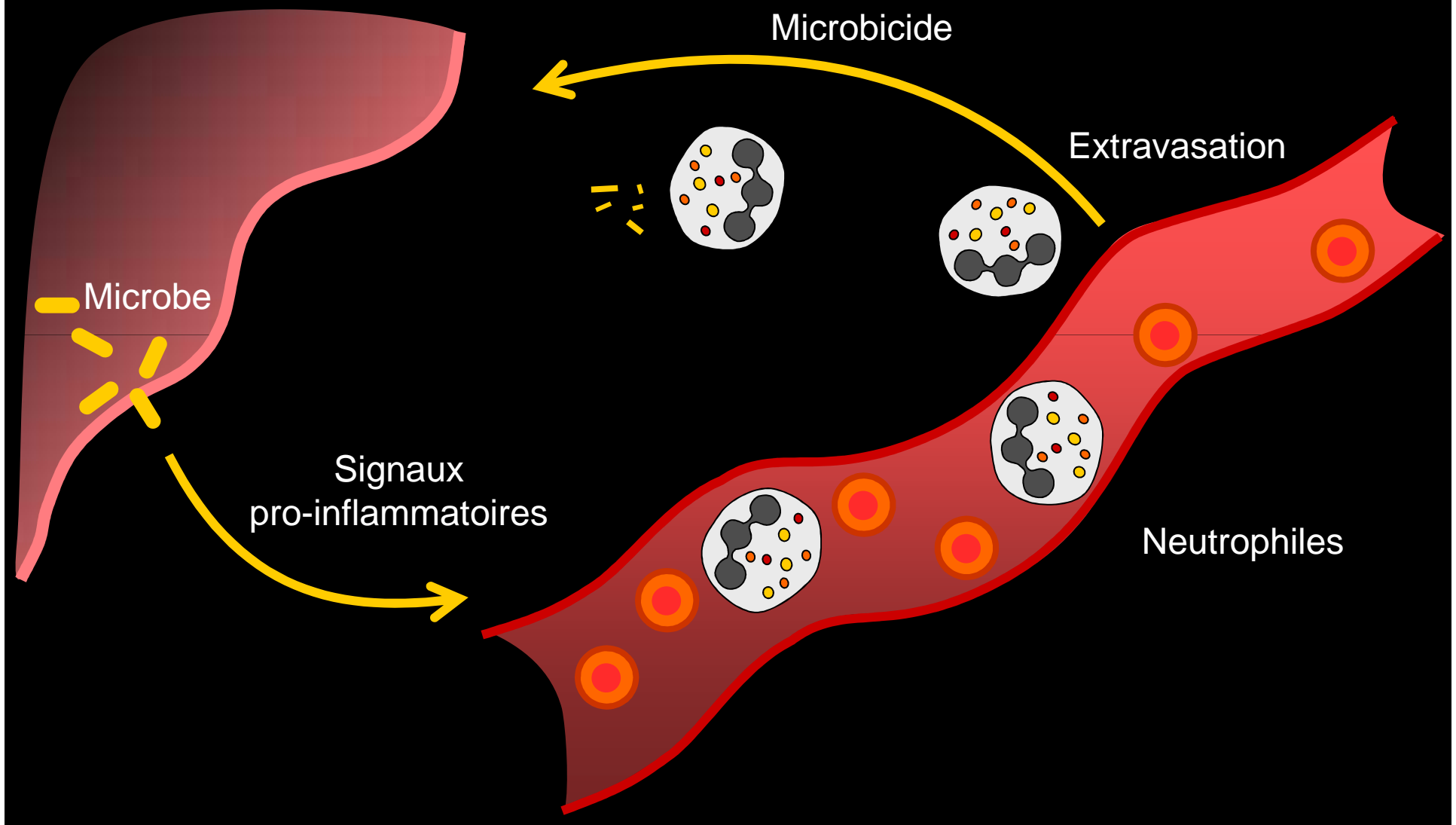


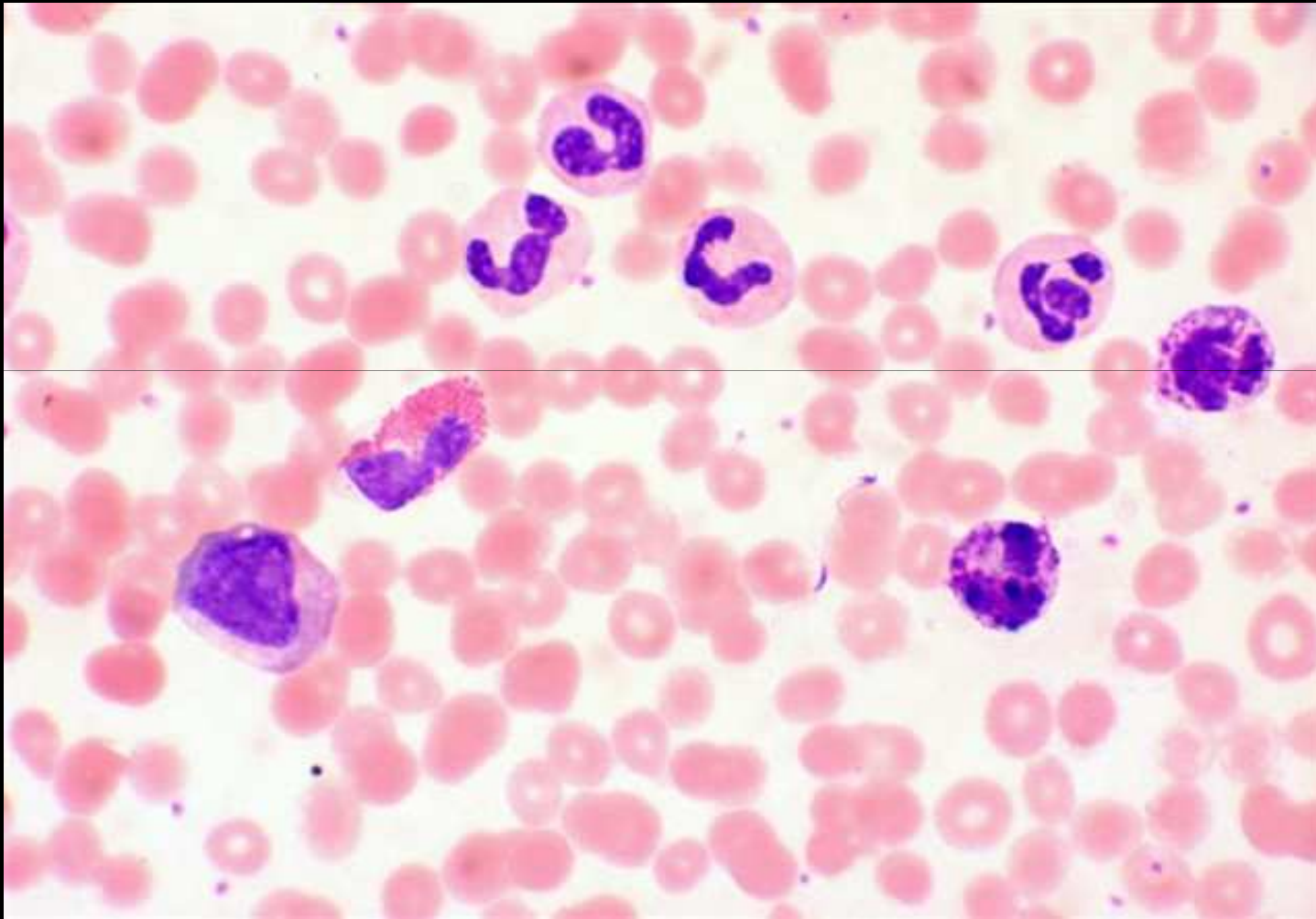
# Trionfo della Morte, Camposanto, Pise.



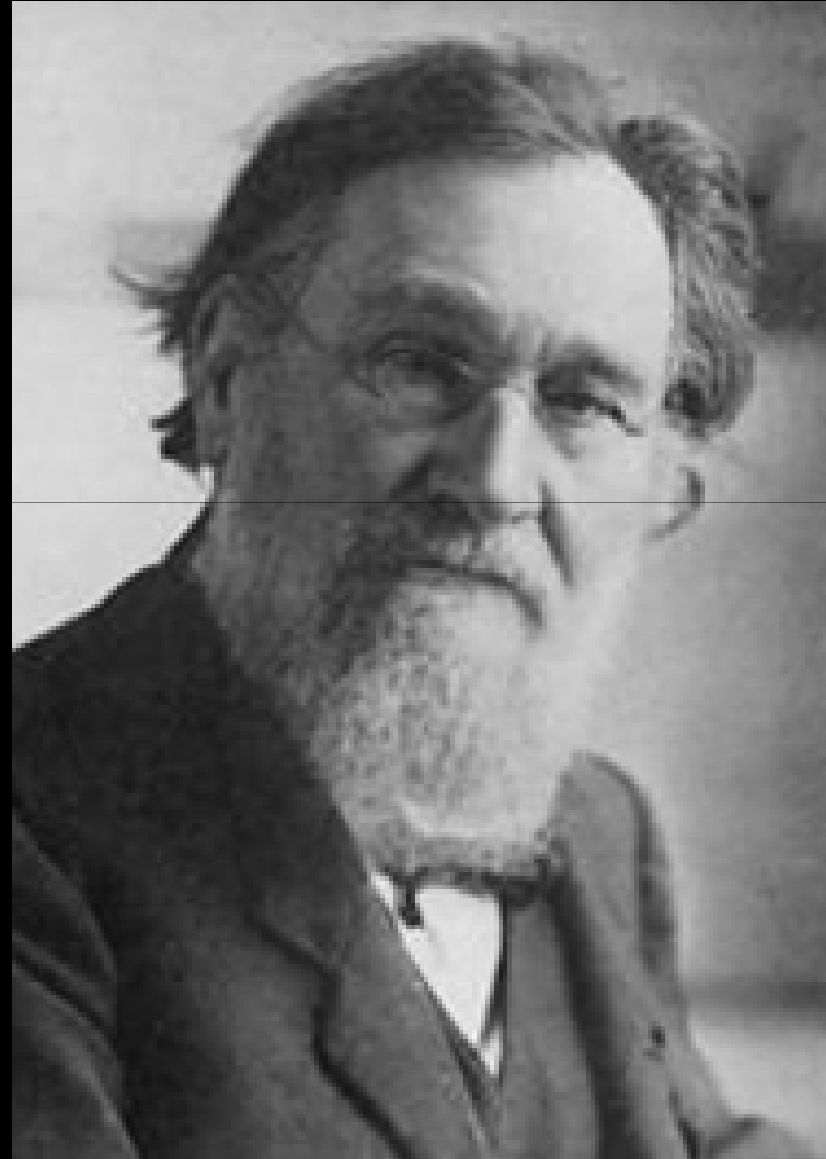
# Les neutrophiles sont les effecteurs du système immunitaire inné



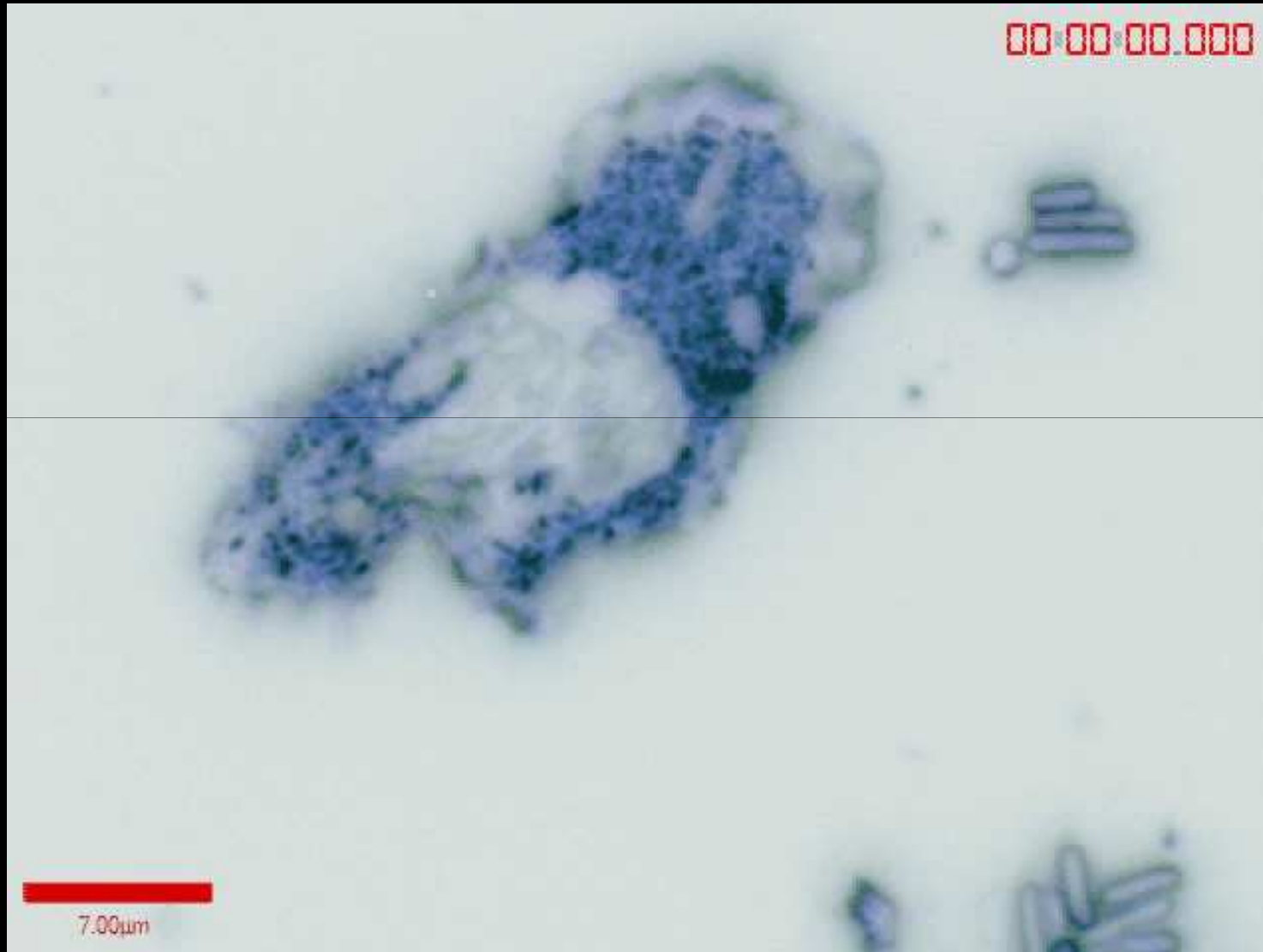
## Abondance des neutrophiles dans le sang



Elie Metchnikoff

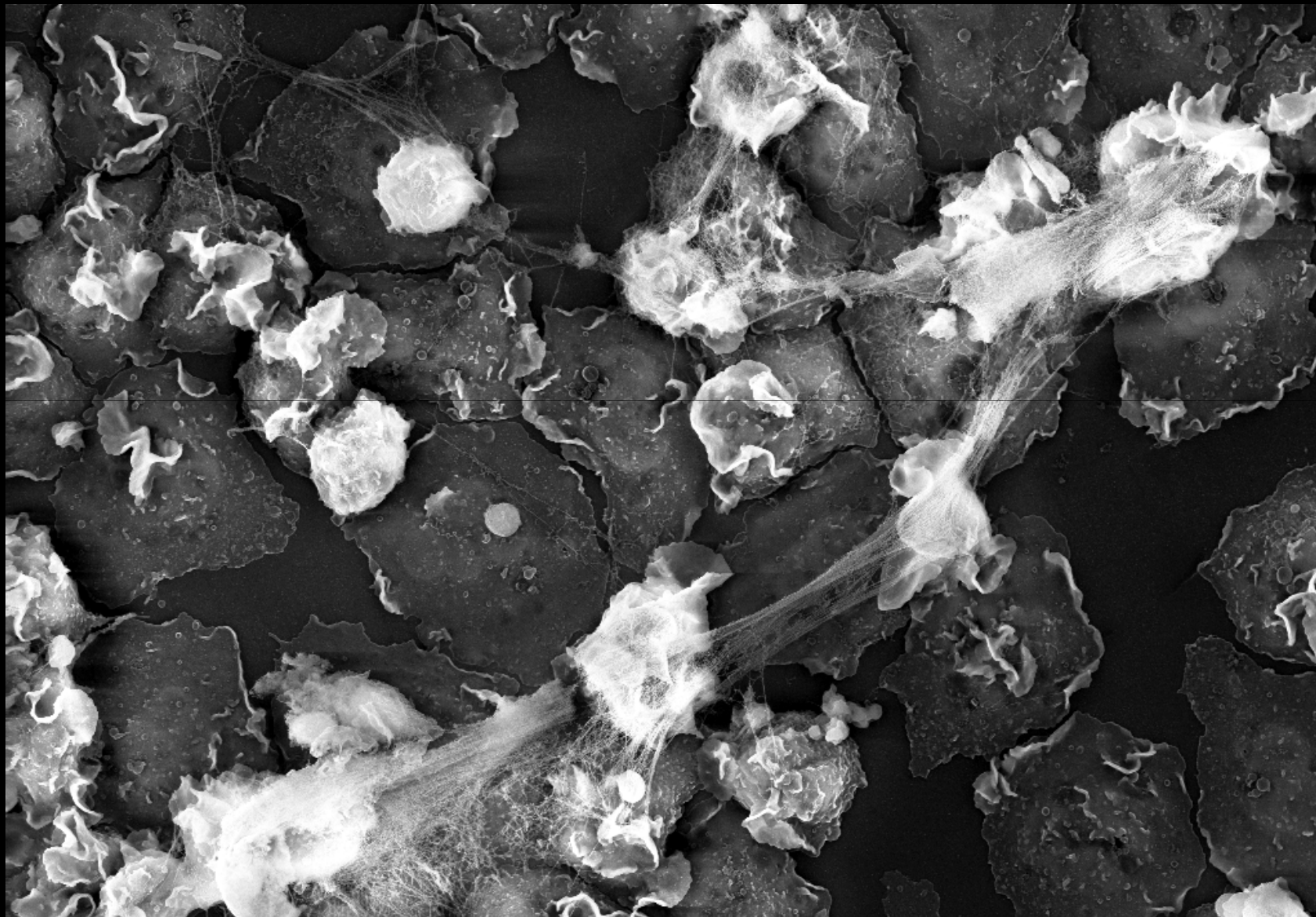


# Les neutrophiles tuent par phagocytose





Les neutrophiles projettent des 'NETs'/filets après activation



## Plan de la présentation

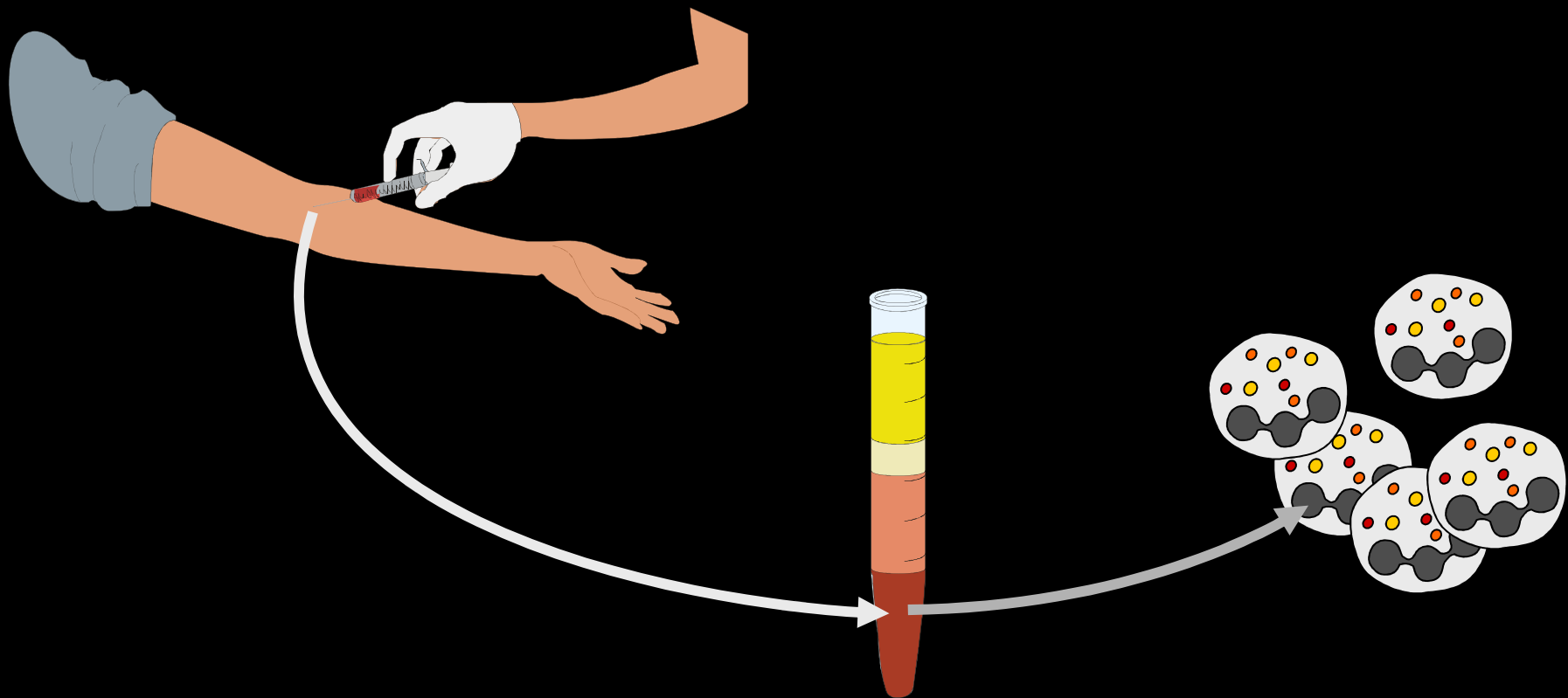
1. Que sont les NETs?
2. Comment les NETs sont-ils produits?
3. Activité antimicrobienne des NETs.
4. Les NETs sont-ils relevant dans l'immunité?
5. Le côté noir des NETs: l'autoimmunité

## Plan de la présentation

1. Que sont les NETs?
2. Comment les NETs sont-ils produits?
3. Activité antimicrobienne des NETs.
4. Les NETs sont-ils relevant pour l'immunité?
5. Le côté noir des NETs: l'autoimmunité

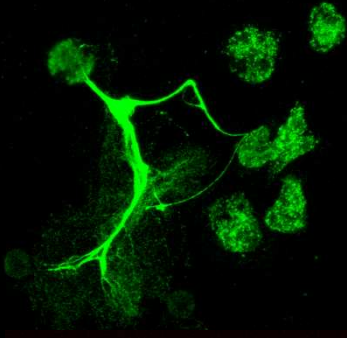


# Approche expérimentale

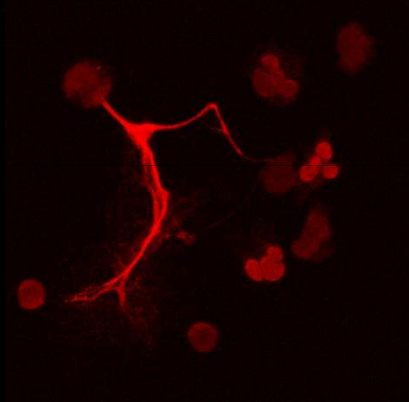


Les NETs contiennent des protéines granulaires et nucléaires ainsi que de l'ADN

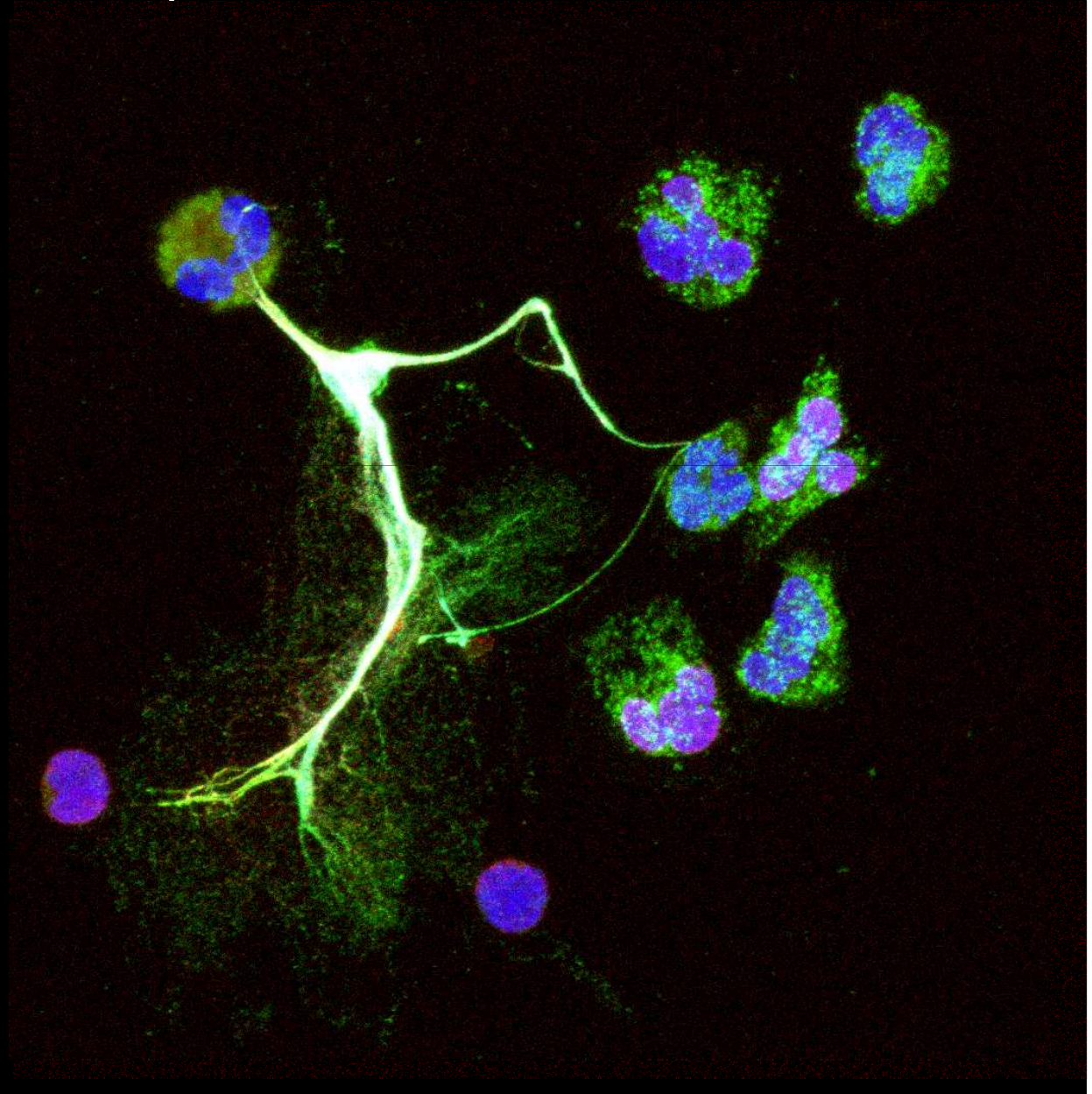
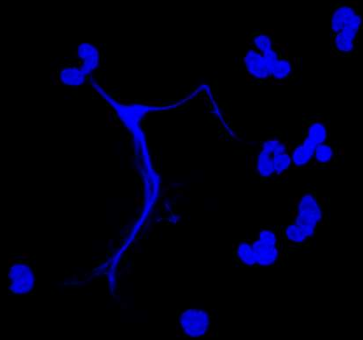
Elastase



Histone 2A



DNA



# Contenu moléculaire total des NETs

Proteome LC Database - SeaMonkey

http://141.14.152.84/cgi-bin/36525/pdbs/lc/menu\_frame.cgi

Proteome LC Database <sup>New</sup> - Organisms

Home - Organisms - Info - Team - References - Statistics

**Organisms**

- Homo sapiens*
  - NETome
    - Identified Proteins
    - Mass Data
    - ICAT-LC/MS

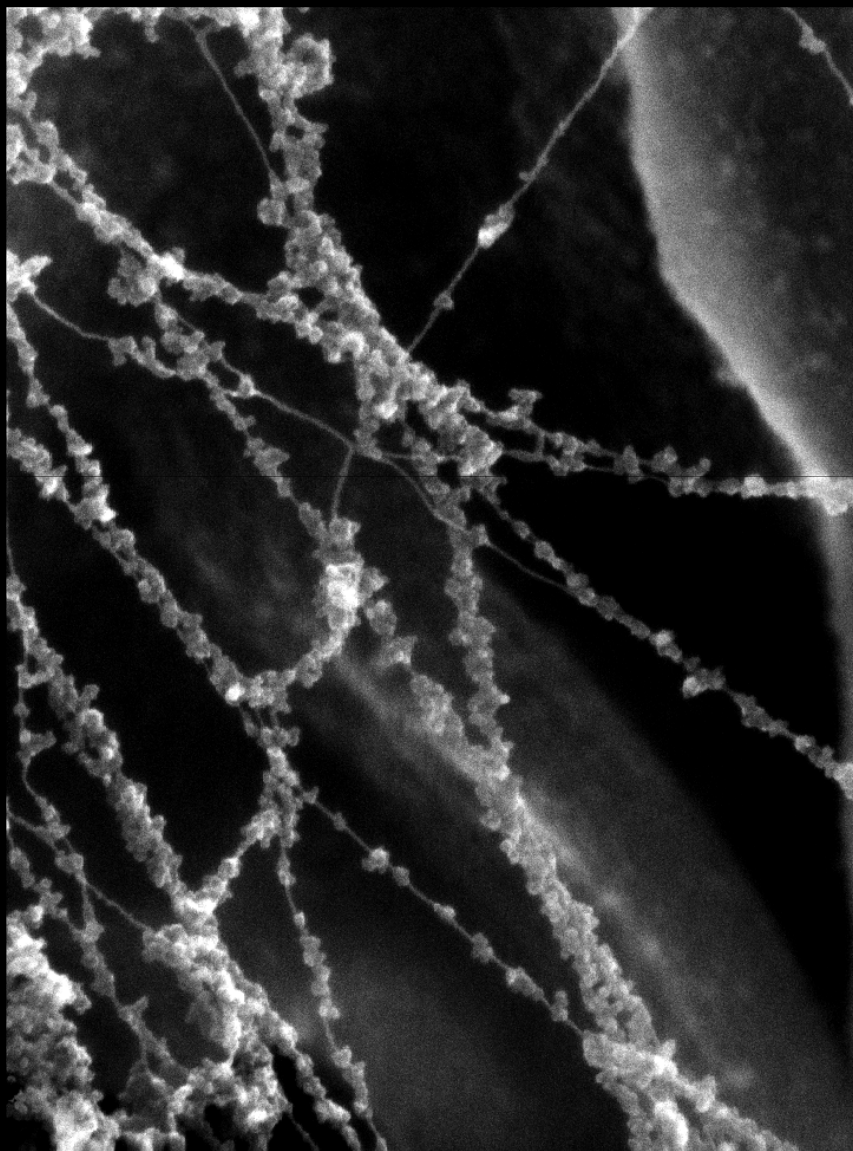
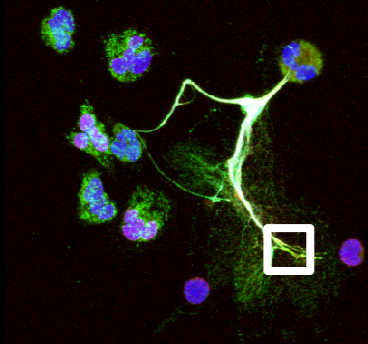
**Identified Proteins**

Accession Number	Protein Name	Gene Name	Mr [Da]	pI	Identification Status					Total Ion Score	Peptide Count	Sequence Coverage [%]
					Samples 1 - 5							
					No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5			
<a href="#">P08246</a>	Leukocyte elastase	ELA2	28,500	9.71	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	150	3	
<a href="#">P02788</a>	Lactotransferrin	LTF	78,132	8.50	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	2884	48	
<a href="#">P20160</a>	Azurocidin	AZU1	26,869	9.75	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	285	5	
<a href="#">P08311</a>	Cathepsin G	CTSG	28,819	11.19	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	588	11	
<a href="#">P05164</a>	Myeloperoxidase	MPO	73,807	9.30	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	1482	26	
<a href="#">P24158</a>	Leukocyte proteinase 3	PR3	27,789	8.72	<a href="#">cand</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">cand</a>	121	3	
<a href="#">P61626</a>	Lysozyme C	LYZ	16,526	9.38	-	<a href="#">cand</a>	<a href="#">cand</a>	-	-	51	2	
<a href="#">P59665</a>	Neutrophil defensin 1 and 3	DEFA-1 and -3	10,194	6.54	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	127	2	
<a href="#">Q9NV63</a>	Histone H2A	H2A	16,100	10.24	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	<a href="#">ident</a>	107	2	

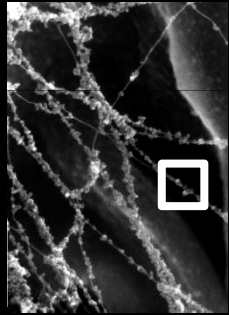
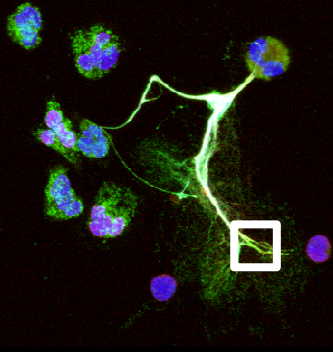
© 2007



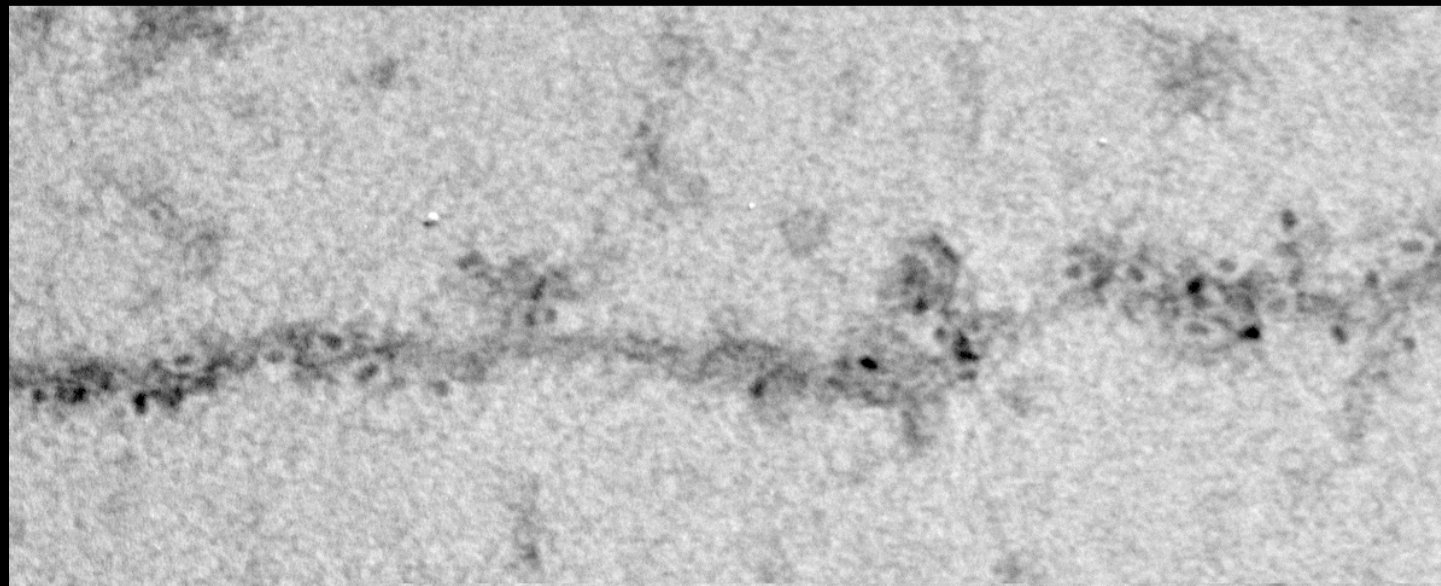
## Les NETs en haute résolution



# Distribution des histones et marqueurs granulaires sur les NETs



Neutrophile Elastase



Histone/ADN

500 nm

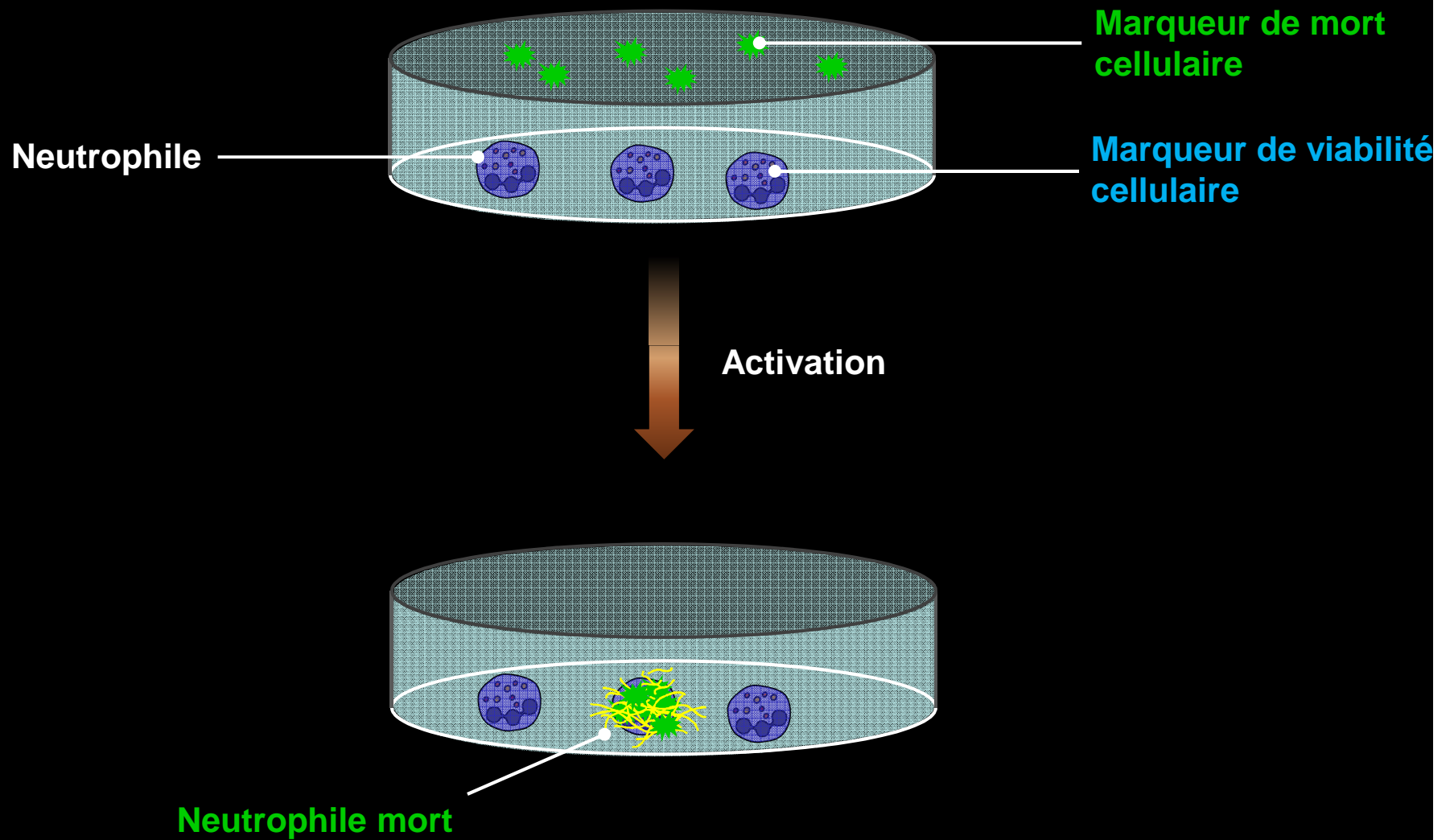


## Plan de la présentation

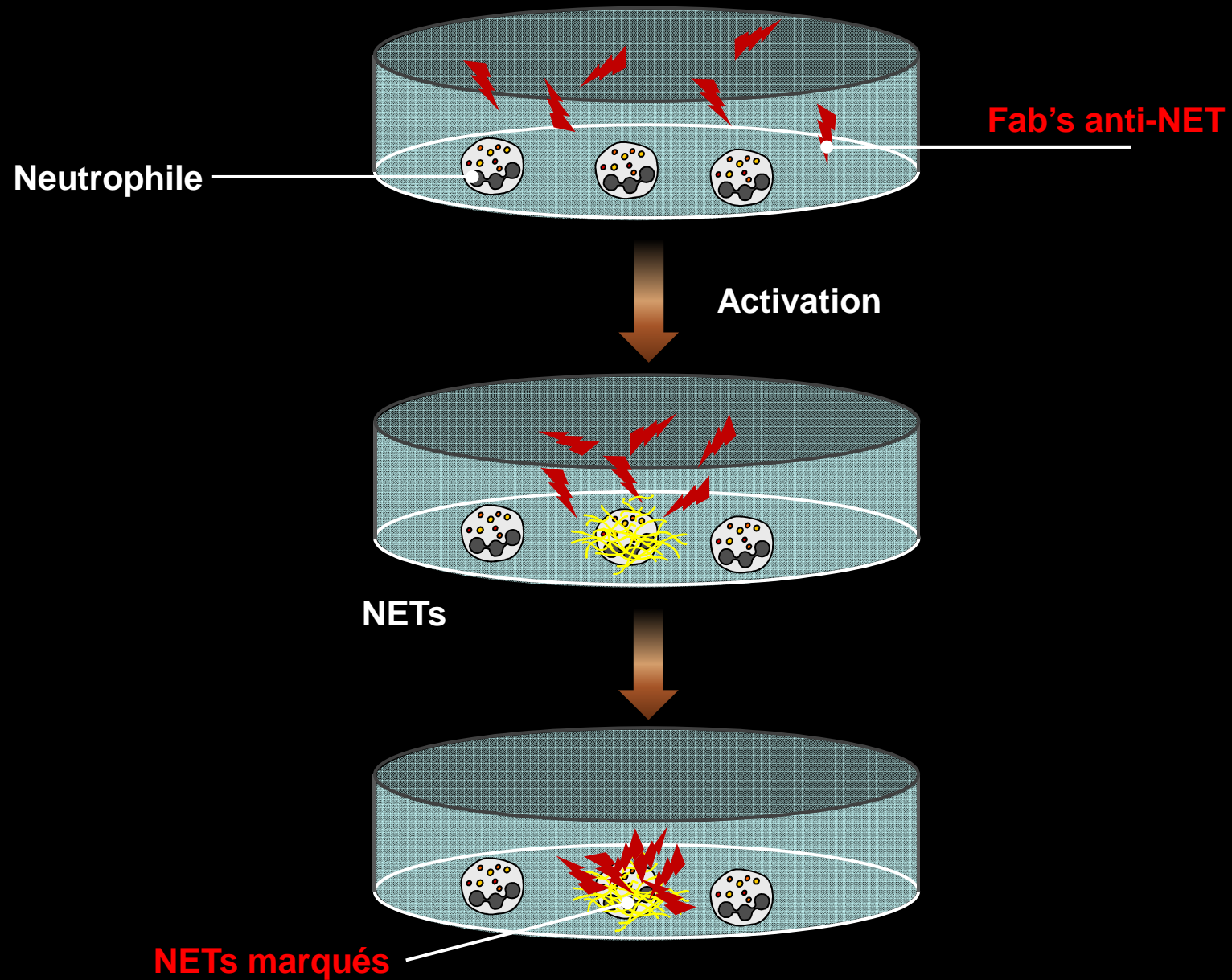
1. Que sont les NETs?
2. Comment les NETs sont-ils produits?
3. Activité antimicrobienne des NETs.
4. Les NETs sont-ils relevant pour l'immunité?
5. Le côté noir des NETs: l'autoimmunité



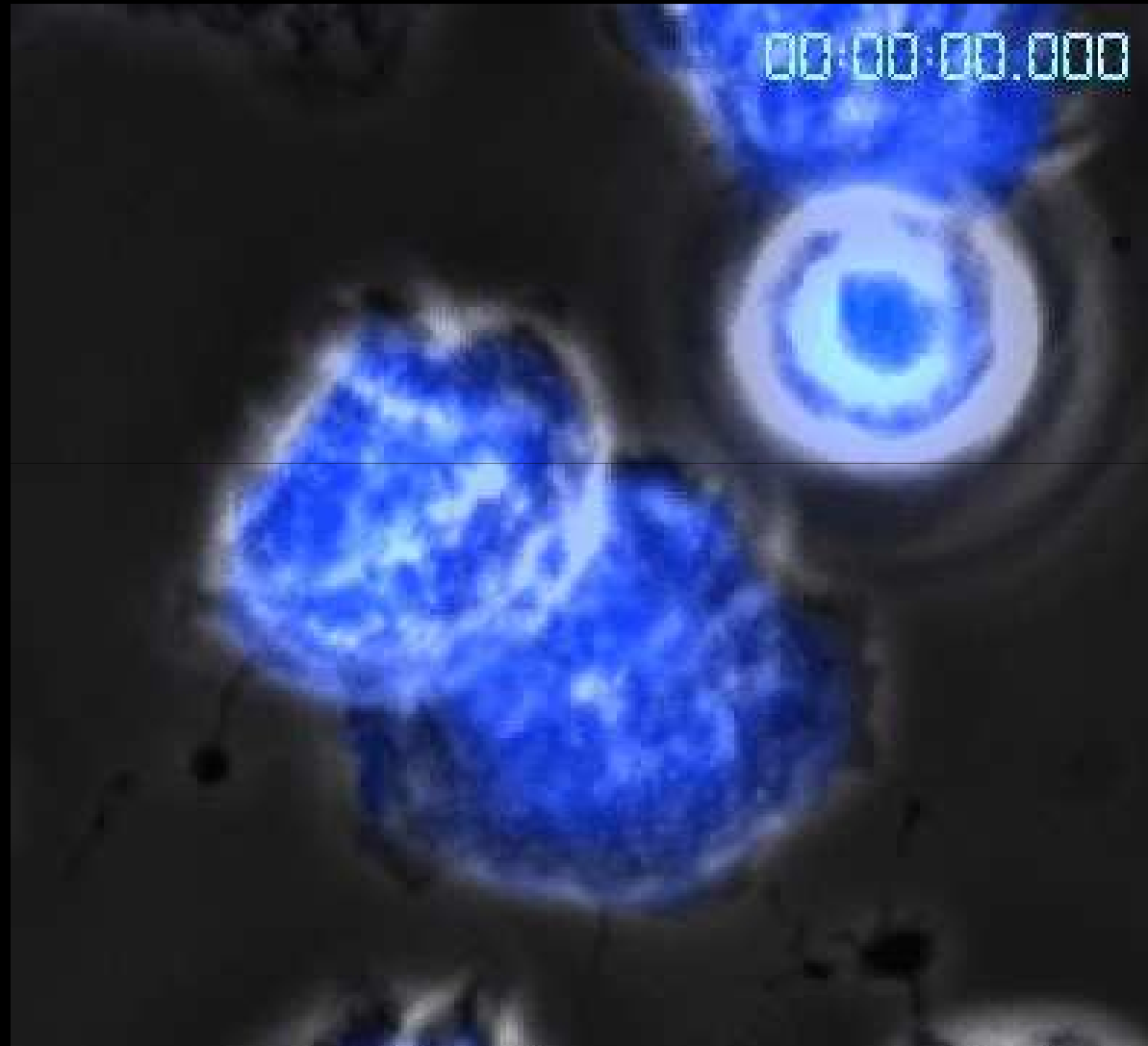
# Visualisation en temps réel de la viabilité et de la mort cellulaire



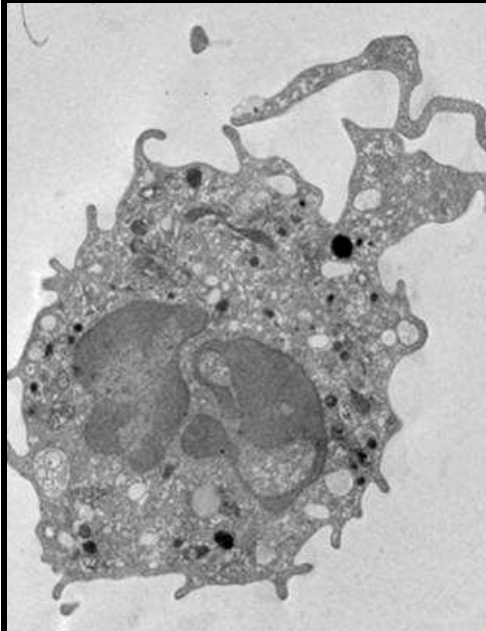
# Visualisation en temps réel de la formation des NETs



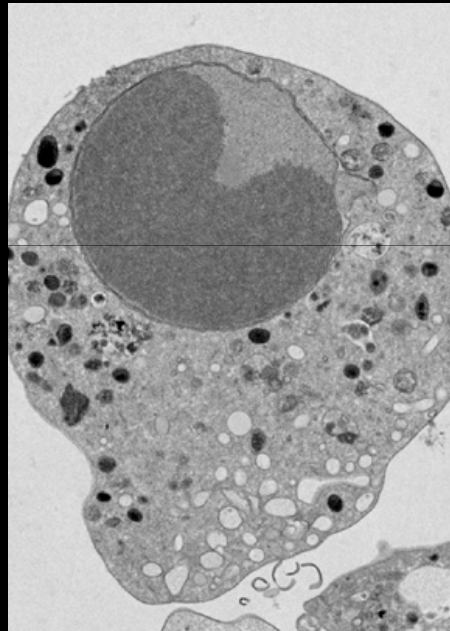
# Visualisation en temps réel de la formation des NETs



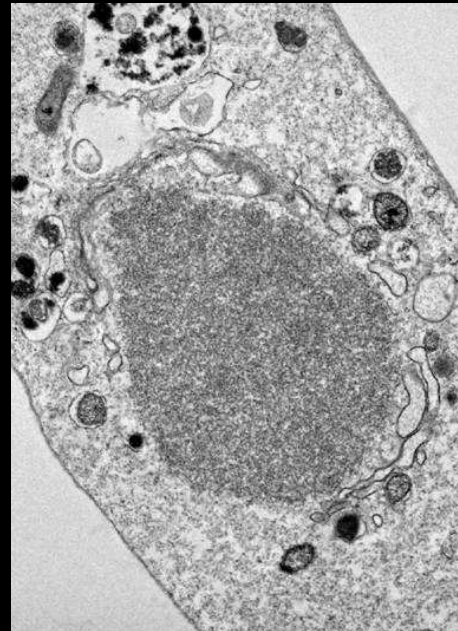
# Processus cellulaire de formation des NETs



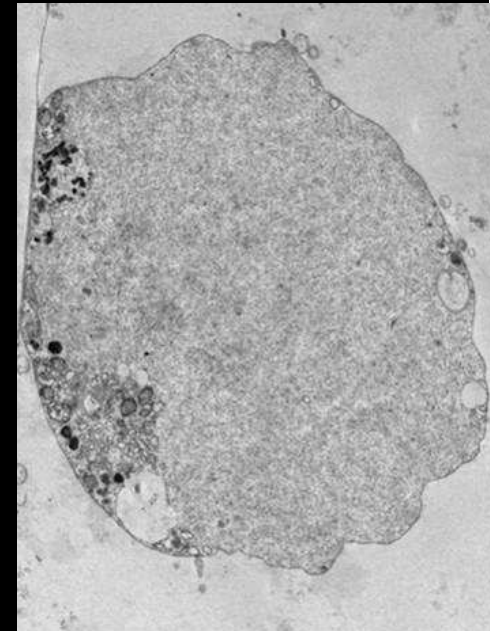
**Naive**



**60 min**

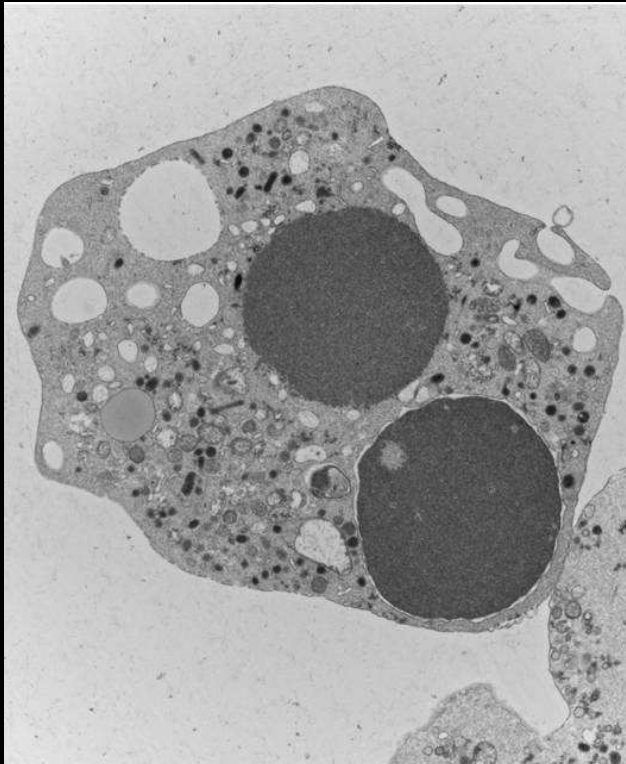


**120 min**

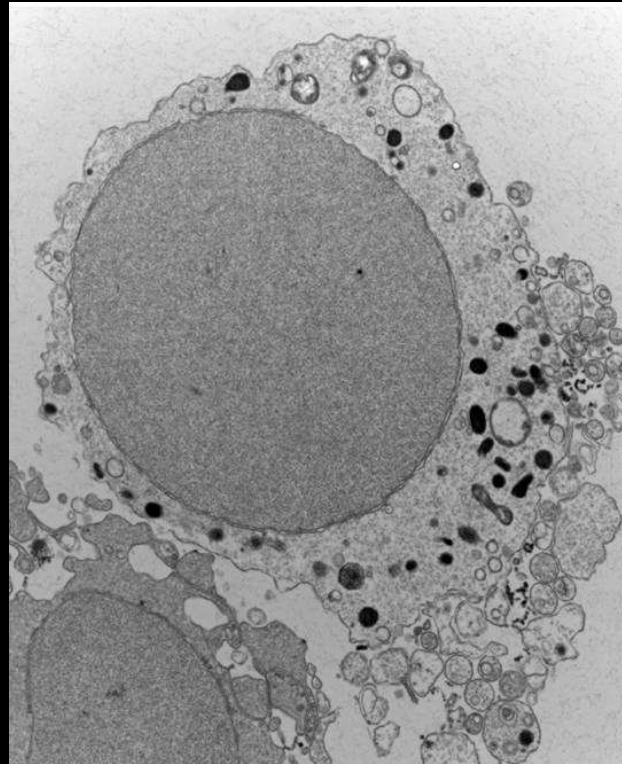


**180 min**

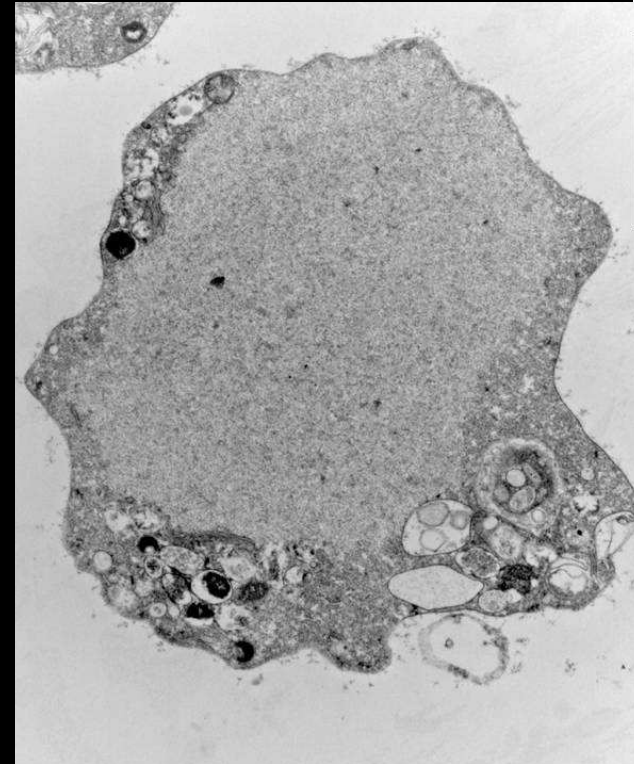
# La mort cellulaire est différente de l'apoptose ou de la nécrose



**Apoptose**



**Necrose**

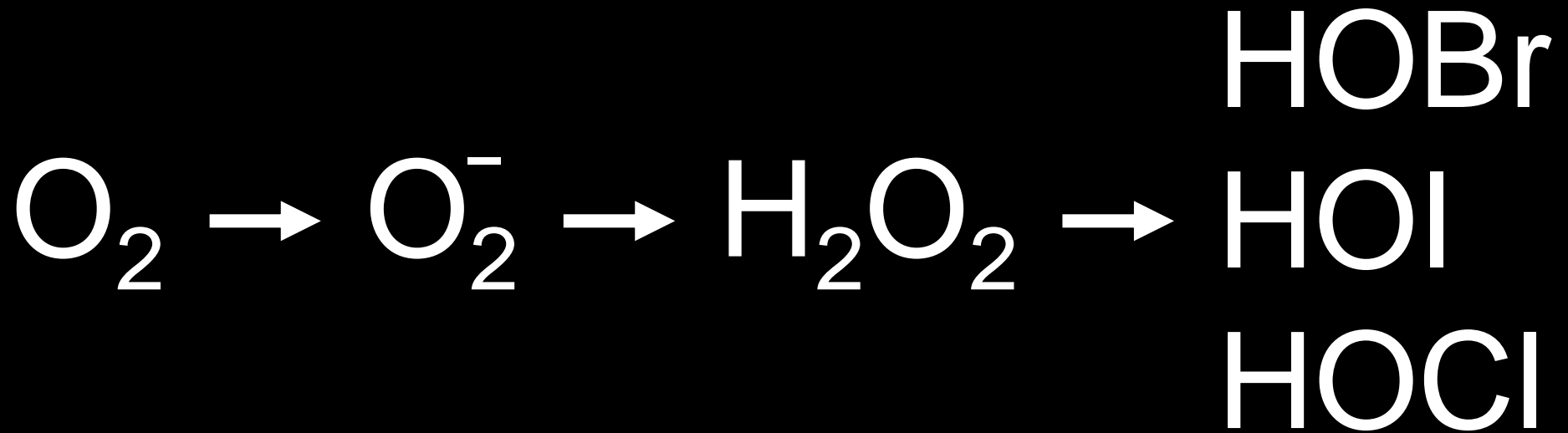


**NETose**

# Radicaux libres de l'oxygène dans les neutrophiles

NADPH

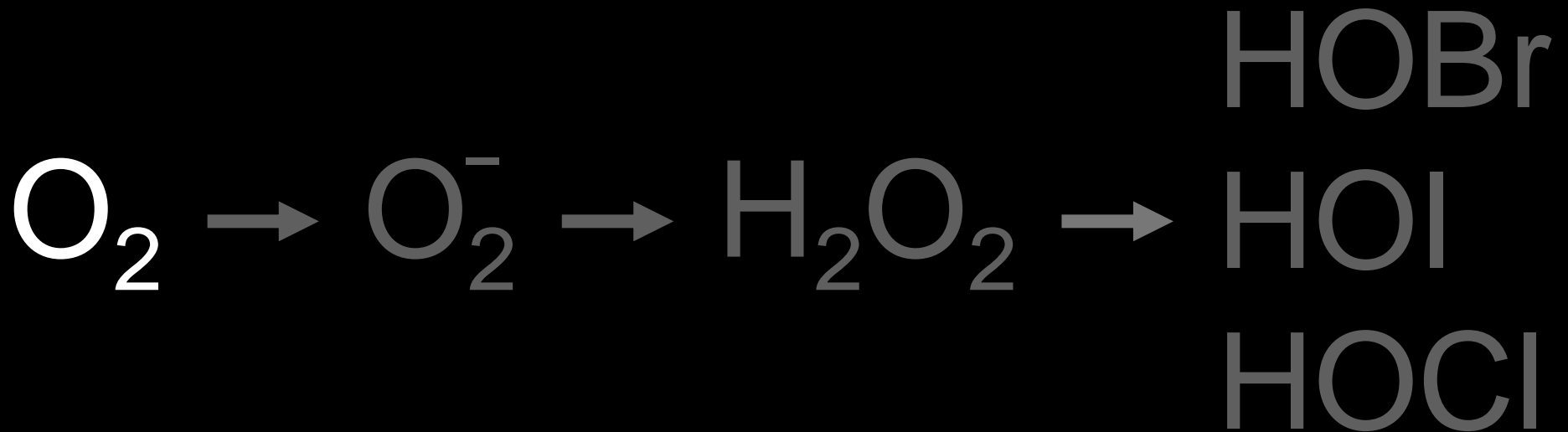
oxidase



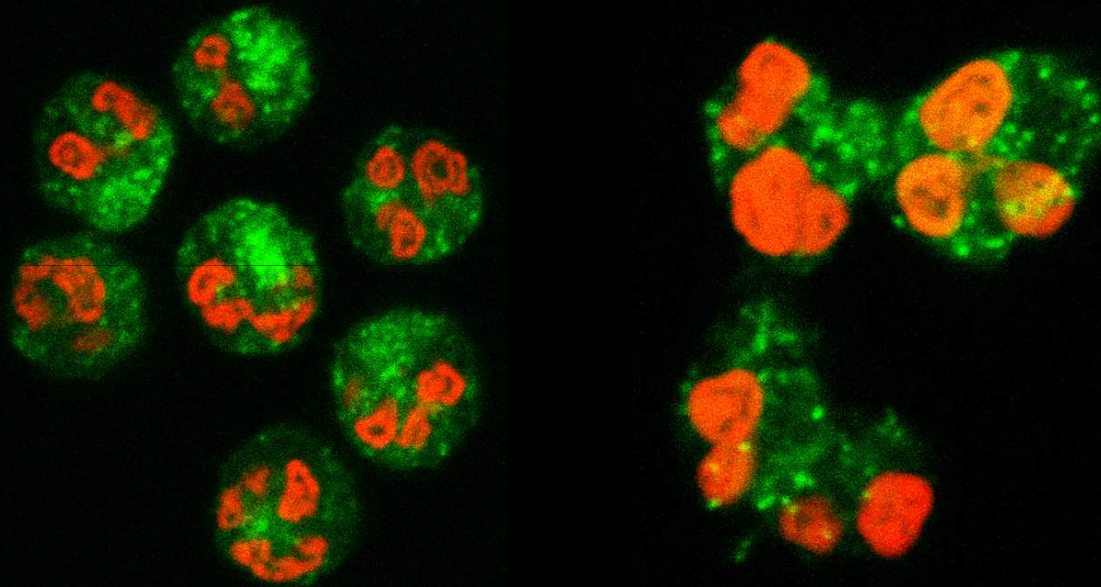


Les patients de Granulomatose Septique Chronique (CGD)  
portent des mutations dans les gènes Phox

~~NADPH~~  
oxidase



# CGD patients do not make NETs

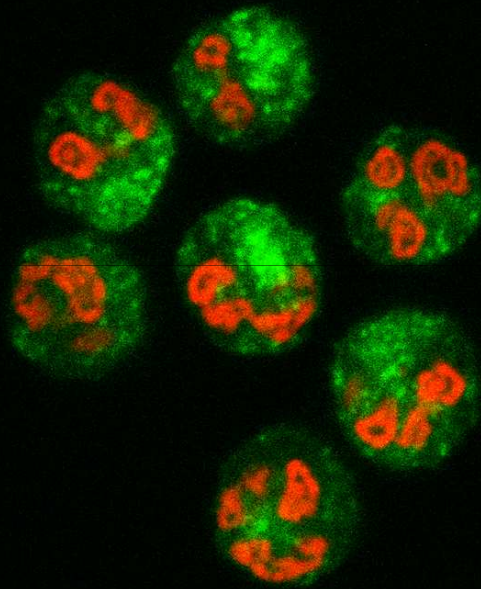


Naive

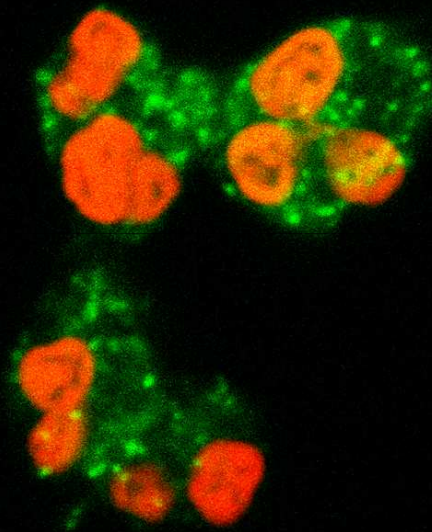
PMA

Neutrophil Elastase Histone/DNA complex

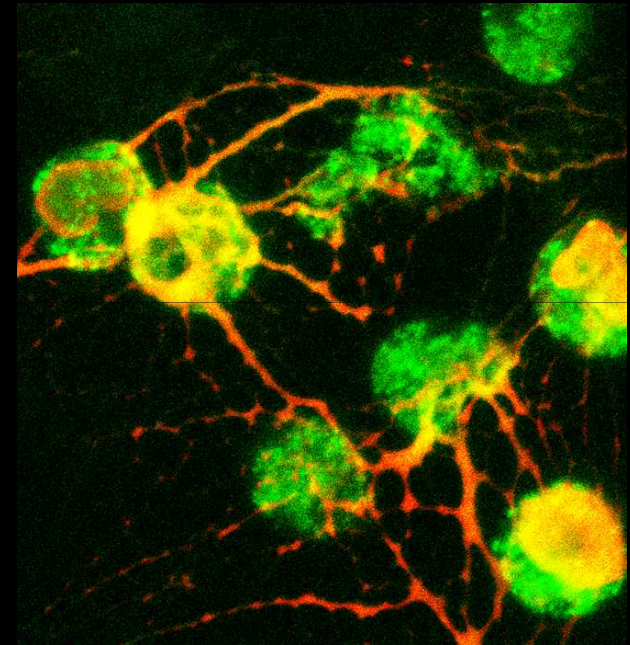
Les patients CGD forment des NETs après une stimulation par  $H_2O_2$



Naive



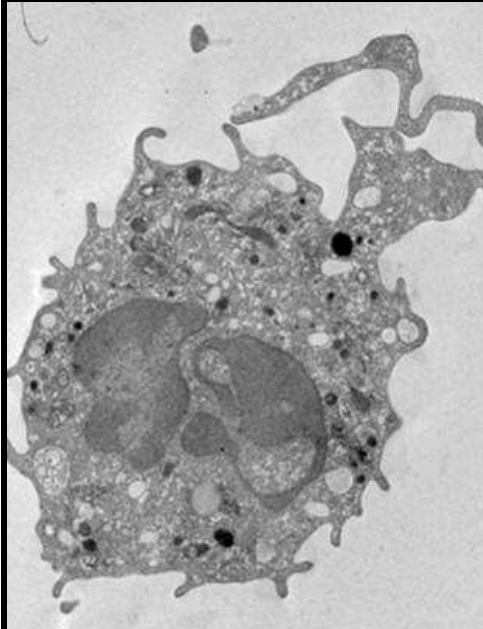
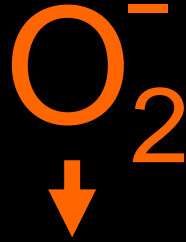
PMA



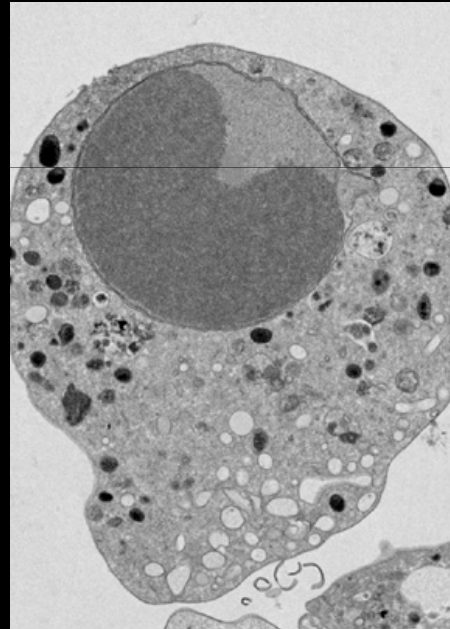
$H_2O_2$

Neutrophil Elastase Histone/DNA complex

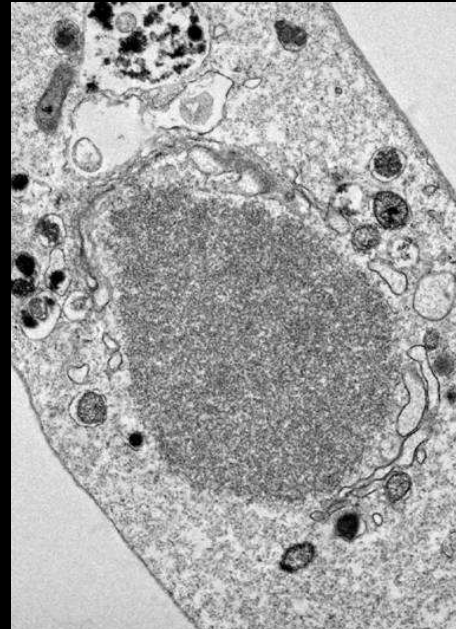
# Processus cellulaire de formation des NETs



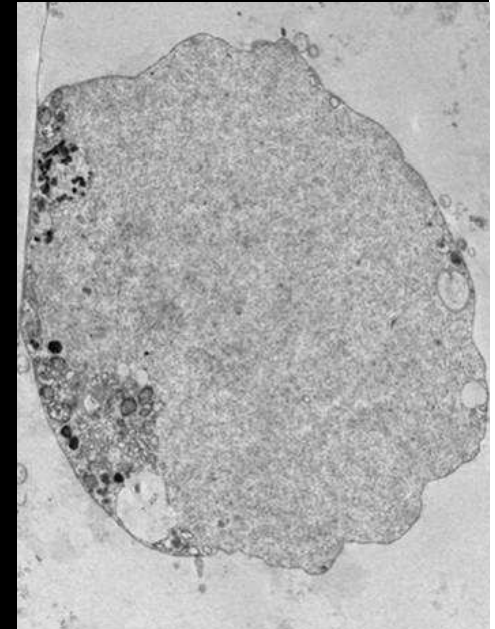
Naive



60 min

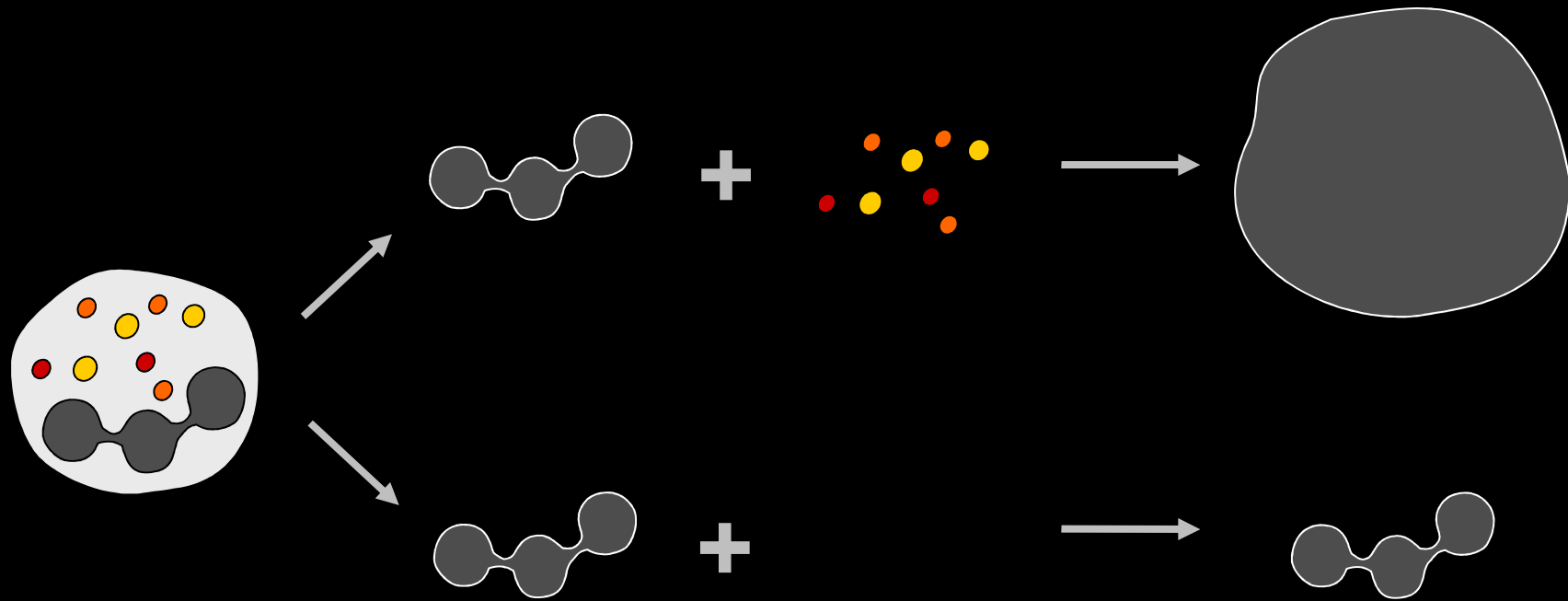


120 min



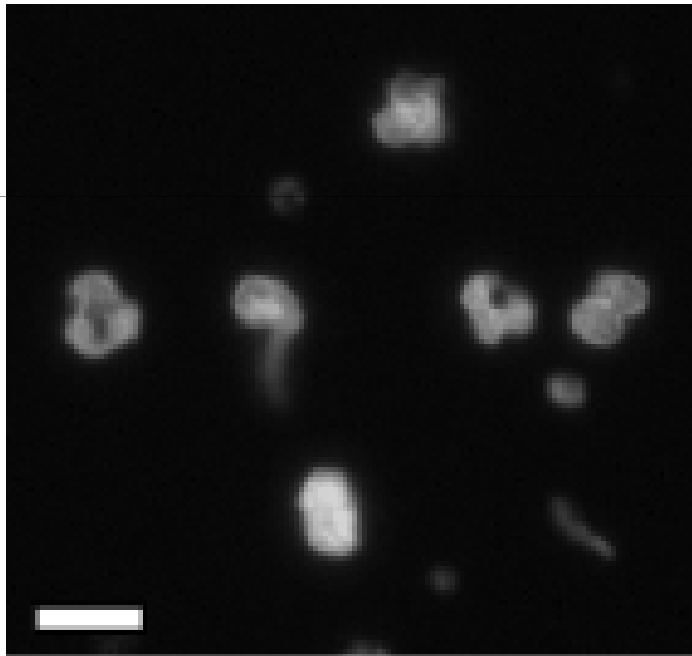
180 min

# Approche expérimentale: Netose "sans cellule"



Le facteur induisant la formation de NETs se trouve dans le cytoplasme

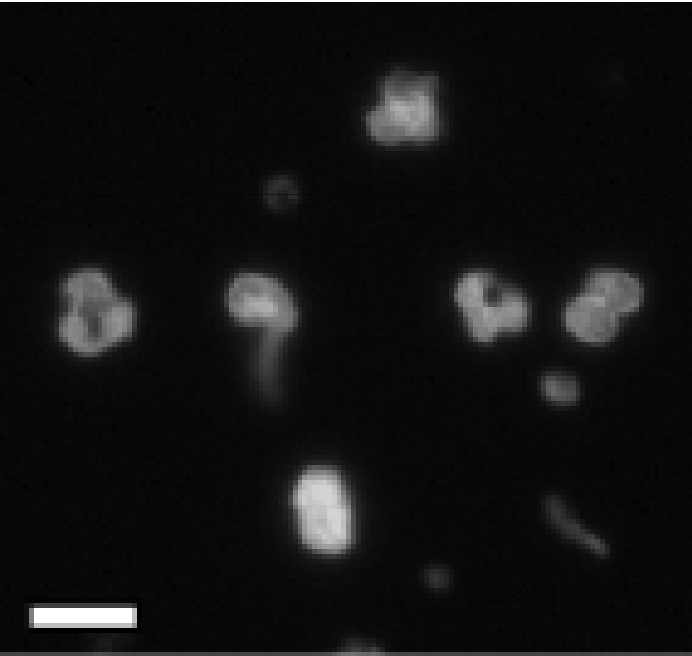
**Buffer**



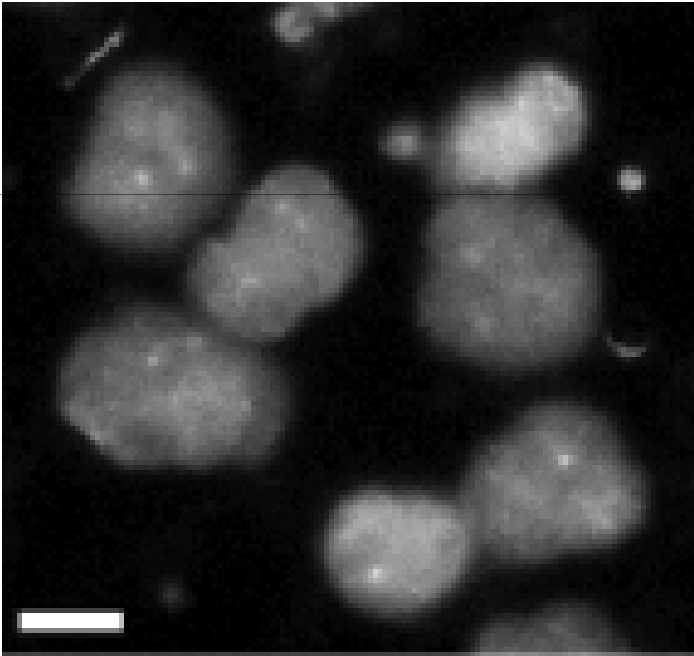


Le facteur induisant la formation de NETs se trouve dans le cytoplasme

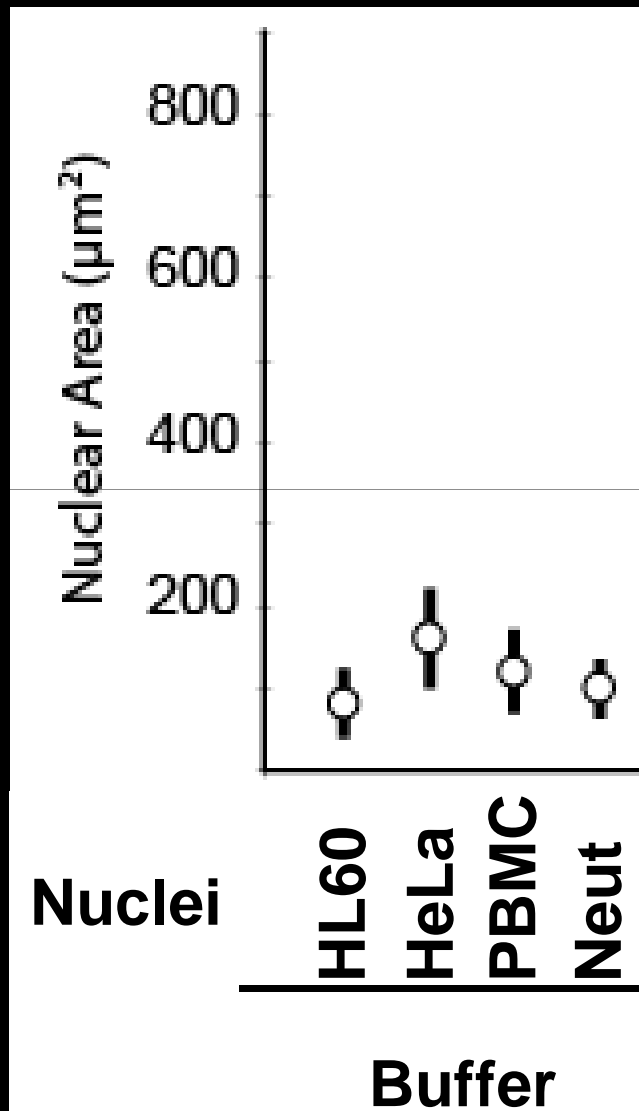
**Buffer**



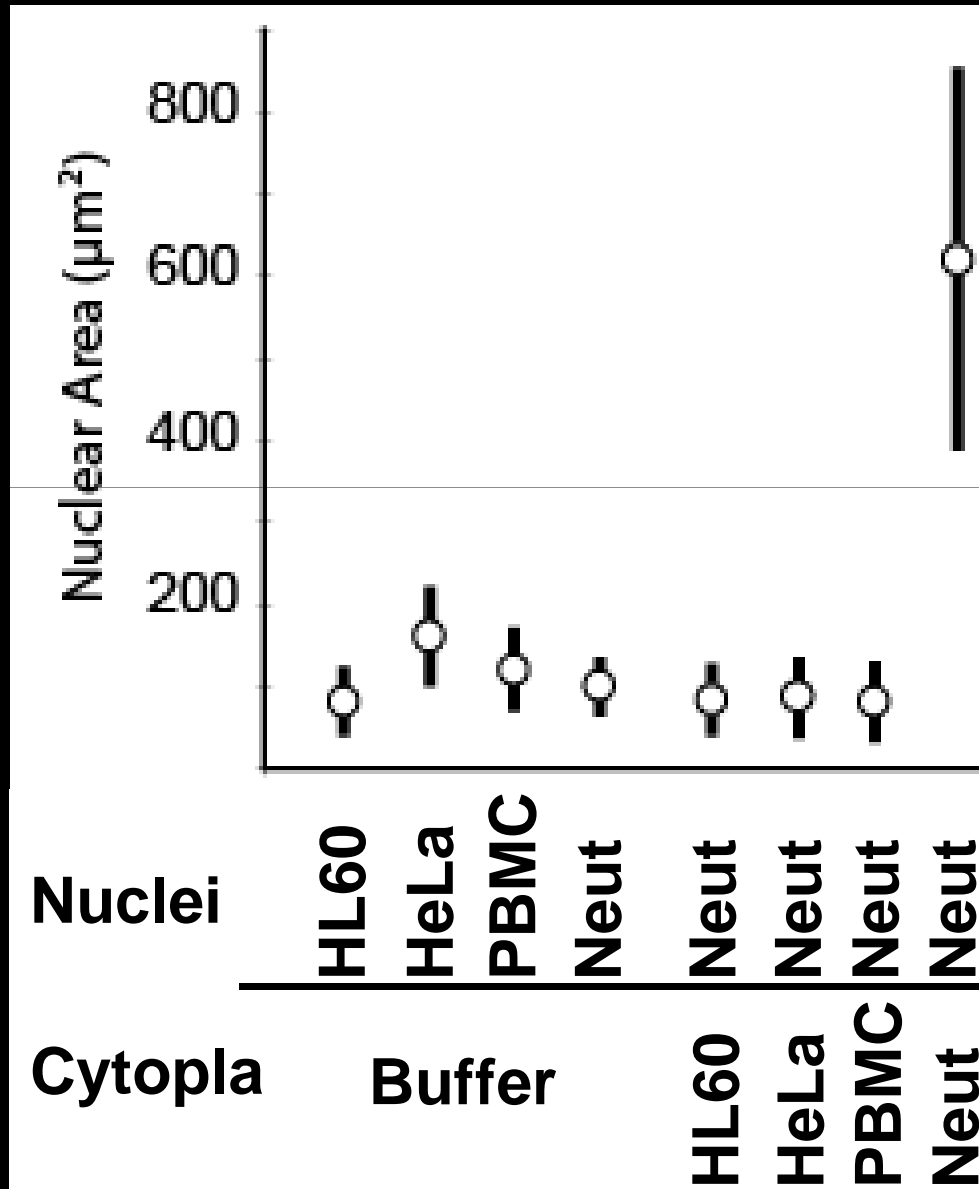
**cytoplasm**



Le facteur induisant la formation de NETs est spécifique aux neutrophiles

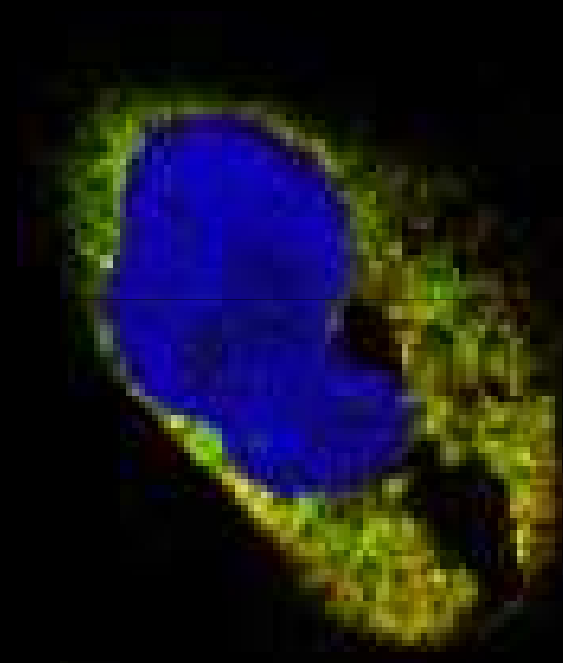


# Le facteur induisant la formation de NETs est spécifique aux neutrophiles

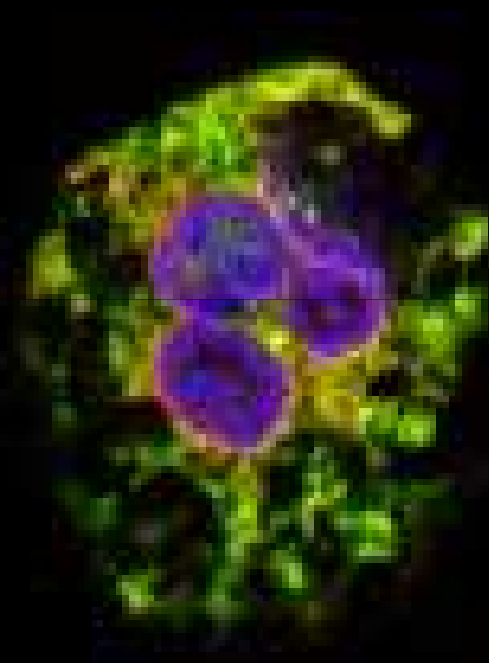


# L'élastase passe des granules au noyau

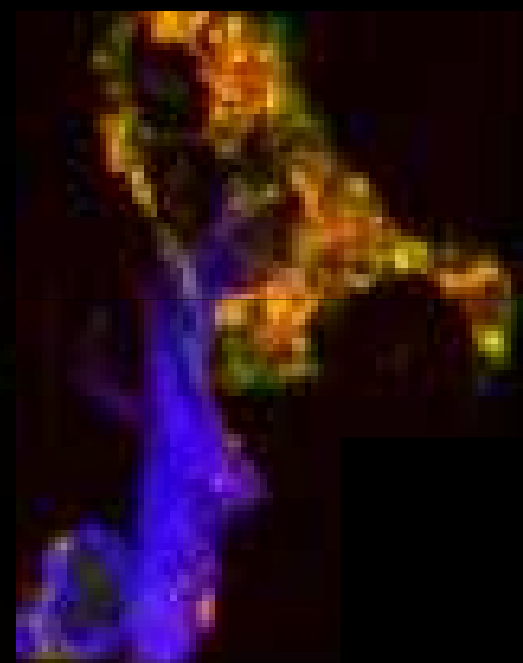
Naif



60 min

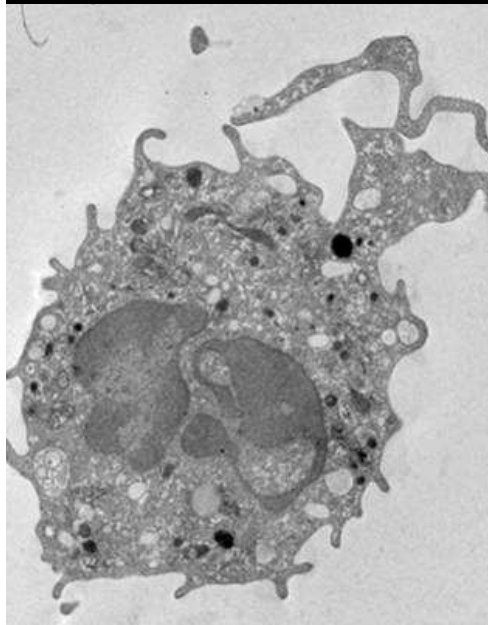
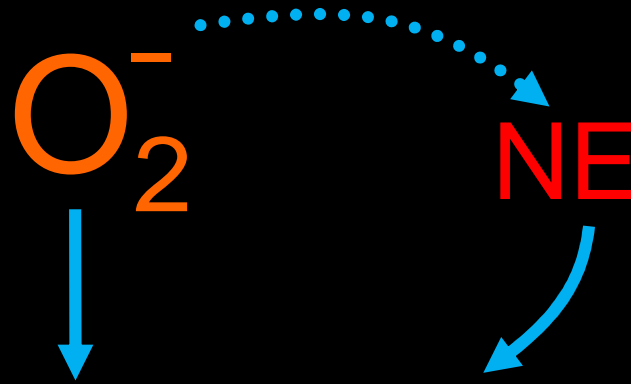


180 min

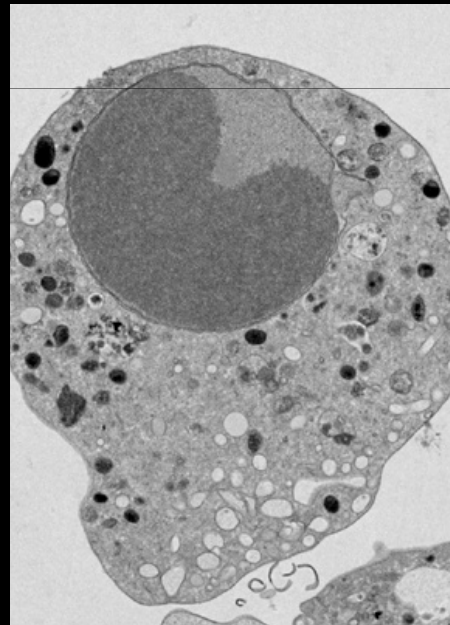


Proteinase 3 Neutrophil Elastase ADN

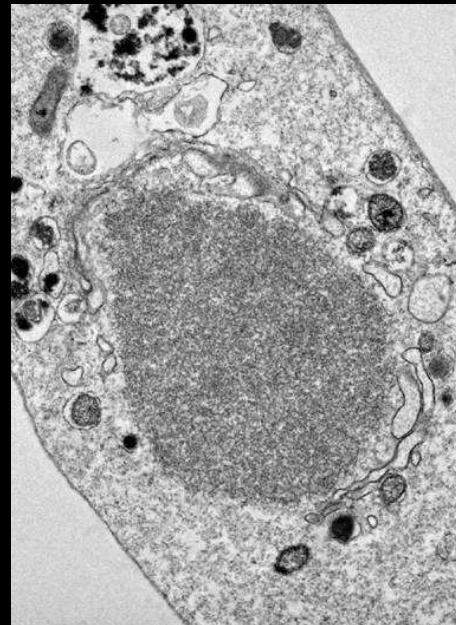
# Processus cellulaire de formation des NETs



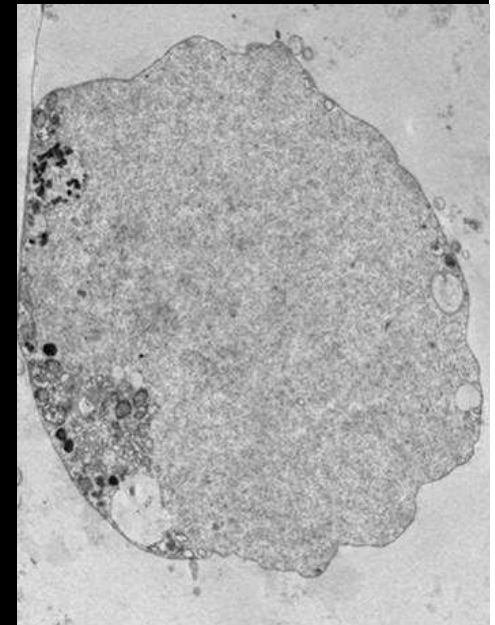
Naif



60 min



120 min



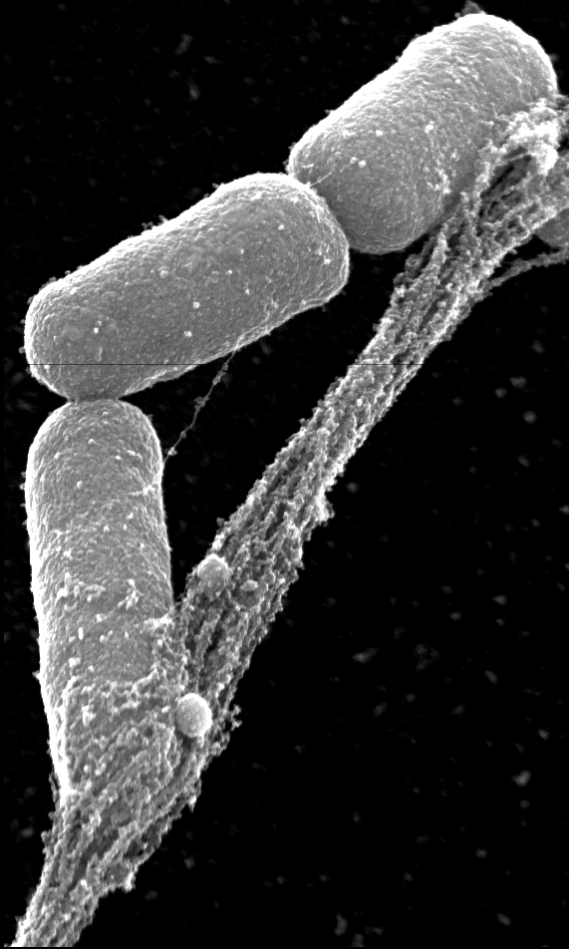
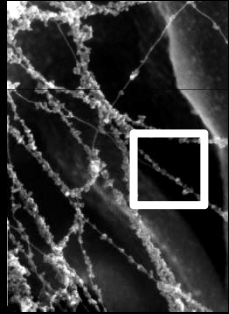
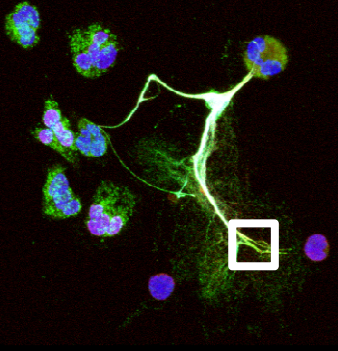
180 min

## Plan de la présentation

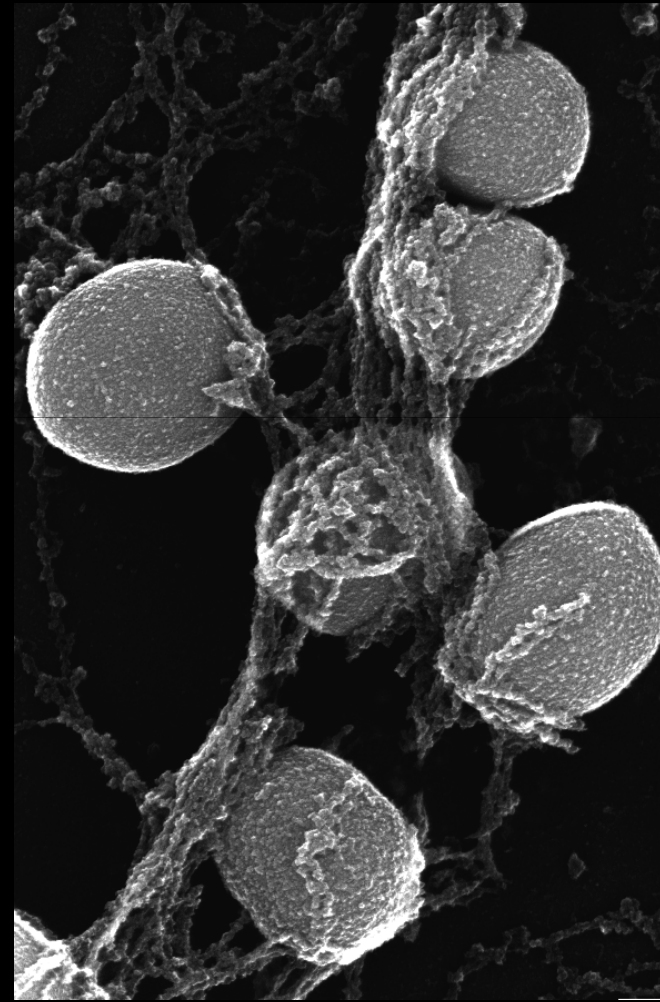
1. Que sont les NETs?
2. Comment les NETs sont-ils produits?
3. **Activité antimicrobienne des NETs.**
4. Les NETs sont-ils relevant dans l'immunité?
5. Le côté noir des NETs: l'autoimmunité



Les NETs lient, désarment et tuent les bactéries

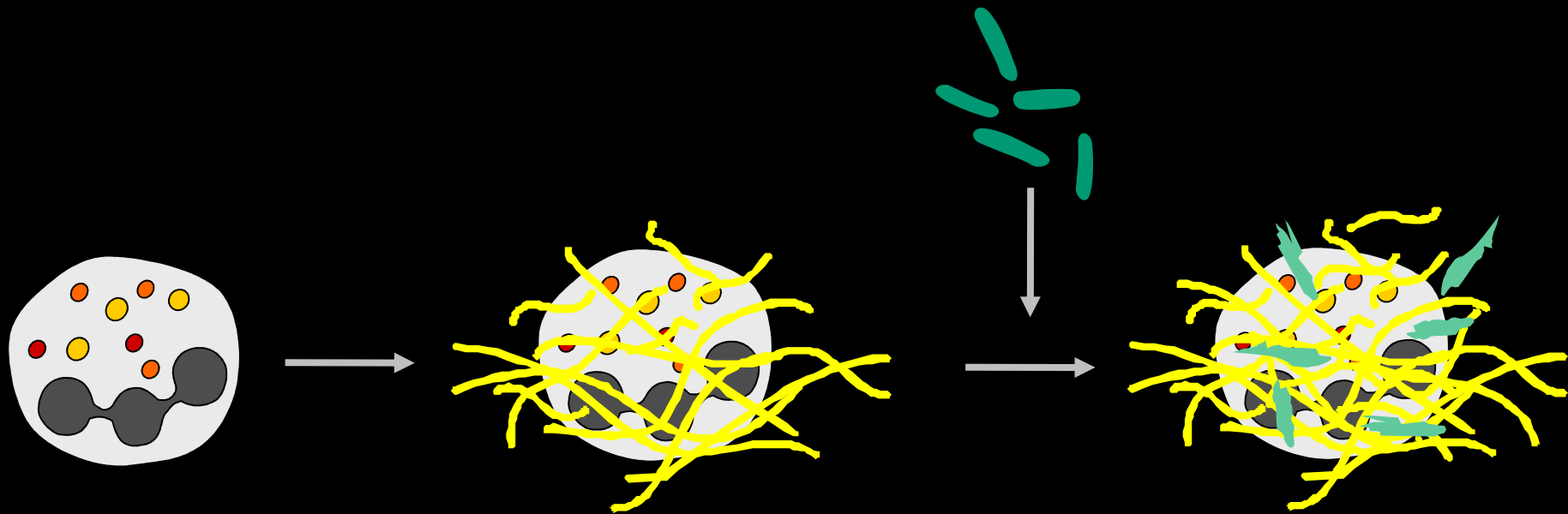


*Shigella*

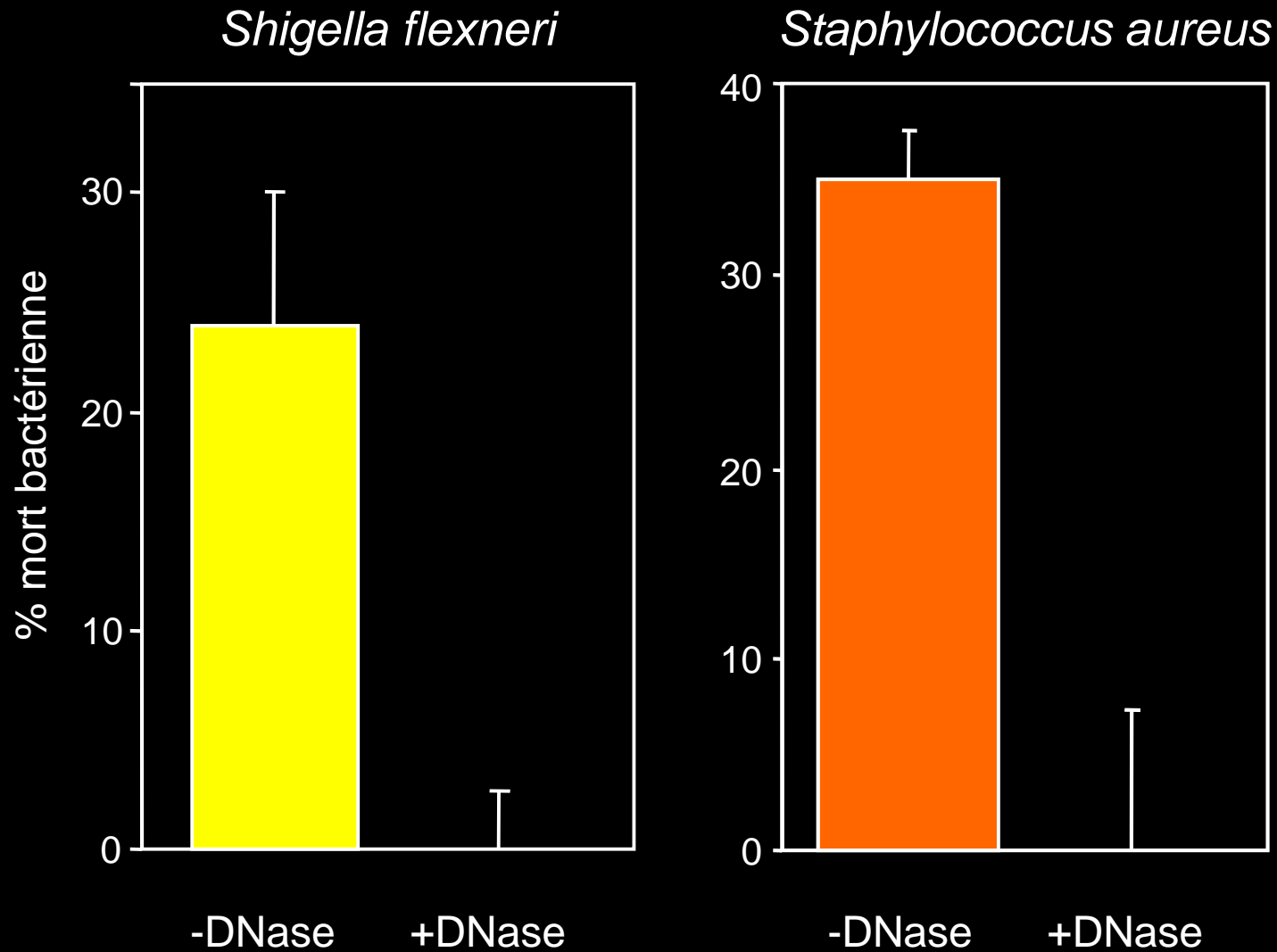


*Staphylococcus*

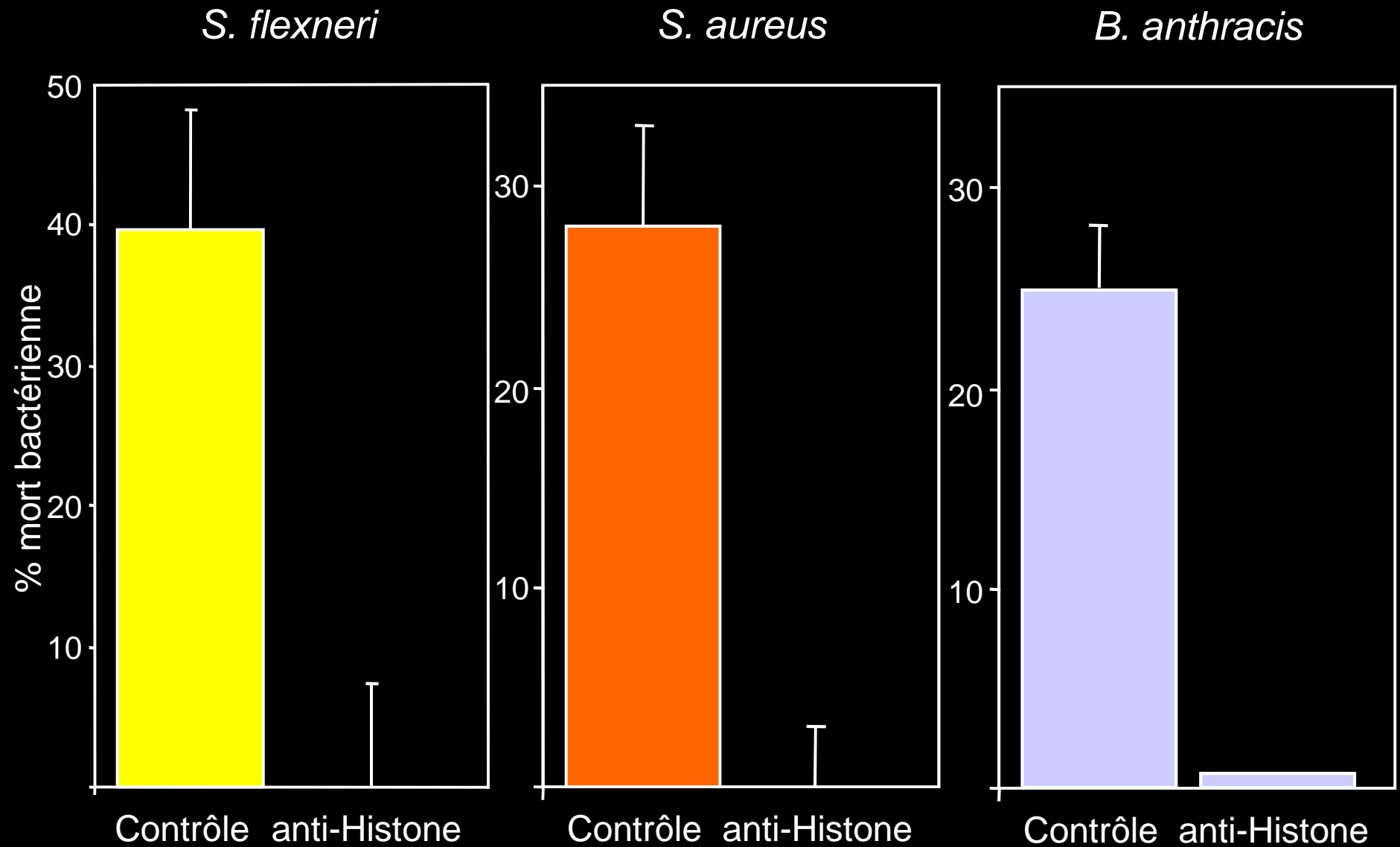
# Approche expérimentale : activité antimicrobienne des NETs



L'activité bactéricide extracellulaire est inhibée lorsque les NETs sont démentelés avec une DNase



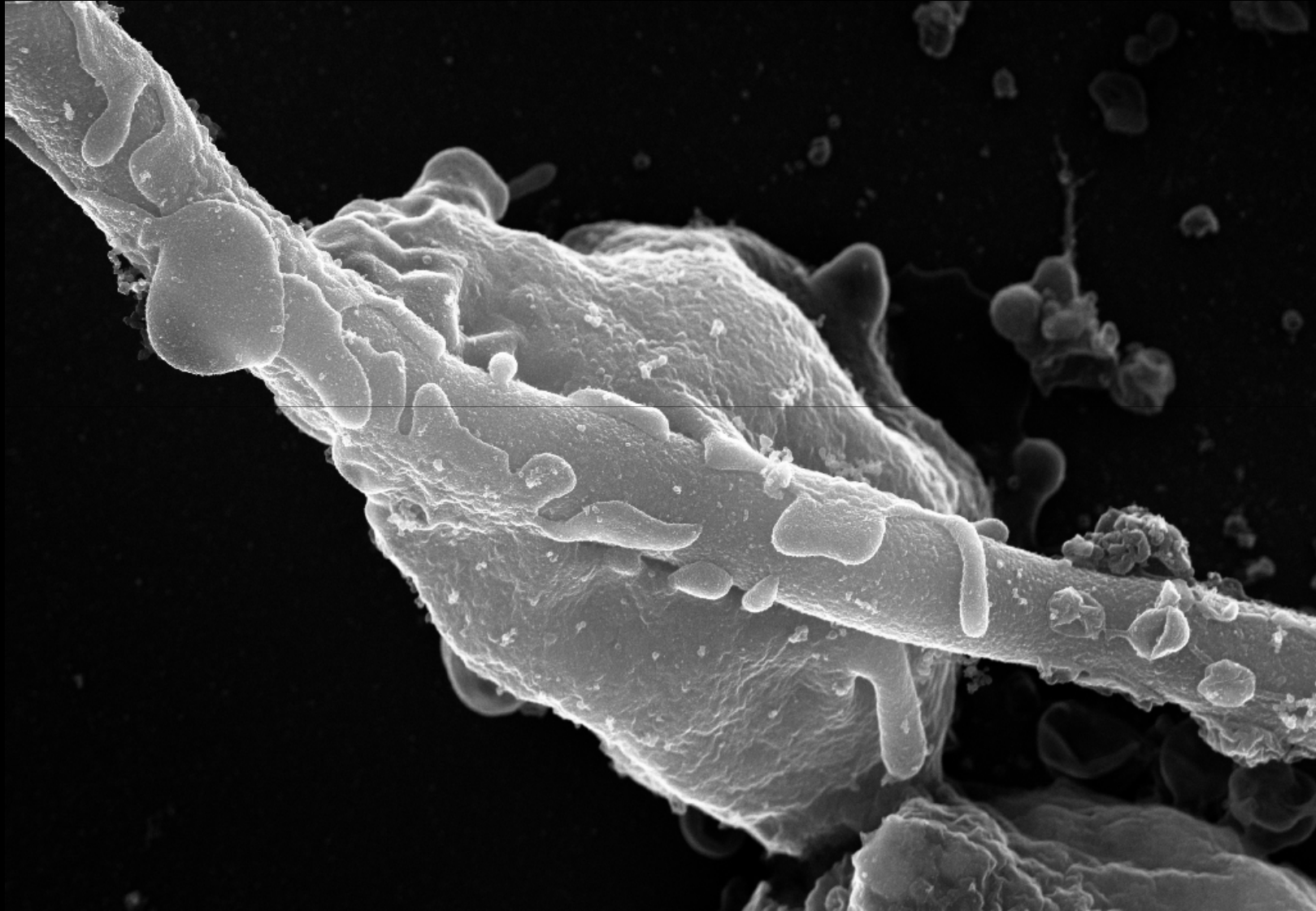
# Anti-H2A bloque l'activité bactéricide extracellulaire



## Plan de la présentation

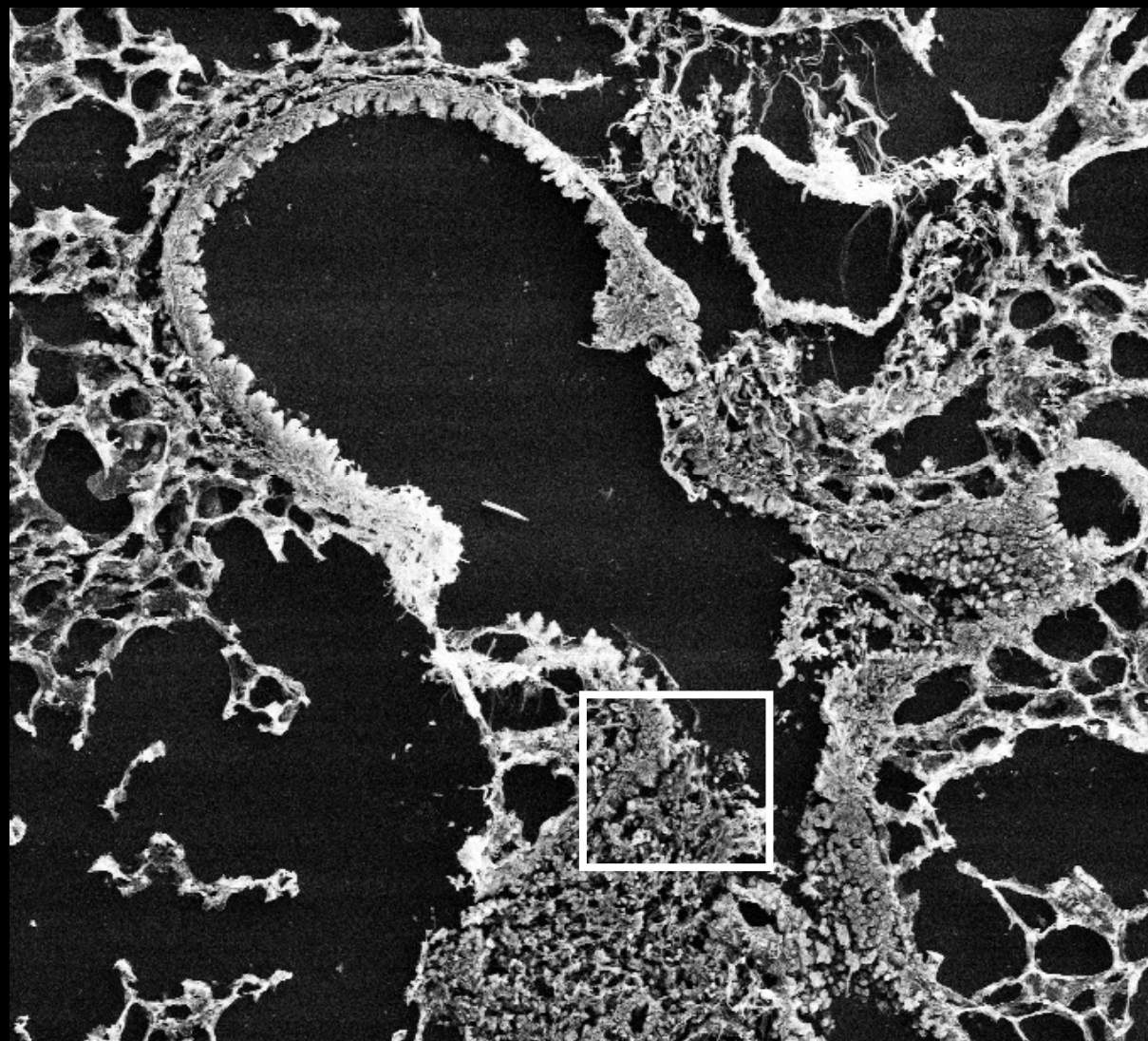
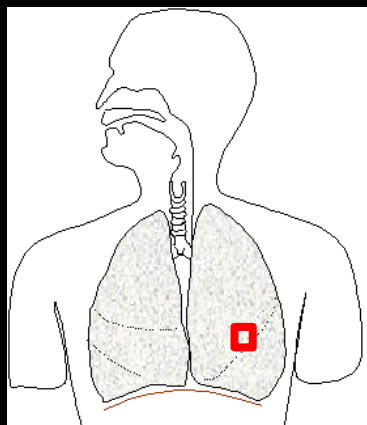
1. Que sont les NETs?
2. Comment les NETs sont-ils produits?
3. Activité antimicrobienne des NETs.
4. Les NETs sont-ils relevant dans l'immunité?
  - 4.1 NETs in vivo
  - 4.2 NETs ciblent des pathogènes
  - 4.3 Une étude de cas: thérapie génique pour les patients CGD.
5. Le côté noir des NETs: l'autoimmunité

Les neutrophiles ne peuvent pas phagocyter les champignons

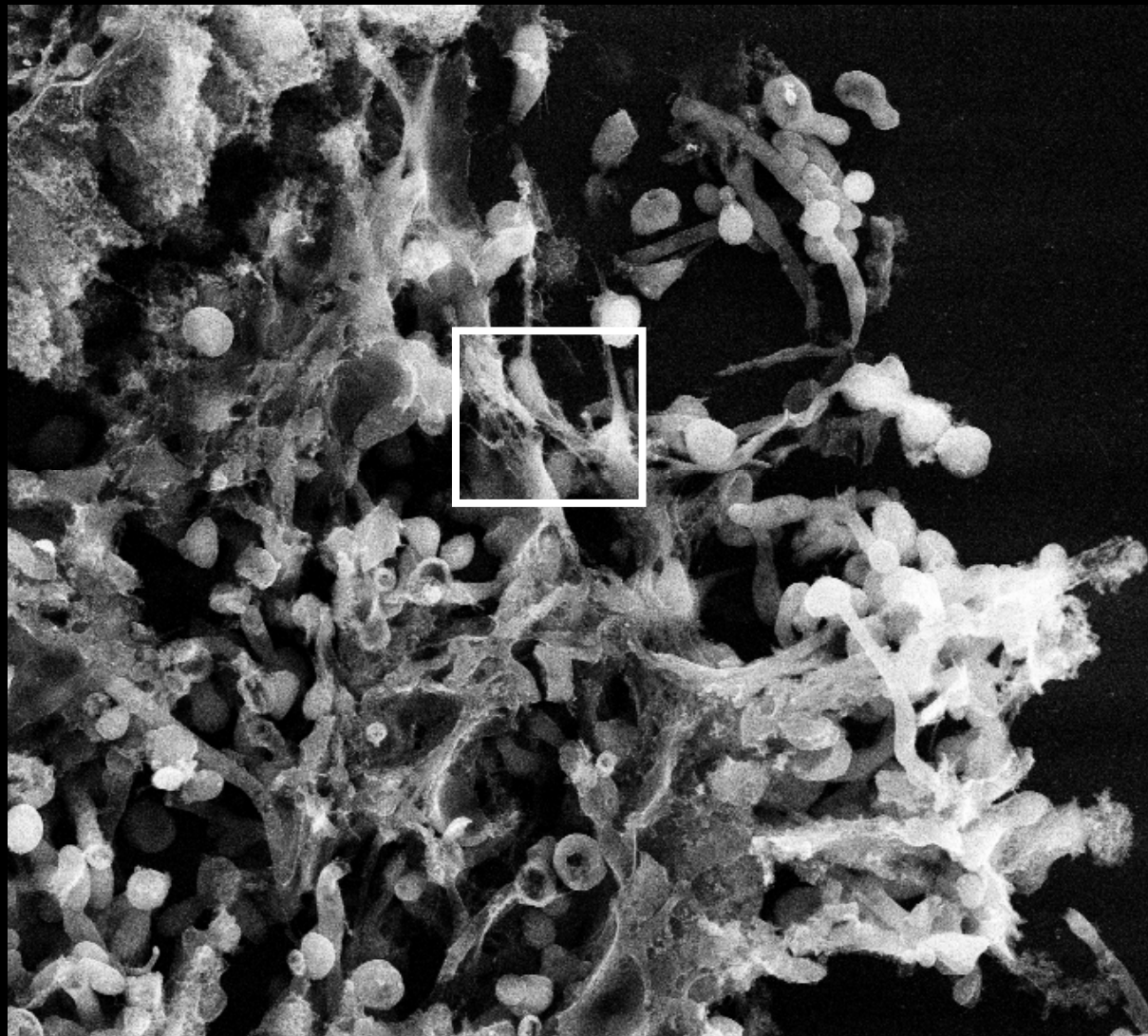




# Les NETs et *C. albicans* interagissent lors d'une candidose pulmonaire

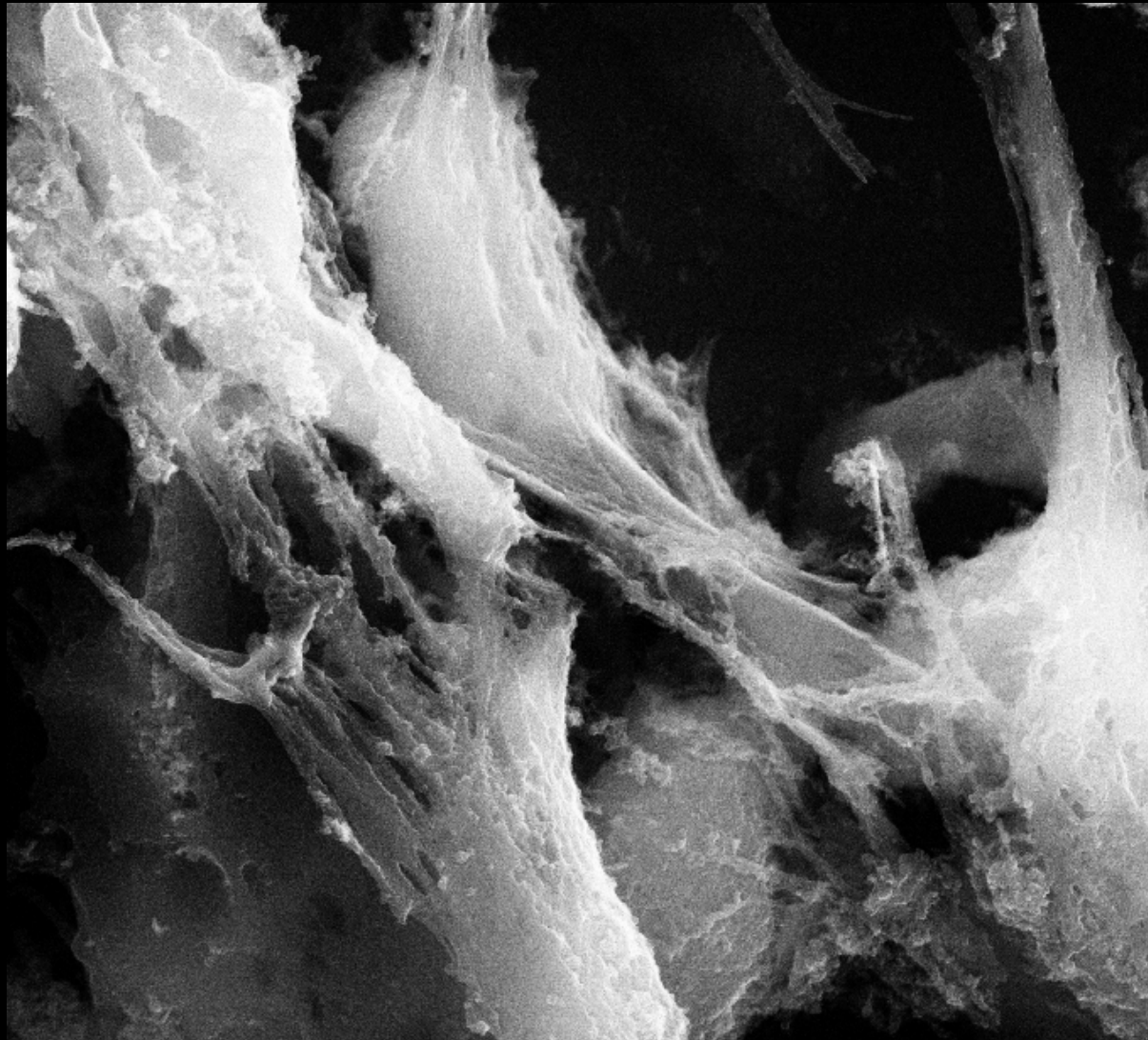


Les NETs et *C. albicans* interagissent lors d'une candidose pulmonaire

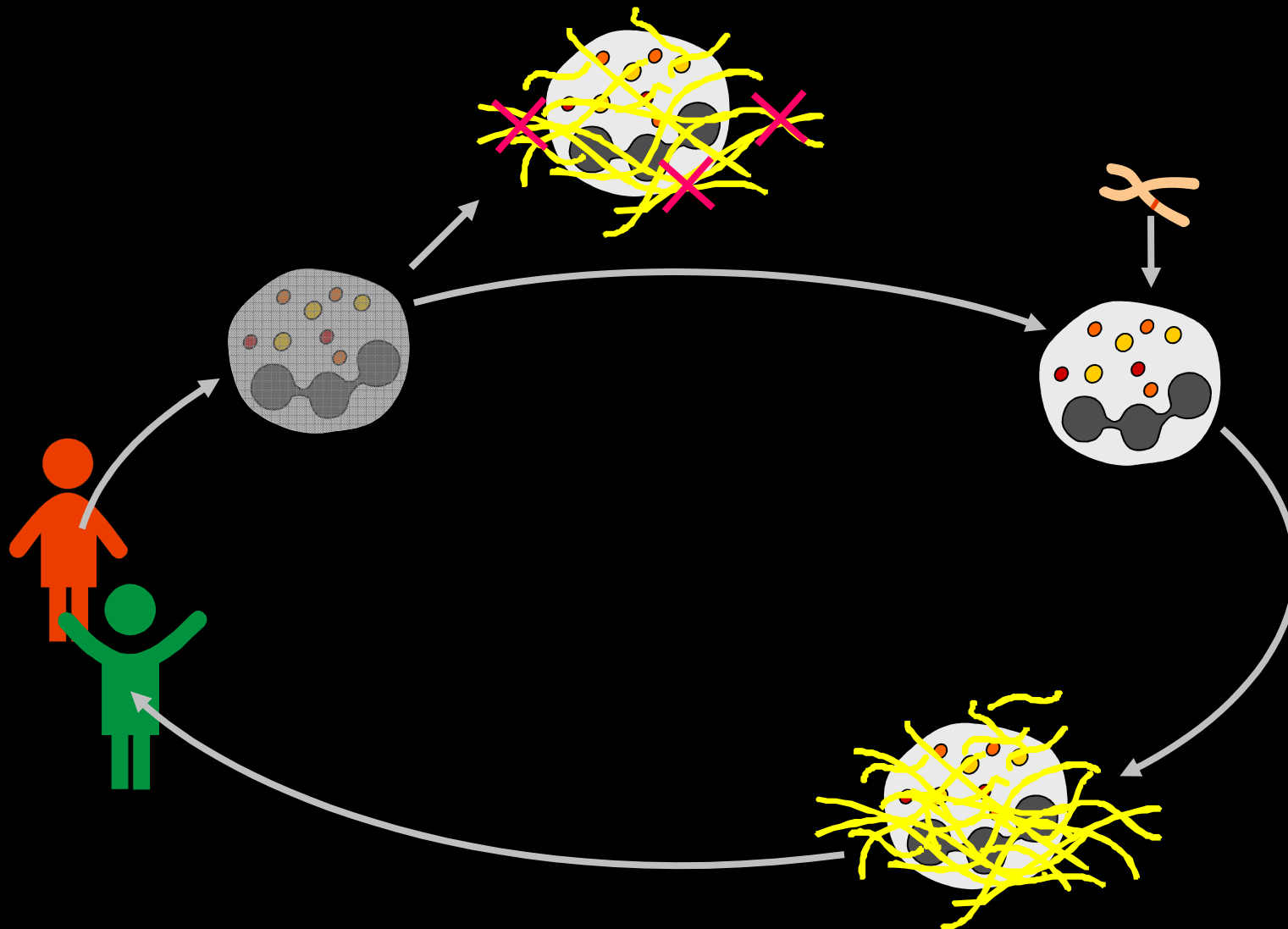




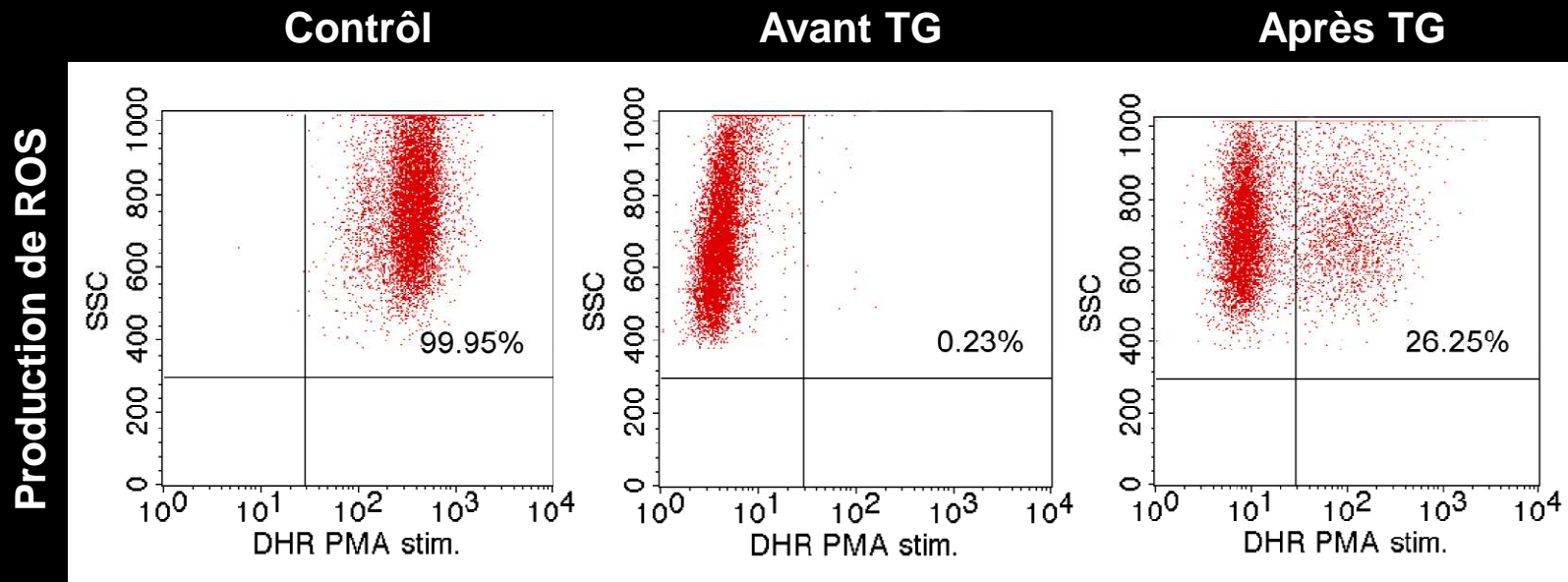
Les NETs et *C. albicans* interagissent lors d'une candidose pulmonaire



# Thérapie génique

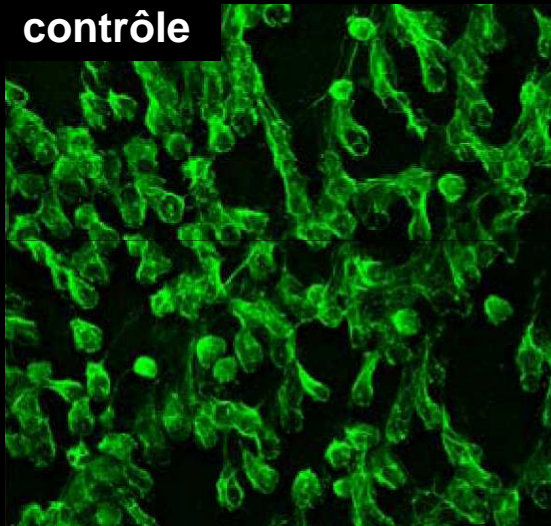


# La thérapie génique restaure la production de ROS chez les patients CGD

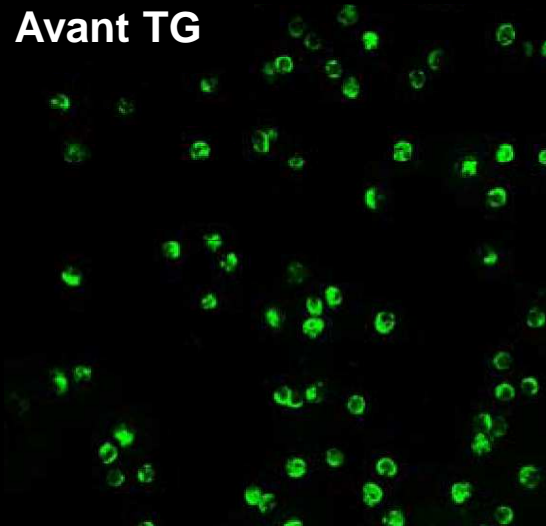


# La thérapie génique restaure la formation de NETs

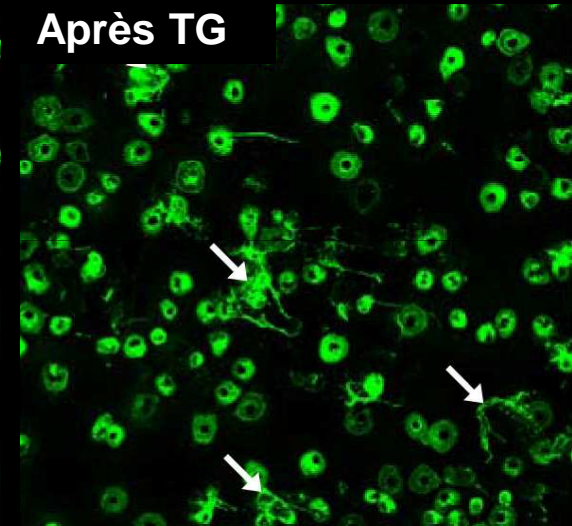
contrôle



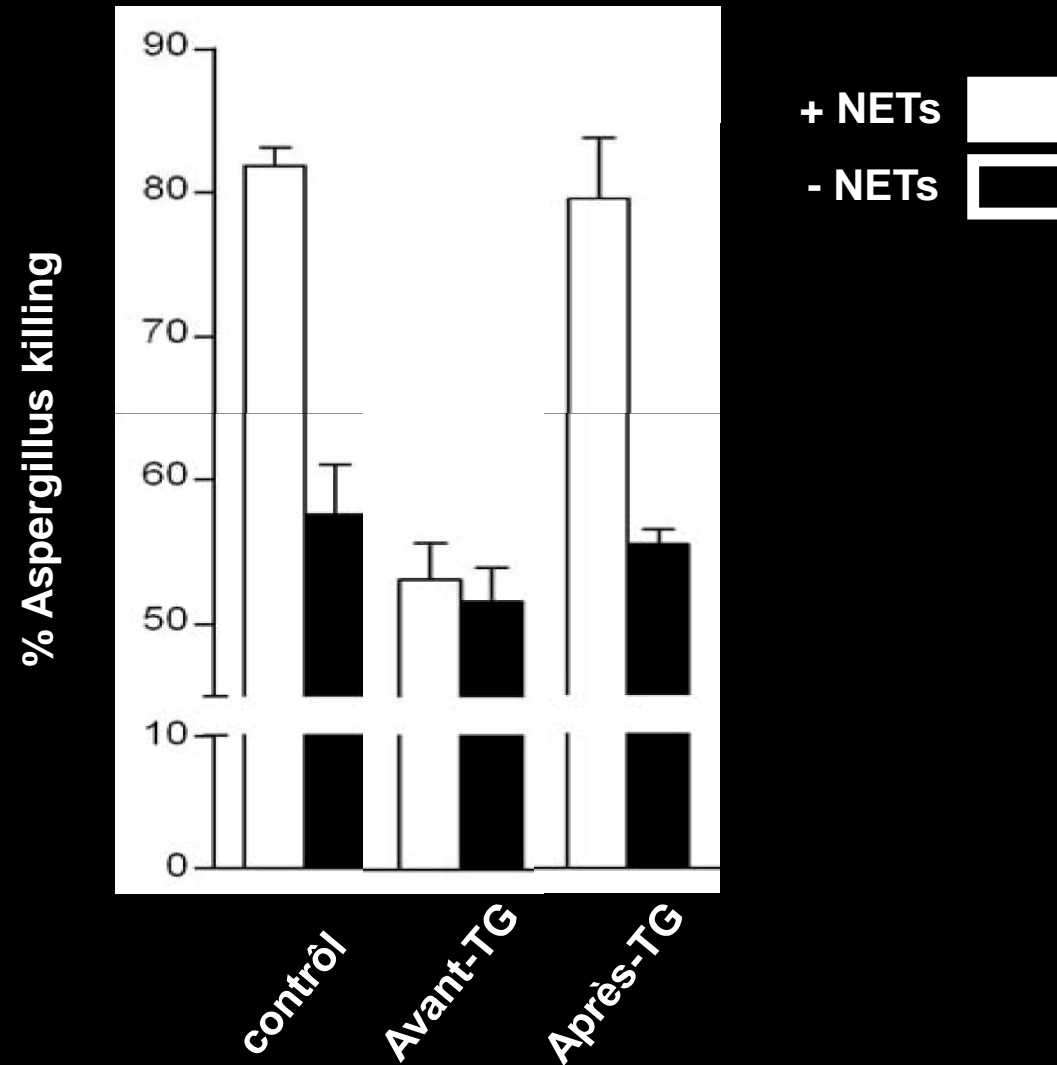
Avant TG



Après TG

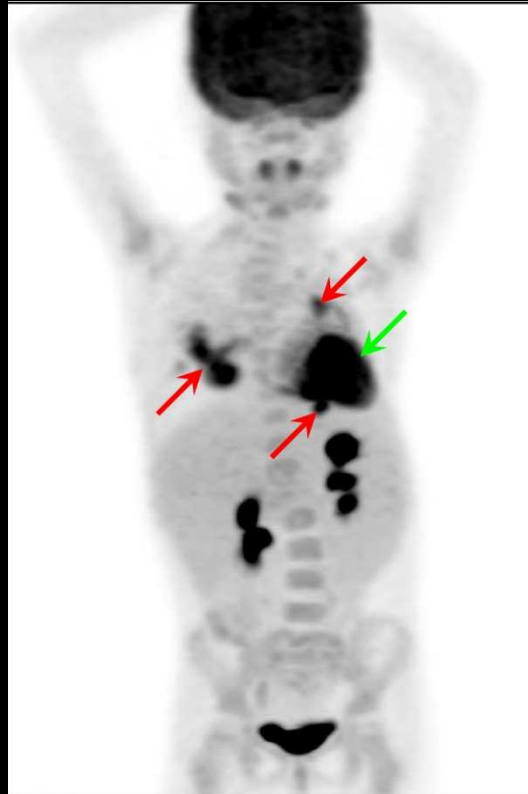


# La thérapie génique restaure la capacité de tuer *Aspergillus*



# La thérapie génique résoud l'infection à Aspergillus

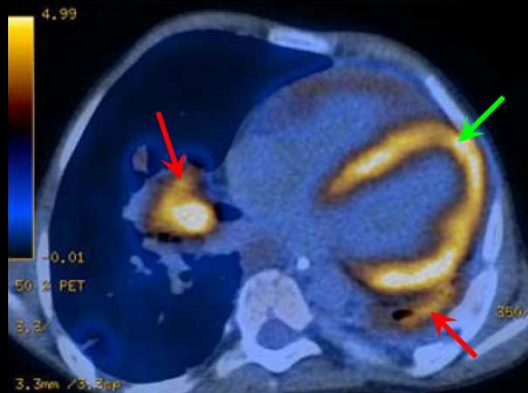
Avant GT



Après GT



Infection →  
Coeur →



## Plan de la présentation

1. Que sont les NETs?
2. Comment les NETs sont-ils produits?
3. Activité antimicrobienne des NETs.
4. Les NETs sont-ils relevant dans l'immunité?
5. Le côté noir des NETs: l'autoimmunité



# Lupus érythémateux systémique

Maladie autoimmune chronique

Femmes : hommes 9:1

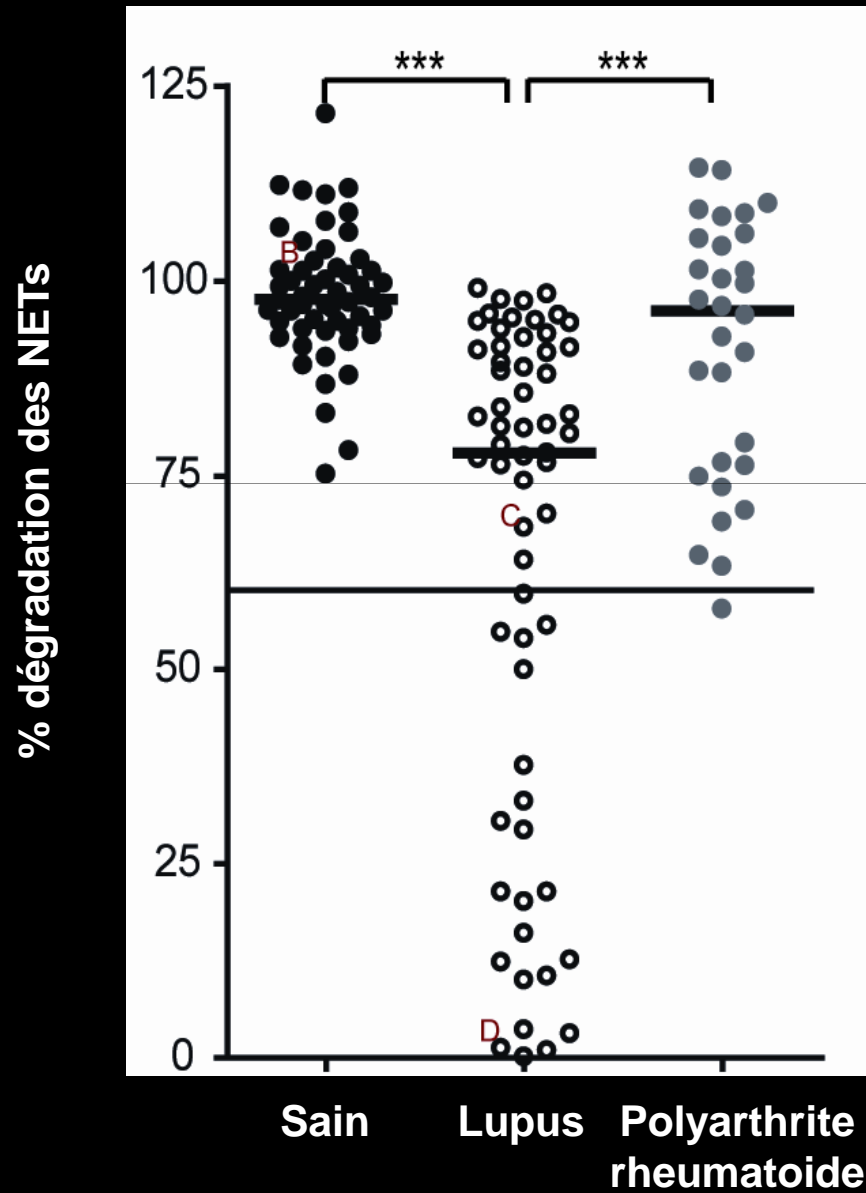
Autoanticorps contre l'ADN, les histones et souvent des composés des neutrophiles

Inflammation de plusieurs organes, les néphrites sont des complications fréquentes

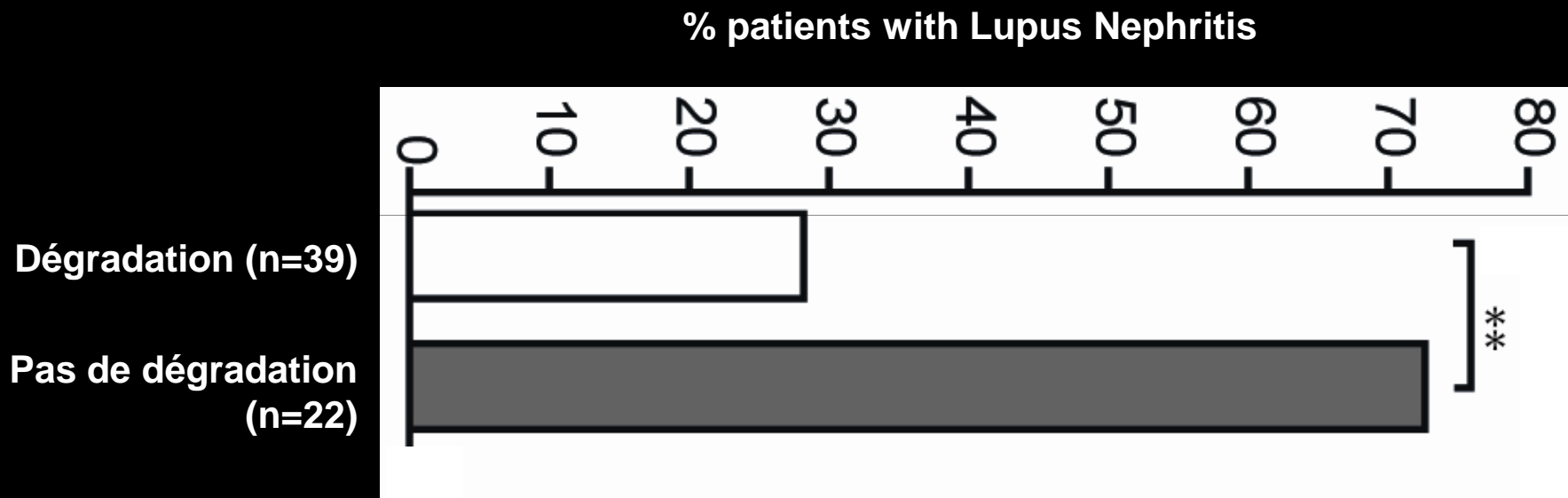
Des infections peuvent entraîner une poussée de la maladie et sont les causes majeures de la mortalité chez ces patients

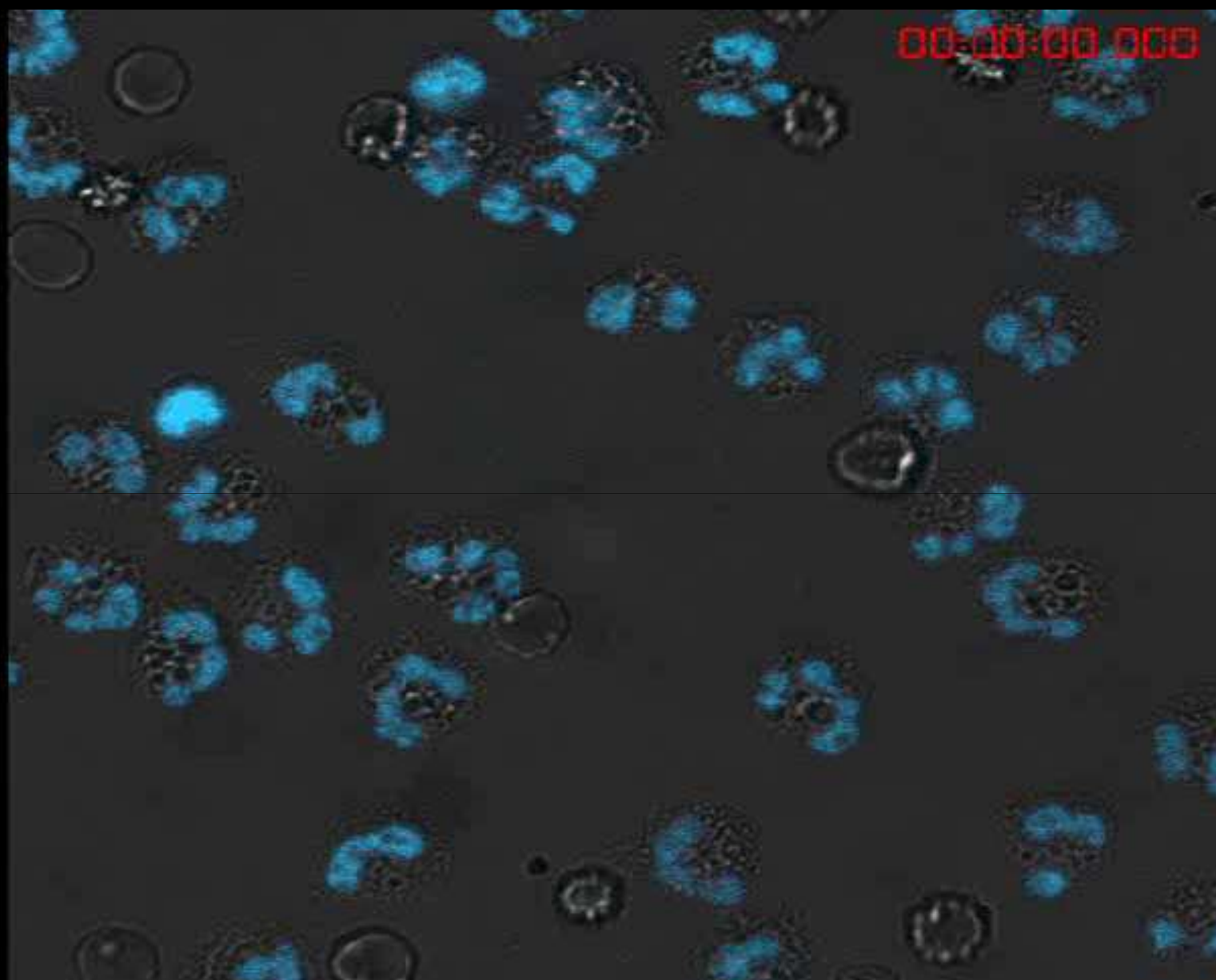
Des mutations dans la DNase1 ont été associées au lupus

# Un défaut de dégradation des NETs est associé au lupus



# Corrélation entre la persistance des NETs et l'occurrence de néphrite lupique





Charite, Berlin

**Ilka Schultze and Volker Wahn**

Kinderspital, Zürich

**Matteo Bianchi, Reinhard A. Seger and Janine Reichenbach**

University Hospital, Erlangen

**Barbara Fürnrohr, Kerstin Amann and Reinhard Voll**

Max Planck Institute for Infection Biology

Microscopy Core Facility

**Volker Brinkmann**

Department of Cellular Microbiology

**Abdul Hakkim, Constantin Urban, Tobias Fuchs**

**Venizelos Papayannopoulos, Kathy Metzler**