

► Les polynucléaires neutrophiles jouent un rôle important dans les défenses contre les pathogènes et la réponse inflammatoire. L'utilisation de souris déficientes en ces cellules a permis de démontrer que les neutrophiles peuvent également participer aux réponses immunitaires adaptatives et à la résolution de l'inflammation. Nous décrivons ici un nouveau modèle d'étude, les souris *PMN^{DTR}*, qui permet une élimination sélective des neutrophiles par injection de toxine diphtérique, et qui a déjà conduit à la mise en évidence d'un rôle protecteur des neutrophiles dans le choc endotoxinique. Ses principaux avantages par rapport à d'autres modèles couramment utilisés sont décrits. ◀

Les neutrophiles : cellules clé de l'immunité innée

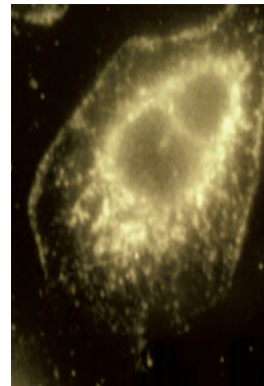
Les neutrophiles, ou polynucléaires neutrophiles (en anglais *polymorphonuclear cells* ou PMN) sont des cellules du système immunitaire inné jouant un rôle très important dans les défenses contre les pathogènes [1]. Ce sont les leucocytes les plus abondants dans la circulation sanguine, et leur nombre augmente très fortement et très rapidement lors d'infections. Les neutrophiles peuvent tuer les microorganismes par une multitude de mécanismes tels que la phagocytose, la libération d'enzymes qu'ils présentent au niveau de leurs granules cytoplasmiques (myéloperoxydase [MPO], élastase, protéinase-3, cathépsine G, etc.), ou de dérivés réactifs de l'oxygène (produits par la NADPH [nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit] oxydase et la MPO), ou la formation de NET (*neutrophil extracellular traps*)¹ [1-3] (→).

(→) Voir la Synthèse de V. Granger et al., *m/s* n° 5, mai 2014, page 544

Certains produits libérés lors de l'activation des neutrophiles, et qui sont impliqués dans les défenses antimi-

Un nouveau modèle de souris pour comprendre le rôle des neutrophiles

Caitlin M. Gillis^{1,*}, Laurent L. Reber¹



¹Institut Pasteur, Département d'immunologie, Inserm U1222, Unité des anticorps en thérapie et pathologie, 25, rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France.

*Adresse actuelle : Cell Clearance in Health and Disease Lab, Inflammation Research Center, Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB) ; Université de Gand, Gand, Belgique.
laurent.reber@inserm.fr

crobiennes, ont également des effets pro-inflammatoires puissants. Les neutrophiles peuvent ainsi contribuer aux dommages tissulaires dans le contexte d'une réponse immunitaire et participer à l'inflammation pathologique dans certaines maladies auto-immunes ou allergiques [4]. Ils sont aussi impliqués dans la résolution de l'inflammation via différents mécanismes [1, 5-9] (→).

En effet, lors de la réponse inflammatoire, les neutrophiles apoptotiques sont éliminés par phagocytose par les macrophages qui subissent alors une modification de leur phénotype avec l'apparition de fonctions anti-inflammatoires [8]. Par ailleurs, l'utilisation de l'oxygène par la NADPH oxydase des neutrophiles induit, au niveau du site d'inflammation, une hypoxie à l'origine d'une réponse anti-inflammatoire par les cellules épithéliales [10]. Plusieurs de ces données récentes ont été obtenues grâce à la mise au point de nouveaux modèles rendant possible l'étude des différentes fonctions des neutrophiles. Même s'il est possible de les isoler et de les étudier *in vitro*, la grande plasticité phénotypique de ces cellules et leur capacité d'expansion et d'infiltration tissulaire rendent leur analyse *in vivo* nécessaire. De nombreux modèles murins ont donc été développés. Nous détaillerons dans une première partie les modèles les plus couramment utilisés avec leurs principaux avantages et limitations (Tableau I).

(→) Voir la Synthèse de A. Chakravarti et al., *m/s* n° 10, octobre 2007, page 862 ; la Synthèse de A. Dumas et M. Pouliot, *m/s* 8-9, août-septembre 2009, page 699 ; la Nouvelle de F. Jönsson et al., *m/s* n° 10, octobre 2011, page 823

Modèles « classiques » d'étude des neutrophiles *in vivo*

Les anticorps « déplétants »

Chez la souris, différents anticorps monoclonaux permettant la déplétion des neutrophiles ont été caractérisés. L'anticorps anti-Gr-1 (clone

Vignette (Photo © Inserm - Isabelle Maridonneau-Parini).

¹ Les NET (ou filets) sont des filaments d'ADN et de protéines émis par les neutrophiles qui se lient aux bactéries à Gram positif et à Gram négatif, les piègent et exercent une activité bactéricide extracellulaire à distance.

	Avantages	Limitations	Références	
Modèles inducibles	Anticorps anti-Ly6C/Ly6G (Gr-1)	- Forte dose d'anticorps - Déplétion des éosinophiles et des monocytes	[11, 12]	
	Anticorps anti-Ly6G (1A8)	- Peuvent être utilisés chez des souris sauvages ou génétiquement modifiées (sauf souris déficientes pour les macrophages ou les récepteurs Fc des immunoglobulines)	- Forte dose d'anticorps - Faible efficacité	[13]
	Anticorps anti-Ly6G (NIMP-R14)	- Forte dose d'anticorps	- Réduction du nombre de monocytes	[15-17]
	<i>hMrp8^{Cre} ; iDTR^{flox} (PMN^{DTR})</i>	- Déplétion des neutrophiles supérieure à 90 % dans le sang, la rate et la moelle osseuse - Peuvent être reconstituées avec des neutrophiles sauvages ou génétiquement modifiés - Niveaux normaux de macrophages, mastocytes, basophiles, éosinophiles, globules rouges, plaquettes, lymphocytes T et B et cellules dendritiques	- Réduction du nombre de certaines sous-populations de monocytes	[28]
Modèles constitutifs	<i>Gfi-1^{-/-}</i>	- Forte neutropénie	- Taille et espérance de vie réduites - Anomalies de développement des cellules lymphoïdes	[20]
	<i>Genista</i>	- Forte neutropénie	- Présence d'une population de neutrophiles « atypiques »	[23]
	<i>LysM^{Cre} ; Mcl-1^{flox} (Mcl-1^{ΔMyelo})</i>	Diminution de 80-90 % des neutrophiles dans le sang, la rate et la moelle osseuse Niveaux normaux de monocytes, macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes T	- Effets potentiels de la délétion du facteur de survie Mcl-1 dans d'autres types de cellules myéloïdes non encore déterminés.	[24, 25]

Tableau 1. Principaux modèles d'étude des neutrophiles in vivo.

RB6-8C5) est le plus couramment utilisé [11, 12]. Il est spécifique des protéines de surface Ly6G et Ly6C. Ly6G est exprimé uniquement par les neutrophiles, mais Ly6C est également exprimé par d'autres cellules, notamment les monocytes [12], induisant également leur déplétion [13] mais aussi celle des éosinophiles [11, 14]. D'autres anticorps reconnaissant spécifiquement Ly6G (clones 1A8 [13] et NIMP-R14 [15]) sont utilisés pour éliminer les neutrophiles, mais ils présentent certains désavantages. Comme l'anticorps anti-Gr-1, NIMP-R14 induit également une diminution du nombre de monocytes [16, 17]. Le clone 1A8 est, quant à lui, moins efficace que les anticorps anti-Gr-1 ou NIMP-R14. Il doit donc être utilisé à de très fortes concentrations. Tous ces anticorps provoquent l'élimination des neutrophiles par des mécanismes de phagocytose impliquant des cellules exprimant des récepteurs FcγR (ou RFcγ) qui lient la région Fc des immunoglobulines (Ig) d'isotype G, principalement les macrophages [18]. Il est donc probable qu'ils soient à l'origine d'effets annexes importants sur ces cellules.

Les souris neutropéniques

La plupart des modèles de souris neutropéniques ont été créés en utilisant une approche génétique visant à bloquer l'expression ou l'activité de la protéine Gfi-1 (*growth factor independent-1*), un répresseur de transcription qui favorise la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en précurseurs de neutrophiles [19]. Les souris déficientes pour *Gfi-1* (souris *Gfi-1^{-/-}*) présentent une forte neutropénie [20] mais aussi des anomalies de développement des cellules lymphoïdes. Ces animaux sont de taille réduite et ont une espérance de vie diminuée par rapport aux souris sauvages [21, 22]. Les souris *Genista* présentent une mutation ponctuelle dans le gène *Gfi-1*. Elles sont déficientes en neutrophiles mais, contrairement aux souris *Gfi-1^{-/-}*, leur croissance est normale, et elles

ne présentent pas de problèmes majeurs au niveau des cellules lymphoïdes [23]. Ces souris possèdent cependant une sous-population de neutrophiles dits « atypiques » ayant un phénotype intermédiaire entre neutrophiles matures et immatures, qui sont capables d'induire certaines réponses inflammatoires mais ne protègent pas des infections bactériennes [23]. Clausen *et al.* [24] ont généré une souris transgénique ayant une délétion ciblée du gène codant Mcl-1 (*myeloid cell leukemia 1*), un facteur anti-apoptotique de la famille de Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), dans toutes les cellules myéloïdes (les souris *LysM^{Cre}*; *Mcl-1^{fllox}*, également appelées *Mcl-1^{ΔMyelo}*) [24, 25]. De manière surprenante, même si ce facteur de survie est absent de toutes les cellules myéloïdes de ces souris, seule la population de neutrophiles semble être affectée, les niveaux de monocytes, macrophages et cellules dendritiques étant normaux [24, 25]. Une étude plus approfondie reste cependant nécessaire avant de pouvoir conclure sur la sélectivité de ce modèle de souris neutropéniques.

Un nouveau modèle murin permettant d'éliminer les neutrophiles par injection de toxine diphtérique

Les cellules de souris sont 10 000 fois plus résistantes aux effets de la toxine diphtérique (DT) que les cellules humaines, car elles n'expriment pas le récepteur de la toxine (DTR) permettant sa pénétration dans les cellules. Plusieurs laboratoires ont généré des modèles de souris transgéniques exprimant le récepteur DTR dans un type de cellules, dans lesquels une injection de DT permet d'éliminer sélectivement la population cellulaire présentant le récepteur [26]. Cependant, cette démarche n'avait jamais été appliquée aux neutrophiles.

Nous avons récemment généré une souris transgénique exprimant le DTR uniquement dans les neutrophiles. Nous avons utilisé les souris *hMrp8^{Cre}*, qui expriment l'enzyme CRE recombinase sous la dépendance du promoteur du gène humain *hMrp8* (*human myeloid-related protein*) [27], qui est exprimé de manière sélective dans les neutrophiles chez la souris. Ces souris ont été croisées avec une lignée de souris chez laquelle l'expression du DTR humain peut être induite par la CRE recombinase (les souris *iDTR^{fl/fl}*), obtenant ainsi une lignée exprimant le DTR dans les neutrophiles (souris *hMrp8^{Cre}*; *iDTR^{fllox}*), que nous avons nommées *PMN^{DTR}* [28].

L'injection de DT aux souris *PMN^{DTR}* provoque l'élimination de plus de 90 % des neutrophiles dans le sang, la rate et la moelle osseuse, sans aucun effet sur d'autres types de cellules immunitaires, à l'exception d'une diminution du nombre de monocytes circulants [28]. Chez ces souris, la population de neutrophiles peut être restaurée de manière sélective par transfert adoptif de neutrophiles purifiés, ce qui est impossible avec les anticorps déplétants (ces anticorps éliminant en effet les neutrophiles transférés).

Des expériences de transferts adoptifs de neutrophiles fluorescents (purifiés à partir de souris exprimant de manière constitutive la protéine fluorescente YFP [*yellow fluorescent protein*]) ont montré que, dans les souris *PMN^{DTR}*, la déplétion des neutrophiles endogènes créait une niche favorable à l'implantation de neutrophiles exogènes. On retrouve ainsi, 4 h après le transfert adoptif, une quantité plus impor-

tante de neutrophiles fluorescents (YFP⁺) dans le sang des souris *PMN^{DTR}* rendues neutropéniques par injection de DT que dans celui des souris contrôles (présentant encore des neutrophiles endogènes) [28]. Les souris *PMN^{DTR}* représentent donc un nouveau modèle de neutropénie inductible et réversible.

Découverte d'un rôle protecteur des neutrophiles dans le choc endotoxinique

Bien que les neutrophiles représentent une importante barrière immunitaire pour combattre les bactéries, il est généralement accepté qu'ils contribuent également à l'inflammation et aux dommages tissulaires induits par certains produits bactériens comme le lipopolysaccharide (LPS, une endotoxine présente à la surface des bactéries Gram négatif). Les souris déficientes en myéloperoxydase (MPO), la principale enzyme produite par les neutrophiles, développent ainsi une inflammation pulmonaire, après injection intranasale de LPS, qui est diminuée par rapport celle observée chez des souris sauvages [29]. De même, les souris déficientes pour l'élastase des neutrophiles ont une inflammation et une mortalité réduites après injection intrapéritonéale de l'endotoxine [30]. Les neutrophiles et en particulier la MPO, sont ainsi souvent utilisés comme marqueur d'inflammation dans des modèles murins en réponse au LPS (modèles de choc endotoxinique). L'utilisation des souris *PMN^{DTR}* a cependant permis de révéler qu'au contraire, les neutrophiles peuvent avoir un effet protecteur, la neutropénie induite chez ces souris se traduisant par une très importante augmentation de l'inflammation et de la mortalité des animaux en réponse au LPS [28] (*Figure 1*). La MPO a également un effet protecteur dans le choc endotoxinique. Une déficience en MPO se traduit en effet par une forte augmentation de l'inflammation et de la mortalité des animaux en réponse au LPS [28]. La repopulation des souris *PMN^{DTR}* rendue neutropéniques par injection de DT, avec des neutrophiles isolés de souris sauvages, permet d'augmenter la survie dans ce modèle de choc endotoxinique, ce qui n'est pas le cas si le transfert est réalisé avec des neutrophiles provenant de souris déficientes pour la MPO. L'ensemble de ces résultats obtenus avec ce nouveau modèle a ainsi permis d'identifier un nouveau mécanisme de protection impliquant les neutrophiles et la MPO, leur principale enzyme.

Conclusion

Les souris *PMN^{DTR}* représentent un nouveau modèle important pour l'étude des neutrophiles *in vivo*, avec

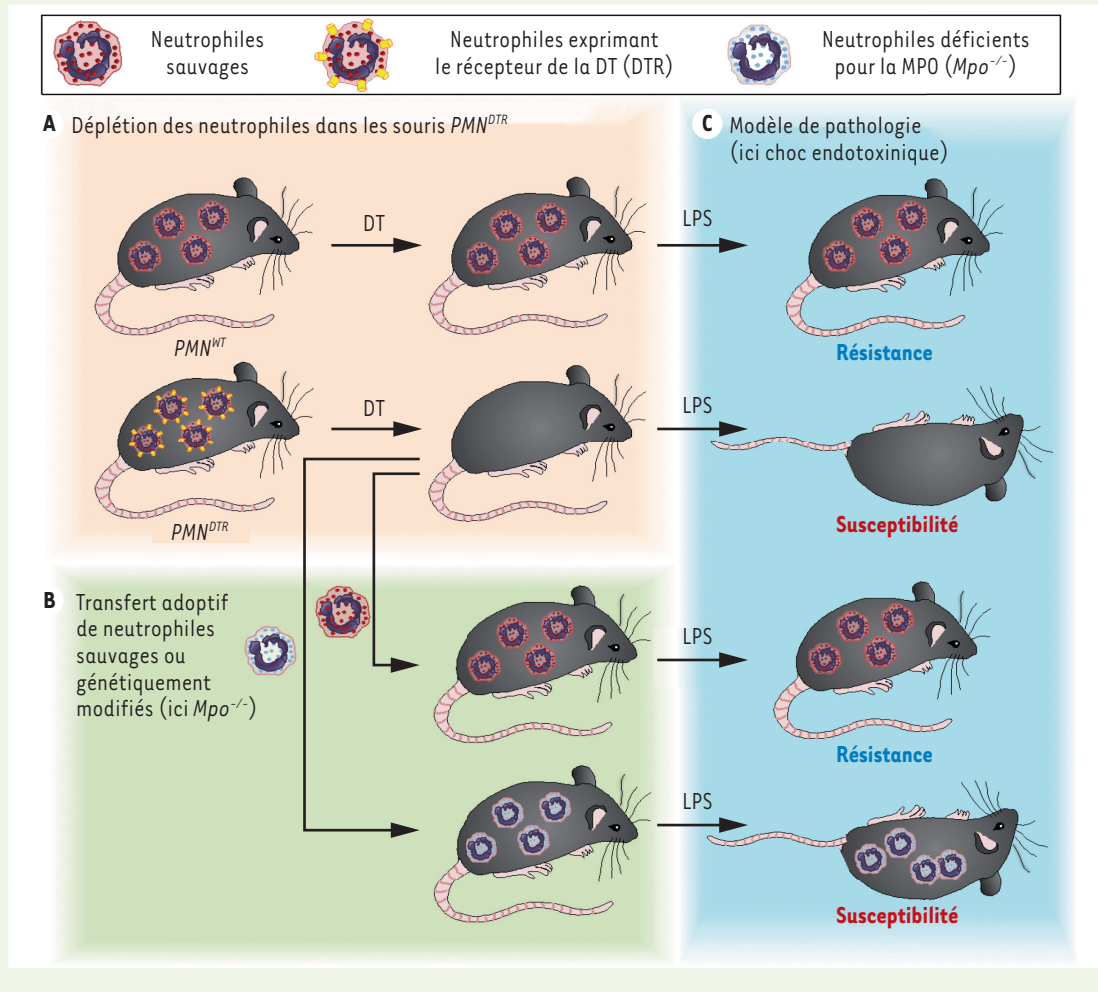


Figure 1. Exemple d'utilisation du modèle PMN^{DTR} : démonstration du rôle protecteur des neutrophiles et de leur enzyme MPO contre le LPS. **A.** L'injection de toxine diphtérique (DT) induit une élimination sélective des neutrophiles chez les souris PMN^{DTR} mais pas chez les souris contrôles PMN^{WT}. **B.** La population de neutrophiles peut être restaurée de manière sélective chez les souris PMN^{DTR} par transfert adoptif de neutrophiles purifiés à partir de moelle osseuse de souris sauvages ou génétiquement modifiées (dans notre étude, des souris déficientes en MPO [Mpo^{-/-}] [28]). **C.** Le rôle des neutrophiles et de certains produits qu'ils libèrent (ici la MPO), dans des modèles de pathologie (ici le choc endotoxinique) est étudié en comparant les réponses de souris PMN^{WT} et PMN^{DTR} reconstituées ou non avec des neutrophiles. Dans notre étude, les groupes de souris déficientes en neutrophiles PMN^{DTR} et de souris PMN^{DTR} reconstituées avec des neutrophiles Mpo^{-/-} sont beaucoup plus susceptibles aux effets toxiques du LPS que les souris contrôles PMN^{WT} et les souris PMN^{DTR} reconstituées avec des neutrophiles sauvages. Ces expériences ont conduit à la conclusion que les neutrophiles et leur enzyme MPO avaient un rôle protecteur contre les effets toxiques du LPS [28]. WT : sauvage ; DTR : récepteur de la toxine diphtérique ; LPS : lipopolysaccharide (une endotoxine présente à la surface des bactéries Gram négatif) ; MPO : myéloperoxidase ; PMN : polynucléaire neutrophile.

des avantages significatifs par rapport aux modèles existants. La déplétion obtenue dans ce modèle est en effet spécifique et transitoire. Le repeuplement sélectif des neutrophiles peut être réalisé à partir de polynucléaires isolés de souris sauvages mais également de souris génétiquement modifiées afin d'étudier le rôle de certains gènes dans les fonctions de ces cellules. Cet outil nous a ainsi permis de révéler le rôle protecteur des neutrophiles et de leur enzyme MPO dans le choc endotoxinique [28]. Il devrait permettre l'identification

de nombreuses autres fonctions de ces cellules dans l'immunité innée et adaptative. ♦

SUMMARY

PMN^{DTR} mice: a new model to study neutrophils *in vivo*
Neutrophils play a key role in host defense against pathogens. They can contribute to pathological inflammation, and are thought to exacerbate tissue injury

upon exposure to bacterial products, such as endotoxin (LPS). Recent findings suggest that neutrophils can also participate in adaptive immune responses and contribute to inflammation resolution. Many discoveries regarding the *in vivo* role of neutrophils were made possible by the use of genetically modified neutrophil-deficient mice, or by the use of neutrophil-depleting antibodies. Here we describe a new mouse model, *PMN^{DTR}* mice, in which neutrophils can be selectively depleted upon injection of diphtheria toxin. Using this model, we have recently demonstrated that neutrophils play a protective role during lethal endotoxin-induced systemic shock. This new mouse model presents several major advantages over more classical models of neutropenia, which are discussed herein. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011 ; 11 : 519-31.
- Pham CT. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2006 ; 6 : 541-50.
- Granger V, de Chaisemartin L, Chollet-Martin S. La pêche miraculeuse des filets du neutrophile. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 544-9.
- Jonsson F, Mancardi DA, Albanesi M, Bruhns P. Neutrophils in local and systemic antibody-dependent inflammatory and anaphylactic reactions. *J Leukoc Biol* 2013 ; 94 : 643-56.
- Chakravarti A, Allaeys I, Poubelle PE. Neutrophile et immunité : est-ce inné ou acquis ? *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 862-7.
- Dumas A, Pouliot M. Le neutrophile : ennemi ou ami ? *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 699-704.
- Jonsson F, Mancardi DA, Daeron M, Bruhns P. Le neutrophile : une cellule choc : un nouveau mécanisme du choc anaphylactique. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 823-5.
- Greenlee-Wacker MC. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol Rev* 2016 ; 273 : 357-70.
- Jones HR, Robb CT, Perretti M, Rossi AG. The role of neutrophils in inflammation resolution. *Semin Immunol* 2016 ; 28 : 137-45.
- Campbell EL, Bruyninckx WJ, Kelly CJ, et al. Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation. *Immunity* 2014 ; 40 : 66-77.
- Tepper RI, Coffman RL, Leder P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* 1992 ; 257 : 548-51.
- Conlan JW, North RJ. Neutrophils are essential for early anti-Listeria defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J Exp Med* 1994 ; 179 : 259-68.
- Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, et al. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* 2008 ; 83 : 64-70.
- Tsujimura Y, Obata K, Mukai K, et al. Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis. *Immunity* 2008 ; 28 : 581-9.
- Charmoy M, Milon G, Tacchini-Cottier F. Role of neutrophils in the early shaping of the Leishmania Major specific immune response in experimental murine cutaneous Leishmaniasis. In: Tacchini-Cottier F, van Zandbergen G, eds. *Neutrophils in infectious diseases*. Bentham Science Publishers, 2011 : 49-58.
- Beutier H, Gillis CM, Iannascoli B, et al. IgG subclasses determine pathways of anaphylaxis in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2017 ; 139 : 269-80 e7.
- Gillis CM, Jonsson F, Mancardi DA, et al. Mechanisms of anaphylaxis in human low-affinity IgG receptor locus knock-in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2017 ; 139 : 1253-65 e14.
- Bruhn KW, Dekitani K, Nielsen TB, et al. Ly6G-mediated depletion of neutrophils is dependent on macrophages. *Results Immunol* 2016 ; 6 : 5-7.
- Vassen L, Duhsen U, Kosan C, et al. Growth factor independence 1 (Gfi1) regulates cell-fate decision of a bipotential granulocytic-monocytic precursor defined by expression of Gfi1 and CD48. *Am J Blood Res* 2012 ; 2 : 228-42.
- Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, et al. Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity* 2003 ; 18 : 109-20.
- Li H, Ji M, Klarmann KD, Keller JR. Repression of Id2 expression by Gfi-1 is required for B-cell and myeloid development. *Blood* 2010 ; 116 : 1060-9.
- Yucel R, Karsunky H, Klein-Hitpass L, Moroy T. The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit⁺ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus. *J Exp Med* 2003 ; 197 : 831-44.
- Ordóñez-Rueda D, Jonsson F, Mancardi DA, et al. A hypomorphic mutation in the Gfi1 transcriptional repressor results in a novel form of neutropenia. *Eur J Immunol* 2012 ; 42 : 2395-408.
- Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, et al. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 1999 ; 8 : 265-77.
- Weber FC, Nemeth T, Csepregi JZ, et al. Neutrophils are required for both the sensitization and elicitation phase of contact hypersensitivity. *J Exp Med* 2015 ; 212 : 15-22.
- Buch T, Heppner FL, Tertilt C, et al. A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat Methods* 2005 ; 2 : 419-26.
- Passague E, Wagner EF, Weissman IL. JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell* 2004 ; 119 : 431-43.
- Reber LL, Gillis CM, Starkl P, et al. Neutrophil myeloperoxidase diminishes the toxic effects and mortality induced by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 2017 ; 214 : 1249-58.
- Haegens A, Heeringa P, van Suylen RJ, et al. Myeloperoxidase deficiency attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation and subsequent cytokine and chemokine production. *J Immunol* 2009 ; 182 : 7990-6.
- Ktalcevic J, Novelli M, Phylactides M, et al. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity* 2000 ; 12 : 201-10.

TIRÉS À PART

L.L. Reber

LA FONDATION PREMUP : UN OPÉRATEUR DE TERRAIN EN PÉRINATALITÉ RECONNU POUR SON EXCELLENCE ET SON INTERDISCIPLINARITÉ

La Fondation de coopération scientifique PremUp, unique en Europe, intervient sur la prévention du handicap à la naissance, par la protection de la santé de la femme enceinte et du nouveau-né.



FONDATION DE COOPÉRATION SCIENTIFIQUE SUR LA GROSSESSE ET LA PRÉMATURITÉ

