupuis G, Fulop T. Signal transduction changes in fMLP, TLRs, TRE-1 and GM-CSF receptors in PMN with aging. In *Handbook on Immunosenescence*. Fulop T, Franceschi C, Hirokawa K, & Pawelec G, eds. Netherlands: Springer; 2009:457–474.
  63. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber ANR, et al. Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog*. 2015;11: e1004651. doi:10.1371/journal.ppat.1004651
  64. Solana R, Campos C, Pera A, Tarazona R. Shaping of NK cell subsets by aging. *Curr Opin Immunol*. 2014;29:56–61. doi:10.1016/j.coi.2014.04.002
  65. Costantini C, Micheletti A, Calzetti F, Perbellini O, Pizzolo G, Cassatella MA. Neutrophil activation and survival are modulated by interaction with NK cells. *Int Immunol*. 2010;22:827–838. doi:10.1093/intimm/dxq434
  66. Müller I, Munder M, Kropf P, Hänsch GM. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol*. 2009;30:522–530. doi:10.1016/j.it.2009.07.007

Article II

**First Report of CD4 Lymphopenia and Defective Neutrophil Functions in a Patient with Amebiasis Associated with CMV Reactivation and Severe Bacterial and Fungal Infections**

Auteurs :

Etienne Ghrenassia, Amélie Guihot, **Yuan Dong**, Pauline Robinet, Thierry Fontaine, Karine Lacombe, Thomas Lescot, Marie-Caroline Meyohas, Carole Elbim

Publié dans le journal « Frontiers in Microbiology », 2017 Feb 13;8:203





# First Report of CD4 Lymphopenia and Defective Neutrophil Functions in a Patient with Amebiasis Associated with CMV Reactivation and Severe Bacterial and Fungal Infections

Etienne Ghrenassia<sup>1</sup>, Amélie Guihot<sup>2,3,4</sup>, Yuan Dong<sup>5</sup>, Pauline Robinet<sup>3,4</sup>, Thierry Fontaine<sup>6</sup>, Karine Lacombe<sup>1</sup>, Thomas Lescot<sup>7</sup>, Marie-Caroline Meyohas<sup>1</sup> and Carole Elbim<sup>3,4\*</sup>

<sup>1</sup> AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Paris, France, <sup>2</sup> Département d'Immunologie, AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France, <sup>3</sup> DHU FAST, CR7, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Paris, France, <sup>4</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1135, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses-Paris, Paris, France, <sup>5</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre de Recherche Saint-Antoine, UMR-S 938, Paris, France, <sup>6</sup> Institut Pasteur, Unité des Aspergillus, Paris, France, <sup>7</sup> Unité de Réanimation Chirurgicale Digestive, Département D'anesthésie et de Réanimation Chirurgicale, AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Tamás Laskay,  
University of Lübeck, Germany

### Reviewed by:

Luka Cicin-Sain,  
Helmholtz Zentrum für  
Infektionsforschung GmbH, Germany  
Werner Solbach,  
University Lübeck, Germany  
Bruno Pozzetto,  
Jean Monnet University, France

### \*Correspondence:

Carole Elbim  
carole.elbim@upmc.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Microbial Immunology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 30 September 2016

**Accepted:** 27 January 2017

**Published:** 13 February 2017

### Citation:

Ghrenassia E, Guihot A, Dong Y, Robinet P, Fontaine T, Lacombe K, Lescot T, Meyohas M-C and Elbim C (2017) First Report of CD4 Lymphopenia and Defective Neutrophil Functions in a Patient with Amebiasis Associated with CMV Reactivation and Severe Bacterial and Fungal Infections. *Front. Microbiol.* 8:203. doi: 10.3389/fmicb.2017.00203

We report the case of a patient with acute necrotizing colitis due to invasive amebiasis associated with CD4 lymphopenia and impaired neutrophil responses. The course of the disease was characterized by CMV reactivation and severe and recurrent bacterial and fungal infections, which might be related to the decreased CD4 T cell count and the impaired functional capacities of neutrophils, respectively. The clinical outcome was positive with normalization of both CD4 cell count and neutrophil functions.

**Keywords:** amebiasis, cytomegalovirus, aspergillosis, neutrophils, CD4 T cells

## INTRODUCTION

The patient, a 55-year-old man from Mali, was hospitalized in the internal medicine department of a general hospital in July 10, 2013 for febrile acute low back pain. His medical history was unremarkable. He came to France 30 years ago, and his last trip abroad was to Mali in April 2011. He worked in a restaurant as a kitchen porter. He smoked cigarettes, but did not drink alcohol or use narcotics. The patient reported asthenia, anorexia, weight loss (−21 kg; BMI 17), liquid stools once a day since several weeks. Laboratory finding included anemia with 6.4 g/dL hemoglobin, CRP at 157 mg/L, and a white blood cell count of 5.470/μL, with 83% neutrophils and 15% lymphocytes, as well as a CD4 T-lymphocyte count below 200/mm<sup>3</sup> (Table 1). HIV serology was negative.

On July 12, the abdominal computed tomography (CT) showed a right retroperitoneum collection with a right colitis. No treatment was introduced until blood cultures were positive for group F *Streptococcus* on July 26–29. Then, antibiotic treatment with amoxicillin plus gentamycin was introduced.

Despite antibiotics he developed septic shock on August 02 and was transferred to the intensive care unit (ICU) department of the same hospital. The abdominal CT showed abscesses of the right kidney, right psoas, and liver, and thickening of the right colon, with loss of the contrast agent in the peritoneal cavity. A right hemicolectomy was performed. A new line of antibiotics

**TABLE 1 | Absolute numbers of leukocytes, neutrophils, and lymphocytes, counted from fresh EDTA blood, with the Sysmex XE-500 Hematology Analyzer; percentages and absolute counts of CD3<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells, and CD19<sup>+</sup> cells and percentages of CD8<sup>+</sup> T-cell subpopulations were determined with CYTOSTAT tetraCHROME kits on a FC500 cytometer (Beckman Coulter) and on a Navios flow cytometer (Beckman Coulter).**

	Normal values [min–max]	Patient August 2013	Patient Dec 2013	Patient Feb 2014	Patient July 2014
Leukocyte count	4,000–10,000	5,470	9,420	6,990	4,940
Neutrophil %	–	83	63	51	43
Neutrophil count (cells/mm <sup>3</sup> )	1,500–7,000	4,540	5,940	3,600	1,682
Lymphocytes %	–	15	17	33	41
Lymphocyte count (cells/mm <sup>3</sup> )	1,500–4,000	860	1,580	2,320	1,599
CD3 <sup>+</sup> T cells %	66–82	57	66	71	79
CD3 <sup>+</sup> T cell count (cells/mm <sup>3</sup> )	879–1,684	490	729	2,067	1,292
CD4 <sup>+</sup> T cells %	37–55	22	27	32	38
CD4 <sup>+</sup> T cell count (cells/mm <sup>3</sup> )	510–1,037	189	301	940	621
CD8 <sup>+</sup> T cells %	18–35	34	36	36	38
CD8 <sup>+</sup> T cell count (cells/mm <sup>3</sup> )	258–615	292	399	1,051	623
CD4/CD8 ratio	–	0.65	0.75	0.89	0.99
<b>CD8<sup>+</sup> T CELL SUB-POPULATIONS</b>					
% CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (Naive)	17–63		38	29	49
% CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (Central Memory)	2–12		27	13	18
% CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> (Effector Memory)	20–47		4	13	18
% CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> (TEMRA)	7–40		31	44	26
% CD38 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	2–7		43	15	16
CD19 <sup>+</sup> cells %	10–21		7	14	6
CD19 <sup>+</sup> cell count (cells/mm <sup>3</sup> )	137–341		78	382	111

was introduced (piperacillin-tazobactam, fluconazole, and amikacin). Orotracheal intubation and mechanical ventilation were needed. Cultures of abscess samples produced group F *Streptococcus* and *Escherichia coli*.

On August 8, a new septic shock occurred. CT showed abscesses of the liver, retroperitoneum, right kidney, right thigh, and psoas, associated with pneumoperitoneum linked to sigmoid perforation.

After beginning a new line of antibiotics (imipenem + amikacin), the patient was transferred to the ICU department at Saint-Antoine Hospital (Paris). Treatment required drainage procedures associated with a right nephrectomy and cholecystectomy. Cultures of the abscesses showed *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Bacteroides thetaiotaomicron*. Histological analysis of the right colon showed many ulcerations of the mucosa and submucosa, covered by many *Entamoeba histolytica*. Histological analysis of the right kidney showed many abscesses in which *E. histolytica* was present. Serology for *E. histolytica* was positive [Latex test: 1/32, positivity threshold >1/5; ELISA: 5 Arbitrary Unit (AU), positivity threshold >1.1 AU].

On August 12, the diagnosis of acute necrotizing colitis due to invasive amebiasis was made. Treatment began with a systemic antiamebic agent (ornidazole) for a month and a local antiamebic (tiliquinol) for 2 weeks.

Moreover, histological analysis of an abscess in the right kidney showed three large cells with eosinophilic inclusion bodies suggestive of invasive CMV. Immunohistochemical analysis of this area found CMV antigen. In addition, quantitative PCR detected CMV DNA in blood (viral load: 20,900/ml) and in

bronchoalveolar lavage fluid (viral load: 31,800/ml). Accordingly, treatment with ganciclovir began on August 12. ELISPOT-IFN-gamma assays were performed to evaluate CMV-specific T cells. Overlapping 15-mer peptides covering two CMV proteins serve as key target antigens for CMV-specific T cells: a late matrix protein (pp65) that is abundant during human CMV infection and an immediate early 1 (IE1) antigen protein that is indispensable for viral replication. CMV-specific T cells were mainly directed against pp65 but not against IE1 (data not shown); this finding suggests a non-protective immune response (Sacre et al., 2005).

On August 18, a new septic shock occurred. Abdominal CT showed new abscesses of the liver, retroperitoneum, right iliopsoas, and right thigh. A third surgery for abscess draining was performed, and antibiotherapy was enlarged to imipenem, vancomycin, ciprofloxacin. Furthermore, chest CT showed excavated nodules surrounded by ground glass opacity in both lungs. Macroscopic analysis of the newest abscesses revealed the presence of fungal filaments, and cultures were positive for *Aspergillus fumigatus*. *A. fumigatus* grew at 10E5 level in endotracheal aspiration. Moreover, the seric galactomanan elevated to 1.1 > 0.5.

These data indicated a diagnosis of confirmed invasive aspergillosis. The patient was then treated with voriconazole for 6 months.

Despite the severity of this condition, and despite 2 new episodes of ventilation associated pneumonia (VAP), documented with *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*, the condition of the patient improved. Tracheostomy was performed on September 13, to allow better ventilation



weaning. Tracheostomy was finally removed on September 29 and patient was transferred in medical ward in November 4.

On December 28, 2013, the patient developed a last sepsis with spondylodiscitis due to *K. pneumoniae* producing extended-spectrum-beta lactamase, treated with association of meropenem and tigecyclin during 3 months. The succession of infectious events is summarized in **Table 2**.

Further immunological studies sought to understand these repetitive infections. Standard immunological studies (complement system, serum immunoglobulins) yielded normal results. No monoclonal peak was identified. Analysis of the CD4 and CD8 T-cell subpopulations demonstrated a low CD4/CD8 ratio, a normal CD8 cell count associated with a decrease in effector memory CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T cells and a concomitant increase in the CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> central memory population, compared with levels in healthy controls. This disruption of CD8 homeostasis was associated with a marked increased percentage of CD8<sup>+</sup> lymphocytes expressing the activation markers HLA-DR and CD38 (**Table 1**). Nevertheless, functional studies of T lymphocytes showed normal production of intracellular cytokines, i.e., IL-2 and IFN $\gamma$ , after stimulation with CD3/CD28 and PMA (not shown).

In view of the severe recurrent and severe bacterial and fungal infections, we investigated neutrophil functions. Standard polymorphonuclear leukocyte (PMN) functional testing showed normal PMN migration under agarose and normal PMN chemiluminescence, respectively, ruling out leukocyte adhesion deficiency and chronic granulomatous disease. We then studied PMN responses elicited by toll-like receptor (TLR)-2, TLR4, TNF $\alpha$ , *A. fumigatus* germling conidia, and galactosaminogalactan (GG), a polysaccharide secreted by this fungus during early growth *in vivo* and reported to modulate immune response (Fontaine et al., 2011). As expected (Campillo-Gimenez et al., 2014), on stimulation, PMNs from controls shed L-selectin (CD62L) and increased their expression of the  $\beta$ 2 integrin, CD11b/CD18. L-selectin was not detectable at the surface of unstimulated PMNs from the patient (**Figure 1A**), and after treatment of his sample with TLR2, TLR4, TNF $\alpha$ , GG, or *A. fumigatus* germling conidia (**Figure 1C**), CD11b increased moderately or not at all (depending on the stimulant), compared with unstimulated PMNs (**Figures 1B,D**). Also as expected (Campillo-Gimenez et al., 2014; Robinet et al., 2014), pre-treatment of whole blood from controls with TLR2, TLR4, or TNF $\alpha$ , or with GG or *A. fumigatus* germling conidia, followed by stimulation with fMLP, a structural analog of bacterial metabolic products, strongly increased the production of reactive oxidative species (ROS) by PMNs. Incubation of whole blood with the different agonists had little stimulatory effect on ROS production by the patient's PMNs (**Figures 2A,B**). We did not detect any antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), which have previously been associated with invasive amebiasis (Pudifin et al., 1994) and might impair PMN functional activity (Bartunková et al., 1997). Finally, immediately after sampling (T0h), the percentage of circulating apoptotic PMNs from controls was <2%, while for the patient it reached 32% (**Figure 2D**). In addition, incubation of whole-blood samples from controls with TLR agonists and TNE, rather than PBS, significantly

decreased their percentage of apoptotic PMNs, as expected (Campillo-Gimenez et al., 2014; Robinet et al., 2014). Such PMN survival was not observed in the patient (**Figures 2C,D**).

Substantial improvement began within 3 months of initiating treatment with meropenem and tigecycline, for the spondylodiscitis in December 2013, and the patient's outcome was favorable. He was seen in consultation in July 2014 and June 2015. His general state was satisfactory; he has gained weight, returning to his baseline weight of 55 kg, and has had no infectious diseases. We have observed the progressive restoration of his CD4 count and homeostasis of the CD8<sup>+</sup> T cells and PMN defects (**Table 1, Figure 1**). In addition, an ELISpot assay against CMV peptides showed a new positive response against IE1 (data not shown).

## BACKGROUND

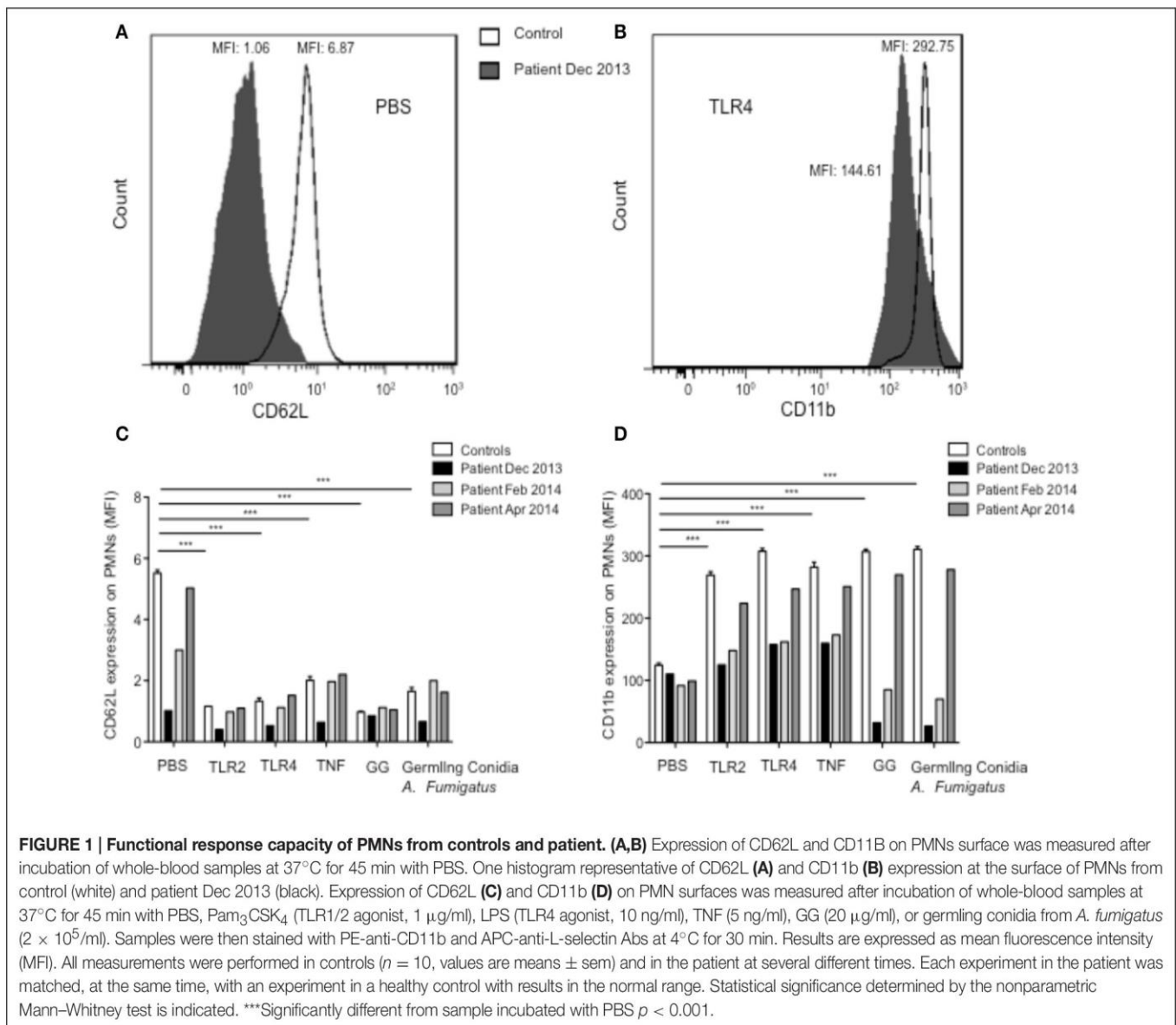
The enteric-dwelling protozoan parasite, *E. histolytica*, is the causative agent of amebiasis. Although, it is primarily a disease of underdeveloped countries, it may be found in travelers who have returned from endemic areas and ingested infective cysts through contaminated food or water. Compared with other parasites, the life cycle of *E. histolytica* is relatively simple and consists of 2 stages: the infectious cyst and the disease-inducing (motile) trophozoite stage. When amebic cysts are ingested via fecal contaminated food or water, they pass through the stomach and excyst in the terminal ileum where they mature into trophozoites and colonize the colon. About 90% of infections are asymptomatic (Haque et al., 2003). For unknown reasons, *E. histolytica* is capable of taking on a pathogenic phenotype. Disease occurs when trophozoites disrupt the mucosal barrier and penetrate the underlying tissue where they secrete enzymes that break down the extracellular matrix, destroy cells, and phagocytose cellular debris. After invading the mucosa and submucosa, trophozoites may enter portal circulation and disperse to the liver and other soft organs. Invasive disease includes dysentery and extra-intestinal amebiasis, most commonly amebic liver abscesses (ALAs), which occur in ~1% of symptomatic cases in developing countries. The host can mount both humoral and cell-mediated immune responses against *E. histolytica*, both of which are associated with protection. In patients with amebic colitis and ALA the parasite employs multiple strategies that allow it to successfully subvert the immune response and establish a chronic infection. In such cases the host develops a defective adaptive response incapable of clearing the parasite (Mortimer and Chadee, 2010; Nakada-Tsukui and Nozaki, 2016).

Sepsis is a descriptive term for a common disorder characterized by a broad and complex set of cellular changes evoked in response to infection or other signatures of danger. These changes are elicited by the engagement of conserved pattern recognition receptors including TLRs, NOD-like receptors (NLRs), RIG-I helicases, and C-type lectin receptors expressed on most cell types. They are ultimately effected through the expression or inhibition of a large number of immune and metabolic genes, and through post-translational changes in key intracellular proteins involved in

**TABLE 2 | Temporal scheme summarizing the succession of infectious events characterized by clinical features, microbial analysis, and results of computed tomography (CT) together with the description of the different surgery and anti-infectious treatments that were applied through time.**

Treatment	Amoxicillin gentamycin	Piperacillin + tazobactam amikacin fluconazole	Imipenem amikacin	Imipenem amikacin ornidazole ganciclovir	Imipenem ciprofloxacin vancomycin ornidazole ganciclovir	Meropenem tigecyclin voriconazole
Surgery	Abcess drain Right colectomy	Abcess drain Right colectomy	Abcess drain Right nephrectomy Cholecystectomy Stomy for sigmoid perforation		Abcess drain	
CT	Right retroperitoneum abcess, night colitis	Several abcess in peritoneum, right retroperitoneum, liver. Right colon perforation	New abcess in right retroperitoneum, right kidney, right psoas, liver. Pneumoperitoneum		New abcess in right retroperitoneum, right psoas, right thigh, liver Lung nodules with groun glass halo	L2-L3 Spondylodiscitis Excavation of lung nodules
Microbial samples	Streptococcus F bacteremia	Streptococcus F, <i>E. coli</i> in abcess Right colon: Many ulcerations and many <i>Entamoeba histolytica</i> histolytica	<i>E. coli</i> Bacteroides thetaiotaomicron, Staphylococcus epidermidis in abcess Right kidney: Several abcess, <i>E.</i> <i>histolytica</i> histolytica	Blood PCR CMV: 20,900/mL	- Clostridium Inocuum and <i>Aspergillus fumigatus</i> in abcess - Blood PCR CMV: 1,800/mL - BAL PCR CMV:31,800/mL - Galactomanan 1.1 > 0.5 - Endotracheal aspiration: 10 <sup>5</sup> <i>Aspergillus fumigatus</i>	Blood culture: Klebsiella pneumoniae Disco-vertebral biopsy: Klebsiella pneugnae
Clinical features	Fever, weight loss, and diarrhea since several weeks	Septic shock Endotracheal intubation Mechanical ventilation	New septic shock Mechanical ventilation		New septic shock Mechanical ventilation	Sepsis Spondylodiscitis
Time	07/12/2013	07/26–29/2013	08/02/2013	08/12/2013	08/18/2013	12/28/2013



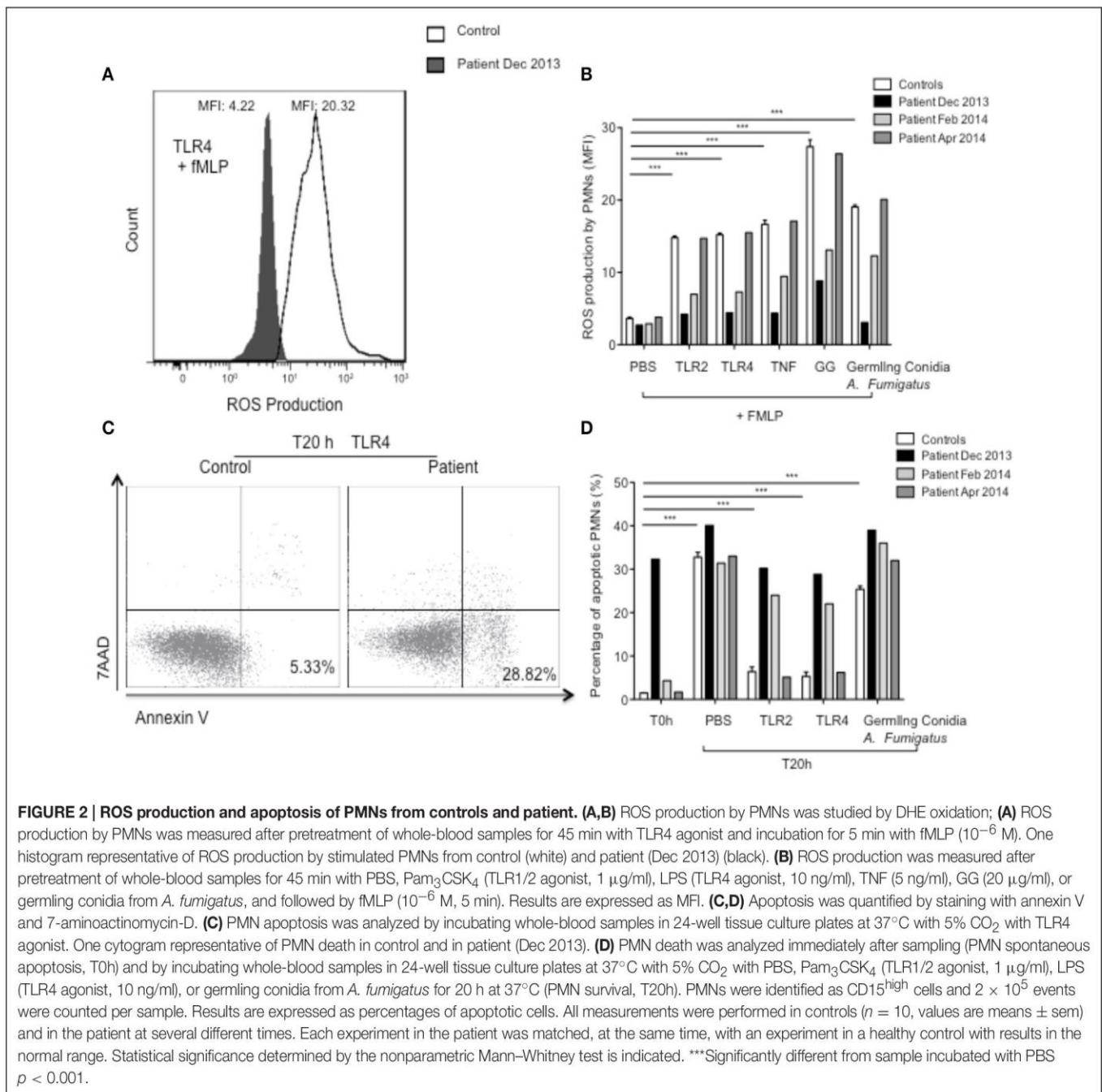


signaling and transcriptional regulation. Following resolution of the primary infection, sepsis patients are susceptible to secondary infections and it has become clear that a sepsis-induced immunosuppressive state accounts for this increased vulnerability toward secondary infections (Koch et al., 2017). Secondary infections include opportunistic bacterial and fungal infections and viral reactivation, Pneumonia is the most common type of infection and Gram-positive bacteria most frequently involved are *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*, whereas *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *P. aeruginosa* predominate among Gram-negative isolates. Bacteria-derived molecules like toxins degrade cell membranes resulting in upregulation of receptors targeted by bacteria for adhesion. This facilitates bacterial tissue invasion predisposing the host to secondary bacterial infections in a direct fashion. However, sepsis also renders the host more vulnerable toward secondary infections in an indirect fashion, by suppressing the immune system. In recent years, invasive Aspergillosis has also been recognized as an emerging disease of non-neutropenic patients

in patients admitted to the ICU, even in the absence of an apparent predisposing immunodeficiency (Bassetti et al. 2014). Bacterial sepsis is also an associated trigger of CMV reactivation. Reactivation events associated with sepsis have been related to inflammatory stimulation of early promoter, transient relative immunoparalysis, and epigenetic regulation of viral DNA (Mansfield et al., 2015).

## DISCUSSION

The amebic trophozoites develop multiple strategies to fend off the attack from elimination of immune cells. In particular, amebic trophozoites are able to kill a variety of cells, including T lymphocytes and neutrophils. *E. histolytica* is reported to kill T lymphocytes through an apoptotic process and to ingest apoptotic T cells via recognition of phosphatidylserine and collectins (Huston et al., 2000). In addition, a recent study reported that *E. histolytica* trophozoites ingested pieces of intact living T cells via trogocytosis. Killing and phago/trogocytosis of T



cells could thus explained the decrease in CD4 T cells associated with a decrease in CD4/CD8 ratio which has been reported in patients with amebiasis associated with extraintestinal diseases such as liver abscess, with most patients recovering a normal CD4/CD8 ratio by one year after infection (Mortimer and Chadee, 2010). We can thus speculate that the decrease in our patient's CD4 T-cell count resulted from amebiasis. This decreased CD4 count might explain the reactivation of CMV that appeared in the course of amebiasis. Active CMV infection is a well-known opportunistic infection in immunocompromised patients, associated with a high viral load (Jaskula et al., 2009). CMV reactivation might also be related to the proinflammatory response associated with sepsis, as previously reported (von Muller et al., 2007; Cook and Limaye, 2012; Mansfield et al.,

2016). Decrease in absolute number of all types of T cells has been reported in septic patients or septic shock, except the T regulatory cells. Thus, the decrease of CD4 count reported in the patient might also be related to septic conditions; nevertheless lymphopenia in sepsis is associated with a CD4/CD8 T cell ratio significantly elevated above normal range (Rimmelé et al., 2016).

At the peak of illness, the patient's CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T cell effector memory (TEM) count decreased at the same time as his CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> central memory (TCM) population increased. The memory T-cell pool functions as a dynamic repository of antigen-experienced T lymphocytes that accumulate over the individual's lifetime. Reactive memory is mediated by TCMs that home to T-cell areas of secondary



lymphoid organs, have little or no effector function, but readily proliferate and differentiate to effector cells in response to antigenic stimulation. TEMs migrate to inflamed peripheral tissues and display immediate effector function (Lanzavecchia and Sallusto, 2000). Decreases in the TEM subpopulation in the patient's peripheral blood may indicate that these cells migrated selectively out of the peripheral blood, or had a decreased survival rate, or that their differentiation from naive T cells to TCMs in peripheral blood was skewed. The disruption of peripheral blood homeostasis of CD8<sup>+</sup> T cells, associated with an increase in the percentage of CD8<sup>+</sup> lymphocytes expressing activation markers might reflect a persistent chronic inflammatory response, as previously reported in various pathological situations (Maldonado et al., 2003; Liu et al., 2007). In addition, septic conditions have been reported to substantially decrease the count of effector memory CD8 T-cells (Trgovcich et al., 2016).

PMNs play a very important role by combating bacterial and fungal infections. In response to pathogens, PMNs rapidly migrate from the blood to inflamed tissues where their activation triggers such microbicidal mechanisms such as the release of proteolytic enzymes and antimicrobial peptides, and the rapid production of ROS in oxidative burst (Nauseef and Borregaard, 2014). After killing microbes, PMNs die spontaneously, mainly by apoptosis; although they have a very short lifespan, their activation by circulating microbial products as well as by proinflammatory mediators promotes their survival and is a critical mechanism in their tissue accumulation and in their effectiveness against pathogens (Gabelloni et al., 2013). We analyzed the L-selectin (CD62L) and the  $\beta$ 2-integrin CD11b/CD18 that play major roles in transendothelial migration, as well as ROS production in priming conditions; this ROS production is critical for bacterial killing. The normal increase in CD11b expression and ROS production in response to various stimuli were defective in the patient's PMN. In the patient, we observed increased PMN spontaneous apoptosis and a decreased survival in response to inflammatory mediators. These data might be related to the direct effect of *E. histolytica* on PMN apoptosis, through the activation of caspase-3 cascade, previously reported *in vitro* (Sim et al., 2005) and might explain at least in part the decreased expression of L-selectin at the PMN surface as well as impaired functional capacities of PMN in response to various stimuli (Kobayashi et al., 2005). These findings might thus explain the patient's severe and repetitive bacterial and fungal infections.

Sepsis is associated to a transient immunosuppression and septic patients are susceptible to secondary infections including opportunistic bacterial and fungal infections. Sepsis in humans is associated with a marked inhibition of rates of constitutive PMN apoptosis (Taneja et al., 2004; Rimmelé et al., 2016). PMNs are also capable of mediating crucial innate immune functions during sepsis. In particular, oxidative burst capacity of septic PMNs is intact (Drifte et al., 2013; Parlato et al., 2014; Rimmelé et al., 2016). Thus, given the major role of PMN

against bacterial and fungal pathogens, it is highly likely that increased PMN apoptosis associated with impaired functional capacities of PMNs that we observed in the patient should be related to the direct effect of *E. histolytica* on PMN apoptosis and should be involved in the patient's increased susceptibility to bacterial and fungal infections. Of note, the first symptoms of the patient were weight loss and liquid stools; he developed a septic shock at a later stage. The initial sepsis due to *F. Streptococcus* and *E. coli*, the plurimicrobial context, as well as the recurrence of septic shocks are highly suggestive of an altered gut integrity which, considering the context, might be related to the acute necrotizing colitis due to invasive amebiasis. In addition, although invasive aspergillosis has been reported in non-neutropenic and septic patients admitted to the ICU, it occurs mainly in patients with quantitative and/or qualitative defects of PMNs (Bassetti et al., 2014). Altogether, these data strongly suggest that invasive amebiasis might be the starting point of a new infectious burst.

## CONCLUDING REMARKS

In conclusion, the case presented here enabled us to describe for the first time invasive amebiasis associated with CD4 lymphopenia and PMN defects. These later alterations could be related to the direct effect of *E. histolytica* on T lymphocytes and PMN apoptosis previously reported by *in vitro* studies. These abnormalities might be the starting point of a new infectious burst. In fact, the decreased CD4 count might explain, at least in part, the reactivation of CMV that appeared in the course of amebiasis. Impaired functional capacities of PMN in response to various stimuli might explain the patient's severe and repetitive bacterial and fungal infections.

## ETHICS STATEMENT

All the clinical and paraclinic investigations were carried out only in the purpose of establishing a diagnosis and treating the patient and not in order to perform a research study. In France, such measurements that are vital for the patient and are part of a routine monitoring do not require an informed consent. The patient has given his consent for the publication of this manuscript.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

EG, KL, TL, and MM were involved in patient's recruitment and characterization, and summarized the patient's medical report. CE and AG designed the experiments. PR performed the experiments; TF prepared *A. fumigatus* germling conidia and galactosaminogalactan. AG, YD, MM, and CE contributed to data analysis. MM and CE wrote the manuscript with comments from co-authors. All the authors read and approved the final manuscript.



## REFERENCES

- Bartunková, J., Araujo, A., Hrusák, O., and Sedivá, A. (1997). Autoimmunity to polymorphonuclears: functional consequences of the binding of antibodies to membrane and cytoplasmic target antigens of polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Immunol.* 17, 455–461. doi: 10.1023/A:1027315609478
- Bassetti, M., Righi, E., De Pascale, G., De Gaudio, R., Giarratano, A., Mazzei, T., et al. (2014). How to manage aspergillosis in non-neutropenic intensive care unit patients. *Crit. Care* 18, 458. doi: 10.1186/s13054-014-0458-4
- Campillo-Gimenez, L., Casulli, S., Dudoit, Y., Seang, S., Carcelain, G., Lambert-Niclot, S., et al. (2014). Neutrophils in antiretroviral therapy-controlled HIV demonstrate hyperactivation associated with a specific IL-17/IL-22 environment. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134, 1142–52.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2014.05.040
- Cook, C. H., and Limaye, A. P. (2012). Cytomegalovirus serostatus and outcome during critical illness. *Crit. Care Med.* 40, 2740–2741. doi: 10.1097/CCM.0b013e31825adc33
- Drifte, G., Dunn-Siegrist, I., Tissières, P., and Pugin, J. (2013). Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care Med.* 41, 820–832. doi: 10.1097/CCM.0b013e318274647d
- Fontaine, T., Delangle, A., Simenel, C., Coddeville, B., van Vliet, S. J., van Kooyk, Y., et al. (2011). Galactosaminogalactan, a new immunosuppressive polysaccharide of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* 7:e1002372. doi: 10.1371/journal.ppat.1002372
- Gabelloni, M. L., Trevani, A. S., Sabatté, J., and Geffner, J. (2013). Mechanisms regulating neutrophil survival and cell death. *Semin. Immunopathol.* 35, 423–437. doi: 10.1007/s00281-013-0364-x
- Haque, R., Huston, C. D., Hughes, M., Houpt, E., and Petri, W. A. Jr. (2003). Amebiasis. *N. Engl. J. Med.* 348, 1565–1573. doi: 10.1056/NEJMra022710
- Huston, C. D., Houpt, E. R., Mann, B. J., Hahn, C. S., and Petri, W. A. Jr. (2000). Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.* 2, 617–625. doi: 10.1046/j.1462-5822.2000.00085.x
- Jaskula, E., Dlubek, D., Duda, D., Bogunia-Kubik, K., Mlynarczewska, A., and Lange, A. (2009). Interferon gamma 13-CA-repeat homozygous genotype and a low proportion of CD4<sup>+</sup> lymphocytes are independent risk factors for cytomegalovirus reactivation with a high number of copies in hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 15, 1296–1305. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.06.008
- Kobayashi, S. D., Voyich, J. M., Whitney, A. R., and DeLeo, F. R. (2005). Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *J. Leukoc. Biol.* 78, 1408–1418. doi: 10.1189/jlb.0605289
- Koch, R. M., Kox, M., de Jonge, M. I., van der Hoeven, J. G., Ferwerda, G., and Pickkers, P. (2017). Patterns in bacterial- and viral-induced immunosuppression and secondary infections in the ICU. *Shock.* 47, 5–12. doi: 10.1097/SHK.0000000000000731
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000). Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290, 92–97. doi: 10.1126/science.290.5489.92
- Liu, G. Z., Fang, L. B., Hjelmström, P., and Gao, X. G. (2007). Increased CD8<sup>+</sup> central memory T cells in patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 13, 149–155. doi: 10.1177/1352458506069246
- Maldonado, A., Mueller, Y. M., Thomas, P., Bojczuk, P., O'Connors, C., and Katsikis, P. D. (2003). Decreased effector memory CD45RA<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells and increased central memory CD45RA<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res. Ther.* 5, R91–R96. doi: 10.1186/ar619
- Mansfield, S., Dwivedi, V., Byrd, S., Trgovcich, J., Griessl, M., Gutknecht, M., et al. (2016). Broncholaveolar lavage to detect cytomegalovirus infection, latency, and reactivation in immune competent hosts. *J. Med. Virol.* 88, 1408–1416. doi: 10.1002/jmv.24472
- Mansfield, S., Griefsl, M., Gutknecht, M., and Cook, C. H. (2015). Sepsis and cytomegalovirus: foes or conspirators? *Med. Microbiol. Immunol.* 204, 431–437. doi: 10.1007/s00430-015-0407-0
- Mortimer, L., and Chadee, K. (2010). The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitol.* 126, 366–380. doi: 10.1016/j.exppara.2010.03.005
- Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2016). Immune response of amebiasis and immune evasion by *Entamoeba histolytica*. *Front. Immunol.* 7:175. doi: 10.3389/fimmu.2016.00175
- Nauseef, W. M., and Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nat. Immunol.* 15, 602–611. doi: 10.1038/ni.2921
- Parlato, M., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Philippart, F., Misset, B., Adib-Conquy, M., and Cavaillon, J. M. (2014). CD24-triggered caspase-dependent apoptosis via mitochondrial membrane depolarization and reactive oxygen species production of human neutrophils is impaired in sepsis. *J. Immunol.* 192, 2449–2459. doi: 10.4049/jimmunol.1301055
- Pudifin, D. J., Duursma, J., Gathiram, V., and Jackson, T. F. (1994). Invasive amoebiasis is associated with the development of anti-neutrophil cytoplasmic antibody. *Clin. Exp. Immunol.* 97, 48–51. doi: 10.1111/j.1365-2249.1994.tb06578.x
- Rimmelé, T., Payen, D., Cantaluppi, V., Marshall, J., Gomez, H., Gomez, A., et al. (2016). Immune cell phenotype and function sepsis. *Shock* 45, 282–291. doi: 10.1097/SHK.0000000000000495
- Robinet, P., Baychelier, F., Fontaine, T., Picard, C., Debré, P., Vieillard, V., et al. (2014). A polysaccharide virulence factor of a human fungal pathogen induces neutrophil apoptosis via NK cells. *J. Immunol.* 192, 5332–5342. doi: 10.4049/jimmunol.1303180
- Sacre, K., Carcelain, G., Cassoux, N., Fillet, A. M., Costagliola, D., Vittecoq, D., et al. (2005). Repertoire, diversity, and differentiation of specific CD8 T cells are associated with immune protection against human cytomegalovirus disease. *J. Exp. Med.* 201, 1999–2010. doi: 10.1084/jem.20042408
- Sim, S., Yong, T. S., Park, S. J., Im, K. I., Kong, Y., Ryu, J. S., et al. (2005). NADPH oxidase-derived reactive oxygen species-mediated activation of ERK1/2 is required for apoptosis of human neutrophils induced by *Entamoeba histolytica*. *J. Immunol.* 174, 4279–4288. doi: 10.4049/jimmunol.174.7.4279
- Taneja, R., Parodo, J., Kapus, A., Rotstein, O. D., and Marshall, J. C. (2004). Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential (DYM) and reduced caspase-9 activity. *Crit. Care Med.* 32, 1460–1469. doi: 10.1097/01.CCM.0000129975.26905.77
- Trgovcich, J., Kincaid, M., Thomas, A., Griessl, M., Zimmerman, P., Dwivedi, V., et al. (2016). Cytomegalovirus reinfections stimulate CD8 T-memory inflation. *PLoS ONE* 11:e0167097. doi: 10.1371/journal.pone.0167097
- von Muller, L., Klemm, A., Durmus, N., Weiss, M., Suger-Wiedeck, H., Schneider, M., et al. (2007). Cellular immunity and active human cytomegalovirus infection in patients with septic shock. *J. Infect. Dis.* 196, 1288–1295. doi: 10.1086/522429

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The reviewer WS and handling Editor declared their shared affiliation, and the handling Editor states that the process nevertheless met the standards of a fair and objective review.

Copyright © 2017 Ghrenassia, Guihot, Dong, Robinet, Fontaine, Lacombe, Lescot, Meyohas and Elbim. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Article III

## Hippocampal T cell infiltration promotes neuroinflammation and cognitive decline in a mouse model of tauopathy

Auteurs :

Cyril Laurent, Guillaume Dorothée\*, Stéphane Hunot\*, Elodie Martin\*, Yann Monnet, Marie Duchamp, **Yuan Dong**, François-Pierre Légeron, Antoine Leboucher, Sylvie Burnouf, Emilie Faivre, Kévin Carvalho, Raphaëlle Caillierez, Nadège Zommer, Dominique Demeyer, Nathalie Jouy, Veronique Sazdovitch, Susanna Schraen-Maschke, Cécile Delarasse, Luc Buée<sup>#</sup>, David Blum<sup>#</sup>



# Hippocampal T cell infiltration promotes neuroinflammation and cognitive decline in a mouse model of tauopathy

Cyril Laurent,<sup>1</sup> Guillaume Dorothee,<sup>2,3,\*</sup> Stéphane Hunot,<sup>4,5,6,7,\*</sup> Elodie Martin,<sup>4,5,6,7,\*</sup> Yann Monnet,<sup>4,5,6,7</sup> Marie Duchamp,<sup>2,3</sup> Yuan Dong,<sup>2,3</sup> François-Pierre Légeron,<sup>4,5,6,7</sup> Antoine Leboucher,<sup>1</sup> Sylvie Burnouf,<sup>1</sup> Emilie Faivre,<sup>1</sup> Kévin Carvalho,<sup>1</sup> Raphaëlle Caillierez,<sup>1</sup> Nadège Zommer,<sup>1</sup> Dominique Demeyer,<sup>1</sup> Nathalie Jouy,<sup>1,8</sup> Veronique Sazdovitch,<sup>4,5,9</sup> Susanna Schraen-Maschke,<sup>1</sup> Cécile Delarasse,<sup>4,5,6,7</sup> Luc Buée<sup>1,#</sup> and David Blum<sup>1,#</sup>

\*,# These authors contributed equally to this work.

Alzheimer's disease is characterized by the combined presence of amyloid plaques and tau pathology, the latter being correlated with the progression of clinical symptoms. Neuroinflammatory changes are thought to be major contributors to Alzheimer's disease pathophysiology, even if their precise role still remains largely debated. Notably, to what extent immune responses contribute to cognitive impairments promoted by tau pathology remains poorly understood. To address this question, we took advantage of the THY-Tau22 mouse model that progressively develops hippocampal tau pathology paralleling cognitive deficits and reappraised the interrelationship between tau pathology and brain immune responses. In addition to conventional astroglial and microglial responses, we identified a CD8-positive T cell infiltration in the hippocampus of tau transgenic mice associated with an early chemokine response, notably involving CCL3. Interestingly, CD8-positive lymphocyte infiltration was also observed in the cortex of patients exhibiting frontotemporal dementia with P301L tau mutation. To gain insights into the functional involvement of T cell infiltration in the pathophysiological development of tauopathy in THY-Tau22 mice, we chronically depleted T cells using anti-CD3 antibody. Such anti-CD3 treatment prevented hippocampal T cell infiltration in tau transgenic animals and reverted spatial memory deficits, in absence of tau pathology modulation. Altogether, these data support an instrumental role of hippocampal T cell infiltration in tau-driven pathophysiology and cognitive impairments in Alzheimer's disease and other tauopathies.

1 Univ. Lille, Inserm, CHU-Lille, UMR-S 1172, Alzheimer and Tauopathies, Lille, France

2 INSERM, UMRS 938, CdR Saint-Antoine, Laboratory Immune System, Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases, Hôpital St-Antoine, Paris, France

3 Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMRS 938, CdR Saint-Antoine, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France

4 Inserm, U 1127, F-75013, Paris, France

5 CNRS, UMR 7225, F-75013, Paris, France

6 Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR S 1127, F-75013, Paris, France

7 Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, F-75013, Paris, France

8 BioImaging center of Lille, 59045 Lille, France

9 Laboratoire de Neuropathologie Escourolle, Hôpital de la Salpêtrière, AP-HP, Paris, France

Correspondence to: Dr David Blum

Inserm UMR-S1172, 'Alzheimer and Tauopathies', Place de Verdun, 59045, Lille Cedex, France

E-mail: david.blum@inserm.fr

Received March 29, 2016. Revised August 28, 2016. Accepted September 5, 2016. Advance Access publication November 5, 2016

© The Author (2016). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)



**Keywords:** tauopathy; T cells; neuroinflammation; chemokines; frontotemporal lobar degeneration

**Abbreviations:** IgG = immunoglobulin G; IFN $\gamma$  = interferon- $\gamma$ ; TCR = T cell receptor; TNF $\alpha$  = tumor necrosis factor  $\alpha$

## Introduction

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder characterized by the progressive development of memory deficits. Its neuropathology is defined by extracellular accumulation of amyloid- $\beta$  peptides into amyloid plaques and intraneuronal fibrillar aggregates of hyper- and abnormally phosphorylated tau proteins (Masters *et al.*, 1985; Sergeant *et al.*, 2008). Lesions in Alzheimer's disease lead to activation of microglial and astroglial cells, triggering a chronic neuroinflammatory innate immune response. Contribution of such neuroinflammation to the pathophysiology of Alzheimer's disease remains highly debated, with both beneficial impacts and detrimental effects that may promote the neurodegenerative process (for review see Heneka *et al.*, 2015). Finally, recent genetic evidence also supported a role of innate immune system in Alzheimer's disease aetiology (Guerreiro *et al.*, 2013; Lambert *et al.*, 2013).

Besides innate neuroinflammation, accumulating evidence emphasizes the involvement of cellular adaptive immunity in the pathophysiology of Alzheimer's disease. Polymorphisms in genes associated with antigen presentation to T cells were identified as susceptibility loci for Alzheimer's disease (Jones *et al.*, 2010; Lambert *et al.*, 2010, 2013). In addition, increased T cell infiltration in the brain parenchyma and enhanced peripheral T cell responses to amyloid- $\beta$  have previously been described in patients with Alzheimer's disease (Rogers *et al.*, 1988; Togo *et al.*, 2002; Monsonego *et al.*, 2003). Of note, higher proportion of activated CD8<sup>+</sup> T cells in the CSF of patients correlated with clinical and structural markers of the pathology (Lueg *et al.*, 2015). Finally, previous reports in mouse models developing amyloid pathology suggested that different types of amyloid- $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cells might either promote both enhanced amyloid- $\beta$  clearance and encephalitis, or reverse cognitive decline and synaptic loss (Ethell *et al.*, 2006; Monsonego *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2009). However, the role of T cells in Alzheimer's disease pathophysiology remains largely ill-defined.

Whereas most studies investigating the role of innate neuroinflammation or adaptive immunity in Alzheimer's disease were carried out in the context of amyloid pathology, much less is known regarding brain immune responses associated with tauopathy. In Alzheimer's disease, tau pathology is observed early in the brainstem and entorhinal cortex (Braak *et al.*, 2011). Its progression from entorhinal cortex to hippocampus and lastly neocortex is associated with progression of clinical symptoms (Duyckaerts *et al.*, 1997; Delacourte *et al.*, 1999; Grober *et al.*, 1999), supporting a pivotal role of tau pathology in cognitive deficits. In accordance, tau pathology has been associated with hippocampal synaptic impairments and

memory deficits in tau transgenic models (Burnouf *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2015). To what extent immune responses may contribute to tau-triggered cognitive decline in Alzheimer's disease remains poorly understood. Previous studies largely focused on the role of glial cells, showing that tau pathology is prone to activate microglia and astrocytes (Bellucci *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2008; Belarbi *et al.*, 2011). In a detrimental circle, microglia activation was suggested to play an important role in the development/spreading of tau pathology and associated memory deficits (Yoshiyama *et al.*, 2007; Gorlovoy *et al.*, 2009; Bhaskar *et al.*, 2010; Nash *et al.*, 2013; Asai *et al.*, 2015). In sharp contrast, the link between tau-related pathology and T cell responses remains totally unknown.

In the present study, we sought to investigate the relationships between tau pathology and brain innate and cellular adaptive immunity using the THY-Tau22 mouse model, which progressively develops hippocampal tauopathy and spatial memory deficits (Burnouf *et al.*, 2013; Laurent *et al.*, 2016). In addition to the expected activation of microglia and astrocytes, our data demonstrate that hippocampal tau pathology is associated with chemokine production and parenchymal T cell infiltration. Importantly, T cell depletion improved spatial memory of THY-Tau22 mice, suggesting an instrumental role of cellular adaptive immunity into tau-triggered cognitive deficits in Alzheimer's disease.

## Materials and methods

### Animals and study design

THY-Tau22 mice (C57BL/6J background) were generated by overexpression of human four-repeat tau mutated at sites G272V and P301S under the control of the neuronal Thy1.2 expression cassette (Schindowski *et al.*, 2006). Non-transgenic wild-type littermates were used as controls. Mice were housed (four to six per cage) in a specific and opportunistic pathogen-free facility and maintained on a 12-h light-dark cycle with *ad libitum* access to food and water. Providing no major gender-related differences were demonstrated in THY-Tau22 mice (Laurent *et al.*, 2016; data not shown), in the present study, both males and females were used for the characterization of immune responses and females to study the effect of anti-CD3 treatment.

Characterization of hippocampal neuroinflammatory responses in THY-Tau22 animals was carried out from 3 months of age (early disease stages) to 12 months of age, when tau pathology and memory deficits are maximal in this model (Burnouf *et al.*, 2012; Van der Jeugd *et al.*, 2013). For such characterization, some of the mice were sacrificed by cervical dislocation, brains harvested and hippocampi dissected out using a coronal acrylic slicer (Deltamicroscopies) at 4°C



and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for biochemical and mRNA analyses. Mice used for immunohistochemical studies were transcardially perfused with NaCl 0.9% and paraformaldehyde 4%, brains were harvested, post-fixed for 24 h in paraformaldehyde 4% and cryoprotected in 20% sucrose before being frozen.

Contribution of T cells to the pathophysiological development in THY-Tau22 mice was investigated following intraperitoneal administration (5 mg/kg every 2 weeks) of depleting hamster anti-mouse CD3 $\epsilon$  monoclonal IgG1 antibody (clone 145-2C11; BioXcell BE0001-1) or hamster IgG isotype control (BioXcell BE0091) (BioXCell). A total of 58 animals were assigned to balanced groups (wild-type iso, wild-type anti-CD3, Tau22 iso and Tau22 anti-CD3). Body weight was measured all along the protocol for monitoring healthy condition of animals (not shown). Blood was collected by tail vein sampling, and flow cytometry analyses were carried out for monitoring treatment efficiency and specificity. T cell depletion was initiated at 4 months of age, i.e. before lymphocyte infiltration was detected, and maintained until 9 months of age, when transgenic animals exhibit maximal T cell recruitment (Fig. 3). At completion of anti-CD3 experiment, half of the animals were transcardially perfused as indicated above. Hippocampi from remaining brains were dissected out for later biochemical analyses. All protocols involving animal studies were approved by local ethics committee (agreement n $^{\circ}$ CEEA 062010R).

## CD8 immunohistochemistry in post-mortem brain of patients exhibiting frontotemporal dementia with P301L mutation

Experiments using human post-mortem material were approved by the 'Comité de Protection des Personnes' review board (Ile de France 1, Paris, France). Immunohistochemical staining on human brain was performed on autopsy cortical tissue (temporal) from three control subjects and three patients with frontotemporal dementia and P301L tau mutation (Papegaey *et al.*, 2016). Tissue was fixed in formaldehyde and then embedded in paraffin. Paraffin-embedded tissues were cut in serial 8  $\mu\text{m}$  thick slices on a microtome, and sections were recovered on SuperFrost $^{\text{®}}$  Plus slides (Kindler O GmbH), before incubation at  $56^{\circ}\text{C}$  for 3 days. Diseased individuals and control subjects did not differ in terms of their mean age at death [frontotemporal patients,  $58 \pm 7.5$  years of age; controls  $65 \pm 6$  years of age;  $P = 0.5$ , Student's *t*-test; mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM)] or the mean interval from death to the freezing of tissue (frontotemporal patients,  $18.0 \pm 9.8$  h; controls  $22.0 \pm 7.5$  h;  $P = 0.78$ ; Student's *t*-test; mean  $\pm$  SEM).

Immunohistochemistry was performed using the Ventana BenchMark LT (Ventana Medical System Inc.). The fully automated processing of barcode-labelled slides included baking of the slides, solvent-free deparaffinization and 30 min of CC1 (Tris/EDTA buffer pH 8.0) antigen retrieval. Human slides were incubated with primary antibody directed against CD8 (clone C8/144B; mouse monoclonal IgG1; dilution 1/25, Dako) for 32 min at room temperature. Staining was revealed by the ABC method (Vector Laboratories) with

3,3-diaminobenzidine as the peroxidase substrate and sections were counterstained with haematoxylin and eosin solution.

## Mouse tissue immunostainings

For immunohistochemical staining, 40  $\mu\text{m}$  floating sections were incubated with primary antibodies directed against Mac-1/CD11b (clone 5C6; rat monoclonal IgG2b; dilution 1/250, AbD Serotec), GFAP (rabbit polyclonal Ig fraction; dilution 1/4000; Dako Z0334), CD8 $\alpha$ , (clone KT15; rat monoclonal IgG2a; dilution 1/100; AbD Serotec) or CD4 (clone YTS191.1; rat monoclonal IgG2a; dilution 1/100, AbD Serotec), at  $4^{\circ}\text{C}$  for 24 to 48 h. Staining was revealed by the ABC method (Vector Laboratories) with 3,3'-diaminobenzidine as the peroxidase substrate.

For immunofluorescent stainings, brain sections were incubated with the following primary antibodies directed against zonula occludens-1 (rabbit polyclonal Ig fraction; dilution 1/500; Zymed), occludin (rabbit polyclonal Ig fraction; dilution 1/500; Zymed), von Willebrand factor (mouse monoclonal clone G-11; dilution 1/200; Santa Cruz). Appropriate Alexa Fluor $^{\text{®}}$  488- and Alexa Fluor $^{\text{®}}$  568-conjugated secondary antibodies (Invitrogen) were incubated for 1 h at room temperature at 1:1000 dilution to reveal the primary antibodies. Sections were counterstained and mounted with Vectashield/DAPI (Vector). Images were acquired on a LSM 710 confocal laser-scanning confocal microscope (Carl Zeiss).

For CCL3 immunofluorescence, brain sections were simultaneously incubated for 48 h at  $4^{\circ}\text{C}$  with two primary antibodies developed in different species and diluted in PBS 0.1 M plus 0.1% Triton $^{\text{TM}}$  X-100: anti-CCL3 (AF-450-NA; Goat IgG; dilution 1:100; R&D Systems) and anti-Iba1 (019-19741; rabbit polyclonal; dilution 1/500; Wako) or anti-GFAP (Z0334; rabbit polyclonal; dilution 1/500; Dako). Appropriate donkey Alexa Fluor $^{\text{®}}$  488- and Alexa Fluor $^{\text{®}}$  647-conjugated secondary antibodies (Life Technologies) were incubated for 1 h at room temperature at 1/1000 dilution to reveal the primary antibodies. DAPI counterstaining (Invitrogen, P36931, dilution 1/1000, 5-min incubation) was performed to reveal nuclei. Sections were examined with an upright confocal microscope Olympus FV-1000 using Olympus FV-1000 software. Images were then prepared with ImageJ software. Noteworthy, specificity of CCL3 immunostaining was validated using immunoabsorption and use of CCL3 knockout mice (not shown).

For IgG immunofluorescence, brain sections were incubated for 1 h at room temperature with antibody directed against total mouse IgG (Alexa Fluor $^{\text{®}}$  488-conjugated goat anti-mouse IgG, 1/500; Life technologies). Sections were counterstained and mounted with Vectashield/DAPI (Vector). Images were acquired with an Apotome microscope (Imager Z1; Zeiss).

## Y-maze studies

Short-term spatial memory was assessed in a spontaneous novelty-based spatial preference Y-maze test as previously described (Laurent *et al.*, 2016). Each arm of the Y-maze was 22-cm long, 6.4-cm wide, with 15-cm high opaque walls. Different extramaze cues were placed on the surrounding walls. Sawdust was placed in the maze during the experiments and mixed between each phase. Allocation of arms was



counterbalanced within each group. During the exposure phase, mice were placed at the end of the ‘start’ arm and were allowed to explore the ‘start’ arm and the ‘other’ arm for 5 min (beginning from the time the mouse first left the start arm). Access to the third arm of the maze (‘novel’ arm) was blocked by an opaque door. The mouse was then removed from the maze and returned to its home cage for 2 min. In the test phase, the mouse was placed again in the ‘start’ arm of the maze, the door of the ‘novel’ arm was removed and the mouse was allowed to explore the maze for 5 min (from the time the mouse first left the start arm). The amount of time the mouse spent in each arm of the maze was recorded during both exposure and test phases using EthovisionXT (Noldus Information Technology).

## mRNA extraction and quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction

Total RNA were extracted from hippocampi and purified using the RNeasy<sup>®</sup> Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen). One microgram of total RNA was reverse-transcribed using the High-Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis was performed on an Applied Biosystems Prism 7900 System using Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The thermal cycler conditions were as follows: 95°C for 10 min, then 45 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 25 s. Sequences of primers used in this study are given in Supplementary Table 1. Cyclophilin A (*Ppia*) was used as a reference housekeeping gene for normalization. Amplifications were carried out in triplicate and the relative expression of target genes was determined by the  $\Delta\Delta C_t$  method.

## Microarray study and GO term enrichment

RNA quality was checked on RNA 6000 Nano chips using a Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies). RNA samples used for microarray experiments had RNA integrity numbers (RINs) > 8.3. Agilent’s Quick Amp labelling Kit (One-color) was used to generate fluorescent cRNA. The amplified cyanine 3-labelled cRNA samples were then purified using Qiagen’s RNeasy<sup>®</sup> mini spin columns and hybridized to Agilent Whole Mouse Genome Microarrays, 4x44K microarray. Slides were washed and scanned with the Agilent scanner G2505C, according to manufacturer’s standard protocol. Information from probe features was extracted from microarray scan images using the Agilent Feature Extraction software v.10.5.1.1. Analyses were performed using GeneSpring 10.0 (Agilent Technologies). Normalization between arrays was performed using the 75 percentile method, flagged probes and low intensity ones in both conditions were removed from statistical analysis. Student *t*-test was performed with Benjamini-Hochberg multiple testing correction as implemented in GeneSpring 10.0 with a *P*-value cut-off of 0.05. Finally we applied a fold change threshold of 2 and found 32 2-fold differentially expressed genes. We carried out a (Gene Ontology) GO-term enrichment analysis for the 32

differentially expressed genes using AmiGO (version 1.7) and MGI as a reference database (GO database release 2010-02-08), with a minimum number of gene products of 2 and a 0.01 *P*-value cut-off with Bonferroni correction. Three genes were excluded from the GO-term enrichment analysis because of their exclusion from the GO database.

## Biochemical studies

Tissue was homogenized in 200  $\mu$ l Tris buffer (pH 7.4) containing 10% sucrose and protease inhibitors (Complete; Roche Diagnostics), sonicated and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Protein amounts were quantified using the BCA assay (Pierce), and samples diluted with lithium dodecyl sulphate buffer ( $2\times$ ) supplemented with reducing agents (Invitrogen) and then separated on 4–12% NuPAGE<sup>®</sup> Novex gels (Invitrogen). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes, which were then saturated with 5% non-fat dried milk or 5% bovine serum albumin in TNT (Tris 15 mM pH 8, NaCl 140 mM, 0.05% Tween) and incubated at 4°C for 24 h with the primary antibodies directed against phosphoepitope of tau protein as follows: phospho(p)-Tyr18, pThr212/pSer214 (AT100) (Pierce), pSer262, pSer404, pSer422 (Invitrogen); dephosphorylated tau (Tau1, Millipore), total tau Cter (in-house antibody recognizing the 11 amino acids in COOH-terminal part of tau), HT7 (MN1000, Thermo Scientific). We also used anti-Arc (SantaCruz, sc17839) and anti 14-3-3 (Santa Cruz, 1019) antibodies. Appropriate HRP-conjugated secondary antibodies were incubated for 1 h at room temperature and signals were visualized using chemoluminescence kits (ECL, Amersham Bioscience) and a LAS4000 imaging system (Fujifilm). Results were normalized to actin and quantifications were performed using ImageJ software (Scion Software).

## ELISA

Hippocampal tissues were homogenized in RIPA buffer (Tris HCl 25 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, sodium deoxycholate 1%, SDS 0.1%, pH 7.6). The resulting lysates were sonicated and incubated for 1 h at 4°C under agitation before centrifugation (12 000 g, 4°C, 15 min). Supernatants were collected and protein amounts determined using the BCA assay (Pierce). CCL3, CCL4 and CCL5 levels were quantified using commercially available ELISA assays (R&D Systems) after loading 300  $\mu$ g of proteins in 50  $\mu$ l volume.

## Isolation of brain-myeloid cells

Preparation of CNS-immune cells was performed using Percoll<sup>®</sup> separation as described previously (Fazilleau *et al.*, 2007). Briefly, mice were perfused with phosphate-buffered saline (PBS) and the brains were dissected out and homogenized in 5 ml of PBS with collagenase IV at 0.2 mg/ml and DNase I at 1 mg/ml (both from Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The brain homogenate was washed with PBS-foetal bovine serum 5% and centrifuged in a 30/37/70% Percoll<sup>®</sup> gradient (GE Healthcare). Myeloid cells were recovered from the 37/70% Percoll<sup>®</sup> interphase and washed. The pellet containing the myeloid cells was resuspended in 400  $\mu$ l PBS-bovine serum albumin 0.5%. Binding of antibodies to Fc receptors was prevented by adding 1  $\mu$ g Fc-block (anti-CD16/CD32 antibodies). One hundred microlitres of cells were



labelled with 100  $\mu$ l of primary antibodies mix: anti-CD45-V450 (30F11) (BD Biosciences) and anti-CD11b-PerCPCy5.5 (M1/70) (eBioscience). After labelling, cells were fixed in 1% paraformaldehyde. A logical gate strategy was applied for the fluorescence-activated cell sorting (FACS) experiments: a morphological gating referred to dot plot FSC-Area versus SSC-Area and duplets discrimination referred to dot plot FSC-Area versus FSC-Height. To standardize our FACS analyses, we analysed the same number of cells for each sample i.e. 20 000 events in this gate per sample. For compensation settings, compbeads (BD Biosciences) with corresponding antibodies were used. Fluorescence intensities were measured using a FACS Verse analyser (BD Biosciences) and data were analysed using the FlowJo Software (FlowJo LLC).

## T cell analyses

Efficiency and specificity of T cell depletion was monitored by flow cytometry. B and T lymphocytes were quantified in blood samples the day before and 5 days after anti-CD3 or isotype control administration. Cells were first incubated for 10 min with FcR-blocking antibodies (2.4G2; BD Biosciences) to avoid non-specific staining, and then surface stained with phycoerythrin-conjugated anti-CD19 (1D3; BD Biosciences) and allophycocyanin-conjugated anti-TCR $\beta$  (H57-597; BD Biosciences) antibodies. In a pilot cohort, 5 days after treatment completion single-cell suspensions were prepared from spleen and pooled popliteal, cervical, inguinal and mesenteric lymph nodes, and then analysed similarly.

In other experiments, we carried out a detailed phenotypic analysis of both CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> peripheral T cells in the blood, spleen and pooled lymph nodes from 5/6-month-old wild-type and THY-Tau22 mice. Cells were first incubated with FcR blocking antibody (2.4G2; BD Biosciences) to avoid non-specific staining. Anti-CD3-FITC (145-2C11), anti-CD8-PerCPCy5.5 (53-6.7), anti-CD4-APC (RM4-5), anti-CD62L-PE (MEL-14), and anti-CD44-Alexa Fluor<sup>®</sup> 700 (IM7) (all from BD Biosciences) were then used for cell-surface staining.

Purified CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from splenocytes of wild-type and THY-Tau22 mice by magnetic cell sorting, using Dynal Mouse CD4 negative isolation kit and Dynabeads<sup>®</sup> untouched mouse CD8 cells kit (Invitrogen), according to manufacturer's instructions. Purity of isolated cells was evaluated by flow cytometry using anti-CD3-FITC (145-2C11), anti-CD8-PerCPCy5.5 (53-6.7), anti-CD4-APC (RM4-5), anti-CD19-PE (1D3) (all from BD Biosciences). Purity of isolated CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells was >80%.

For the analysis of activation-induced cytokine production, 2  $\times$  10<sup>6</sup> splenocytes from wild-type or THY-Tau22 mice were stimulated *in vitro* for 5 h at 37°C with a cocktail of PMA + ionomycin (Leukocyte Activation Cocktail; BD Biosciences) in the presence of brefeldin A. Cells were then harvested, incubated with FcR-blocking antibody (2.4G2) to avoid non-specific staining, and surface-stained using anti-CD3-FITC (145-2C11), anti-CD8-PerCPCy5.5 (53-6.7), anti-CD4-APC-eFluor780 (GK1.5; eBioscience). After cell surface staining cells were processed for intracellular cytokine staining using the BD Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences). After permeabilization, cells were first incubated with FcR-blocking antibody (2.4G2), followed by anti-IFN $\gamma$ -PE-Cy7 (XMG1.2;

BD Biosciences) and anti-TNF $\alpha$ -BV421 (MP6-XT22; Biolegend).

All fluorescence data related to T cell analyses were collected on a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter) and analysed using Kaluza Analysis 1.3 software (Beckman Coulter).

## Statistical analysis

Results are expressed as means  $\pm$  SEM or  $\pm$  standard deviation (SD). Differences between mean values were determined using the Student's *t*-test or one-way ANOVA followed by a *post hoc* Fisher's least significant difference (LSD) test using Graphpad Prism Software. *P* values < 0.05 were considered significant.

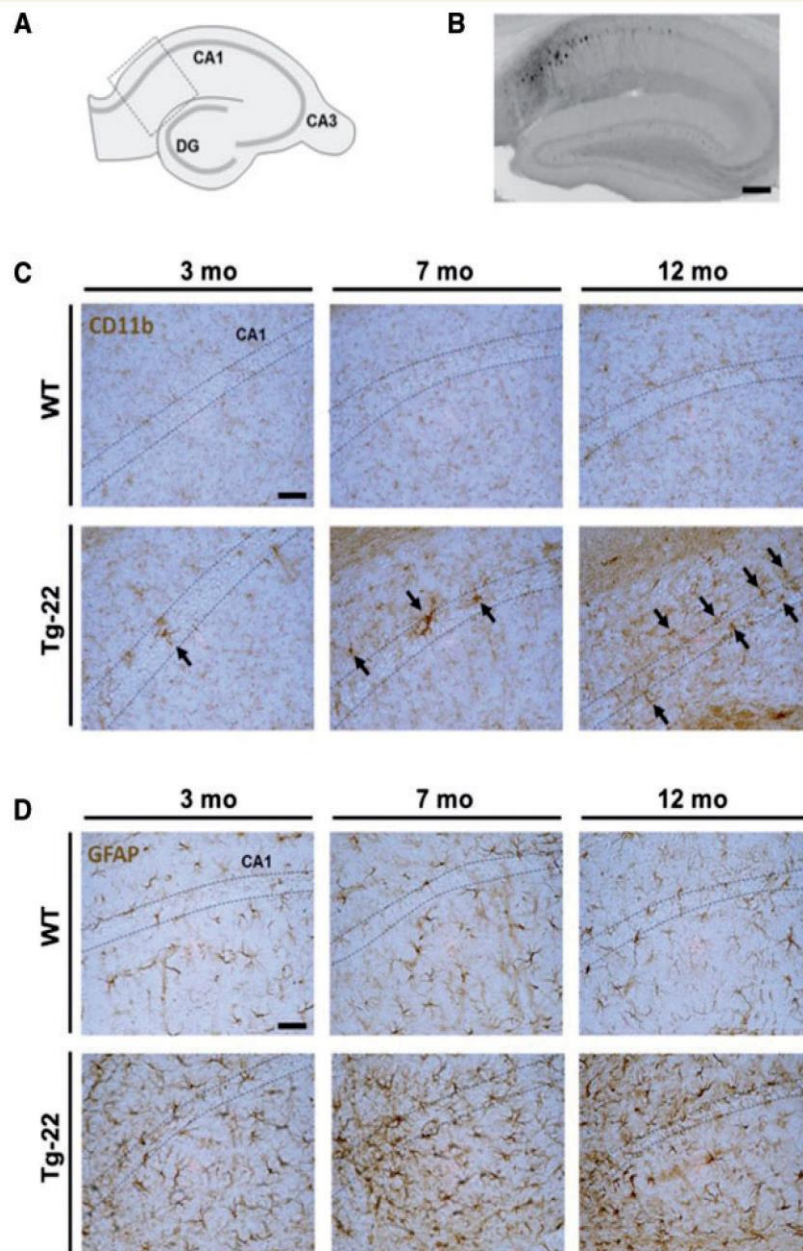
## Results

### Development of hippocampal neuroinflammation in THY-Tau22 mice

We first evaluated glial cell activation in the hippocampus of THY-Tau22 mice, from an early stage (3 months of age), i.e. when hippocampal tau pathology starts developing, to later stages (12 months of age), when pathology and memory deficits are maximal in this mouse model (Burnouf *et al.*, 2012; Van der Jeugd *et al.*, 2013). As expected from previous studies in several tau transgenic models (Yoshiyama *et al.*, 2007; Bellucci *et al.*, 2011; Laurent *et al.*, 2014), immunostainings for CD11b and GFAP showed significant microgliosis and astrocytosis, which were spatiotemporally correlated with hippocampal tau pathology in THY-Tau22 mice, as compared to wild-type littermates (Fig. 1). Accordingly, we found significant mRNA upregulation of innate immunity markers such as *Tlr2* (toll-like receptor 2), *Cd68* and *Tnfa* (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) (Supplementary Fig. 1).

To gain further insights into the relationships between tau pathology and neuroinflammation, we performed a microarray study on hippocampal mRNA samples from 12 month-old wild-type and THY-Tau22 mice (*n* = 7/group), to evaluate global gene expression changes associated with the development of tauopathy. As shown in Supplementary Table 2, 32 genes were identified as differentially expressed, with 28 genes being upregulated and only four genes downregulated in THY-Tau22 mice, as compared to wild-type animals. Most of the upregulated genes were associated with immune responses, in line with GO-Term Enrichment analysis (Supplementary Table 2). Expression changes of uncovered immune markers (indicated as bold in the Supplementary Table 2) were validated by quantitative PCR using independent mRNA samples. For most markers, such analysis demonstrated an age-dependent increased expression in tau transgenic mice as compared to wild-type littermates (Fig. 2A and Supplementary Fig. 2). Altogether, these data indicate that significant neuroinflammatory responses progressively





**Figure 1** Glial cell activation in the hippocampus of THY-Tau22 mice. (A and B) As seen using an antibody revealing pSer422 immunoreactivity, THY-Tau22 mice exhibit a high level of abnormally phosphorylated tau species in the CA1 region of hippocampus at 12 months of age. (C and D) CD11b immunostaining point out progressive microglial (C, arrows) and astroglial (D) responses in the hippocampal CA1 area of THY-Tau22 mice (bottom) as compared to wild-type (WT) animals (top).  $n = 3/\text{group}$ . Scale bars = 500  $\mu\text{m}$  (B); 100  $\mu\text{m}$  (C and D).

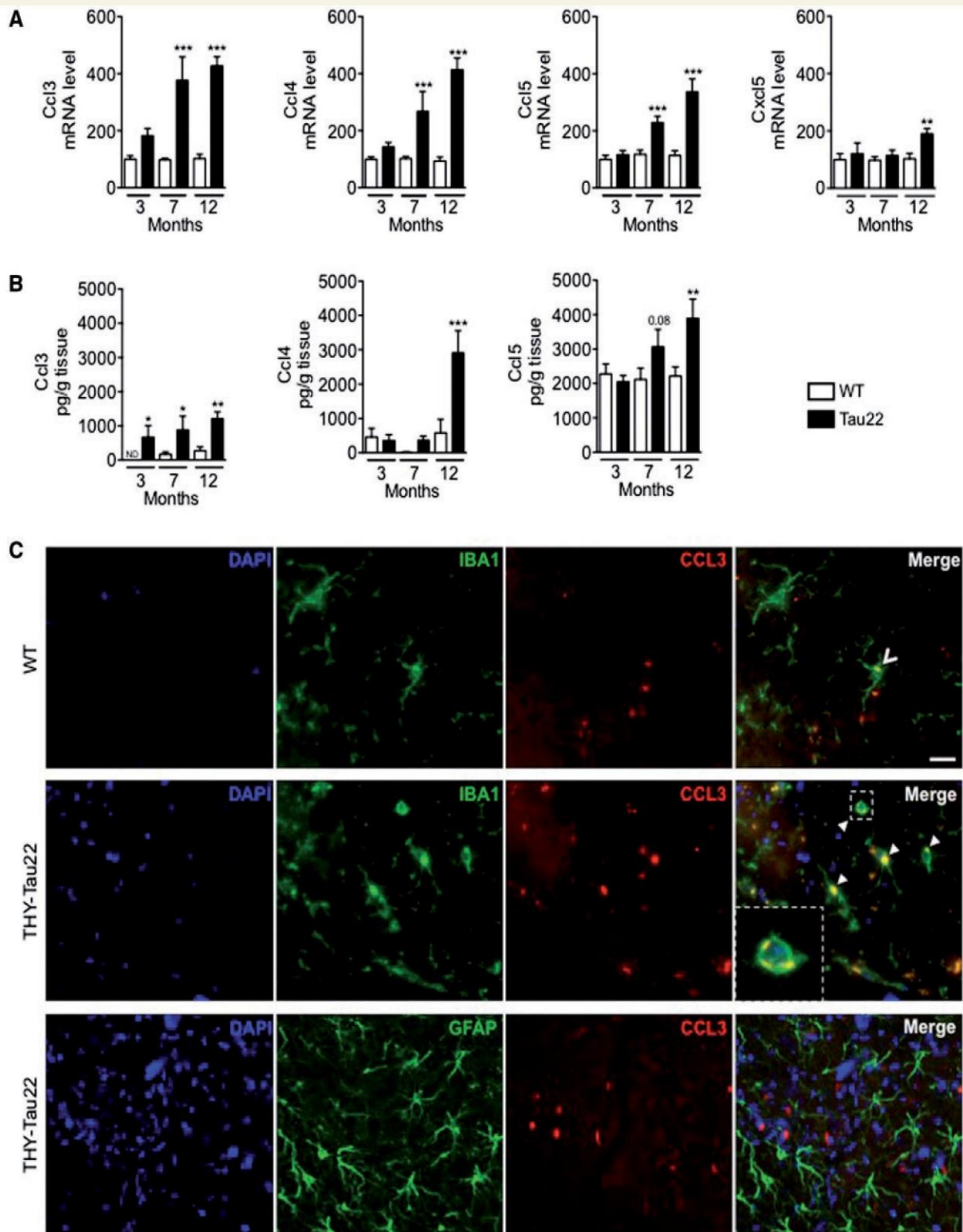
develop along with tau pathology and memory deficits in the hippocampus of THY-Tau22 mice.

### Chemokine surge is associated with hippocampal T cell infiltration

Among the 28 genes overexpressed in the hippocampus of THY-Tau22 mice (Supplementary Table 2), four of them encode chemokines, i.e. *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5* and *Cxcl5*. Upregulation of CCL3, CCL4 and CCL5 was confirmed by both quantitative PCR and ELISA (Fig. 2A and B). Of note, compared to CCL4 and CCL5, hippocampal CCL3

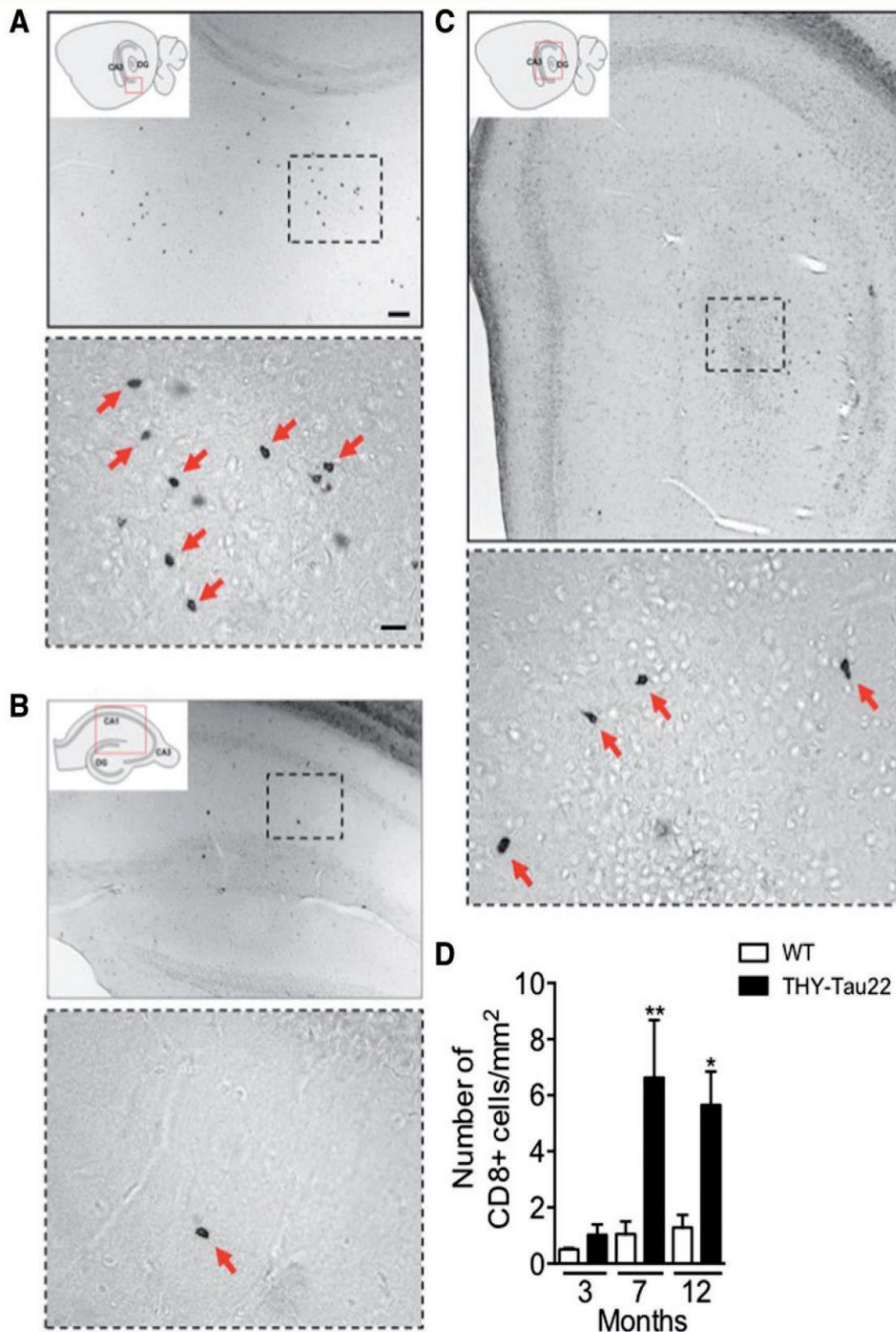
levels were progressively and significantly upregulated from early pathological stages as compared to control littermates (Fig. 2B). Immunofluorescence analysis revealed clustered CCL3 staining in Iba1-positive (Fig. 2C) but not GFAP-positive (Fig. 2C) hippocampal cells, suggesting that CCL3 is almost exclusively produced by microglia in the hippocampus of THY-Tau22 mice.

Chemokines are pivotal in the trafficking of leucocytes into the brain (Jaerve and Müller, 2012). Among them, CCL3 was suggested to favour T cell infiltration in the brain of patients with Alzheimer's disease (Man *et al.*, 2007). To test the hypothesis that chemokine release in the hippocampus of THY-Tau22 mice was associated



**Figure 2** Age-dependent upsurge of chemokines in the hippocampus of THY-Tau22 mice. **(A)** Quantitative PCR analysis of *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5* and *Cxcl5* mRNAs revealed a significant and generally progressive overexpression in the hippocampus of transgenic animals as compared to wild-type (WT). Results are expressed as means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  versus wild-type (3 months) using one-way ANOVA followed by a *post hoc* Fisher's LSD test.  $n = 5$ – $13$ /group. **(B)** ELISA determinations of hippocampal CCL3, CCL4 and CCL5 levels in wild-type and THY-Tau22 mice at all ages. The three chemokines were found significantly increased in tau animals, CCL3 being the earliest upregulated chemokine. Results are expressed as means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  versus wild-type (3 months) using one-way ANOVA followed by a *post hoc* Fisher's LSD test.  $n = 6$ – $8$ /group. **(C)** Immunofluorescence analysis of CCL3 expression in the hippocampus of THY-Tau22 mice and wild-type littermates at the age of 12 months. Labelling of CCL3 (red) with the microglial marker Iba1 or the astrocyte marker GFAP (green) revealed clustered CCL3 staining solely in Iba1-positive cells (arrowheads and inset) in transgenic tau mice. To a lesser extent, such clusters are present in wild-type animals. Scale bar = 20  $\mu$ m.





**Figure 3** Hippocampal CD8<sup>+</sup> T cell infiltration in the parenchyma of THY-Tau22 mice. (A–C) Top: CD8 immunostaining highlights numerous parenchymal lymphocytes in the whole hippocampus of tau transgenic animals. Infiltrated lymphocytes were clearly identified at higher magnification (red arrows in bottom panels). Scale bars = 500  $\mu$ m (top) and 50  $\mu$ m (bottom panels). (D) Hippocampal density of CD8<sup>+</sup> T cells was found significantly increased from 7 months of age. Results are expressed as means  $\pm$  SEM. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 versus wild-type mice using one-way ANOVA followed by a *post hoc* Fisher's LSD test.  $n$  = 3/group.

with T cell recruitment, hippocampal CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were quantified by immunohistochemistry. Numerous CD8<sup>+</sup> cells exhibiting typical lymphocyte morphology

accumulated in the hippocampus of THY-Tau22 mice all along the rostro-caudal axis, an area exhibiting hyperphosphorylated tau species (Fig. 3A–C). Quantitative



analysis revealed a significant increase in the density of hippocampal CD8<sup>+</sup> T cells in THY-Tau22 mice as compared to wild-type animals, starting from 7 months of age (Fig. 3D). Unlike CD8<sup>+</sup> T cells, parenchymal CD4<sup>+</sup> cells were barely observed in both THY-Tau22 mice and wild-type littermates at all ages (not shown). As chemokines, and notably CCL3, can also be a chemoattractant for myeloid cells (Trifilo *et al.*, 2003), we have also determined by flow cytometry the proportion of microglia (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>med</sup>) and peripheral macrophages (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>high</sup>) in the brain of THY-Tau22 mice. We found that the proportion of macrophages was not increased in the brain of THY-Tau22 mice compared to wild-type mice at the age of 6 and 12 months, indicating that macrophages do not significantly infiltrate the CNS during the pathology (Supplementary Fig. 3).

In parallel, we also evaluated the activation status of peripheral T cells in THY-Tau22 mice. We carried out a detailed phenotypic analysis of both CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells in the blood, spleen and pooled lymph nodes (cervical, axillary and inguinal) from 5/6-months old wild-type and THY-Tau22 mice, based on the expression of CD44 and CD62L activation markers. We observed no differences in the frequency of naive (CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>low</sup>), effector memory (CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>hi</sup>), central memory (CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>) or acute/activated effector (CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>low</sup>) CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> T cells (Supplementary Fig. 4). Hence, human tau transgene expression in THY-Tau22 mice did not result in altered balance of activated versus naive CD8<sup>+</sup> nor CD4<sup>+</sup> T cells in the periphery. Furthermore, to rule out a potentially altered functionality of peripheral T cells in THY-Tau22 mice due to potential transgene expression in CD4<sup>+</sup> and/or CD8<sup>+</sup> T cells, we analysed the expression of human *MAPT* (tau) transgene in purified CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells isolated from the spleens of both wild-type and tau transgenic mice. As expected from previous works showing that the Thy1.2 expression cassette only drives expression solely in neurons and not T cells (Vidal *et al.*, 1990; Caroni, 1997), we did not detect any human 4R tau transgene in both purified CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from THY-Tau22 mice (Supplementary Fig. 5). Finally, we assessed whether peripheral T cells from transgenic mice may display any altered functionality at producing effector cytokines as compared to T cells from wild-type mice. By intracellular cytokine staining and flow cytometry analysis, we quantified the frequency of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells producing key effector cytokines interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) and/or TNF $\alpha$  upon polyclonal activation of either wild-type or THY-Tau22 splenocytes. No significant differences were observed in the frequency of TNF $\alpha$ -producing CD8<sup>+</sup> T cells, as well as in percentages of IFN $\gamma$ <sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>-</sup> or IFN $\gamma$ <sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells, between wild-type and transgenic animals (Supplementary Fig. 6). These data indicate that 4RTau transgene is neither significantly expressed at the protein level in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from THY-Tau22 animals, nor does it impair their capacity to produce effector cytokines upon activation. Altogether, these studies

rule out a possible impact of human tau transgene expression in T cells on their activation profile and functionality in THY-Tau22 mice. Hence, these data further suggest that hippocampal T cell infiltration in THY-Tau22 animals is not a bystander effect resulting from potentially altered functionality of peripheral T cells prior entering the brain, but rather related to brain-restricted neuroinflammatory processes triggering selective CD8<sup>+</sup> T cell recruitment.

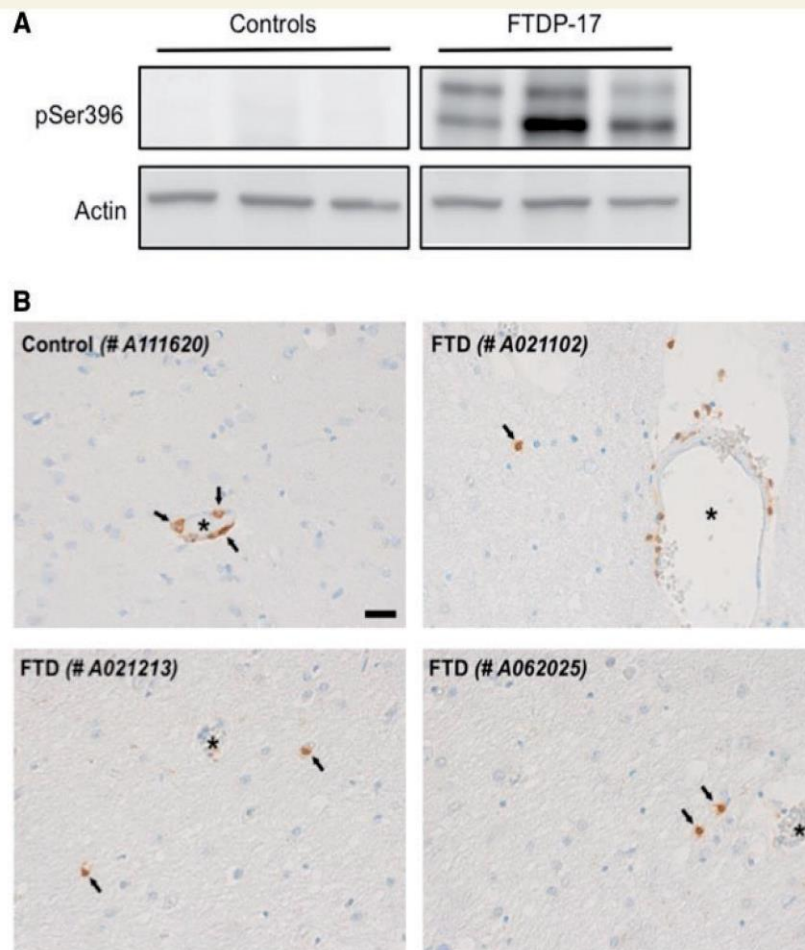
To confront the data obtained in our experimental model of tauopathy-associated cognitive impairment with human pathology, we investigated CD8<sup>+</sup> T cell recruitment in post-mortem brain specimens from patients exhibiting frontotemporal dementia with tau P301L mutations and age-matched control individuals. As expected, tau hyperphosphorylation was observed in the cortex of patients with frontotemporal dementia carrying P301L mutations (Fig. 4A). Whereas CD8<sup>+</sup> T cells were exclusively distributed along the blood vessels in control individuals, both vascular and parenchymal CD8<sup>+</sup> cells were systematically observed in patients suggesting that tau pathology is associated with brain tissue recruitment and infiltration of CD8<sup>+</sup> T cells at distance from the blood–brain barrier (Fig. 4B).

As T cell entry could rely on passive mechanisms due to blood–brain barrier breakdown (Blair *et al.*, 2015), we evaluated the integrity of the blood–brain barrier by analysing the status of tight junctions and the potential presence of IgG extravasation in the hippocampus of THY-Tau22 mice. Immunostainings show a similar overlap for tight-junctions markers zonula occludens-1 and occludin, with the constitutive endothelial marker von Willebrand factor in the hippocampus of 12-month-old THY-Tau22 mice as compared to wild-type animals (Fig. 5 and Supplementary Fig. 7). *Tjp1* (zonula occludens-1) and *Ocln* (occludin) mRNA expressions also remained unchanged (not shown). Finally, we did not find any sign of IgG extravasation in THY-Tau22 mice, supporting the lack of major blood–brain barrier disruption (Supplementary Fig. 8). Altogether our data support that hippocampal tau pathology is sufficient for promoting active brain-restricted recruitment of CD8<sup>+</sup> T cells.

## T cell depletion restrains cognitive deficits in THY-Tau22 mice

To evaluate the impact of T cell infiltration on disease progression, we assessed the consequences of T cell depletion on pathophysiological development in THY-Tau22 mice. Tau transgenic animals were injected every 2 weeks with either anti-CD3 depleting antibody or control isotype from 4 to 9 months of age, i.e. starting from an early disease stage before T cell infiltration can be detected up to later stages when hippocampal T cell accumulation is maximal (Fig. 3B). As shown in Supplementary Fig. 5, TCR $\beta$ <sup>+</sup> circulating T cells drop dramatically 5 days after anti-CD3 treatment as compared to isotype-treated mice, while



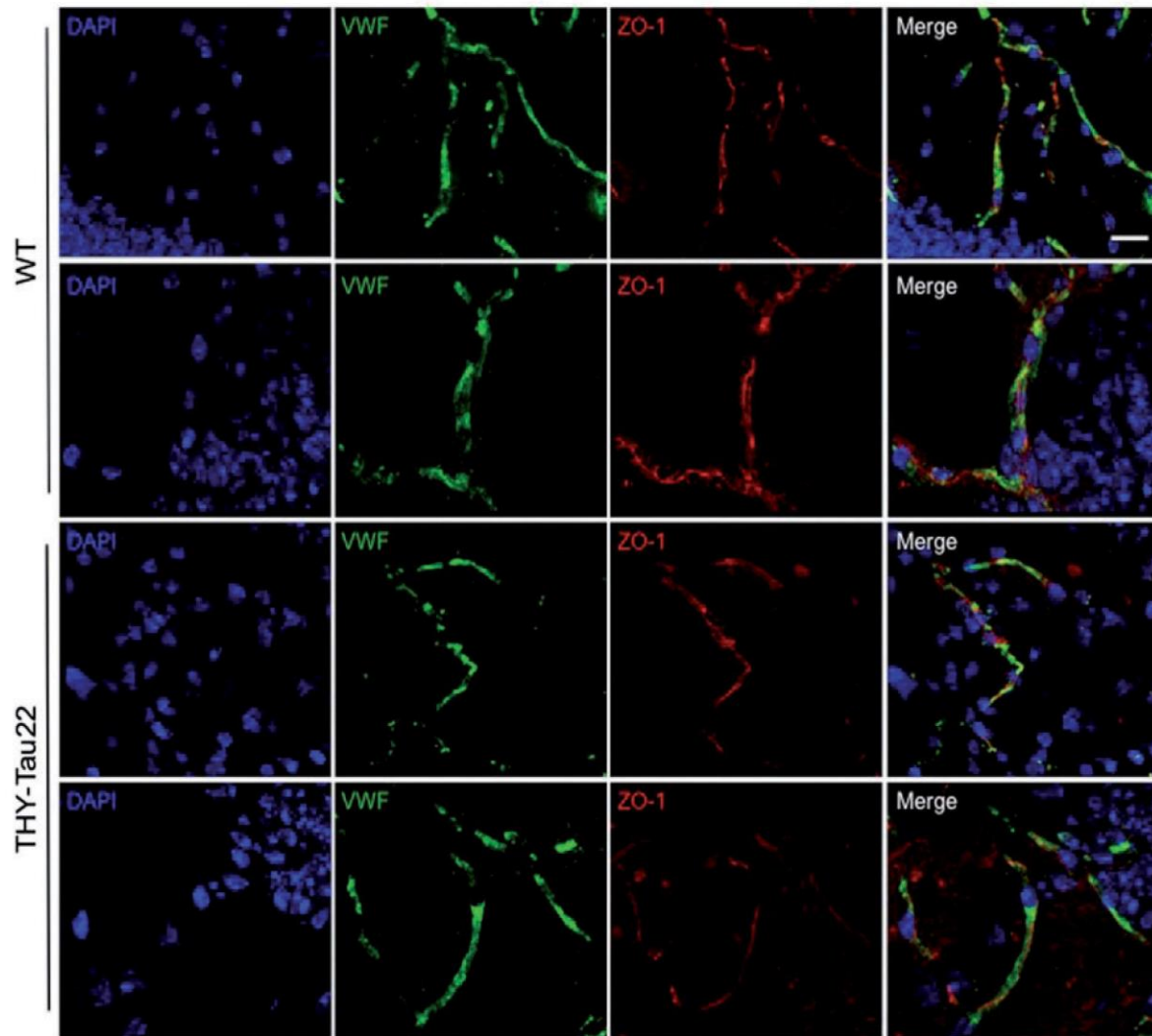


**Figure 4** Presence of parenchymal CD8<sup>+</sup> cells in the cortex of patients with frontotemporal dementia (FTDP-17) carrying P301L mutations. **(A)** Western blot analysis performed on the cortex of patients revealed, as expected, tau hyperphosphorylation at pSer396 epitope as compared to age-matched controls ( $n = 3/\text{group}$ ). **(B)** Immunohistochemical detection of CD8<sup>+</sup> T cells in the human cortex of controls and patients. Whereas CD8<sup>+</sup> T cells were exclusively distributed along the blood vessels (indicated by an asterisk) in control individuals, parenchymal (arrows) CD8<sup>+</sup> cells are observed at distance from the blood–brain barrier in patients. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .

CD19<sup>+</sup> B cells remain unchanged. Drastic decrease in both frequency and absolute numbers of TCR $\beta$ <sup>+</sup> T cells but not B cells was also observed in spleen and pooled lymph nodes, confirming the efficiency and specificity of T cell depletion approach (Supplementary Fig. 9C and D). On completion of treatment, i.e. in 9-month-old animals, we examined the impact of T cell depletion on the development of memory deficits in THY-Tau22 mice, using the Y-maze task.

Treatment of wild-type littermates with either anti-CD3 or control isotype did not significantly impact spatial memory. Indeed, as shown in Fig. 6A, wild-type animals spent significantly more time in the novel arm as compared to the other one ( $P < 0.001$  versus other arm for both groups; one-way ANOVA). Accordingly, percentage of time spent in the novel arm was significantly above chance (i.e. >50%) in both groups (wild-type + isotype:  $P = 0.01$ ; wild-type + anti-CD3:  $P = 0.027$ ). As expected (Belarbi *et al.*, 2011; Laurent *et al.*, 2016), THY-Tau22 mice injected with control isotype exhibited impaired spatial memory as demonstrated by the lack of preference for

the novel arm ( $P = 0.69$  when compared to 50% chance, and  $P = 0.61$  versus the other arm; one-way ANOVA). In contrast, THY-Tau22 animals treated with anti-CD3 antibody behaved like wild-type animals, spending significantly more time in the novel arm than the other arm ( $P = 0.011$  when compared to 50% chance,  $P < 0.0001$  versus other arm; one-way ANOVA), indicative of improved spatial memory upon T cell depletion (Fig. 6A). Impaired memory has been associated with altered plasticity in tau transgenic mice (Burlot *et al.*, 2015). We then investigated to what extent anti-CD3 treatment impacted on markers known to modulate synaptic plasticity. Specifically, we studied expression of Arc and 14-3-3 proteins, both known to regulate hippocampal-dependent memory (Qiao *et al.*, 2014; Minatohara *et al.*, 2016). As shown in Fig. 6B, hippocampal expression of Arc and 14-3-3 significantly decreased, respectively, by  $42.9 \pm 1.9\%$  ( $P = 0.016$ ) and  $23.0 \pm 0.9\%$  ( $P = 0.014$ ) in THY-Tau22 injected with isotype compared to wild-type mice treated with isotype. Whereas anti-CD3 antibody did not impact on Arc and 14-3-3 expressions in wild-type mice, their levels were



**Figure 5 Blood–brain barrier integrity of THY-Tau22 mice.** Immunofluorescence labelling of the tight junction marker zonula occludens-1 (ZO-1; red) and the constitutive endothelial marker von Willebrand factor (VWF; green) in the CA1 region of the hippocampus of wild-type (WT; top) and THY-Tau22 mice (bottom) at 12 months of age. DAPI staining of nuclei in blue. Similar co-stainings was observed in both genotypes, reflecting an absence of major blood–brain barrier impairment in transgenic animals.  $n = 3/\text{group}$ . Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .

significantly increased in THY-Tau22 mice treated with the antibody (Arc:  $+32.2 \pm 6.7\%$ ,  $P = 0.025$  versus THY-Tau22 + isotype; 14-3-3:  $25.6 \pm 7.6\%$ ,  $P = 0.023$  versus THY-Tau22 + isotype, one-way ANOVA; Fig. 6B). Strikingly, prevention of spatial memory deficits was associated with a significant reduction in the density of  $\text{CD8}^+$  cells in the hippocampus of T-cell-depleted THY-Tau22 mice, reaching similar levels than in control littermates (Fig. 6C).

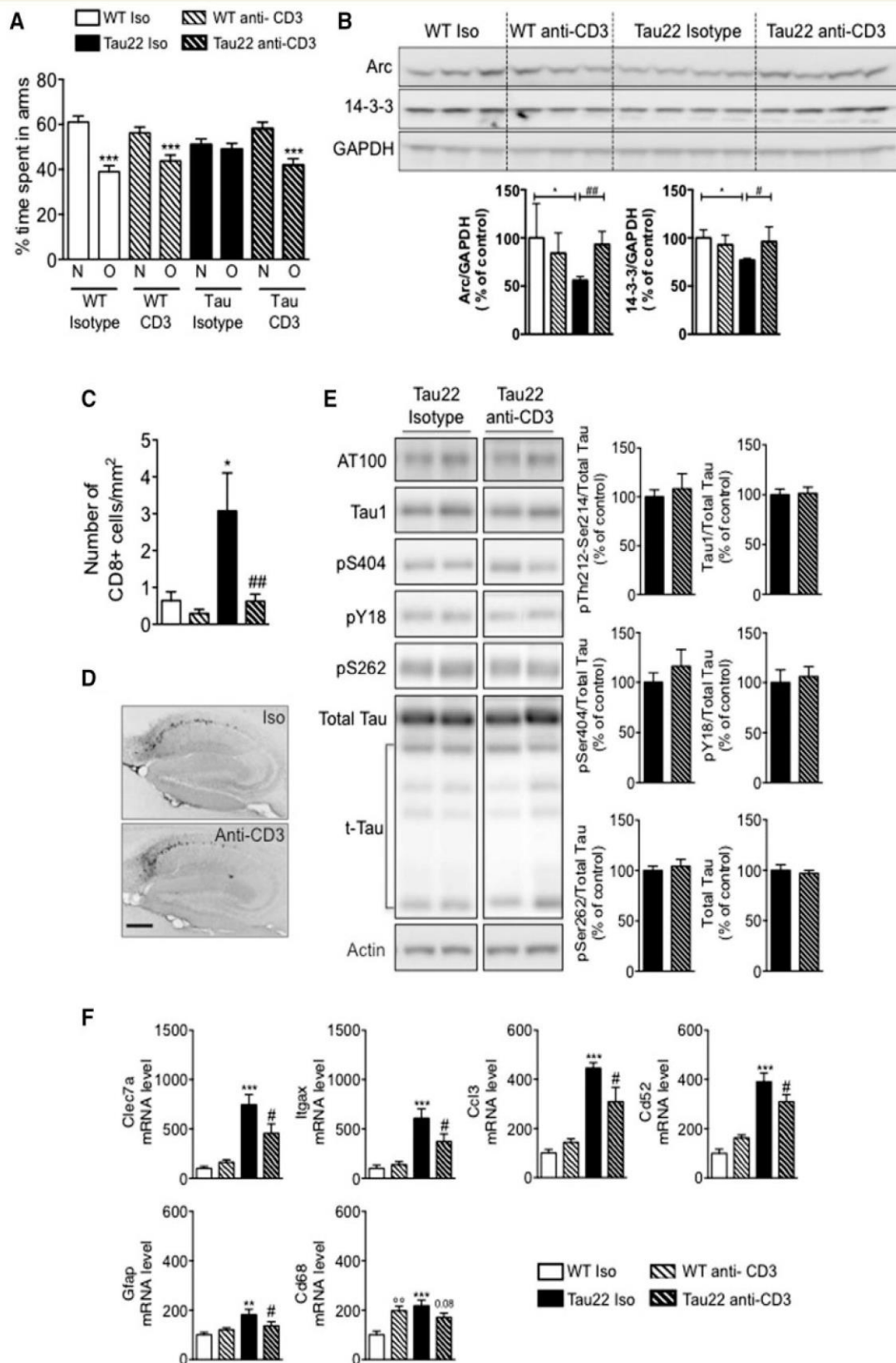
We demonstrated previously a correlation between spatial memory impairment and tau hyperphosphorylation in the THY-Tau22 mouse model (Burnouf *et al.*, 2013; Leboucher *et al.*, 2013; Laurent *et al.*, 2016). We thus investigated the impact of T cell depletion on hippocampal tau phosphorylation in THY-Tau22 mice. Immunohistochemical studies showed that percentage of AT8-stained hippocampal area was similar in both groups of THY-Tau22 mice ( $1.13 \pm 0.11\%$  in isotype-treated mice versus  $1.39 \pm 0.22\%$  after anti-CD3 treatment;  $P > 0.05$ ,

Student *t*-test; Fig. 6D). Western blot experiments further indicated that T cell depletion did not alter tau expression, truncation or phosphorylation at multiple epitopes (Fig. 6E). Of note, quantitative RT-PCR analysis showed that T cell depletion was associated with significant reduction of *Clec7a*, *Itgax*, *Ccl3*, *Cd52*, *Gfap* and *Cd68* mRNA expression levels in THY-Tau22 mice as compared to isotype-treated transgenic animals (Fig. 6F). Altogether, these data strongly support that hippocampal  $\text{CD8}^+$  T cell infiltration promotes neuroinflammation and cognitive decline in THY-Tau22 transgenic mouse model of tauopathy, without affecting tau protein deposition or phosphorylation.

## Discussion

Accumulating evidence support an instrumental role of immunity in the pathophysiology of Alzheimer's disease.





**Figure 6** Impact of T cell depletion on spatial memory and hippocampal tau pathology in THY-Tau22 mice. **(A)** Effect of anti-CD3 antibody treatment on spatial memory using Y-maze task. While wild-type (WT) mice, regardless of treatment, exhibited a preference for the new arm, compared to the familiar arm, THY-Tau22 treated with the isotypic control did not demonstrate preference for the new arm, showing defective spatial memory. By contrast, anti-CD3 treated THY-Tau22 mice demonstrated a preference for the new arm similarly to control animals. Results are expressed as means  $\pm$  SEM. \*\*\* $P < 0.001$  Familiar/Other (O) versus New (N) arms using one-way ANOVA.  $n = 6-19$ /group. **(B)** Effect of T cell depletion on hippocampal markers of synaptic plasticity. Hippocampal Arc and 14-3-3 immunoreactivities were found significantly decreased in THY-Tau22 mice treated with isotypic control versus wild-type mice and return to control level in THY-Tau22 mice treated with the anti-CD3 antibody. \* $P < 0.05$ , versus wild-type isotype, # $P < 0.05$  and ## $P < 0.01$  versus THY-Tau22 isotype group, using using

(continued)



Whereas most previous studies focused on amyloid-driven pathology, interrelationships between innate and adaptive immune responses with tau pathology remain unclear so far. Our study in a tau transgenic mouse model highlights that tau pathology is associated with an early chemokine surge followed by hippocampal T cell infiltration. Importantly, our data support that such T cell recruitment promotes tau-triggered spatial memory deficits, without affecting tau protein deposition nor phosphorylation, but at least partially through promoting innate neuroinflammatory responses. To the best of our knowledge, this is the first report documenting an instrumental role of brain T cell infiltration in the pathophysiology of tauopathy.

In the present work, we describe that development of hippocampal tauopathy, previously linked to significant cognitive deficits (Van der Jeugd *et al.*, 2011; Burnouf *et al.*, 2013; Laurent *et al.*, 2016), induces progressive innate neuroinflammatory response associated with T cell recruitment in the absence of neuronal death (Van der Jeugd *et al.*, 2011; Burnouf *et al.*, 2013). Innate neuroinflammation has previously been associated with tau pathology (Yoshiyama *et al.*, 2007; Garwood *et al.*, 2010) and is thought to contribute, in a vicious circle, to tau hyperphosphorylation, aggregation, secretion and pathology spreading (Yoshiyama *et al.*, 2007; Gorlovoy *et al.*, 2009; Bhaskar *et al.*, 2010; Asai *et al.*, 2015). Microglia activation can result in multiple phenotypes characterized by distinct molecular and functional patterns. In particular, classical proinflammatory M1-like phenotype, such as induced by the prototypic activation cocktail Lipopolysaccharide plus IFN $\gamma$ , is associated with expression of proinflammatory mediators (TNF $\alpha$ , interleukin 1 $\beta$ , interleukin 6, ...) as well as several chemokines including CCL3 (for review see Mantovani *et al.*, 2004). Here, we demonstrate that development of tau pathology is associated with an early and progressive surge of microglial-produced CCL3 in the hippocampus of THY-Tau22 mice. Together with TNF $\alpha$  expression observed at later stages, these data suggest that tau-associated microglial activation in our transgenic mice is reminiscent of a proinflammatory-like profile. Early increase in Toll-like receptor 2 expression further supports this idea, as Toll-like receptor 2 expression is associated with M1-like microglial polarization profile and function (Liu *et al.*, 2012). Hippocampal CCL3 upregulation in THY-Tau22 mice could contribute to several mechanisms converging to memory deficits. As we

previously demonstrated in wild-type mice (Marciniak *et al.*, 2015), CCL3 could directly alter long-term plasticity and spatial memory in the hippocampus of THY-Tau22 mice. In addition, our current data support that tau-triggered CD8<sup>+</sup> T cell infiltration in the brain contributes to the development of memory impairments. Interestingly, CCL3 production is detected before T cell infiltration and could therefore contribute to T cell diapedesis. Indeed, among other chemokines, CCL3 has been shown to contribute to T cell recruitment to the brain (Man *et al.*, 2007; Shechter *et al.*, 2013; see Wilson *et al.*, 2010 for review). Leucocyte infiltration has been recently reported in tau transgenic animals (Blair *et al.*, 2015). However, in this study using the rTg4510 strain, infiltration of CD3<sup>+</sup> cell was strongly associated with tau-induced neurotoxicity and blood–brain barrier damage, as notably seen using IgG staining. Our data rather suggest that development of tau pathology is associated with T cell hippocampal recruitment that occurs in the absence of major blood–brain barrier leakage, in favour of an active process possibly involving CCL3-mediated chemotaxis. This view is further supported by increased *Itgb2* (lymphocyte function-associated antigen 1/LFA-1), *Vcam1* (vascular cell adhesion molecule 1), and *Icam1* (intercellular adhesion molecule) mRNA expression in the hippocampus of THY-Tau22 mice (not shown). It is worth noting that T cell infiltration was neither related to an altered T cell activation profile nor impaired functionality in the periphery prior to entering the brain, ruling out that our observations rely on skewed functional differentiation of T cells in our transgenic mouse model. Lymphocyte infiltration has been described in brains of patients with Alzheimer's disease (Rogers *et al.*, 1988; Togo *et al.*, 2002; Zotova *et al.*, 2013), as well as in murine models of amyloid-driven pathology (Stalder *et al.*, 2005; Browne *et al.*, 2013). Of note, Zotova *et al.* (2013) pointed out that presence of CD3<sup>+</sup> T cells in the brain parenchyma of patients correlated with phospho-tau but not amyloid pathology. In the present manuscript, we qualitatively observed parenchymal CD8<sup>+</sup> cells in the cortex of patients exhibiting frontotemporal dementia carrying P301L tau mutation, in accordance with CD8<sup>+</sup> cell infiltration evidenced in THY-Tau22 mice. Altogether, these data support that tau-triggered innate neuroinflammatory responses may promote CD8<sup>+</sup> T cell infiltration into the brain of patients with Alzheimer's disease. Of note, antigen specificity of such infiltrating T cells

#### Figure 6 Continued

one-way ANOVA followed by a *post hoc* Fisher's LSD test.  $n = 3\text{--}4/\text{group}$ . Hippocampal density of CD8<sup>+</sup> T cells in the different experimental groups. Density of CD8<sup>+</sup> T cells was significantly increased at 9 months of age in THY-Tau22 mice treated with isotype and returned to control level in THY-Tau22 mice treated with anti-CD3 antibody. \* $P < 0.05$  versus wild-type isotype, <sup>###</sup> $P < 0.01$  versus THY-Tau22 isotype group, using one-way ANOVA followed by a *post hoc* Fisher's LSD test.  $n = 3\text{--}10/\text{group}$ . (D) AT8 immunostaining indicate a similar immunoreactivity in THY-Tau22 mice regardless of treatment.  $n = 8/\text{group}$ . Scale bar = 500  $\mu\text{M}$ . (E) Anti-CD3 treatment did not impact human tau expression, truncation (t-tau) and hyper-phosphorylation at several phospho-epitopes in THY-Tau22 mice.  $n = 6\text{--}8/\text{group}$ . Results are expressed as a percentage of THY-Tau22 mice injected with isotype  $\pm$  SEM. (F) Effect of anti-CD3 treatment upon mRNA expression of neuroinflammatory markers in the hippocampus of THY-Tau22 mice. <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*\*</sup> $P < 0.001$  versus wild-type isotype, <sup>#</sup> $P < 0.05$  versus THY-Tau22 isotype group, using one-way ANOVA followed by a *post hoc* Fisher's LSD test.  $n = 6\text{--}9/\text{group}$ .



still remains unknown, as well as whether their selective hippocampal recruitment relies on antigen-specific transmigration processes, as previously described in murine models of multiple sclerosis (Galea *et al.*, 2007).

Our study supports that tau-triggered T cell infiltration plays an instrumental role in the development of tau-induced memory deficits. Whereas anti-CD3 treatment had no significant effect in wild-type littermates, such peripheral T cell depletion in THY-Tau22 mice abolished both CD8<sup>+</sup> T cell infiltration in the hippocampus and cognitive deficits, as measured using the short-term memory Y-maze task, previously shown to be very sensitive in the THY-Tau22 strain (Belarbi *et al.*, 2011; Troquier *et al.*, 2012; Burlot *et al.*, 2015; Laurent *et al.*, 2016). Noteworthy, behavioural improvement occurred without detectable impact on tau phosphorylation nor deposition, suggesting that T cell infiltration is not instrumentally involved in the direct modulation of tau proteinopathy, but rather stands as a downstream factor promoting cognitive impairment. In accordance with this view, we observed that tau-pathology induced downregulation of Arc and 14-3-3 proteins, both involved in hippocampal synaptic plasticity and the formation of memory traces (Qiao *et al.*, 2014; Minatohara *et al.*, 2016), which was prevented by anti-CD3 treatment in THY-Tau22 mice. Of note, our data show that T cell depletion was associated with significant downregulation of several neuroinflammatory markers in THY-Tau22 mice, suggesting differential activation of astrocytic and microglial responses in T cell-depleted animals. Activated microglia and astrocytes can produce a significant range of soluble factors capable of modulating synaptic function and plasticity, such as inflammatory mediators, trophic factors, neurotransmitters and neuromodulators. Variations in the activation phenotypes of such glial cell populations is expected to translate into different capacities to modulate cognitive functions (Jones and Lynch, 2015; Patterson, 2015). Hence, hippocampal T cells infiltrating the brain in the context of tau pathology may directly modulate microglial and/or astrocytic activation status, towards a profile with detrimental impact on synaptic plasticity. This is in part reminiscent of our recent data in a mouse model of amyloid-driven pathology, suggesting that some T cell populations, i.e. regulatory T cells, inversely contribute to restrain cognitive deficits at least partially through modulation of microglial responses, without altering amyloid- $\beta$  deposition (Dansokho *et al.*, 2016). Of note, it was recently suggested that the complement-dependent pathway of synaptic pruning by microglia is inappropriately activated and mediate synapse loss in Alzheimer's disease (Hong *et al.*, 2016). Considering that complement has previously been described to contribute to the regulation of T cell functional differentiation, expansion and survival (Kwan *et al.*, 2012), it now remains to be determined whether the impact of complement pathway on synapse loss may also partly rely on complement-mediated regulation of T cell responses and/or their crosstalk with microglia.

Alternatively, hippocampal CD8<sup>+</sup> T cells might also directly affect neuronal function and plasticity. Several evidence

indicates that neurons can express major histocompatibility complex class I molecules, either constitutively or more particularly in an inflammatory context. Both antigen-dependent and antigen-independent interactions between neurons and T cells, including CD8<sup>+</sup> T cells, have been previously described. Among other mechanisms, based on antigen- and major histocompatibility complex class I-dependent interactions, CD8<sup>+</sup> T cells were shown to promote direct localized structural damage to neurites, or even neuron lysis (Pool *et al.*, 2012; Sauer *et al.*, 2013). Activated CD8<sup>+</sup> T cells can also inhibit neurite outgrowth without detectable neuronal apoptosis in a contact-dependent but antigen-independent manner (reviewed in Liblau *et al.*, 2013). Cytokines released from activated T cells might also contribute to direct and collateral disturbances of neuronal electrical activity. Further investigations will be needed to determine whether such mechanisms occur in the context of tau pathology.

A recent report in mouse models of amyloid pathology suggested that boosting overall T cell responses via immune checkpoint blockade reduces pathology and improves memory, supporting a beneficial role for CNS-specific cell-mediated immunity in Alzheimer's disease and potentially other neurodegenerative disorders (Baruch *et al.*, 2016). Whereas our previous studies in a mouse model of Alzheimer's disease-like amyloid pathology suggested that amyloid- $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> T cells do not trigger detrimental autoimmune neuroinflammatory processes (Rosset *et al.*, 2015), our current data support a detrimental involvement of proteopathic tau-triggered CD8<sup>+</sup> T cell infiltration in the pathophysiology of Alzheimer's disease and other tauopathies. In addition, using mouse models of amyloid pathology, conflicting results have been reported regarding the impact of regulatory T cells on disease progression, suggesting both beneficial and detrimental impacts, which may vary depending on disease stages (Baruch *et al.*, 2015; Dansokho *et al.*, 2016). Given the unique capacity of regulatory T cells to inhibit T cell responses, our study supporting a pathogenic role of CD8<sup>+</sup> T cells in disease development underlines the need for addressing their role in tau pathology as well.

Our work adds further to the growing body of evidence supporting an instrumental role of cellular adaptive immunity in the pathophysiology of Alzheimer's disease. Importantly, it further highlights the need for better understanding the complex interplay of different T cell populations in the context of both amyloid and tau pathology. Such studies will be required for implementing innovative immunotherapy and/or immunomodulation strategies targeting T cell immunity, which constitute promising approaches for the treatment of Alzheimer's disease.

## Acknowledgements

We express gratitude to patients and their families who allowed us to perform brain autopsies. We are grateful to



the IMPRT (Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique, Lille) for access to the confocal microscopy platform and FACS facilities. We thank the animal core facility (animal facilities of Université de Lille–Inserm) of « Plateformes en Biologie Santé de Lille » and M. Besegher, I. Brion, D. Cappe, R. Dehaynin, J. Devassine, Y. Lepage, C. Meunier and D. Taillieu for transgenic mouse production and animal care as well as Meryem Tardivel (imaging facilities of BioImaging center of Lille) for confocal assistance. We also thank Charles Duyckaerts and Claude-Alain Muraige for support.

## Funding

This work was supported by grants from ANR (ADONTAGE, ADORATAU, CYTOKALZ to D.B., P2X7RAD to C.D. and S.S.M., and PARKEMOS to S.H.), Association France Alzheimer, Fondation de France, LECMA/Alzheimer Forschung Initiative, Fondation Plan Alzheimer (to G.D. and D.B.) and from the programs Investissements d'avenir LabEx (excellence laboratory) DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease), LiCEND excellence centre for neurodegenerative diseases and ANR-10-IAIHU-06. Some of the post mortem samples were collected by the Brain Bank GIE NeuroCEB (BRIF number 0033-00011), funded by the patients' associations France Alzheimer, France Parkinson, ARSEP, 'Connaître les Syndromes Cérébelleux' and by IHU A-ICM and Fondation Plan Alzheimer to which we express our gratitude. Our laboratories are also supported by Inserm, CNRS, Université Lille 2, UPMC, Lille Métropole Communauté Urbaine, Région Nord/Pas-de-Calais, FEDER, DN2M and FUI MEDIALZ. C.L. and A.L. held doctoral grants from Lille 2 University, and S.B. from Région Nord Pas de Calais and CHRU de Lille. E.F. held a post-doctoral grant from Région Nord-Pas-de-Calais (DN2M) and ANR (ADORATAU). The authors declare no conflict of interest regarding the present work.

## Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

## References

- Ahmed T, Blum D, Burnouf S, Demeyer D, Buée-Scherrer V, D'Hooghe R, et al. Rescue of impaired late-phase long-term depression in a tau transgenic mouse model. *Neurobiol Aging* 2015; 36: 730–9.
- Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Haydar T, et al. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* 2015; 18: 1584–93.
- Baruch K, Rosenzweig N, Kertser A, Deczkowska A, Sharif AM, Spinrad A, et al. Breaking immune tolerance by targeting Foxp3(+) regulatory T cells mitigates Alzheimer's disease pathology. *Nat Commun* 2015; 6: 7967.
- Baruch K, Deczkowska A, Rosenzweig N, Tsitsou-Kampeli A, Sharif AM, Matcovitch-Natan O, et al. PD-1 immune checkpoint blockade reduces pathology and improves memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Med* 2016; 22: 135–7.
- Belarbi K, Burnouf S, Fernandez-Gomez FJ, Laurent C, Lestavel S, Figeac M, et al. Beneficial effects of exercise in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease-like Tau pathology. *Neurobiol Dis* 2011; 43: 486–94.
- Bellucci A, Westwood AJ, Ingram E, Casamenti F, Goedert M, Spillantini MG. Induction of inflammatory mediators and microglial activation in mice transgenic for mutant human P301S tau protein. *Am J Pathol* 2004; 165: 1643–52.
- Bellucci A, Bugiani O, Ghetti B, Spillantini MG. Presence of reactive microglia and neuroinflammatory mediators in a case of frontotemporal dementia with P301S mutation. *Neurodegener Dis* 2011; 8: 221–9.
- Bhaskar K, Konerth M, Kokiko-Cochran ON, Cardona A, Ransohoff RM, Lamb BT. Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor. *Neuron* 2010; 68: 19–31.
- Blair LJ, Frauen HD, Zhang B, Nordhues BA, Bijan S, Lin YC, et al. Tau depletion prevents progressive blood-brain barrier damage in a mouse model of tauopathy. *Acta Neuropathol Commun* 2015; 3: 8.
- Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K. Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *J Neuropathol Exp Neurol* 2011; 70: 960–9.
- Browne TC, McQuillan K, McManus RM, O'Reilly JA, Mills KH, Lynch MA. IFN- $\gamma$  Production by amyloid  $\beta$ -specific Th1 cells promotes microglial activation and increases plaque burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Immunol* 2013; 190: 2241–51.
- Burlot MA, Braudeau J, Michaelsen-Preusse K, Potier B, Aycirieux S, Varin J, et al. Cholesterol 24-hydroxylase defect is implicated in memory impairments associated with Alzheimer-like Tau pathology. *Hum Mol Genet* 2015; 24: 5965–76.
- Burnouf S, Belarbi K, Troquier L, Derisbourg M, Demeyer D, Leboucher A, et al. Hippocampal BDNF expression in a tau transgenic mouse model. *Curr Alzheimer Res* 2012; 9: 406–10.
- Burnouf S, Martire A, Derisbourg M, Laurent C, Belarbi K, Leboucher A, et al. NMDA receptor dysfunction contributes to impaired brain-derived neurotrophic factor-induced facilitation of hippocampal synaptic transmission in a Tau transgenic model. *Aging Cell* 2013; 12: 11–23.
- Caroni P. Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J Neurosci Methods* 1997; 71: 3–9.
- Cao C, Arendash GW, Dickson A, Mamcarz MB, Lin X, Ethell DW. Abeta-specific Th2 cells provide cognitive and pathological benefits to Alzheimer's mice without infiltrating the CNS. *Neurobiol Dis* 2009; 34: 63–70.
- Dansokho C, Ait Ahmed D, Aid S, Toly-Ndour C, Chaigneau T, Calle V, et al. Regulatory T cells delay disease progression in Alzheimer-like pathology. *Brain* 2016; 139 (Pt 4): 1237–51.
- Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buee L, Wattez A, Vermersch P, et al. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 1999; 52: 1158–65.
- Duyckaerts C, Bannic M, Grignon Y, Uchihara T, He Y, Piette F, et al. Modeling the relation between neurofibrillary tangles and intellectual status. *Neurobiol Aging* 1997; 18: 267–73.
- Ethell DW, Shippy D, Cao C, Cracchiolo JR, Runfeldt M, Blake B, et al. Abeta-specific T-cells reverse cognitive decline and synaptic loss in Alzheimer's mice. *Neurobiol Dis* 2006; 23: 351–61.
- Fazilleau N, Delarasse C, Motta I, Fillatreau S, Gougeon ML, Kourilsky P, et al. T cell repertoire diversity is required for relapses in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2007; 178: 4865–75.
- Galea I, Bernardes-Silva M, Forse PA, van Rooijen N, Liblau RS, Perry VH. An antigen-specific pathway for CD8 T cells across the blood-brain barrier. *J Exp Med* 2007; 204: 2023–30.



- Garwood CJ, Cooper JD, Hanger DP, Noble W. Anti-inflammatory impact of minocycline in a mouse model of tauopathy. *Front Psychiatry* 2010; 1: 136.
- Gorlovoy P, Larionov S, Pham TT, Neumann H. Accumulation of tau induced in neurites by microglial proinflammatory mediators. *FASEB J* 2009; 23: 2502–13.
- Grober E, Dickson D, Sliwinski MJ, Buschke H, Katz M, Crystal H, et al. Memory and mental status correlates of modified Braak staging. *Neurobiol Aging* 1999; 20: 573–9.
- Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeve E, Majounie E, et al. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2013; 368: 117–27.
- Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2015; 14: 388–405.
- Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* 2016; 352: 712–16.
- Jaerve A, Müller HW. Chemokines in CNS injury and repair. *Cell Tissue Res* 2012; 349: 229–48.
- Jones L, Holmans PA, Hamshere ML, Harold D, Moskvina V, Ivanov D, et al. Genetic evidence implicates the immune system and cholesterol metabolism in the aetiology of Alzheimer's disease. *PLoS One* 2010; 5: e13950.
- Jones RS, Lynch MA. How dependent is synaptic plasticity on microglial phenotype? *Neuropharmacology* 2015; 96 (Pt A): 3–10.
- Kwan WH, van der Touw W, Heeger PS. Complement regulation of T cell immunity. *Immunol Res* 2012; 54: 247–53.
- Lambert JC, Grenier-Boley B, Chouraki V, Heath S, Zelenika D, Fievet N, et al. Implication of the immune system in Alzheimer's disease: evidence from genome-wide pathway analysis. *J Alzheimers Dis* 2010; 20: 1107–18.
- Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet* 2013; 45: 1452–8.
- Laurent C, Eddarkaoui S, Derisbourg M, Leboucher A, Demeyer D, Carrier S, et al. Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology. *Neurobiol Aging* 2014; 35: 2079–90.
- Laurent C, Burnouf S, Ferry B, Batalha VL, Coelho JE, Baqi Y, et al. A2A adenosine receptor deletion is protective in a mouse model of Tauopathy. *Mol Psychiatry* 2016; 21: 97–107.
- Leboucher A, Laurent C, Fernandez-Gomez FJ, Burnouf S, Troquier L, Eddarkaoui S, et al. Detrimental effects of diet-induced obesity on  $\tau$  pathology are independent of insulin resistance in  $\tau$  transgenic mice. *Diabetes* 2013; 62: 1681–8.
- Liblau RS, Gonzalez-Dunia D, Wiendl H, Zipp F. Neurons as targets for T cells in the nervous system. *Trends Neurosci* 2013; 36: 315–24.
- Liu S, Liu Y, Hao W, Wolf L, Kiliaan AJ, Penke B, et al. TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid  $\beta$  peptide to trigger neuroinflammatory activation. *J Immunol* 2012; 188: 1098–107.
- Lueg G, Gross CC, Lohmann H, Johnen A, Kemmling A, Deppe M, et al. Clinical relevance of specific T-cell activation in the blood and cerebrospinal fluid of patients with mild Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2015; 36: 81–9.
- Man SM, Ma YR, Shang DS, Zhao WD, Li B, Guo DW, et al. Peripheral T cells overexpress MIP-1 $\alpha$  to enhance its transendothelial migration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2007; 28: 485–96.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; 25: 677–86.
- Marciniak E, Favre E, Dutar P, Alves Pires C, Demeyer D, Caillierez R, et al. The Chemokine MIP-1 $\alpha$ /CCL3 impairs mouse hippocampal synaptic transmission, plasticity and memory. *Sci Rep* 2015; 5: 15862.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 4245–9.
- Minatohara K, Akiyoshi M, Okuno H. Role of immediate-early genes in synaptic plasticity and neuronal ensembles underlying the memory trace. *Front Mol Neurosci* 2016; 8: 78.
- Monsonog A, Zota V, Karni A, Krieger JI, Bar-Or A, Bitan G, et al. Increased T cell reactivity to amyloid beta protein in older humans and patients with Alzheimer disease. *J Clin Invest* 2003; 112: 415–22.
- Monsonog A, Imitola J, Petrovic S, Zota V, Nemirovsky A, Baron R, Fisher Y, et al. Abeta-induced meningoencephalitis is IFN-gamma-dependent and is associated with T cell-dependent clearance of Abeta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 5048–53.
- Nash KR, Lee DC, Hunt JB Jr, Morganti JM, Selenica ML, Moran P, et al. Fractalkine overexpression suppresses tau pathology in a mouse model of tauopathy. *Neurobiol Aging* 2013; 34: 1540–8.
- Papegaaey A, Eddarkaoui S, Deramecourt V, Fernandez-Gomez FJ, Pantano P, Obriot H, et al. Reduced Tau protein expression is associated with frontotemporal degeneration with progranulin mutation. *Acta Neuropathol Comm* 2016; 4: 74.
- Patterson SL. Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: interactions of microglia, IL-1 $\beta$ , BDNF and synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 2015; 96 (Pt A): 11–18.
- Pool M, Rambaldi I, Darlington PJ, Wright MC, Fournier AE, Bar-Or A. Neurite outgrowth is differentially impacted by distinct immune cell subsets. *Mol Cell Neurosci* 2012; 49: 68–76.
- Qiao H, Foote M, Graham K, Wu Y, Zhou Y. 14-3-3 proteins are required for hippocampal long-term potentiation and associative learning and memory. *J Neurosci* 2014; 34: 4801–8.
- Rogers J, Lubner-Narod J, Styren SD, Civin WH. Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1988; 9: 339–49.
- Rosset MB, Lui G, Dansokho C, Chaigneau T, Dorothée G. Vaccine-induced A $\beta$ -specific CD8+ T cells do not trigger autoimmune neuroinflammation in a murine model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflamm* 2015; 12: 95.
- Sasaki A, Kawarabayashi T, Murakami T, Matsubara E, Ikeda M, Hagiwara H, et al. Microglial activation in brain lesions with tau deposits: comparison of human tauopathies and tau transgenic mice TgTauP301L. *Brain Res* 2008; 1214: 159–68.
- Sauer BM, Schmalstieg WF, Howe CL. Axons are injured by antigen-specific CD8(+) T cells through a MHC class I- and granzyme B-dependent mechanism. *Neurobiol Dis* 2013; 59: 194–205.
- Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Bégard S, Brion JP, Hamdane M, et al. Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am J Pathol* 2006; 169: 599–616.
- Sergeant N, Bretteville A, Hamdane M, Caillet-Boudin ML, Grognet P, Bombois S, et al. Biochemistry of tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics* 2008; 5: 207–224.
- Shechter R, Miller O, Yovel G, Rosenzweig N, London A, Ruckh J, et al. Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus. *Immunity* 2013; 38: 555–69.
- Stalder AK, Ermini F, Bondolfi L, Krenger W, Burbach GJ, Deller T, et al. Invasion of hematopoietic cells into the brain of amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 2005; 25: 11125–32.
- Togo T, Akiyama H, Iseki E, Kondo H, Ikeda K, Kato M, et al. Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *J Neuroimmunol* 2002; 124: 83–92.

- Trifilo MJ, Bergmann CC, Kuziel WA, Lane TE. CC chemokine ligand 3 (CCL3) regulates CD8(+)-T-cell effector function and migration following viral infection. *J Virol* 2003; 77: 4004–14.
- Troquier L, Caillierez R, Burnouf S, Fernandez-Gomez FJ, Grosjean ME, Zommer N, et al. Targeting phospho-Ser422 by active Tau immunotherapy in the THY<sub>Tau22</sub> mouse model: a suitable therapeutic approach. *Curr Alzheimer Res* 2012; 9: 397–405.
- Van der Jeugd A, Ahmed T, Burnouf S, Belarbi K, Hamdane M, Grosjean ME, et al. Hippocampal tauopathy in tau transgenic mice coincides with impaired hippocampus-dependent learning and memory, and attenuated late-phase long-term depression of synaptic transmission. *Neurobiol Learn Mem* 2011; 95: 296–304.
- Van der Jeugd A, Vermaercke B, Derisbourg M, Lo AC, Hamdane M, Blum D, et al. Progressive age-related cognitive decline in tau mice. *J Alzheimers Dis* 2013; 37: 777–88.
- Vidal M, Morris R, Grosveld F, Spanopoulou E. Tissue-specific control elements of the Thy-1 gene. *EMBO J* 1990; 9: 833–40.
- Wilson EH, Weninger W, Hunter CA. Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest* 2010; 120: 1368–79.
- Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, et al. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 2007; 53: 337–51.
- Zotova E, Bharambe V, Cheaveau M, Morgan W, Holmes C, Harris S, et al. Inflammatory components in human Alzheimer's disease and after active amyloid- $\beta$ 42 immunization. *Brain* 2013; 136: 2677–96.

# Implication des polynucléaires neutrophiles au cours de la maladie d'Alzheimer et des tauopathies

## Résumé :

Les Polynucléaires neutrophiles (PN) jouent un rôle majeur dans la défense de l'organisme contre l'introduction d'un agent pathogène. Cependant, en cas de stimulation excessive et/ou inappropriée, les PN peuvent également conduire à des lésions tissulaires majeures et ont été impliqués dans la physiopathologie de nombreuses maladies inflammatoires aiguës ou chroniques. Nous avons observé, dans une cohorte des patients atteints maladie d'Alzheimer (MA) au stade de démence, une hyper-activation basale des PN, associée à une augmentation de la production des formes réactives d'oxygène (FRO) et des NETs. Les PN circulants chez les patients de la MA présentent également une altération de l'homéostasie associée à une augmentation de la population sénescence CXCR4<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup> et une diminution de la population immunosuppressive CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup>. Ces altérations qui sont plus importantes chez les patients dont la progression de la maladie est rapide pourraient participer aux processus inflammatoires systémiques et être impliqués dans le déclin cognitif. Par ailleurs, certaines anomalies, notamment l'augmentation de la production de FRO et la diminution de la population de PN immunosuppressive, ont été observées chez les patients atteints de MA atypiques mais ne sont pas retrouvées en cas de tauopathies, Elles apparaissent donc spécifiques de la pathologie amyloïde.

Le phénotype des PN pourrait donc représenter un bio-marqueur prédictif sanguin innovant en cas de pathologie amyloïde. Par ailleurs, nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour le développement de nouvelles stratégies d'immunothérapie au cours de la MA basées sur la modulation des PN.

*Mots clés : Neutrophiles, Inflammation, Maladie d'Alzheimer, Homéostasie*

## Abstract :

Neutrophils are key components of early innate immunity and contribute to uncontrolled systemic inflammation if not tightly regulated. Our study demonstrated that blood samples from Alzheimer's Disease (AD) patients with dementia revealed neutrophil hyperactivation associated with increased reactive oxygen species (ROS) production and increased levels of intravascular neutrophil extravascular traps. The homeostasis of circulating neutrophils in these patients also changed: the ratio between the harmful hyperreactive CXCR4<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup> senescent and the CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> immunosuppressive neutrophil subsets rose in the latter stage of the disease. These abnormalities, that may play an instrumental role in establishing systemic chronic inflammation, were greater in fast-decliner than in slow-decliner patients. Some abnormalities, including the increased level of ROS production, were observed in patients with atypic AD but not in Tauopathies suggesting that these alterations are specific of amyloid pathology.

Our data strongly suggest that the neutrophil phenotype may constitute an innovative and prognostic blood biomarker in patients with Alzheimer's disease open new perspectives for the development of innovative immunotherapy strategies based on neutrophil modulation.

*Key words : Neutrophils, Inflammation, Alzheimer's Disease, Homeostasis*