



Immunité innée et inflammasome : rôle des signaux de dangers endogènes

Nicolas Riteau

► To cite this version:

Nicolas Riteau. Immunité innée et inflammasome : rôle des signaux de dangers endogènes. Sciences agricoles. Université d'Orléans, 2011. Français. NNT : 2011ORLE2038 . tel-00684046

HAL Id: tel-00684046

<https://theses.hal.science/tel-00684046>

Submitted on 30 Mar 2012

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.

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Laboratoire d'Immunologie et Embryologie Moléculaires - IEM -
UMR6218 – CNRS - Université d'Orléans

THÈSE présentée par :
Nicolas RITEAU

soutenue le : **22 septembre 2011**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**
Discipline : Science du vivant / Immunologie

**Immunité Innée et Inflammasome : Rôle des
Signaux de Dangers Endogènes**

THÈSE dirigée par :

Isabelle COUILLIN Chargée de recherche, HDR, CNRS Orléans
Bernhard RYFFEL Directeur de recherche, HDR, CNRS Orléans

RAPPORTEURS :

François RASSENDREN Directeur de recherche, HDR, CNRS Montpellier
Fabio MARTINON Assistant professor, Université de Lausanne, Suisse

JURY

Sahil ADRIOUCH	Maître de conférences, Université de Rouen
Isabelle COUILLIN	Chargée de recherche, HDR, CNRS Orléans
François ERARD	Professeur de l'Université d'Orléans (Président du jury)
François HUAUX	Professeur de l'Université Catholique de Louvain, Belgique
Fabio MARTINON	Assistant professor, Université de Lausanne, Suisse
François RASSENDREN	Directeur de recherche, HDR, CNRS Montpellier
Bernhard RYFFEL	Directeur de recherche, HDR, CNRS Orléans

INTRODUCTION 11

Différentes approches de l'immunité, externe, interne, ciblée.....	11
A. L'immunité et le Vivant	11
1 Les origines de l'immunité	13
2 L'immunité chez les plantes	15
3 L'immunité chez les invertébrés.....	18
a L'immunité chez les nématodes	18
b L'immunité chez les insectes	19
4 L'immunité chez les vertébrés.....	20
a L'immunité chez les poissons.....	20
i Les poissons sans mâchoires	20
ii Les poissons à mâchoires	22
b L'immunité chez les mammifères.....	22
5 L'immunité, l'évolution ou l'effort du carré jaune	23
B. L'immunité et les Hommes	28
1 Résumé historique de l'immunologie jusqu'au XX ^{ème} siècle.....	28
2 Pasteur et Koch (1880-1890) « Immunologie microbiologique »	33
3 Immunité cellulaire contre immunité humorale.....	34
a Metchnikoff (« cellulariste »).....	34
b Von Behring et Kitasato (« humoraliste »).....	35
4 Les théories de la formation des anticorps : instruction contre sélection.....	36
a Ehrlich et théorie de la sélection (1897-1900).....	36
b Pauling et théorie instructionniste (1940)	37
5 Les modèles de l'immunité des années 50 à nos jours	37
a Les 30 glorieuses du modèle SNS (self-nonself)	37
i Sélection clonale selon Burnet (1956)	37
ii Actualisations du modèle SNS.....	39
b Du « Dirty little secret » au modèle INS (infectious nonself)	43
c Des pommes à la grammaire.....	45
d De la critique du SNS à la théorie du danger	46
i Transplantation, tumeurs et auto-immunité.....	46
ii Les bases de la théorie du danger	47
6 Nouvelles du front ; innate immunity : quo vadis.....	49
C. Nalp3, découverte et parallélisme. Désordres inflammatoires, apoptosome, inflammasome	50
1 Préambule.....	50
2 Découvertes des gènes de pathologies auto-inflammatoires	51
3 Les « death domains »	53
a Quelques mots sur l'apoptose	53
b Découverte du death domain CARD	53
c Découverte de NOD1	54
i Par son domaine CARD.....	54
ii Par son domaine d'oligomérisation.....	54
4 Découverte du death domain PYRIN	55
5 Découverte des NALPs	56
6 Premiers pas vers la découverte de l'inflammasome.....	57
7 De l'apoptosome à l'inflammasome	58
8 La découverte de l'inflammasome NALP3.....	59
9 La famille des Nod-like Receptors (NLRs).....	60
10 Les inflammasomes	61
D. Purines et signalisation	64
1 Les purines	64
a Purine et ATP, pour La vie	64
b Libération d'ATP	65
c Modes d'excrétion.....	66
i Excrétion vésiculaire.....	66
ii Présence de transporteur	66
iii Intervention de connexines/pannexines	67
d Situations d'excrétion	69

i	Libération constitutive	69
ii	Libération stimulée.....	69
e	ATP et conversion.....	70
i	Famille des ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTDPase)	70
ii	La famille Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP)	71
iii	La famille ecto-5'-nucleotidase	71
iv	Alkaline phosphatases (AP)	72
v	Formes solubles.....	73
vi	Inactivation de l'adénosine et autres nucléosides par des ectoenzymes	73
vii	Régénération de l'ATP en extracellulaire.....	74
viii	Contrôle de la dégradation/synthèse par les ectoenzymes	75
f	Cas d'autres nucléotides/nucléosides	76
2	Les récepteurs.....	76
a	Diversité et signalisation.....	76
i	Les récepteurs P1.....	77
ii	Les récepteurs P2X.....	78
iii	Les récepteurs P2Y	80
b	Focus sur le système immunitaire	81
i	"I act" signals, signalisation autocrine	81
ii	La libération d'ATP par une cellule en active une autre.....	84
iii	Distinction chimiotactisme / chimiocinétique : cas de l'ATP	87
	La Pièce Jouée : unité de lieu, d'action et de temps	88
A.	Unité de Lieu : Architecture Pulmonaire et fibrose	88
1	Architecture pulmonaire.....	88
a	Anatomique et physiologique.....	88
b	Cellulaire.....	89
i	Non myéloïdes.....	89
ii	Myéloïdes innées.....	90
2	La fibrose pulmonaire idiopathique (IPF).....	91
a	Description.....	91
b	Etat des causes	91
c	Symptômes.....	92
d	Traitements et pronostic.....	92
B.	Unité de Temps :	93
1	La phase inflammatoire aiguë.....	93
2	La phase inflammatoire chronique et la fibrose	94
C.	Unité d'action :	95
1	La Bléomycine et modèle murin de l'IPF	95
a	Nature, découverte et utilisation	95
b	Bléomycine et fibrose	96
ii	Mode d'action	97
iii	Atouts.....	97
iv	Critiques.....	98
v	Autres modèles	98
2	Les particules	99
a	Macroscopiques.....	99
b	Nanoscopiques.....	99

RESULTATS	101
I. Article 1 : Rôle de l'acide urique et de sa forme cristalline MSU dans l'inflammation Nlrp3-dépendante et la fibrose pulmonaire	101
II. Article 2 : Rôle de l'ATP extracellulaire dans l'inflammation et la fibrose pulmonaire.....	114
III. Article 3 : Etablissement d'un lien entre signalisation purinerque autocrine et réponse aux particules	126
DISCUSSION	159
A. Signaux de dangers et Pathogenèse	159
1 Signaux de dangers et poumon	159
a Acide urique	159
b ATP	161
c Autres signaux de dangers	163
2 Signaux de dangers et autres maladies.....	167
3 Distinction apoptose/nécrose, une simple histoire de sémantique ?	167
4 Et l'autophagie dans les réponses inflammatoires ?	172
B. Mécanismes d'activation de l'inflammasome Nlrp3.....	174
1 Présentation des scénarii en hypothèse majeure	174
2 Hypothèse « Entrée de PAMPs »	174
3 Hypothèse « Déstabilisation lysosomale »	177
4 Hypothèse « ROS »	180
5 Hypothèse « Potassium et Gonflement »	185
6 QUID	188
7 Hypothèse de travail du laboratoire	191
C. Quelques mots sur la régulation de l'activité de l'inflammasome.....	192
CONCLUSION	195
I. Sur mon travail de thèse	195
II. Sur l'immunologie.....	195
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	197
ANNEXE	205
Annexe 1 : Article 4 : Nanoparticules et Inflammation pulmonaire.....	205
Annexe 2 : Article 5 : IL-17 et fibrose pulmonaire	215

RERMERCIEMENTS

Je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'examiner et de critiquer mon travail de thèse. La diversité de leurs domaines de compétences saura enrichir les thèmes abordés dans ce manuscrit.

Un grand merci au Dr Valérie Quesniaux, directrice du l'unité, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire. Je garderai une image très positive de cette expérience professionnelle et humaine. Elle va de paire avec l'image que je conserverai de Bernhard Ryffel, co-directeur de ma thèse et personnage haut en couleur, pour son dynamisme débordant et son insatiable appétit scientifique.

Je remercie ma directrice de thèse, Isabelle Couillin, avec qui j'estime avoir eu la chance de réaliser une thèse très enrichissante et profitable pour la suite. Isabelle s'est battue en mon absence pour que j'obtienne une bourse de thèse et a su ensuite remplir pleinement son rôle d'encadrante.

J'adresse toute ma reconnaissance au professeur François Erard. L'estime que je lui porte dépasse le cadre professionnel, elle s'étend à l'homme, débonnaire et humaniste convaincu. Nos conversations ont toujours été d'une grande richesse pour moi, m'amenant parfois face à mes propres contradictions.

Quand vient l'heure des remerciements aux autres membres du laboratoire, permanents ou stagiaires, p'tites mains ou séniors, jeunes recrues ou dinosaures, français ou d'ailleurs, qui apportent un brassage et une richesse indispensable, la révérence collective est de mise.

Je remercie tous les membres de notre équipe, autoproclamée Padateam, pour des raisons aussi légères que la rigueur par ailleurs nécessaire à la discipline scientifique. Cette équipe à forte dominance féminine, comme le reste du laboratoire, apporte le luxe d'y être souvent chouchouté.

Je n'oublie pas toutes les personnes qui, comme moi, sont venues quelques temps à l'IEM puis sont parties vers d'autres expériences. La demie-vie d'une population de thésards est très courte et le transfert de compétence une nécessité.

Enfin, une attention particulière à ceux qui, d'affinités crochues, ont supporté ma propension à la provocation douce et au décalage. De ma mémoire des faits éphémères j'en conserverai une image intarissable.

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

- Figure 1** | Représentation des familles de PRRs et de leurs principaux ligands
- Figure 2** | Immunité croisée invertébrés et mammifères
- Figure 3** | Le syndrome du carré jaune
- Figure 4** | Systèmes immunitaires chez les deutérostomes
- Figure 5** | Couverture et sélection du « Discours très ample de la peste »
- Figure 6a** | Premier modèle de distinction soi/non soi
- Figure 6b** | Modèle « *helper* » à deux signaux
- Figure 6c** | Modèle « co-stimulation » par les APCs
- Figure 6d** | Modèle « Infectious nonself »
- Figure 6e** | Modèle de « danger »
- Figure 7** | Immunité innée : quel devenir?
- Figure 8** | Mutations dans les NLRs et associations avec des désordres auto-inflammatoires
- Figure 9** | Représentation théorique de l'inflammasome Nlrp3 et liste non exhaustive de ses activateurs
- Figure 10** | Représentation des mécanismes permettant la libération d'ATP d'une cellule vers l'extérieur
- Figure 11** | Représentation classique des jonctions communicantes
- Figure 12** | Représentation du canal formé par la pannexine
- Figure 13** | Conversion de l'ATP par des enzymes membranaires
- Figure 14** | Représentation des récepteurs purinergiques et de leurs ligands associés
- Figure 15** | Représentation de la signalisation purinergique autocrine
- Figure 16** | Représentation de la signalisation purinergique autocrine après détection d'un facteur chimio-attractant (C5a) par un macrophage
- Figure 17** | Intervention de la signalisation purinergique dans la synapse immunologique
- Figure 18** | ATP pro-inflammatoire
- Figure 19** | Représentation de la voie « *find me* »
- Figure 20** | Représentation de la différence entre chimiotactisme et chimiocinétique
- Figure 21** | Représentation des types cellulaires dans les différentes parties du poumon
- Figure 22** | Représentation d'une alvéole
- Figure 23** | Représentation de la balance MM9/TIMP et pathologies associées
- Figure 24** | Dualité de recrutement en réponse à l'apoptose
- Figure 25** | Activation canonique de l'inflammasome Nlrp3
- Figure 26** | Modèle d'activation de Nlrp3 par « entrée de PAMPs »
- Figure 27** | Modèle d'activation de Nlrp3 par « déstabilisation des lysosomes »
- Figure 28** | Modèle d'activation de Nlrp3 « production de ROS »
- Figure 29** | Modèle d'activation de Nlrp3 « efflux de potassium »
- Figure 30** | Hypothèse de recherche développée par le laboratoire IEM
- Tableau 1a** | Caractéristiques principales des récepteurs à l'Adénosine
- Tableau 1b** | Caractéristiques principales des récepteurs canaux P2X
- Tableau 1c** | Caractéristiques principales des récepteurs métabotropiques P2Y
- Tableau 2** | Approches expérimentales pour l'induction de fibrose pulmonaire
- Tableau 3** | Signaux de dangers endogènes et pathologies associées
- Tableau 4** | Résumé non exhaustif des principaux activateurs de Nlrp3 étudiés et les voies associées

ABBREVIATIONS ET ACRONYMES

α -SMA	α -Smooth Muscle Actin	kDa	kilo Dalton
AAP	Acétaminophène	LPS	Lipopolysaccharide
ADA	Adenosine deaminase	LRR	Leucine Rich Repeat
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	LTB4	Leucotriène B4
ADNmt	ADN mitochondriale	MAM	Mitochondria-associated ER membranes
ADP	Adénosine Di-Phosphate	MAPK	Mitogen-activated protein kinase
AIM2	Absent In Melanoma-2	MCP-	Macrophage Chemoattractant Protein
ALI	Acute Lung Injury	MDP	Muramyl dipeptide
AMP	Adénosine Mono-Phosphate	MEC	Matrice extracellulaire
AP	Alkaline phosphatase	MIP-	Macrophage Inflammatory Protein
APC	Antigen Presenting Cell	MIP2	Major intrinsic protein-2
ARN	Acide RiboNucléique	MMP	Matrix MetalloProteinase
ASC	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Card domain	MSU	Monosodium Urate
Atg	Autophagy-related genes	MWS	Muckle-Wells Syndrom
ATP	Adénosine Tri-Phosphate	MyD88	Myeloid Differentiation factor 88
BCR	B cell receptor	NACHT	Nucleotide-binding and oligomérisation
BAL(F)	Bronchoalveolar lavage (Fluid)	NALP	NACHT-, LRR- and PYD- containing proteins
BLM	Bléomycine	NBS	Nucleotide-Binding Site
CIITA	MHC Class II Transcription Activator	NBS-LRR	Nucléotide Binding Site-Leucine Rich Repeat
CAM	Cellular Adhesion Molecule	NF κ B	Nuclear Factor κ B
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain	Nlrc4	(IPAF)
CIAS1	Cold-Induced Autoinflammatory Syndrome 1	NK	Natural Killer cell
CINCA	Chronic Infantile Neurological Cutaneous and Articular syndrome	NKT	Natural Killer T cell
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité	NLR	Nod-Like Receptor
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease	NLRP3	NOD-like Receptor Protein 3
CPPD	Calcium pyrophosphate dihydrate	NO	Nitric Oxide
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyte	NOD	Nucleotide-binding and Oligomerization Domain
Cx	Connexine	NOMID	Neonatal Onset Multisystemic Inflammatory Disease
CXCL	Chimiokine avec motif : Cys-Acide aminé X-Cys	PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
CXCR	Récepteur des CXCL	Panx	pannexines
DAMP	Danger Associated Molecular Pattern	PGN	Peptidoglycan
DC	Dendritic Cell	PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
DD	Death Domain	PMN	PolyMorphonucéaire Neutrophile
DED	Death Effector Domain	PRR	Pattern Recognition Receptor
EAE	Encéphalomyélite auto-immune expérimentale	PYD	Pyrin Domain
ECM	ExtraCellular Matrix	RAG	Recombination-Activating Gene
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition	RAGE	Receptor for Advanced Glycation End-products
E-NPP	ecto-nucleotide pyrophosphatases	RIG-I	Retinoic acid-Inducible Gene-1
E-NTPDases	ecto-nucleosidetriphosphate diphosphohydrolases	RLR	RIG-I Like Receptor
ER	Endoplasmic Reticulum	RNAi	ARN interférent
FCAS	Familial cold autoinflammatory syndrome	ROR	Retinoic Orphan nuclear Receptor
FCU	Familial cold urticaria	ROS	Reactive Oxygen Species
FMF	Familial Mediterranean Fever	SLO	Streptolysine O
fMLP	N-formyl-Met-Leu-Phe	SNS	Self / Non Self
FPR1	Formyl-peptide receptor 1	T2DM	Type 2 Diabetes Mellitus
ICAM	Intercellular cell adhesion molecule	T3SS	Type III Secretion System
INS	Infectious Non Self	TCR	T Cell Receptor
IPF	Fibrose Pulmonaire Idiopathique	TGF- β	Transforming Growth Factor- β
HDM	Hous Dust Mite	Th	lymphocytes T helper
HMGB1	High Mobility Group Box 1	THP1	Human acute monocytic leukemia cell line
HSP	Heat Shock Protein	TIMP	Tissue Inhibitor of MetalloProteinase
ICE	IL-1 Converting Enzyme	TIR	Toll/IL-1 Receptor
IFN	Interféron	TIRAP	TIR-domain-containing Adaptor Protein
Ig	Immunoglobuline	TLR	Toll-Like Receptor
IL-	Interleukine	TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
IP	Intrapéritonéal	TNFR	Tumour Necrosis Factor Receptor
IPAF	Ice Protease Activating Factor	TRAM	TRIF-related Adaptor Molecule
IPF	Idiopathic Pulmonary Fibrosis	TRIF	TIR-domain-containing adaptor protein inducing
IRAK	IL-1R-associated Kinase	TRX	Thioredoxine
IV	Intraveineux	TXNIP	Thioredoxin-interacting protein
KC	Keratinocyte-derived Chemokine	VDAC	Voltage-dependent anion conductance
		VLR	Variable Lymphocyte Receptors

« Les faits ne cessent pas d'exister parce qu'on les ignore »
Aldous Huxley

Préambule

Loin de devoir s'en prémunir outre mesure la sphère scientifique actuelle utilise comme beaucoup d'autres l'anglais. Historiquement dans le système universitaire anglo-saxon le doctorant aspire au titre de PhD, contraction de *philosophiæ doctor*. Le terme philosophie est utilisé dans son sens antérieur au XIX^{ème} et désigne l'étude générale des connaissances. Je ne suis pas, au même titre que mes camarades doctorants en science, en mesure de prétendre posséder un quelconque savoir suffisant en philosophie pour mériter une reconnaissance si élogieuse. Toutefois l'idée d'entremêler l'ombre de la philosophie dans le spectre de l'immunologie me ravit. A cela des raisons personnelles, telle que la recherche perpétuelle de mise en perspective, un regard critique sur la Science qui a perdue beaucoup de ses lettres de noblesses parce que trop spécialisée et derrière tout cela, cause ou conséquence, un certain mal être, un sentiment de pas être à ma place, de perdre mon temps et celui des autres, d'être en désaccord avec mes promesses d'antan.

Pour ne pas verser dans le dramatisme pastiche, le lien avec la philosophie et notre travail n'est peut être pas réduit aux seules ironiques lettres de PhD. Fort heureusement la philosophie ne se réduit nullement à la seule lecture des classiques. La philosophie est avant tout une démarche personnelle plus ou moins consciente qui peut se résumer en « *la quête du salut* », c'est à dire où chacun aborde les grandes questions métaphysiques non par la théorie profonde mais par ses références et interrogations propres. En ce sens, que je ne trouve pas exagéré, nous sommes tous philosophes. Aussi dans mon travail quotidien, largement dépendant de présences amicales, j'ai essayé d'allier la nécessité de rigueurs expérimentales avec les largesses de la discipline philosophique.

Aussi vrai que nous pouvons nous déplacer en avion sans savoir piloter, utiliser un micro-onde sans comprendre son fonctionnement ou encore clamer $E=MC^2$, la science et son application technique permet de l'utiliser à tout instant sans jamais justifier un degré suffisant de compréhension. En serait-il autrement pour un étudiant en thèse scientifique ? A quel moment lui demandons-nous une appréciation et un discernement personnel ? Quelle qualité de raisonnement exigeons-nous réellement d'un aspirant Docteur ? Qui n'a jamais éprouvé de difficultés à exposer sa recherche à tout non-initié, membre de sa famille, amis ou enfants ? Je partage l'idée selon laquelle nous pouvons estimer posséder un bon degré de compréhension d'un sujet quelconque une fois en mesure de l'expliquer clairement à un enfant de primaire. Il me serait bien difficile d'exposer la « cross-présentation », « l'exclusion allélique » ou la « différenciation Th17 versus Th9 ». Tout confiant de mon savoir, telle une armure de fer protégeant un corps friable, je pourrais néanmoins plus aisément distiller au sein de ma communauté, à grands renforts de vocables non abscons à nous seuls, une version solennelle de la « théorie du danger ».

La connaissance que nous sommes en mesure de relater ne vient elle pas d'un savoir largement commun, disponible et impersonnel ? Le manuscrit d'une thèse en science biologique en est

bien trop souvent un exemple flagrant, souffrant du manque d'originalité. A cela plusieurs raisons qu'il me plaît à rapporter avant d'entreprendre ce travail de rédaction :

- l'habitude du style, formaté depuis l'enfance à suivre des instructions
- le manque de temps qui pousse au quantitatif au détriment du qualitatif
- l'utilité restreinte, où le seul intéressé en détail au manuscrit n'est autre que son rédacteur
- la prise de risque, qui nécessite un travail plus fourni et documenté que la droite ligne

N'échappant à aucune de ses réalités, je suis comme tous mes camarades dans le même état de fait.

Introduction

Différentes approches de l'immunité, externe, interne, ciblée

« Nothing in biology makes sense except in the light of evolution »

Theodosius Dobzhansky

Biologiste et généticien russe. Son œuvre majeure fut sa participation à la mise en place de la théorie synthétique de l'évolution.

A. L'immunité et le Vivant

N'en déplaise aux créationnistes, une accumulation de données scientifiques atteste de la validité de la théorie de l'évolution. Elle fut initiée au grand public par Darwin en 1859, qui compila le fruit de ses recherches et de son voyage à bord du Beagle. Des enquêtes régulières montrent que plus de 50% des américains rejettent la théorie de l'évolution (1). Pourtant aujourd'hui les données géologiques, l'étude des fossiles, l'embryologie, l'anatomie comparée ou plus récemment la révolution de la biologie moléculaire tentent toutes à prouver l'évolution.

L'immunité ne dispose pas d'un traitement de faveur qui la dispenserait de dépendre des contraintes de pressions sélectives. Sa très grande complexité apparente prend toute sa dimension mis en lumière par Stephen J. Gould, pour qui « *les choses ne se passent pas telles qu'elles auraient du se passer mais telles qu'elles ont pu se passer* ».

Une découverte majeure en biologie de l'évolution de ces dernières décennies est que de nombreuses voies de signalisation chez l'homme impliquées dans le développement, l'homéostasie et la pathogénèse étaient déjà évoluées au moment du dernier ancêtre commun entre l'homme et les nématodes, il y a environ 600 millions (2). Les systèmes immunitaires des mammifères seraient composés d'éléments de ceux qui ont évolué au sein de leurs prédécesseurs invertébrés (3). Les pathogènes ont aussi évolué afin de se prémunir des mécanismes antimicrobiens des métazoaires (4). Une compilation de données pointe que la réponse immunitaire innée des mammifères possède des origines anciennes, présentant des points communs à celles des arthropodes et des nématodes (4-8). De nombreux acteurs de l'immunité innée interviennent mais ne seront pas détaillés ici. Citons des paramètres humoraux tels que des inhibiteurs de croissance, des enzymes lytiques, les voies de signalisations du complément, les agglutinines (opsonines, lectines), des peptides antimicrobiens et évidemment les membres des familles de cytokines et de chimiokines. Sans oublier les barrières physiques de la peau et des muqueuses, le surfactant pulmonaire, le pH acide de l'estomac et du vagin.

La reconnaissance par l'immunité innée est basée sur une stratégie de défense qui implique une gamme de récepteurs non spécifiques appelés **Pattern-Recognition Receptors (PRRs)**. Ils ciblent des molécules ayant peu évoluées présentes chez les micro-organismes. Ces molécules sont appelées

Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) et font références aux molécules organiques qui induisent une réponse immunitaire innée. Les PAMPs sont conservées dans l'évolution par la fonction critique qu'elles exercent pour la survie. Ils permettent à l'hôte de s'identifier par rapport au pathogène. Ils incluent le **LipoPolySaccharide (LPS)**, les **PeptidoGlycaN (PGN)**, les flagellines bactériennes et les mammanes des levures.

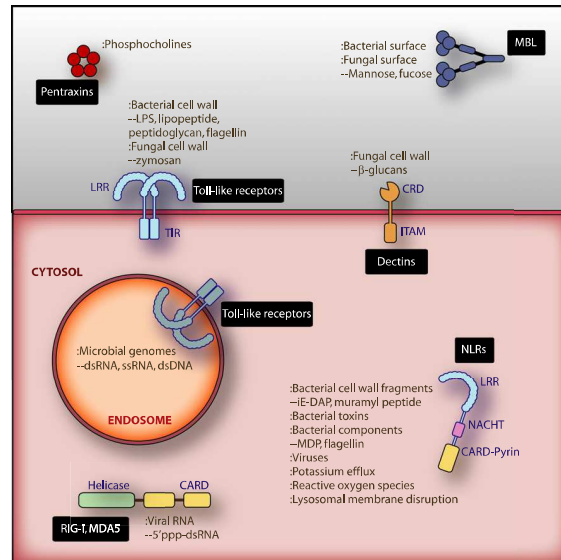


Figure 1 | Pathogen Recognition Receptors
Représentation des familles de PRRs et de leurs principaux ligands (9)

Ces composés sont cruciaux et le terme *Pathogen*-AMP est abusif puisque les micro-organismes non pathogènes, bien plus nombreux, les synthétisent également. Pour éviter toute confusion, le terme **Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs)**, relativement peu utilisé, apparaît plus adéquat. Cette distinction *a priori* triviale dévoile des réflexions importantes. Un humain adulte possède environ 10^{14} cellules eucaryotes contre 10^{15} cellules procaryotes représentant 10% de son poids à sec (10). Si l'immunité innée s'insurgeait contre chacune de ses entités elle serait en état de siège permanent. Conservant le lexique militaire, notre système immunitaire inné serait en état de marche forcée perpétuelle, exposé à tout instant à la surchauffe, incapable d'édifier un champ de bataille approprié lorsque qu'un « ennemi » se présente. La critique principale à cette thèse est que la majorité de ces micro-organismes se situent sur la peau et dans la lumière de l'intestin, compartiments appartenant *stricto sensu* au milieu extérieur, sans objet pour notre immunité. La vision de l'immunité comme dualité hôte/étranger ou soi/non-soi, bien que historiquement très importante et servant à dresser un portrait caricatural, est dépassée.

Nous avons besoin des micro-organismes certainement beaucoup plus qu'ils n'ont besoin de nous. A toutes les échelles de la vie des métazoaires, les bactéries sont indispensables. La synthèse des protéines nécessite de l'azote. La fixation biologique de l'azote atmosphérique est catalysée par un complexe enzymatique mis en évidence uniquement chez des procaryotes (Eubactéries et Archaea). Les légumineuses dont fait partie la luzerne réalisent une symbiose avec des bactéries fixatrice d'azote dans leur système racinaire pour en assimiler. Remontant la chaîne alimentaire, les vaches broutent de

la luzerne mais ne peuvent pas digérer la cellulose, principal constituant des plantes et ressource glucidique fondamentale. Le ruminant fait appel à des bactéries contenues dans ses estomacs. Le steak de notre repas du midi est entièrement dépendent de la bonne marche des bactéries, dont d'autres permettront la synthèse des vitamines K, B8 et B12. Sans parler de l'histoire de la mitochondrie, de sa terreur du passé et de son bénéfice actuel dans la production d'énergie aérobie. L'immunité à la lourde responsabilité de lutter pour ménager la chèvre et le chou, de protéger et coopérer avec cette poule aux œufs d'or.

L'immunité utilise sans conteste d'autres moyens que ceux classiquement étudiés. Il me semble que la nature repoussante que nous procure une odeur de putréfaction fait indéniablement partie à part entière de notre immunité. Qu'en est-il des animaux qui font leur toilette ou de ceux qui avant de s'allonger marchent en décrivant un cercle pour inspecter leur couchette ? Ainsi, volontairement provocateur, pourquoi ne pas voir la première ligne de défense comme une vaste gamme de comportements réflexes et de situations d'évitement qui tendraient à signifier que le meilleur moyen de surmonter une menace est de ne pas avoir à l'affronter.

Les vertébrés sont le seul embranchement à posséder une immunité adaptative. Elle est basée sur une réponse spécialisée et amplifiée face à un pathogène particulier par des cellules appelées lymphocytes. La réponse immunitaire innée est utile à la production de molécules de costimulation, de cytokines et de chimiokines nécessaires à l'activation des lymphocytes (11). En retour les lymphocytes influent sur la réponse immunitaire innée, le tout pour une orchestration optimale de la réponse immunitaire mais aussi de sa résolution. L'étude des mécanismes de fonctionnement de l'immunité adaptative est fondamentale et bien que peu présente dans ce manuscrit, son importance n'en reste pas moins capitale chez l'homme. S'il fallait s'en convaincre, prenons simplement l'exemple de la vaccination et des progrès vertigineux réalisés sur la baisse de la mortalité humaine.

Le fait qu'environ 90% des espèces animales ne possèdent pas d'immunité adaptative (12) prouve le succès de leurs stratégies de défense et ne rend qu'encore plus intéressante l'étude de l'immunité innée.

1 *Les origines de l'immunité*

La question de l'origine de l'immunité dépasse très largement le champ d'investigation de cette thèse et ma compétence. Pour être honnête et scientifiquement recevable, elle exigerait une accumulation prodigieuse de connaissances et un incroyable pouvoir de synthèse. Selon certains spécialistes dont jaillit une forme de préscience inversée, les premières formes de protection ou d'immunité seraient aussi âgées que l'apparition des premiers eucaryotes. Elles seraient apparues sous

la forme de peptides à activité toxique et de molécules capables de désactiver l'expression de gènes, pour contrecarrer les micro-organismes et virus invasifs (12). Ces outils se retrouvent actuellement chez tous les eucaryotes, des plus simples au plus évolués (12). Les protistes, les champignons et les autres eucaryotes unicellulaires ont également développé des mécanismes de défense qui leur confèrent une résistance face aux micro-organismes pathogènes (11). A l'heure où les métazoaires demanderaient encore des centaines de millions d'années avant d'apparaître, existait sans doute une capacité immunologique non négligeable puisqu'elle a permis à leurs ancêtres de traverser les âges.

Dans son livre, Landman (13), plus tard repris par Nagy (14), explore l'idée que les premières amibes réalisaient leur auto-défense, ou immunité, par un moyen simple, efficace et toujours d'actualité : l'ingestion de l'adversaire. Leur intense recherche d'un scénario plausible les a conduits à l'hypothèse, difficilement jugeable, selon laquelle l'ingestion de matériel biologique étranger conduirait à la production de débris non digérables, tels que de petits peptides, qui ne pourraient être pris en charge par l'hôte. Ces déchets qui ne pouvaient être ni collectés ni acheminés dans des vésicules pour excrétion devaient ainsi flotter dans le cytoplasme. La nécessité de s'en débarrasser pour survivre et ne pas les accumuler au fur et à mesure des générations nécessitait qu'un système capable de les reconnaître et de les transporter activement à l'extérieur de la cellule soit sélectionné par l'évolution. Des molécules CMH-like anciennes auraient ainsi fonctionnées comme des « *pelles à ordures* » (« *garbage shovel* »). Zoltan Nagy est très clair quand il écrit « *to my opinion, the defence-related antigen presenting function is just a secondary use of the waste disposal system* » (14). Aussi incroyable que cela puisse paraître, la fonction première du complexe majeur d'histocompatibilité, au milliard d'année du lymphocyte, ne serait pas immunologique mais physiologique. Pour éviter toute confusion, rappelons que l'expression du CMH telle que nous le connaissons actuellement n'est présente que chez les vertébrés à mâchoires. Aucune identification claire d'homologue de CMH I ou II n'a été trouvée à l'extérieur des gnathostomes, qui représentent l'infra-embranchement à partir duquel la présentation antigénique est apparue (15).

Quelque soit l'inatteignable réalité de son origine, on peut cependant affirmer avec platitude que l'immunité a sans aucun doute trouvé les moyens de contrer l'adversité à laquelle elle eut à lutter. La meilleure preuve de cela, irréfutable au sens « *cogito, ergo sum* » de Descartes est la contestation possible de toutes les spéculations sur l'immunité, pas son succès.

J'ai choisi de décrire brièvement l'immunité au sein de plusieurs familles du vivant afin d'illustrer les tendances maîtresses de l'évolution et son aboutissement actuel, en *continuum* perpétuel. Les plantes tout d'abord, bien souvent délaissées et pourtant si riches d'enseignement. Viendront ensuite les nématodes avec une attention particulière pour *C. elegans* qui permet de mieux comprendre l'apoptose, processus dont on mesure mal encore toute l'importance et son lien avec l'inflammasome. Prenons de la hauteur avec les insectes et son membre phare en science, *D. melanogaster*, qui nous apportera la découverte des TLRs (**T**oll **L**ike **R**eceptors). A la croisée des chemins sera ensuite

présenter l'immunité des poissons. Les membres sans mâchoires, agnathes, qui possèdent une forme alternative d'immunité adaptative. Les membres à mâchoires et tous les vertébrés qui en découleront avec une immunité adaptative au sens plus classique. Enfin quelques mots sur les mammifères, où c'est principalement de la souris qu'on espère tirer de substantielles améliorations de la connaissance au bénéfice de la santé humaine. Il ne s'agit en aucun cas de livrer la totalité des composantes de l'immunité chez ces différents embranchements. L'important est de susciter l'intérêt dans une approche holistique.

2 *L'immunité chez les plantes*

De nombreux micro-organismes sont pathogènes pour les plantes, altérant leur croissance et leur reproduction. Ils utilisent différentes stratégies. Les pathogènes bactériens prolifèrent dans les espaces intercellulaires (apoplastes) après être entrés par les pores aqueux (stomates), gazeux (hydathodes) ou par des lésions. Les nématodes (vers non segmentés) et les aphidoidea (pucerons) se nourrissent en insérant un stylet directement au travers des barrières de l'hôte.

A la différence des mammifères, les plantes ne possèdent pas de cellules mobiles de défense ni de système immunitaire adaptatif somatique. Les plantes contiennent leur système immunitaire inné inscrit dans chacune des cellules et émettent des signaux systémiques émanant des sites infectés (16) (11) (17).

Le système immunitaire des plantes se décline en deux branches de PRRs :

- La première reconnaît et répond à des molécules communes à de nombreuses classes de micro-organismes, incluant les non-pathogènes.
- La deuxième répond à des facteurs de virulence de pathogène, soit directement, soit via les effets sur les cibles hôtes. Ce sont les protéines de résistance NBS-LRR, répondant à des facteurs de virulence spécifiques d'une souche de pathogène.

La première branche de l'immunité chez les plantes utilise des récepteurs transmembranaires aux PAMPs (18). Comme les insectes et les vertébrés par exemple, les plantes répondent à beaucoup de molécules similaires, incluant LPS et flagelline. Des PRRs s'activent également en réponse à une large variété de molécules associées aux oomycètes (protistes filamenteux) dont des composants de leur paroi cellulaire, tels la chitine et l'ergostérol (19).

Un très bon exemple est celui de la flagelline bactérienne, laquelle entraîne des réponses immunitaires chez de nombreuses plantes (20). La mobilité due à la flagelline est très importante pour la pathogénicité des bactéries chez les plantes (18). Un peptide de synthèse de 22 acides aminés, flg22, constitue un domaine conservé de la flagelline. Il suffit pour induire des multiples réponses cellulaires (21) dont la transcription en l'espace d'une heure de plus d'un millier de gène chez *Arabidopsis thaliana* (22), plante de référence pour l'étude du règne végétal. Le PRR liant flg22 est un récepteur à activité kinase contenant un LRR extracellulaire appelé FLS2 (**F**lage**L**lin **S**ensitive) (23). FLS2

engage une cascade de MAPK, des facteurs de transcription appelés WRKY et des protéines effectrices (24). A noter que son homologue humain, TLR5 (Toll-Like Receptor-5), reconnaît des domaines différents de la flagelline (18), ce qui renverrait à un mécanisme d'évolution convergente.

La deuxième branche de l'immunité chez les plantes agit largement en intracellulaire, utilisant les protéines NBS-LRR codées par la plupart des gènes R (de **R**ésistance) (16). Seules les plantes possèderaient des récepteurs immunitaires qui sont réellement pathogène-spécifique. Ils reconnaissent des facteurs de virulence codés par un pathogène. Ces facteurs sont des molécules effectrices libérées par différents pathogènes, comme les effecteurs de type III (11). Les facteurs de virulence sont des structures, des enzymes, des toxines ou des résidus du métabolisme qui contribuent à l'expression du pouvoir pathogène. Il en existe plusieurs types qui agissent à différents stades de l'infection, dont voici quelques exemples : certains permettent aux agents infectieux de s'attacher aux tissus, d'autres les aident à éviter les défenses intracellulaires de l'hôte ou à s'y opposer, d'autres encore contribuent à leur propagation dans un organe ou dans l'organisme et enfin certains comme les toxines empoisonnent leurs hôtes. Simples molécules ou structures élaborées, ces facteurs sont codés par des gènes et spécifiques d'un agent pathogène donné (25).

Les NBS-LRR possèdent un domaine de liaison aux nucléotides (Nucléotide **B**inding **S**ite) et un domaine LRR (**L**eucine **R**ich **R**epart). Les NBS-LRR des plantes sont comparés aux NLRs (Nod **L**ike **R**eceptors) des animaux (26). Les effecteurs de pathogènes, provenant de différents règnes, sont reconnus par les NBS-LRR et activent des mécanismes de défense. La résistance engagée par les NBS-LRR est efficace contre les pathogènes qui ne peuvent croître que sur du tissu vivant (biotrophes obligatoires) mais pas contre les pathogènes qui tuent les tissus de l'hôte durant la colonisation (nécrotrophes) (27).

Les effecteurs reconnus par une protéine NBS-LRR sont appelés protéines Avr (**A**virulence). Il s'ensuit souvent une mort cellulaire qui s'étend rarement au delà des cellules infectées. Cette mort cellulaire, qui pourrait retarder la croissance de certains types de pathogènes, n'est pas toujours observée et n'est pas requise pour l'immunité induite par les facteurs de virulence. Ce qui stoppe la croissance du pathogène dans la plupart des cas n'est toujours pas connu. Egalement peu de choses sont connues à propos des signalisations requises pour activer l'immunité via les NBS-LRR. Ces protéines sont probablement conformées à l'état inactif par des protéines chaperons, telles HSP90 (28). Les LRRs semblent agir comme des régulateurs négatifs qui bloquent l'activation inappropriée du domaine NBS. L'activation de ces protéines nécessitent des changements conformationnels intra- et intermoléculaires. Cela pourrait ressembler au mécanisme moléculaire de mort cellulaire engagée chez l'animal par Apaf-1 (29). On y retrouve d'étonnantes corrélations avec les NLRs des mammifères et la formation de l'inflammasome dont l'organisation tripartite similaire aux NLRs (30) et le rôle supposé des LRRs.

Il existe une grande diversité de gène de résistance (R). Les cellules d'*Arabidopsis* contiennent

140 NBS-LRR (31) et le riz plus de 500 (32). Rappelons qu'une des raisons possibles de cette multiplicité est qu'à la différence des NLRs les NBS-LRR répondent spécifiquement vis à vis d'un pathogène, notamment contre leurs facteurs de virulence. Néanmoins, Jones et Dangl pensent que beaucoup des protéines R pourraient être activées en reconnaissant indirectement les effecteurs d'un pathogène et non eux-mêmes directement (25). Cette « *hypothèse de garde* » implique que les protéines R reconnaissent indirectement les effecteurs pathogéniques en contrôlant l'intégrité des cibles des effecteurs microbiens (16). Le concept des protéines R reconnaissant le « *soi modifié par un pathogène* » est similaire à la reconnaissance du « *soi modifié* » dans le modèle de danger du système immunitaire mammalien de Polly Matzinger (33).

Comment ces différentes catégories de PRRs fonctionnent ensemble pour fournir une réponse coordonnée de la plante ? Une possibilité est que ces différents types de récepteurs renforcent mutuellement la réponse immunitaire, constituant une serrure à deux loquets pour réduire les pertes engendrées par une réponse complète face à des organismes non pathogènes.

Les récepteurs extracellulaires non spécifiques tels FLS2 pourraient servir de sentinelle précoce et alerter la plante de la présence d'un pathogène potentiel, activant une réponse locale transitoire et/ou en primant les défenses de la plante afin de produire une réponse plus longue, plus vigoureuse et systémique si un second signal cytosolique est détecté par un récepteur NBS-LRR. Où alors le fait de posséder des récepteurs de molécules conservées de micro-organismes et également des facteurs de virulence spécifiques pourrait permettre aux plantes de faire la distinction entre les pathogènes, les saprophytes et les micro-organismes commensaux (11).

De nombreux pathogènes contaminent le cytoplasme des cellules hôtes par l'intermédiaire d'un appareil appelé « système de sécrétion de type III (T3SS, **Type III** Secretion System), véritable seringue moléculaire, moteur de l'interaction bactérie-cellule eucaryote. Il est possible d'envisager que les pathogènes aient évolué des effecteurs de type III, facteurs de virulence, pour abroger les réponses des plantes aux PAMPs (34) et que les plantes en retour aient évolué des récepteurs pour ces effecteurs de type III. Puisqu'il y a un nombre quasi illimité d'effecteurs de type III potentiels que les plantes auraient à reconnaître, les récepteurs NBS-LRR auraient évolué pour contrôler les cibles des effecteurs de type III plutôt que de fonctionner comme des récepteurs directs de ces effecteurs (16). De nombreuses publications fournissent une accumulation de données qui peuvent expliquer comment les plantes peuvent potentiellement reconnaître une gamme diverse de pathogènes et de molécules spécifiques à un pathogène en utilisant un nombre relativement limité de récepteurs (34, 35). La solution évolutive chez les plantes pour identifier les pathogènes impliquerait l'auto-surveillance, tandis que chez les vertébrés elle mettrait en œuvre un système immunitaire adaptatif impliquant la détection d'antigènes étrangers.

3 L'immunité chez les invertébrés

Les métazoaires diploblastiques les plus anciens, éponges et l'ancien taxon de cœlentérés regroupant cnidaires (hydres, méduses, coraux, anémone de mer) et cténares (ceinture de vénus) possèdent des cellules amiboïdes qui exercent des rôles digestifs et ingèrent également les organismes étrangers. Ces phagocytes sont les précurseurs fonctionnels des macrophages des vertébrés (36).

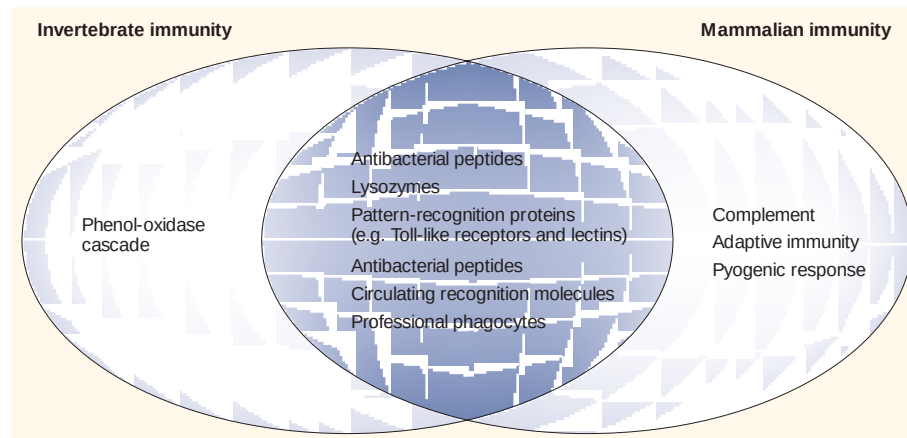


Figure 2 | Immunité croisée invertébrés et mammifères
Diagramme soulignant les hautes similarités entre des animaux
a priori aussi éloignés que les invertébrés et les mammifères (4)

a L'immunité chez les nématodes

Les nématodes, ou vers ronds, sont les animaux les plus abondants sur Terre (37). Les nématodes ont interagité et coévolués au contact de micro-organismes pendant plus de 600 millions d'années (4). Certains nématodes vivant dans le sol, tel l'animal modèle du développement et de l'apoptose *Caenorhabditis elegans* (38), sont bactérivores. Des spécialistes estiment que l'évolution des mécanismes défensif et offensif afin d'éviter la prédation par les nématodes et d'autres invertébrés serait à l'origine des traits reliés à la virulence (4). A l'opposé, l'évolution des mécanismes de défense des nématodes sous la forme d'un système immunitaire inné serait devenue essentielle pour survivre à l'ingestion de pathogènes potentiels.

L'analyse du génome de *C. elegans* identifia un seul gène codant pour un PRR transmembranaire de la famille des TLR appelé Tol-1. Il possède d'autres gènes codants pour des composants reliés à ceux des voies de signalisation TLRs chez les insectes et les mammifères, incluant TRF-1 relié à TRAF1 (**TNFR-Associated Factor-1**), PIK-1 relié à Pelle et IRAKs (**IL-1R-Associated Kinases**), et IKB-1 relié à l'inhibiteur de NF-κB (IkB) (39). Cependant, le génome de *C. elegans* ne semble pas coder d'homologue de MyD88 (**Myeloid Differentiation factor 88**) ni des facteurs de transcription NF-κB-like (40). Il existe d'autres protéines/voies de signalisations similaires ou notablement différentes non référencées ici entre les génomes. Le but n'est pas tant de faire « catalogue » que de montrer la distance certaine mais relative entre les nématodes et d'autres animaux.

b L'immunité chez les insectes

Le travail chez *Drosophila melanogaster* identifia le rôle central du récepteur Toll dans le développement et la détection de pathogène (41). Les études des voies de signalisation TLR ont servi de paradigme quant à la conservation des composants de l'immunité innée (42, 43). Il me paraît important de résumer cette histoire phare de l'histoire des sciences de la fin du XX^{ème} siècle.

Initialement, Toll fut identifié comme un gène du développement dans l'établissement précoce de l'axe dorso-ventral de l'embryon (44). En 1991, le domaine cytoplasmique de Toll fut rapporté comme possédant une homologie avec le domaine cytoplasmique de l'interleukine 1 (IL-1) humaine et fut baptisé domaine TIR (**T**oll/**I**nterleukin 1 **R**eceptor) (45). En 1996, une avancée convaincante fut la mise en évidence que les mutants de la voie Toll étaient immuno-déficientes (46). L'année suivante, un homologue humain de Toll fut montrée comme activant l'expression de gènes contrôlés par NF-κB (47). En 1998, le positionnement sur le génome humain du gène murin Lps, qui lui confère la résistance face au choc endotoxique induit par le LPS, permit l'identification de TLR4 (48).

Chez la drosophile adulte Toll agit en amont d'une cascade de signalisation conservée dans l'évolution et impliquée dans l'immunité innée. Il me paraît très curieux qu'une même protéine répondant au même ligand au sein du même organisme puisse avoir deux fonctions critiques dans deux systèmes *a priori* très distincts. Cela tendrait je pense à bien montrer que l'évolution du système immunitaire, et au delà son niveau d'aboutissement actuel tel qu'on pourrait à tort l'envisager, ne s'est pas réalisé de façon idéalement autonome mais par des chemins parfois bien détournés, me rappelant le « *Hasard et la nécessité* » de Jacques Monod.

Toll dans son rôle immunitaire est activé par Spaetzle, une cytokine produite chez les insectes suite à la détection de PAMPs. Chez les vertébrés les TLRs sont activés par les PAMPs, directement ou à l'aide de protéines accessoires comme dans le cas TLR4/LPS. A la fois chez les insectes et les vertébrés, cette détection de PAMPs conduit à l'activation de facteurs de transcription dont NF-κB grâce à des voies de signalisation impliquant notamment TIRAP, MyD88 et d'autres protéines aidant à l'assemblage de complexes multi-protéiques. NF-κB régule plusieurs aspects de la différenciation cellulaire pendant le développement ainsi que la transcription de gènes qui codent pour des protéines impliquées dans les réponses immunitaires innées, tels que les peptides antimicrobiens et les cytokines pro-inflammatoires des vertébrés (49).

Chez *D. melanogaster*, l'activation de NF-κB par la voie Toll se réalise principalement en réponse aux champignons et bactéries pathogènes Gram-positive (46, 50), tandis qu'une voie parallèle IMD (**I**mmune **D**eficiency) est activée principalement à l'encontre de pathogènes Gram-négatifs (51). La voie IMD de la drosophile correspond à la voie de signalisation TNFR (**T**umor **N**ecrosis **F**actor **R**eceptor) chez les mammifères (41).

4 *L'immunité chez les vertébrés*

a L'immunité chez les poissons

La majorité de nos connaissances sur la composition, le fonctionnement et la régulation des deux branches immunitaires innée et adaptative repose sur des études réalisées chez l'homme et la souris. Récemment, de nouvelles découvertes ont relancé l'intérêt de l'étude de l'immunologie des poissons. Sans oublier la réalité économique où l'aquaculture devient primordiale et où l'infection des poissons d'une ferme piscicole pourrait générer des surcouts importants (36).

Le nombre de gènes de l'immunité innée des poissons s'est agrandi afin de permettre les augmentations fonctionnelles de la flexibilité, de la diversité et de la redondance. Cela supporterait l'apparente faiblesse de leur capacité d'adaptation. Par exemple le poisson zèbre possède environ 50% de plus de TLR que les mammifères ce qui lui permettrait de reconnaître plus de PAMPs ou de posséder une réponse plus spécifique pour chacun d'entre eux (36).

Les poissons comprennent des membres dépourvus de mâchoire (agnathes) et ceux qui en possèdent (gnathostomes). Ces derniers peuvent être cartilagineux (comme le requin) ou osseux (comme le gardon).

i Les poissons sans mâchoire (52)

Les agnathes sont apparus au Cambrien il y a 500 millions d'années. Les seuls représentants actuels sont les lamproies et les myxines. Avant les agnathes, les invertébrés et les chordés antérieurs utilisaient des molécules codées directement par les gènes somatiques pour la détection de micro-organismes et la phagocytose comme réponse primaire des cellules effectrices (53).

Le sang des agnathes contient des cellules qui sont morphologiquement similaires aux lymphocytes, aux plasmocytes, aux monocytes et aux granulocytes des vertébrés supérieurs. Durant les années 60 et début 70, une accumulation de données montrait que les agnathes possédaient un système immunitaire adaptatif. L'immunisation de lamproies avec des antigènes particuliers, tels des bactéries tuées à la chaleur, des bactériophages ou des érythrocytes de mammifères induisait la production d'agglutinines anticorps-like spécifiques (54). L'identification des bases génétiques par analyse transcriptomique montra la présence de gènes impliqués dans l'immunité adaptative. Néanmoins les éléments cardinaux, immunoglobulines, RAG1 et RAG2, CMH1 et CHM2 étaient absents. Des études génomiques récentes ont confirmé leur absence.

En 2004, il fut injecté aux lamproies un mélange d'antigènes et de mitogènes qui induisent une transformation lymphoblastoïde des cellules lymphocytes-like (55). Ces cellules activées du sang furent triées et une étude des cDNA fut réalisée par rapport à des ceux d'érythrocytes. Sur les 1500 clones de cDNA étudiés, 239 contenaient une séquence unique de LRR, uniquement exprimée par les lymphocytes. En raison de cette diversité et de leur expression restreinte aux lymphocytes, ces récepteurs furent appelés **Variable Lymphocyte Receptors (VLRs)**. Chaque VLR code un peptide signal invariant (SP) suivi de modules LRR ordonnés mais très variables (55)

Ces observations et d'autres permirent de conclure qu'une forme alternative d'immunité adaptative comprenant des récepteurs antigéniques basés sur des modules LRRs avait évoluée avant notre système basé sur des Ig (**Immunoglobulines**). Contrairement aux segments V, D, J des Ig de vertébrés à mâchoires, les cassettes LRRs ne sont pas bordées de séquence signal de recombinaison. Il existe deux types de VLRs, VLRA et VLRB, exprimés par des populations de cellules lymphocytes-like différentes. Des enzymes apparentées à la cytosine désaminase de l'ADN pourraient catalyser l'assemblage des deux gènes en établissant des cassures de l'ADN. Ces enzymes permettraient un appariement par homologie de cassettes LRRs et interviendraient dans l'assemblage et la diversification des VLRs.

La majorité des séquences variables dans un VLR forme une surface concave, ce qui suggère une liaison à l'antigène. Les VLR sont exprimés uniquement sur les cellules lymphoïdes. Celles-ci réalisent le phénomène d'exclusion allélique, qui signifie que lorsque qu'une copie d'un gène a réussi son réarrangement l'expression de la seconde est empêchée.

- Les cellules VLRB produisent des anticorps solubles similaires aux réponses IgM des poissons osseux et cartilagineux.
- Les cellules VLRA subissent une transformation lymphoblastoïde et une prolifération consécutive à l'immunisation par des virus, des bactéries et des cellules de mammifères. Elles ne produisent pas de protéines VLRA solubles mais se différencient en cellules sécrétrices de cytokines qui pourraient diriger la réponse immunitaire.

Ces deux populations de cellules lymphoïdes paraissent fonctionnellement similaires aux lymphocytes B et T des vertébrés à mâchoire.

Le système immunitaire adaptatif des vertébrés sans mâchoire a beaucoup de similarités avec celui des vertébrés à mâchoires, incluant la compartimentalisation du développement des lymphocytes B-like et T-like. En réponse à des antigènes, les deux lignées prolifèrent et se différencient en plasmocytes sécréteurs de VLR et en cellules sécrétrices de cytokines pro-inflammatoires.

La séquence des modules LRR individuels assemblés dans un VLR est très diverse. La diversité combinatoire est comparable à celle des immunoglobulines ($\sim 10^{14}$ combinaisons) (56)

ii Les poissons à mâchoires (56)

Le système immunitaire adaptatif classique, centré sur la reconnaissance de l'antigène par des lymphocytes grâce la recombinaison somatique est apparu il y a environ 450 millions d'année (57). Il est commun à tous les gnathostomes, depuis les poissons à mâchoires jusqu'aux mammifères en passant par les amphibiens, reptiles et oiseaux.

Deux évènements macro-évolutifs y auraient contribué : l'émergence du transposon RAG (**R**ecombination-**A**ctivating **G**ene) et deux séries de duplication complète du génome.

Les gnathostomes actuels partagent un système immunitaire complexe qualifié d'anticipatoire. Sommairement, il est préparé à répondre à toute éventualité de diversité organique. Ce répertoire très divers de récepteurs aux antigènes est généré par le réarrangement somatique de segments V, D, J des gènes des immunoglobulines grâce à des recombinases RAG pendant le développement clonale des lymphocytes.

Les poissons à mâchoires sont les plus anciens porteurs d'un système adaptatif basé sur le trio BCR-TCR-CMH. Les molécules de CMH permettent de présenter à la surface de toutes les cellules d'un hôte une identité tissulaire basée sur une portion de protéines du soi. Les antigènes étrangers sont réduits à l'état de peptide et également présentés. Ce complexe peptide/CMH est reconnu par les récepteurs des cellules T (TCR, **T-Cell Receptor**) exprimés à la surface de lymphocytes sentinelles spécifiques. En théorie simplifiée, les molécules dérivées du non-soi (micro-organismes, virus) ou du soi modifié (tumorigénèse, auto-immunité) activent des lymphocytes T qui vont par divers moyens, notamment en activant des lymphocytes B, permettre de combattre une situation potentiellement délétère.

A la fin des années 1980, Sakano, Tonegawa et al. ont découvert la présence de séquences signal de recombinaisons et ont remarqué leurs répétitions inversées semblables au transposon. Un transposon est une séquence d'ADN capable de se déplacer et de se multiplier de manière autonome dans les génomes (58). La diversité des TCR et BCR vient du réarrangement de portions de gènes par des enzymes RAG. Les recombinaisons sont réalisées entre de séquences signales conservées bornant des segments variable (V), de diversité (D) et de jonction (J).

b L'immunité chez les mammifères

Leur immunité innée comprend pour une grande part des récepteurs et des voies de signalisation retrouvés dans de nombreux autres organismes vivants. Les mammifères possèdent l'immunité adaptative sans doute la plus performante, notamment dévoilée par le succès indéniable de la vaccination. Le détail des voies de signalisations, de la relation et de communication entre innée et acquis ne sera pas développer ici.

5 L'immunité, l'évolution ou l'effort du carré jaune

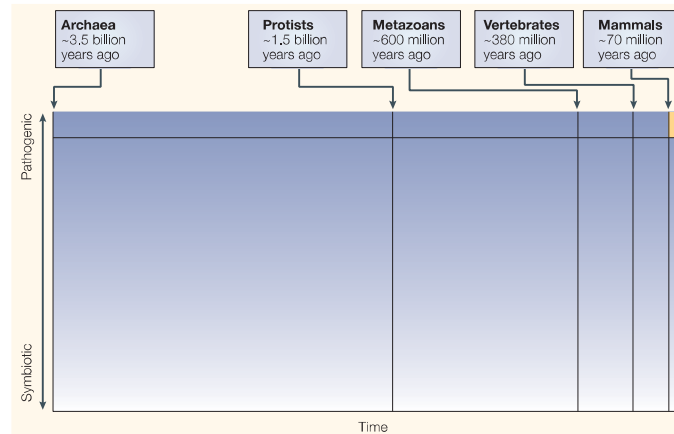


Figure 3 | Le syndrome du carré jaune

Diagramme représentant en abscisse le temps à l'échelle géologique et en ordonnée la proportion restreinte de bactéries pathogéniques par rapport aux symbiotiques. Le carré jaune en haut à droite concentre les efforts de la Recherche, à savoir l'effet des pathogènes sur les mammifères. Plus de 99% des relations hôtes/bactéries ne rentrent pas dans ce cadre et peuvent grandement atténuer notre appréhension de l'immunité (4)

Evolution de l'immunité innée

Chez certains invertébrés comme l'oursin (59) il s'est produit une forte expansion du nombre de PRRs, ce qui pourrait suggérer un mécanisme compensant la déficience de l'immunité adaptative (56). Les plantes auraient encore plus de récepteurs de l'immunité innée que les invertébrés, ce qui serait peut être la conséquence du fait que les plantes sont sessiles, ont une durée de vie beaucoup plus longue et qu'elles n'ont pas de cellules mobiles qui peuvent se spécialiser dans la défense face aux pathogènes (25). Les cellules des plantes sont fixées dans leur paroi et chaque cellule est donc responsable de sa propre défense (11).

L'origine des domaines LRRs est très ancienne, ceux-ci étant retrouvés dans presque tout l'ensemble du vivant, incluant plantes et animaux.

L'immunité innée chez les vertébrés, les invertébrés et les plantes a des caractéristiques communes, parmi lesquelles la présence de récepteurs aux PAMPS, des cascades conservées de protéines kinases (MAPK) et la production de peptides antimicrobiens (11). Il est généralement admis que ces similarités de l'immunité innée chez ces organismes distants représentent un procédé d'évolution divergente à partir d'un archétype unicellulaire eucaryote qui date d'avant la divergence entre les règnes animal et végétal.

Ausubel pense que l'étude des données disponibles montre que l'apparente analogie entre les modules de l'immunité innée utilisés chez les plantes et les animaux est la conséquence d'une évolution divergente et reflèterait la présence de contraintes inhérentes à la construction d'un système immunitaire (11). Il estime que l'idée répandue selon laquelle les PRRs, les voies de signalisation et les effecteurs sont conservés chez les plantes, les insectes et les vertébrés est peu recevable. La similarité entre les récepteurs de la flagelline FLS2 de la plante et TLR5 des mammifères comprend la présence d'un domaine LRR en extracellulaire et l'utilisation d'une activité tyrosine/thréonine kinase

pour la transduction. Cependant, élément important, les deux récepteurs répondent à des épitopes différents de la flagelline (60). Les régions LRR de FLS2 et TLR5 sont très divergentes. A la différence des TLRs, le récepteur FLS2 ne possède pas de domaine TIR-like intracellulaire. aucun homologue des protéines adaptatrices cytosoliques contenant un domaine TIR, comme MyD88 n'a été identifié chez la plante.

Si ces récepteurs à la flagelline ont évolué à partir d'une ancêtre eucaryote, il est difficile d'expliquer pourquoi la spécificité au ligand et les domaines de signalisation intracellulaires sont différents chez la plante et chez l'animal (11).

Les plantes ne possèdent pas de facteurs de transcription homologue de la famille Rel-like, incluant DIF chez la drosophile et NF- κ B chez les mammifères. A l'inverse, la famille de facteurs de transcription WRKY des plantes, activés par FLS2, n'est pas retrouvée chez les animaux (11). L'implication commune des MAPKs ne permettrait également aucune hypothèse de conservation. Les MAPK réalisent des cascades d'activations en établissant des ponts entre divers senseurs/récepteurs et leurs gènes cibles. Cela se retrouve chez des eucaryotes aussi éloignés que les levures, les plantes, les invertébrés et les vertébrés. Les MAPK seraient donc apparemment apparues tôt dans l'évolution, avant même l'émergence de la multi-cellularité (11).

En résumé, les structures globales des voies de signalisations immunitaires innées enclenchées par les PAMPs sont similaires chez les plantes et les animaux. Toutes deux emploient un récepteur transmembranaire avec un domaine LRR en extracellulaire, une cascade de signalisation comportant des MAPK, la production de substances oxygénées et nitrogènes, des flux de calcium, une activation de facteurs de transcription et l'expression de effecteurs immunitaires inductibles. Ausubel estime que les similarités observées ne reflètent pas une conversation phylogénétique d'une voie de signalisation ancienne mais un mécanisme d'évolution convergence.

Evolution de l'immunité adaptative

Dans les années 1980, les TCRs furent découverts et un consensus approuva l'idée qu'ils partageaient un ancêtre commun avec les gènes des BCR. Cette attestation est basée sur une organisation similaire de leurs domaines et sur un mécanisme de base commun dans la génération de la diversité. Le système immunitaire adaptatif basé sur le trio BCR-TCR-CMH est présent à partir des poissons cartilagineux mais absent des chordés plus anciens. Deux évènements macro-évolutifs l'auraient permis (56) :

- l'invasion du transposon RAG, fournissant la capacité d'innovation
- la duplication totale du matériel génétique, fournissant la base matérielle

Les gènes RAG sont des transposons qui ne proviennent pas originellement du génome de l'hôte. Les gènes RAG1 et RAG2 sont retrouvés chez l'oursin (échinoderme), ce qui implique que le transposon RAG est entré 100 millions d'années minimums avant l'émergence d'un système immunitaire adaptatif et y est resté latent ou qu'il s'est introduit plusieurs fois. Sans égard aux modalités de cette invasion, l'arrivée du transposon RAG a probablement fournie une capacité d'innovation majeure puisque tous les gènes BCR et TCR utilisent actuellement le même mécanisme de réarrangement VDJ.

L'idée d'une duplication du matériel génétique est apparue environ 40 années en arrière par Susumu Ohno. Il proposa que les vertébrés ont subi une ou deux fois une duplication totale de leur génome. L'idée fut l'objet d'un intense débat et est maintenant largement acceptée. Une duplication a eu lieu après l'apparition des urochordés (animaux marins primitifs) et avant la radiation des vertébrés à mâchoires (56). Avec quelles exceptions, le système immunitaire adaptatif des gnathostomes est resté remarquablement uniforme pendant les derniers 500 millions d'années (56).

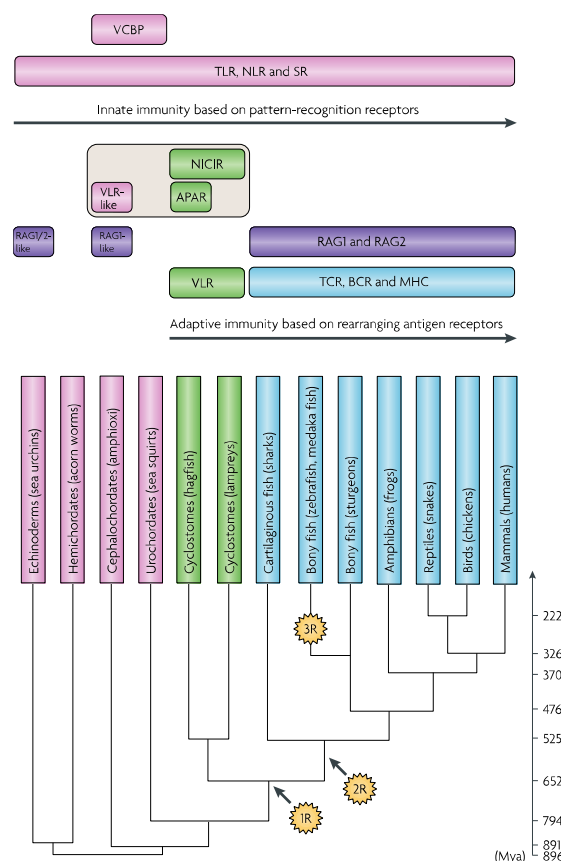


Figure 4 | Systèmes immunitaires chez les deutérostomes

Ce diagramme d'évolution phylogénétique montre bien la présence ubiquitaire des PRRs (TLR, NLR et SR (*scavenger receptor*)). L'immunité adaptative est apparue chez les poissons par des deux systèmes différents : le système VLR chez les agnathes et le système TCR-BCR-CMH chez les gnathostomes. Les étoiles jaunes représentent les étapes de duplication complète du matériel génétique (56)

Les cellules lymphoïdes (le cœur de l'immunité adaptative) les plus anciennes au niveau phylogénétique sont retrouvées chez les prévertébrés de la division des deutérostomes (56), c'est à dire

par exemple chez étoile de mer mais pas chez le calmar. De plus l'observation que les agnathes possèdent des cellules B- et T-like indique que leur apparition a eu lieu avant la divergence entre vertébrés sans/avec mâchoire.

Les VLRs des agnathes et les BCRs/TCRs des gnathostomes sont basées sur une diversité combinatoire générant un répertoire de liaisons possibles très vaste. Cependant, les gènes des VLRs n'ont pas de similarités avec ceux des BCRs/TCRs et la machinerie de recombinaison est différente car seuls les derniers possèdent RAG. Ces observations suggèrent que les deux branches de récepteurs ont évolué indépendamment. L'ancêtre des vertébrés aurait les précurseurs à la fois des BCR/TCR mais aussi des VLRs.

Quelles pressions sélectives ont conduit à l'émergence d'un système immunitaire adaptatif ? Il ne semble pas indispensable puisque les invertébrés et les plantes, deux grand succès évolutif, se contentent de mécanismes de défense innée. Toutefois, des systèmes adaptatifs primitifs ont été décrits chez plusieurs taxons d'invertébrés (61) et l'utilisation d'un mécanisme RNAi-like fournirait des réponses adaptatives chez un grand nombre d'espèces (62).

Certains chercheurs estiment qu'un système de défense anticipatoire pourrait à terme causer plus de problèmes qu'il n'en résout. Il nécessite un mécanisme de tolérance au soi pendant l'ontogénie des lymphocytes et son échec peut mener à l'auto-immunité (63). En outre, le système immunitaire adaptatif ne semble se maintenir que sous de fortes pressions sélectives. Les organismes comme la morue, l'hippocampe ou l'axolotl, qui ne seraient pas contraignés à de fortes pressions sélectives par des pathogènes, semblent avoir perdu leur capacité de monter des réponses adaptatives (56).

Selon Flajnik et Kasahara, Le système BCR–TCR–MHC se révèle toutefois très performant (56). Ils avancent l'idée que l'apparition de ce système qui s'est réalisée avec les vertébrés à mâchoire reflète probablement leur caractère prédateur. Or les prédateurs ont souvent une progéniture restreinte, maintenant un ratio prédateur/proie en *statu quo* (56). Ces chercheurs estiment qu'avec l'apparition des mâchoires le matériel à digérer pouvait causer des lésions de l'intestin et présenter un risque d'infection massive (56). Par ailleurs, il est établi que les premiers membres de cette superclasse, les placodermes, furent également les premiers à réaliser la fertilisation interne (64).

Conclusions

Bien qu'il soit généralement accepté que les réponses immunitaires des plantes et des animaux partagent au moins quelques origines évolutives communes, l'examen des données disponibles échoue à supporter cette conclusion, en dépit des similarités dans la « logique » globale des réponses immunitaires innées chez les eucaryotes multicellulaires (11).

Les plantes et les animaux utilisent des familles de facteurs de transcription différents pour leurs réponses immunitaires innées. La famille WKRY chez les plantes est absente chez les animaux. La famille NF- κ B utilisée chez les insectes et les vertébrés n'est pas présente chez les plantes et *C. elegans* n'en possède aucune des deux.

Bien que des composants des voies de signalisation de l'immunité innée chez les plantes et les animaux partagent certains motifs protéiques, incluant TIR, NBS et LRR, il semble aussi probable que ces motifs aient été recrutés indépendamment dans des lignages évolutifs différents pour fonctionner dans la signalisation immunitaire que ces motifs aient évolué à partir des protéines de signalisation immunitaire innée ancestrale. Les études phylogénétiques de familles de gènes impliqués dans l'immunité innée supportent cette conclusion, suggérant que d'autres composants de la signalisation immunitaire chez les insectes et les vertébrés, incluant TLRs et NF- κ B, représentent des protéines de signalisation hautement conservées qui furent sélectionnées indépendamment pour fonctionner dans la signalisation immunitaire innée (65, 66). Ce n'est pas nécessairement inattendu. Les LRRs par exemple sont utilisés en tant que récepteurs pour une large variété de ligands par de nombreuses protéines eucaryotes. L'idée d'un processus d'évolution convergente est également supportée par le système immunitaire combinatoire des lamproies (vertébrés sans mâchoire), lequel implique des LRRs très divers à la place de segments de gènes des immunoglobulines chez les vertébrés à mâchoire (55).

Certaines revues admettent la conclusion que l'évolution convergente explique mieux les similarités dans les réponses immunitaires des plantes et des animaux (19) mais cela n'est pas établi explicitement. Pourquoi l'évolution a-t-elle choisi un nombre limité de modules régulateurs apparemment analogues au sein de lignage évolutif distants ? Cela reflète-il des contraintes biochimiques inhérentes qui résultent de la manière dont un système immunitaire effectif peut être construit ?

Par exemple les protéines possédant des domaines TIR sont impliquées dans trois voies de signalisations immunitaires innées apparemment distantes : les protéines TIR-NBS-LRR des plantes, la TIR-(p38) MAPK du nématode (et peut être d'autres phylum) et la signalisation TLRs des insectes et des vertébrés. De plus, au moins chez les animaux, les protéines à domaines TIR semblent être utilisées exclusivement par les voies de signalisation immunitaire. Il est concevable que les domaines TIR, tout autant que d'autres domaines tels LRRs ou les kinases type Pelle-like, trouvés communément dans les voies de signalisation immunitaire, possèdent de propriétés biochimiques intrinsèques qui les rendent particulièrement bien adaptés à ces signalisations ou soit particulièrement résistants aux attaques de contre-défense des pathogènes (11).

B. L'immunité et les Hommes

« On ne connaît pas complètement une science tant qu'on n'en sait pas l'histoire »

Auguste Comte

Philosophe Français. Son système positiviste contribua à établir des critères de rationalité des savoirs et à l'élimination des spéculations métaphysiques abstraites

1 Résumé historique de l'immunologie jusqu'au XX^{ème} siècle

Les premières occurrences connues de la maladie et de la peste apparaissent dans les premières œuvres écrites de l'humanité (67). Rédigée en cunéiforme sur des tablettes d'argile, l'épopée de Gilgamesh est un récit légendaire de l'ancienne Mésopotamie. Elle s'inspire de plusieurs récits, en particulier sumériens, dont la première version complète connue fut en akkadien dans la Babylonie du XVIII^{ème} ou XVII^{ème} siècle av. J.C. Dans la tablette VII, "La mort d'Enkidu", on lit « *Un mal le (Enkidu) saisit aux entrailles. La maladie s'installe (...) se prolonge et s'aggrave chaque jour. Au douzième jour il reproche à Gilgamesh son impuissance. Il meurt.* ». La tablette suivante, la VIII^{ème}, "Les funérailles d'Enkidu", continue : « *Un mauvais démon a surgi pour me dépouiller (...) Enkidu, ô mon ami, mulet impétueux, âne sauvage de la montagne, léopard de la steppe (...) Quel est le sommeil qui t'a saisi, toi, Que tu te sois assombri et que tu ne m'entendes plus* ».

Des descriptions plus précises de la peste sont présentes dans les écrits des anciennes dynasties d'Egypte. Selon les croyances de l'époque, l'apparition de la maladie résultait d'une punition divine consécutive à des péchés ou des pensées impures. Cependant certains anciens avaient déjà noté qu'une personne qui survivait une première fois à une maladie n'y succomberait probablement pas lors d'épisodes futurs. L'historien grec Thucydides rapporta ce phénomène étrange dans son récit de la peste qui ravagea Athènes vers 430 av. J.C., épidémie qui arracha notamment la vie à Périclès. Le mot immunologie vient du latin « *immunitas* » qui désignait l'exemption de charges accordée aux sénateurs romains, soustraits au droit commun. Thucydides lui donna un sens appliqué à la médecine où il désigne, comme il l'a observé lors de cet épisode dramatique, l'état de protection spécifique d'une maladie conféré aux survivants d'une épidémie.

En France, au VI^{ème} siècle, Grégoire de Tours écrit dans son Histoire des Francs « *on compta, un dimanche, dans une basilique de Saint Pierre, trois cents corps morts. La mort était subite ; il naissait dans l'aîne ou dans l'aisselle une plaie semblable à la morsure d'un serpent ; et ce venin agissait tellement sur les hommes qu'il rendait l'esprit le lendemain ou le troisième jour ; et la force du venin leur ôtait entièrement le sens* » {Grégoire de Tours, VI^{ème} siècle #808}.

Dix siècles plus tard, Nicolas de Nancel apporte des précisions sur sa propagation où « *la peste est une fièvre continue, aiguë et maligne, provenant d'une certaine corruption de l'air extérieur*

en un corps prédisposé : laquelle étant prise par contagion se rend par même moyen communicable et contagieuse : résidente aux trois parties nobles ; accompagnée de très mauvais et très dangereux accidents, et tendant de tout son pouvoir, à faire mourir l'homme, voire tout le genre humain » (68). Une telle description, ramenée aux connaissances et aux croyances de l'époque, apparaît d'une brillante lucidité.

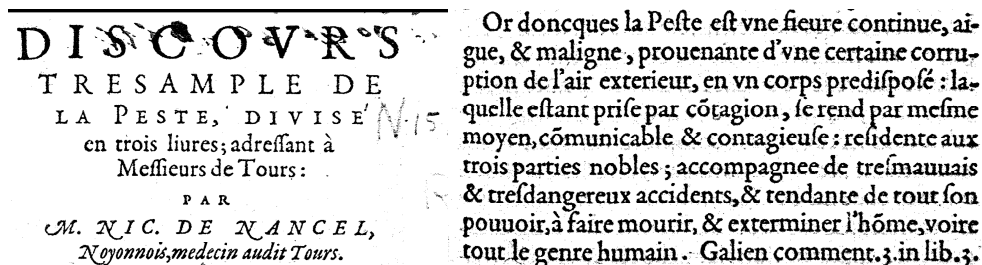


Figure 5 | Couverture et sélection du « Discours très ample de la peste », écrit par Nicolas de Nancel en 1581
Remarquer la clairvoyance et peut être la témérité de l'auteur en cette période d'inquisition

La peste n'est pas la seule maladie largement étudiée et documentée dans l'histoire. La variole est une maladie contagieuse causée par un virus de la famille des orthopoxvirus. Elle serait apparue il y a plus de trois millénaires en Inde ou en Egypte. Les cicatrices présentes sur la momie du pharaon Ramses V, mort au XII^{ème} siècle av. J.C., sont considérées comme ayant été causées par la variole. Le virus sévit partout en Europe et fut apporté en Amérique par les conquistadors. Il tua plus d'aztèques et d'indiens nord-américains que le firent les colons blancs. Dans certaines cultures, la variole était tellement dévoreuse d'enfants que la coutume prohibait de prénommer le nouveau-né jusqu'à ce qu'il en soit touché et prouvé qu'il pourrait y survivre.

La variole, ou petite vérole, toucha toutes les couches de la société, tuant des rois, des reines et des empereurs tout autant que la plèbe. Ce fut une des maladies les plus calamiteuses pour l'humanité. Pendant des siècles, des épidémies répétées ont balayé les continents, décimant la population et influençant le cours de l'histoire. La petite vérole emporta la reine Mary II d'Angleterre, l'empereur Joseph I^{er} d'Autriche, le roi Louis I^{er} d'Espagne, le tsar Peter II de Russie et le roi Louis XV le bien aimé. Elisabeth I^{ère}, Mozart, George Washington, Abraham Lincoln ou encore Joseph Staline l'ont contractées. Au XVIII^{ème} siècle, la variole était la maladie la plus crainte et la plus dévastatrice. Elle tuait environ 10% de la population en Angleterre et jusqu'à 20% en ville où la dissémination se trouvait favorisée. Chez les enfants, la variole était la cause d'un mort sur trois. Selon l'OMS, la variole tuait environ 30% des personnes infectées. Entre 65 et 80% des survivants portaient de profondes marques et cicatrices, proéminentes sur le visage. La cécité était une autre complication. Au XVIII^{ème} siècle, un tiers de tous les cas rapportés de cécité furent consécutifs à la variole. Une enquête au Vietnam en 1898 indiqua que 95% des adolescents étaient marqués et neuf dixième de tous les cas de cécité furent attribués à la variole.

Les médecins de l'Inde ancienne avaient remarqué que les malades ayant survécu à une première atteinte de variole résistaient, partiellement ou totalement, à une deuxième exposition. Ils en conçurent une méthode de prévention, la variolisation, qui consistait à inoculer une faible quantité de pus variolique à des sujets sains pour les protéger des attaques ultérieures. Cette pratique de variolisation fut adoptée aux X^{ème}-XI^{ème} siècles par des médecins chinois de la dynastie Ming qui la modifièrent. Ils insufflaient des croûtes varioliques réduites en poudre dans les narines des jeunes enfants, en espérant que les sujets développeraient une forme atténuée de cette pestilence. Ce procédé de variolisation suivi la route de la soie, se répandit dans tout le Moyen-Orient et en particulier dans l'empire ottoman, surtout à Constantinople où elle était pratiquée par « inoculation ».

La première véritable description de la variole fut donnée par un scientifique perse, Al-Razi. Mort vers 930 av. J.C., Al-Razi est considéré comme un des plus grands alchimistes de tous les temps. Il fut le premier à établir une distinction entre rougeole et variole, écrivit le premier article connu sur l'allergie et l'immunité et découvrit l'asthme allergique. Il fut aussi la première personne à réaliser que la fièvre était un mécanisme de défense naturelle du corps qui était produit pour combattre la maladie. Il est possible qu'Al-Razi fût le premier à envisager l'immunité acquise. Peu après, au XI^{ème} siècle, le grand philosophe et médecin perse, Avicenne, proposa également une théorie de l'immunité acquise. Il est considéré par beaucoup comme « le père de la médecine moderne ». En Europe, Averroès (1126-1198), praticien célèbre et philosophe de Cordoue, nota également que la variole ne récidivait jamais. Ainsi, contrairement à la génétique médicale qui sera restée longtemps une science très théorique, l'immunologie s'est depuis l'origine appuyée sur des pratiques empiriques telle que la variolisation.

Nous savons que c'est Lady Wortley Montagu, femme d'un ambassadeur anglais, qui introduisit cette technique en Angleterre au début du XVIII^{ème} siècle d'où elle gagna le reste de l'Europe. Cette pratique fut plus largement acceptée lorsque que le prince et la princesse de Galles autorisèrent leurs enfants à être inoculés en 1722, après cependant avoir été testée sur des prisonniers condamnés. La variolisation était efficace mais elle présentait de réels dangers. Prélevés vivants sur des croûtes de victimes de la variole, les virus inoculés pouvaient provoquer d'authentiques varioles et entretenaient l'épidémie. Des études quantitatives par James Jurin en 1722 et Zabdiel Boylston en 1726 établirent que la mortalité parmi les personnes inoculées était de un sur cinquante, tandis que celle des personnes contractant naturellement la maladie était de une sur six. L'amélioration des techniques d'injection du virus et le changement des prétraitements des patients ont permis de réduire la mortalité en 1765 à moins de un sur cinq cents. La variolisation par inoculation de pustules varioliques était connue et pratiquée largement en Asie, en Afrique et dans l'Europe de l'ouest, bien que les méthodes d'administration du matériel infecté variaient grandement.

Restant en Angleterre sur la question du « prétraitement », continuons avec le brillant William Watson. Il fut médecin à l'hôpital pour la « *Maintenance and Education of Exposed and Deserted Children* » établi à Londres en 1739. En 1767, Watson dédiait tout son temps pour le soin des enfants acceptés dans cet établissement de charité. Répétons qu'à cette époque la cause principale de mortalité

chez les enfants londoniens était la variole. L'infection était endémique et tuait environ un enfant sur quatre né dans la ville. Il fut admis qu'un tel établissement où les enfants résidaient en dortoir favorisait la propagation de la maladie. Il fut ordonné que tous les enfants n'ayant pas déjà fait face à la variole soient inoculés. Introduite en 1721, soixante-quinze ans avant les expériences de vaccination (Cf. infra), l'inoculation consistait à infecter un patient avec une faible dose de fluide contenu dans une pustule variolique au sein d'une petite incision généralement pratiquée en haut du bras. Bien que celle-ci ait été largement utilisée et relativement sûre, de nombreuses interrogations demeuraient. Watson se posa en particulier les deux questions suivantes : Quelle est la meilleure source d'inoculum ? Est-ce que le mercure, utilisé en routine en prétraitement, est bénéfique ? La plupart des médecins de l'époque préparaient les patients en utilisant une combinaison de régime sans viande et de purgatifs pour vider l'estomac et les intestins de leur contenu. Beaucoup y rajoutait une prescription d'antimoine et de mercure, mixture suggérée en premier lieu par Hermann Boerhaave comme un antidote contre le « poison variolique » qui était censé causer la variole. Watson doutait que le mercure puisse être bénéfique, mais puisque les médecins les plus en vue l'utilisaient des preuves convaincantes étaient nécessaires avant de l'exclure. Il n'y avait pas non plus de consensus à propos de la meilleure source d'inoculum. Certains utilisaient des pustules jeunes, d'autres matures et les derniers, celles qui étaient quasiment résorbées.

Watson réalisa des expériences novatrices pour explorer ces deux questions. Il reconnut la nécessité d'étudier de larges groupes d'enfants (entre 7 et 20) d'âge similaire et des deux sexes, plutôt qu'un ou deux enfants à la fois. Il prit la peine d'être certain que tous les enfants avaient le même régime alimentaire, les mêmes vêtements, jouaient aux mêmes endroits et dormaient dans les mêmes dortoirs. Il inclut également un groupe contrôle ne subissant ni régime particulier ni addition de métaux « *it was proper to also to be informed of what nature unassisted, not to say undisturbed, would do for herself* » (69). La première expérience, réalisée le 12 octobre 1767 sur les trois au total, comptait 31 enfants répartis en trois groupes :

- 10 enfants (5 de chaque sexe) recevant avant et après la variolisation un mélange de mercure et de jalap (laxatif)
- 10 enfants (5 de chaque sexe) recevant une infusion de « senna » et du sirop de rose (laxatif léger) par trois occasions
- 11 garçons ne recevant aucun traitement supplémentaire.

Le matériel inoculé provenait pour cette expérience de lésion précoce et fut le même utilisé pour les trois groupes. Il nota scrupuleusement, à l'aide d'assistants à l'hôpital, le nombre de pustules sur chacun des individus. Depuis longtemps déjà, les médecins reconnaissaient une corrélation entre le nombre de pustules et le pronostic du patient. Utilisant la moyenne pour outil statistique, aucun n'autre n'étant disponible en 1767, il conclut brillamment au terme des trois expériences que le mercure ou le prétraitement au laxatif avait un impact négligeable sur les résultats de la variolisation à

l'aide de pustules jeunes. Il s'agit ici, datant de presque 250 ans, du premier cas avéré de science clinique, ayant pour cadre la variole.

Autre médecin anglais, Edward Jenner est un peu plus connu. Sa démonstration la plus frappante fut menée en 1798. Il montra que l'inoculation d'une souche proche mais nettement moins dangereuse que la variole, la vaccine, pouvait protéger un individu contre la première. L'histoire raconte que, comme de nombreux confrères, Edward Jenner réalisait la variolisation pour protéger ses patients contre la variole. Cependant, il s'est intéressé très tôt dans sa carrière à la rumeur qui prétendait que les personnes contaminées par leurs vaches à la vaccine ne pouvaient pas être atteintes de la variole. Cette rumeur, sa propre expérience de la variolisation et des risques encourus l'ont conduit à mener la plus importante recherche de sa vie.

La vaccine est une infection modérée chez les vaches. Elle cause des pustules sur leurs mamelles. Les laitières pouvaient contracter le virus occasionnellement. Elles en gardaient des pustules sur les mains qui ne les handicapaient pas davantage. En Mars 1796, Sarah Nelmes consulta Jenner pour une éruption cutanée apparue sur la main. Le médecin diagnostiqua la vaccine et Sarah lui confirma qu'une de ses vaches, appelée Blossom, avait récemment été atteinte de la vaccine. Jenner réalisa que c'était là l'occasion de tester les effets protecteurs de la vaccine en l'administrant à un individu qui n'avait jamais souffert de la variole. Il choisit James Phipps, le fils de son jardinier âgé de huit ans. Le 14 mai il réalisa quelques égratignures sur l'un des bras de James et y frotta le contenu d'une des pustules présentes sur la main de Sarah. Le jeune garçon fut atteint d'une fièvre modérée quelques jours plus tard puis guérit dans la semaine. Jenner sut alors que la vaccine était transmissible non seulement de la vache à l'homme mais aussi d'homme à homme. La prochaine étape fut de tester si la vaccine pouvait protéger l'enfant de la variole et le 1^{er} juillet, Jenner le contamina. Il éprouva sans doute un grand réconfort lorsqu'il vit que James ne développait pas la variole. On peut penser que James lui-même n'en fut que plus heureux. Jenner testa plusieurs fois l'immunité de James avec les mêmes résultats. Il fit d'autres expériences et essaya de publier ses recherches mais rencontra une forte résistance. Finalement il les publia en 1798 à ses propres frais dans le livre « *An inquiry into the causes and effects of the variole vaccinae, a disease discovered in some western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow pox* ». Ce ne fut que lorsque ses expériences furent confirmées que la « vaccination » fut acceptée. La vaccine vient du latin *vacca* qui signifie vache en latin. Jenner n'a jamais essayé d'expliquer comment la vaccination fonctionnait. La vaccination fut progressivement adoptée partout dans le monde et deux cents ans après son invention elle permit d'éradiquer la variole. L'OMS lança en 1967 une intensification de sa lutte et grâce au succès de cette campagne globale d'éradication, la variole fut finalement éliminée de la corne de l'Afrique où le dernier cas naturel fut identifié en Somalie en 1977. Un cas d'infection mortelle dans un laboratoire anglais fut à déplorer au Royaume-Uni en 1978. L'élimination de la variole fut certifiée

sur la base d'intenses vérifications sur le terrain par une commission d'experts scientifiques en décembre 1979. En 1980, l'OMS a pu annoncer l'éradication planétaire de la variole.

Alors que le sang du « touche-à-tout » Lavoisier coulait sous la France de la terreur, l'année 1794 vit la publication d'un livre de Hunter intitulé « *A treatise on the blood, inflammation and gun shot wounds* ». Ce fut le premier apport scientifique sur l'inflammation. Il souligne l'importance de l'inflammation dans l'élimination de l'infection mais suggère également qu'elle pourrait causer d'elle-même des maladies.

La deuxième moitié du XIX^{ème} siècle commença en Immunologie par la découverte de la phagocytose (Haeckel, 1862) et des mastocytes (Ehrlich, 1877). Puis vint l'aire Pasteur.

2 *Pasteur et Koch (1880-1890) « Immunologie microbiologique »*

Le jurassien Louis Pasteur (1822-1895) fut chimiste et physicien de formation. Il obtint notamment la médaille Rumford en 1856 pour ses travaux sur la chiralité (dissymétrie moléculaire). Grâce à l'intervention de Jean-Baptiste Biot il s'intéressa par hasard à la fermentation, lorsque Biot lui dit que certains composés présents lors de la fermentation avaient la propriété de dévier la lumière polarisée. Il dépensa alors beaucoup d'énergie et déploya un scrupuleux travail d'observation.

Pasteur publia en 1861 ses travaux réfutant la théorie de la génération spontanée, alors en plein débat. L'Académie des sciences lui décerna le prix Jecker pour ses recherches sur les fermentations. Nombreux sont ceux qui luttèrent pour contredire Pasteur et valider la théorie de la génération spontanée. Ainsi par exemple Georges Clémenceau, jeune journaliste mais aussi médecin, mit en cause les compétences de Pasteur en tant que biologiste.

Les intérêts de Pasteur se dirigèrent progressivement sur des maladies animales économiquement préjudiciables. Il étudia une maladie du ver à soie qui handicapait sérieusement son industrie et l'anthrax qui causait de lourds dégâts sur les animaux domestiques. Il démontra la présence de microorganismes dans les vers affectés et réussit à mettre en évidence que le transfert des microbes d'un organisme atteint vers un organisme sain suffisait à ce dernier pour devenir lui aussi malade.

En 1878, il se pencha que le cholera des poules. Louis Pasteur et ses collaborateurs constatèrent que lorsque les bactéries responsables de la maladie sont mises en culture pendant plusieurs semaines ou exposées à des conditions défavorables, elles sont modifiées et perdent leur virulence. Des animaux inoculés avec ces bactéries dégénérées ne développent pas la maladie. Cette observation fortuite lui a permis de découvrir le « principe d'atténuation » des germes pathogènes. En collaboration avec Emile Roux (1853-1933), Pasteur démontra en 1880 que l'immunité acquise pouvait être induite chez le poulet en utilisant une forme de pathogène atténué. Autrement dit, l'utilisation d'une forme atténuée du pathogène protège le receveur contre une infection ultérieure

avec l'agent infectieux virulent. Le vaccin était né ! Pasteur mis alors au point des vaccins contre deux autres maladies animales, le rouget du porc et le charbon du mouton.

Il procédait en domestiquant les microbes en milieu défavorable en vue d'une immunisation par ces germes atténués. L'agent infectieux responsable de l'anthrax, la bactérie Gram⁺ *Bacillus anthracis*, fut isolé en 1876 par Robert Koch. Pasteur réalisa en 1881 une très célèbre expérience de terrain sur cinquante moutons où furent conviés sceptiques et journalistes. Malgré la présence de nombreux détracteurs, ce fut un triomphe. Il y démontra que les moutons vaccinés résistaient parfaitement à l'inoculation ultérieure d'une souche de charbon très virulente. Toutefois n'étant pas médecin, il aborda le problème de la vaccination chez l'homme avec beaucoup de prudence.

La rage faisait à l'époque des milliers de victimes par an, notamment en France. Pasteur s'attacha d'abord à protéger le chien qui représentait à l'époque le principal vecteur de la rage pour l'homme. Il utilisa comme matériel expérimental le lapin dont la moelle épinière devenait après inoculation très virulente. Le virus rabique est extrêmement fragile, il ne survit pas dans le milieu extérieur. Il atténuait la virulence en desséchant les moelles dont il se servait pour vacciner les chiens. Sans l'avoir identifié, Pasteur inactivait le virus de la rage lors du processus de dessiccation de la moelle épinière de lapin. Il n'envisageait pas encore de vacciner l'homme.

En 1885, l'arrivée en catastrophe à Paris d'un jeune berger alsacien très gravement mordu par un chien enragé, Joseph Meister (1876-1940), précipita la décision. Pasteur lui appliqua, non sans angoisse, le même traitement que celui qui avait réussi chez le chien : l'inoculation de moelles de moins en moins desséchées, c'est à dire de plus en plus virulentes. Il réussit à stopper la marche lente mais inexorable de cette maladie et sauva l'enfant de 9 ans d'une mort atroce. Le principe pasteurien de vaccination était établi. On ne savait pas par quel mécanisme la protection vaccinale était obtenue.

L'avant dernière décennie du XIX^{ème} siècle ne fut pas en reste de découvertes dont allait fortement bénéficier la santé humaine. En 1882, Robert Koch (1843-1910) découvre *Mycobacterium tuberculosis*. En 1884, l'agent étiologique de la diphtérie, emportant alors de très nombreux enfants, le bacille diphtérique, fut isolé et cultivé par le microbiologiste allemand Edwin Klebs (1834-1913).

3 Immunité cellulaire contre immunité humorale

Une bataille épique de la fin du XIX^{ème} siècle au compte de la seconde

a Metchnikoff (« cellulariste »)

Découverte de la phagocytose et théorie phagocytaire de l'Immunité

Le zoologiste d'origine ukrainienne Elie Metchnikoff (1845-1916) a découvert en 1884 un phénomène biologique original : la phagocytose. Une larve d'étoile de mer blessée par une épine de

rosier réagit en mobilisant contre l'intruse des cellules particulières « amiboïdes » qui l'ingèrent et la digèrent. Les cellules responsables, les « phagocytes », proviennent du mésoderme de l'invertébré. Metchnikoff rejoignit l'institut Pasteur en 1888, d'où il constata que la phagocytose existe aussi chez les animaux supérieurs et chez l'homme. Certains globules blancs, les grands monocytes, pouvaient se muer en phagocytes et ces « éboueurs » cellulaires éliminaient bactéries et débris divers. Il lança l'idée que la phagocytose était un phénomène très général et qu'elle constituait un mécanisme essentiel de défense contre les infections.

Les tenants de l'immunité cellulaire comme lui, considéraient que la défense de l'organisme était due à des cellules ayant la capacité de phagocyter des corps étrangers. L'importance de l'immunité cellulaire fut longtemps dénigré et il fallu longtemps avant qu'elle acquiert ses lettres de noblesse.

b Von Behring et Kitasato (« humoraliste »)

Découverte de l'immunité humorale et ascendance

Le concept d'une immunité cellulaire prédominante fut combattu par la plupart des biologistes de l'époque. En particulier Paul Ehrlich (1854-1915), le père de la chimiothérapie, pour lequel les défenses anti-infectieuses relevaient presque uniquement de facteurs humoraux, les anticorps. Des objections à la théorie de l'immunité cellulaire sont apparues en constatant que des actions immunitaires pouvaient se produire en absence de cellules.

En 1888 Jules Héricourt (1850-1933) et Charles Richet (1850-1935) montrèrent la possibilité de transmettre passivement par injection de sérum l'immunité d'un animal vacciné à un animal vierge. La même année deux disciples de Pasteur, Emile Roux (1853-1933) et Alexandre Yersin (1863-1943), démontraient que le pouvoir pathogène du bacille diphtérique était dû à un poison plutôt qu'à la bactérie elle-même. Ils isolèrent et caractérisèrent ce qu'ils appelèrent la toxine diphtérique. Ils furent devancés dans leur recherche deux ans plus tard à Berlin par deux disciples de Robert Koch, Emil von Behring (1854-1917) et Shibasaburo Kitasato (1852-1931). Ceux-ci montrèrent que le sang de sujets immunisés contre la diphtérie ou le tétanos contenait des substances capables de neutraliser la toxine. Ces substances furent alors appelées antitoxines, sérums antitoxiques à la fois contre la diphtérie et contre le tétanos. En 1890 la sérothérapie, ou le traitement des maladies infectieuses par des immun-sérums, était née. Dès 1893 fut préparé chez des chevaux des immuns sérums antitoxines à usage thérapeutique. Cette découverte contrastait fortement avec les tenants de l'immunité cellulaire qui prônaient le rôle des phagocytes. Les antitoxines eurent un immense retentissement et enchantèrent tellement le monde médical de l'époque que Von Behring reçut le premier prix Nobel en 1901.

Le nom d'antitoxines resta jusqu'à ce que Paul Ehrlich en 1897 leur attribue le terme générique d'anticorps, définissant en retour les antigènes comme les molécules reconnues et neutralisées par les anticorps. L'identification des anticorps circulant dans le sang devait permettre à

Jules Bordet, en 1899, de définir le complément formé de molécules également circulantes qui aident les anticorps à détruire les cellules ou microbes sur lesquels ils se fixent.

En cette fin de XIX^{ème} siècle, la théorie humorale explique simultanément la reconnaissance de l'antigène (anticorps) et la destruction de la cellule reconnue par un effecteur (complément), tous deux de nature moléculaire. Elle rend accessoire le rôle des phagocytes. Pourtant la même année il est établi que des facteurs sériques, nommés opsonines, augmentent l'action des phagocytes chez l'animal immunisé. Grâce à l'opsonisation le phagocyte participe avec le complément à la compréhension de l'action antimicrobienne.

En 1908, le prix Nobel de médecine sera attribué conjointement à Metchnikoff et Erlich, sans que cela parvienne à réconcilier leur point de vue. C'est finalement la théorie humorale de l'immunité qui retiendra l'attention des biologistes pendant plus de 60 ans, tout en évoluant.

4 Les théories de la formation des anticorps : instruction contre sélection

Durant cette période qui donnait la part belle aux théories sur les anticorps, un des sujets en vogue concernait l'origine de la spécificité face à un grand nombre de pathogènes. Deux théories principales furent énoncées, l'« instruction » ou la « sélection » des anticorps. Dans le modèle instructif, l'anticorps adopte une structure complémentaire à l'antigène à la manière d'un moule et de son empreinte. Dans le modèle sélectif, l'exposition à un antigène induit le recrutement de certains anticorps provenant d'un pool aux spécificités variés.

a Ehrlich et théorie de la sélection (1897-1900) *Les anticorps les plus affins sont utilisés*

Ehrlich élaborait une théorie dite sélective (1897-1900) sur l'apparition des anticorps. Elle est également désignée par « théorie des chaînes latérales ». Ces entités seraient présentes dans le protoplasme cellulaire. En réponse à leur liaison à des toxines bactériennes elles seraient libérées et conduiraient à l'élaboration d'un excès de chaînes similaires, « *In the course of immunisation [...] the cells become, so to say, educated or trained to reproduce the necessary side-chains in ever increasing quantity* » (70).

Les cellules formant les anticorps comporteraient également des constituants membranaires capables de fixer spécifiquement des antigènes. La liaison d'un antigène à son récepteur membranaire provoquerait une synthèse abondante de ce récepteur ou de ces chaînes qui seraient ensuite libérées dans la circulation et constitueraient les anticorps. Pour expliquer la spécificité de cette fixation, Ehrlich l'a comparée à l'adaptation d'une clé (antigène) à une serrure (anticorps), et a admis qu'il s'agirait d'une réaction chimique covalente.

Malgré la nouveauté de sa théorie, elle n'expliquait pas la diversité du répertoire. La théorie sélective postulait que les cellules sécrétrices d'anticorps, les lymphocytes, possédaient une réserve d'anticorps prédéterminée parmi lesquels chaque antigène sélectionnait celui qui lui était le mieux adapté. Après avoir été longtemps dénigrée, cette conception finira par triompher, non sans subir de nombreux aménagements.

b Pauling et théorie instructionniste (1940)

Les anticorps se forment au contact des antigènes

La théorie basée sur l'instruction des anticorps apparaît autour de la période des découvertes de Karl Landsteiner and Merrill Chase, étalée sur une quinzaine d'années. Ils surent générer des anticorps contre presque n'importe quelle structure chimique, même synthétique (71). Fritz Breinl et Felix Haurowitz suivirent cette découverte avec intérêt et notèrent déjà en 1930 « *We can now generate an almost infinite number of artificial antigens which cannot be found in nature. It is not feasible that the organism is constantly producing antibodies for thousands of artificially generated antigens* » (72). Ils proposèrent en conséquence la première théorie instructionniste ou informatrice qui stipulait que l'antigène imprimait à l'anticorps sa spécificité en agissant sur lui comme un moule. L'anticorps aurait une structure suffisamment malléable pour adapter sa configuration spatiale à ce moule. Cette théorie fut reprise par le grand biochimiste américain Linus Pauling (1901-1994) en 1940. Après avoir appliqué la mécanique quantique aux liaisons chimiques et défini les liaisons faibles, Linus Pauling se consacra à l'étude des protéines. Il établit avec Corey le modèle des structures protéiques primaire et secondaire, configuration en hélice α et en feuillet β . Concernant la réaction antigène/anticorps il considérait que l'antigène réagissait avec l'anticorps et lui imposait une forme complémentaire.

La théorie instructionniste fut désapprouvée en 1964 lorsque fut montré que des anticorps peuvent être dénaturés puis se reformer en absence d'antigène. Pauling reçut néanmoins le prix Nobel de chimie en 1954 pour sa contribution à la connaissance des liaisons biochimiques.

5 Les modèles de l'immunité des années 50 à nos jours

a Les 30 glorieuses du modèle SNS (self-nonself)

i Sélection clonale selon Burnet (1956)

En 1941, Sir Frank Macfarlane Burnet* et ses collègues firent paraître la première édition de « *The Production of Antibodies* » (73) dans laquelle ils acceptent la théorie instructionniste de Breinl et Haurowitz au dépend de la théorie sélective d'Ehrlich. Ils durent cependant faire face à plusieurs problèmes en adoptant ce modèle. L'un d'eux était l'absence d'explication de l'augmentation exponentielle de la production d'anticorps dans la phase précoce de la réponse immunitaire. Or sans

une augmentation des moules, la production des anticorps devraient être linéaire. Burnet propose une version révisée, dans laquelle les anticorps sont synthétisés à l'intérieur des cellules en adoptant une configuration complémentaire à l'antigène mais sont aussi capable d'autoréplication. Il existerait des enzymes cellulaires adaptatives formant un « *antibody-producing mechanism [which] can be transmitted to descendent cells by some hereditary process replication* » (73).

En 1948, Burnet et son compatriote australien Frank Fenner publièrent une courte revue intitulée « *Genetics and Immunology* » (74). Ils y conservèrent l'idée générale du mécanisme de formation des anticorps. L'année suivante paraît la deuxième édition de « *The Production of Antibodies* » dans laquelle les auteurs s'intéressent à la biochimie à l'échelle cellulaire. Un embarras majeur pour Burnet fut que l'antigène paraissait être phagocyté par les macrophages tandis que l'anticorps correspondant était produit par les cellules plasmatiques. Il nota « *We feel that a clarification of the function of the lymphocyte would probably throw a great deal of light on the general problem of immunity* » (75).

En outre, le mode de réplication des protéines avec une action adaptative d'enzymes était à l'encontre des grandes avancées récentes de la génétique. Lorsque Francis Crick publia son « *central dogma* » sur l'orchestration du triumvirat ADN, ARN, protéine, il cita directement Burnet comme supportant des idées opposées aux siennes (76). Burnet reconsidéra sa vision et proposa notamment que le transfert de la capacité de sécréter des anticorps spécifiques d'une cellule à ses descendantes se réalisait par hérédité nucléaire (77). En 1957, il apparaît avoir changé d'avis concernant la formation des anticorps et réhabilite la théorie de la sélection clonale supportée par Niels Jerne. Il intitula sa nouvelle théorie de la sélection clonale des lymphocytes « *a modification of Jerne's theory of antibody production* » (78).

Jerne réfutait l'idée que les structures des anticorps soient « infinies ». Il montra que sur les quelques milliers étudiés jusqu'alors beaucoup trop réagissent entre eux (79). Jerne proposa que seule une petite quantité d'anticorps parmi tous ceux possibles est produite et sécrétée spontanément dans le sang, générant un pool naturel. Ces anticorps seraient soumis à une forte réplication après leur liaison à l'antigène. Pour rester en ligne avec les données indiquant son origine cellulaire, Jerne postula que suite à la liaison à l'antigène, l'anticorps était transféré dans les cellules appropriées pour y être reproduit. Trois points principaux sont abordés. Brièvement, la production précoce localisée des anticorps « *Possibly a specialised lymphoid tissue, such as that of the thymus [...] is engaged in this function* », un mécanisme d'induction de la tolérance « *the early removal of a specific fraction of molecules* » et un mécanisme sur la maturation d'affinité « *copying mistakes will be harmless, and may occasionally produce an improved fit* » (79). Jerne réalisa lui même les deux points faibles de sa théorie. A l'encontre des résultats expérimentaux, l'injection d'un anticorps spécifique d'un antigène particulier devait engendrer la production massive par réplication d'anticorps dirigé contre lui. Le deuxième problème rejoignait celui de Burnet où les protéines n'agiraient pas comme des unités

réplicatives, mais dont les structures seraient codées par le génome.

La première version de la théorie de sélection clonale de Burnet est condensée en deux pages. Deux ans plus tard, notamment après avoir apprécié l'opinion de David Talmage (80) et pris la mesure des travaux de Peter Medawar, il publiera en 1959 le fameux ouvrage « *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity* » (81), pilier de l'histoire de l'immunologie et repris dans le paragraphe suivant.

** Sir Frank Macfarlane Burnet, virologue australien (1899-1985) réalisa des études d'importances sur les bactériophages et les virus. Il fit des découvertes significatives sur les mécanismes de réplifications virales puis contribua grandement à la théorie de la sélection clonale. Burnet reçut en compagnie du britannique Peter Medawar le prix Nobel de médecine en récompense de ses travaux sur la tolérance immunologique qui permis de mieux appréhender la transplantation d'organe.*

ii Actualisations du modèle SNS

Le modèle que Burnet proposa est actuellement qualifié de modèle de distinction soi/non-soi ou SNS (Self / Non Self). Chaque lymphocyte exprime à sa surface des récepteurs d'un type particulier. L'interaction entre l'antigène et son récepteur entraîne la prolifération du lymphocyte, son « expansion clonale », en même temps que leur maturation. Cette expansion clonale se trouve relancée et amplifiée lors d'un deuxième contact avec l'antigène, quelques « lymphocytes mémoires » ayant conservé entre temps le souvenir du premier contact.

Le modèle SNS tenu le haut du pavé de la communauté scientifique pendant plusieurs décennies et connu plusieurs actualisations au gré des découvertes devant y trouver place. Ce modèle est considéré comme un point d'ancrage dans l'histoire de l'évolution des idées de l'immunologie. Il présume que la discrimination entre le soi et le non-soi est un élément critique dans la décision d'initier une réponse immunitaire. Les différentes versions du modèle SNS incluent ce principe et suggère que la réponse immunitaire est générée dès que l'hôte rencontre quelque chose d'étranger.

La théorie de la sélection clonale suggérait trois points cruciaux, le troisième incorporé par la suite :

- (i) chaque lymphocyte exprime un grand nombre de copies d'un récepteur de surface particulier et spécifique d'une entité étrangère. La reconnaissance de l'antigène sera appelée « signal 1 ».
- (ii) la signalisation engagée par cet anticorps de surface initie la réponse immunitaire
- (iii) les lymphocytes auto-réactifs sont éliminés précocement au cours de la vie.



Figure 6a | Premier modèle de distinction soi/non soi
Les lymphocytes sont directement activés par la présence d'antigènes étrangers (33)

Le point (iii) est fondamental pour la crédibilité du modèle et permis son acceptation par le plus grand nombre. Sir Peter Medawar (1915-1987) démontra que les cellules auto-réactives sont éliminées précocement durant l'ontogénie. Il expliqua expérimentalement avec ces collègues cette tolérance immune chez l'animal en 1953 (82). Leurs résultats montrent que le rejet des allogreffes (greffes de tissus provenant d'un individu de la même espèce) est d'origine immunologique. Cependant l'injection de cellules allogéniques à un souriceau nouveau-né est parfaitement tolérée. De plus, ce premier contact rend l'animal incapable de rejeter une greffe ultérieure de tissus provenant du même donneur que celui qui avait fourni les cellules allogéniques. Les souris adultes sont en mesure d'accepter une allogreffe de peau si elles ont reçu très jeunes des cellules du même donneur (82, 83).

Burnet et Medawar incorporèrent les résultats des travaux de ce dernier au modèle SNS (81). Les deux hommes se partagèrent le prix Nobel de médecine en 1960. Leurs travaux, avec ceux de Jerne, conduisirent à la notion essentielle de l'existence d'un fossé biologique séparant le « soi » du « non-soi ». Les succès de la théorie clonale vont différer de quelques temps encore le renouveau de l'immunologie cellulaire, vers 1970. L'attention portée à l'immunité adaptative va conduire à sous estimer globalement l'importance de l'immunité innée jusque vers 1990.

Cependant à partir de 1960 le « tout humoral » a commencé à subir de sérieux coups durs. L'importance des mécanismes cellulaires de l'immunité était largement sous-estimée. Auparavant déjà, les indices commencèrent à s'accumuler. Ainsi Landsteiner, découvreur des groupes sanguins et récompensé par le prix Nobel 1930, chercha à réaliser un transfert passif d'immunité (84). Ces expériences prirent une tournure inattendue lorsqu'il observa que le transfert de sérum n'avait pas d'effet sur la sensibilité de la réponse d'un animal non traité. Il a ensuite fortuitement isolé des leucocytes et les a transférés au sein d'un receveur qui cette fois devenait aussi sensible que le donneur.

En 1967, Mosier établit que les lymphocytes doivent interagir avec des cellules non myéloïdes, tels les macrophages, pour générer une réponse immunitaire productrices d'anticorps (85). Deux ans plus tard, Forsdyke proposa qu'à l'intérieur du système immunitaire « *two separable and distinguishable signals [were] required to separate inactivation by self from activation to nonself* » (86).

Suivant ce travail, Bretscher, Cohn publièrent en 1970 une théorie à deux signaux permettant une discrimination soi/non-soi (87). Deux mois plus tard, Weigert et Cohn montrent une variabilité des séquences protéiques de la partie variable d'une chaîne légère d'immunoglobuline. Il déduisent que des mutations somatiques sont à l'origine de ce phénomène (88). Leur découverte de l'hypermutation somatique des lymphocytes B activés amenait la création de nouvelles cellules potentiellement auto-réactives tout au long de la vie, à l'encontre des points (i) et (iii).

La forte probabilité d'apparition d'auto-immunité étant en fort désaccord avec les données empiriques, les protagonistes de cette théorie incorporèrent au système un nouveau paramètre, un

second signal plus tard appelé « helper ». Ils suggérèrent que la reconnaissance d'un antigène (signal 1) pourrait mener à la mort de la cellule B à moins de recevoir à temps un signal approprié d'une cellule « helper ». Les lymphocytes B devaient être activable que sous certaines conditions afin de ne pas engager de réponse contre le soi. Les lymphocytes « helpers » allaient devenir plus tard les Lymphocytes T helpers (Th). Leur addition au modèle SNS stipulait que les lymphocytes B reconnaissant un antigène mourraient en l'absence de signaux générés par les « helpers ».

En résumé, Bretscher et Cohn ajoutèrent un nouveau type cellulaire et un nouveau signal connu sous le nom de « modèle à deux signaux »

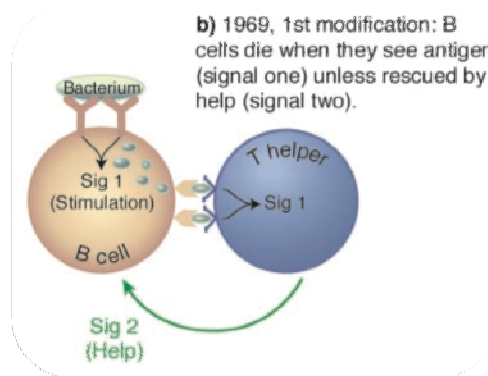


Figure 6b | Modèle « helper » à deux signaux (33)
La réponse des lymphocytes B nécessite l'aval de lymphocytes T

En 1975, Lafferty et Cunningham ont dû composer avec leur découverte que les cellules T répondaient plus fortement contre des cellules étrangères de leur propre espèce que contre des cellules d'une espèce différente (89). Autrement dit, l'alloréactivité et souvent plus forte que la xénoréactivité. Ils proposèrent, toujours en accord avec le modèle SNS, que les cellules T-helper ne sont pas actives de façon constitutive mais qu'elles nécessitent comme les cellules B une signalisation venant d'un autre type cellulaire. Les lymphocytes T nécessitent un second signal appelé « costimulation » exercé par les cellules « accessoires », les cellules présentatrices d'antigènes (APCs, Antigen Presenting Cells). Suivant l'idée de Bretscher et Cohn, ils stipulèrent que le signal 1 seul conduirait à la tolérance de la cellule T.

Peter Doherty et Rolf Zinkernagel collaborèrent sur un projet visant à étudier les mécanismes par lesquels les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) causent des dommages au sein de souris infectées par le LCMV (Lymphocytic Choriomenigitis Virus) (90). Ils conclurent que les CTLs devaient reconnaître deux choses séparées. Le premier venant du virus dans la cellule infectée et l'autre de son CMH. Cette double reconnaissance (CMH et dérivé du virus ici) sera appelée la « restriction au CMH » (91). Ces résultats et les autres qui suivirent changèrent la manière dont les scientifiques percevaient la spécificité de la réponse immunitaire. En résumé, l'antigène doit être présenté par la

cellule dendritique en association avec une molécule du CMH. La cellule dendritique saisit et découpe l'antigène en peptides, comme l'ont montré Zinkernagel et Doherty, en 1975 (92).

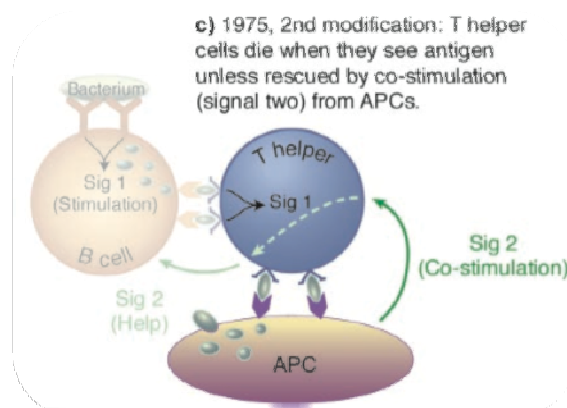


Figure 6c | Modèle « costimulation » par les APCs (33)
Les APCs et non plus les lymphocytes sont les tenants de la décision de réponse adaptative

En 1976, Tonegawa et Hozumi proposèrent qu'environ mille pièces de matériel génétique dans la portion variable d'une cellule B peuvent se recombinaison en différentes séquences (93). Il découvrit le mécanisme de réarrangement somatique qui permet la production d'anticorps spécifiques pour plus d'un milliard d'antigènes différents. Le groupe de Tonegawa révéla l'existence des séquences jonctionnelles J au sein des chaînes légères d'Ig (94) tandis que Weigert montrera plus tard leur rôle dans le remaniement des séquences V-J (95). En 1980, le segment D (diversité) dans les chaînes lourdes fut découvert par une autre équipe, et ainsi le réarrangement complet V-D-J (96).

A noter que durant plus de 10 ans le modèle de Brescher, Langman et Cohn (helper) a retenu l'attention et fut largement étudié tandis que celui de Lafferty et Cunningham (costimulation) fut ignoré. Il fallu attendre 1987, lorsque Jenkins et Schwartz découvrirent (inopinément*) que les APCs fixées au glutaraldéhyde étaient incapables de stimuler des clones de cellules T (97). Ainsi, la seule reconnaissance par les lymphocytes d'un complexe CMH/peptide présenté par un APC ne suffit pas à l'activation. Les preuves en faveur de ce modèle ne tardèrent pas à s'accumuler, notamment avec la découverte des molécules de costimulation.

Selon Polly Matzinger (98), la raison principale pour laquelle le modèle « cellule helper et signal help » fut bien accueilli et celui « APC et costimulation » désapprouvé est que ce dernier ne peut guère s'inclure au modèle SNS de base. Tout va bien si le signal *help* provient de la cellule *helper* qui elle-même reconnaît spécifiquement un antigène et peut être éliminée si elle est autoréactive. En revanche la costimulation provient des APCs, lesquelles ne peuvent pas distinguer le soi du non-soi à défaut de récepteurs antigène spécifique clonalement distribué. Ils peuvent présenter tout ce qui passe alentour. Si les réponses immunitaires sont initiées par les signaux provenant des APCs, il devient très difficile de comprendre comment le système immunitaire peut se focaliser uniquement sur les antigènes étrangers. Jusqu'au milieu des années 90 la costimulation fut négligée (99) ou ignorée (100).

* Cette histoire fut un bel exemple de « serendipité » en science, soit d'une découverte inattendue. Jenkins et Schwartz n'étudiait pas la costimulation. Il cherchait la nature des complexes peptide/CMH auxquels répondent les cellules T. Essayant de stabiliser ces complexes, ils utilisèrent du glutaraldéhyde pour fixer les APCs chargés en antigène et découvrirent que ces APCs n'étaient plus en mesure de stimuler des clones de cellules T. Helen Quill, travaillant dans le même laboratoire, mis des complexes peptide/CMH au sein de bicouches de lipides synthétiques et ne découvrit aucune activation des cellules T. Il semblait donc que quelque chose d'autre que l'antigène était nécessaire.

b Du « Dirty little secret » au modèle INS (infectious nonself)

Devenu empiriquement incontestable, la nécessité de costimulation posa un problème majeur au modèle SNS. Si comme estimé précédemment la décision de répondre ou non est détenue par des cellules antigène-spécifique et que celles auto-réactives sont éliminées, alors l'immunité peut être dirigée contre le non-soi. Mais si les réponses sont initiées par des APCs, non antigène-spécifique, capturant toutes sortes de substances du soi comme du non-soi, alors l'immunité ne peut être dirigée uniquement contre le non-soi. Souffrant de cette ambiguïté, Janeway offrit en 1989 une solution ingénieuse qui provoqua la chute d'un mur pour l'heure infranchissable. Ce tremblement de la communauté scientifique eut lieu dans l'état de New York lors de la 54^{ème} édition du « *Cold spring harbor symposium* ».

Auparavant, Janeway s'intéressa à presque tous les aspects des cellules T. A la tête de la section immunologie de l'université de Yale, il présida la publication de plus de trois cents articles. Certains n'hésitaient pas à parler de « présience » pour qualifier la capacité de Janeway à percevoir le fonctionnement global du système immunitaire (101). Il aimait à utiliser des expressions aux formes imagées pour étayer un fond autrement plus sérieux. Ainsi, il aurait mentionné « *the good, the bad and the ugly* » pour décrire le développement des lymphocytes T dans le thymus (101). « *The bad* » dévolu aux cellules éliminées qui portent des récepteurs auto-réactifs et « *the ugly* » à celles dont les récepteurs ne remplissent pas toutes les conditions pour être positivement sélectionnées. La plus fameuse de ses expressions fut celle qui résonna lors de l'introduction au 54^{ème} cold spring harbor symposium. Deux membres organisateurs, Watson et Inglis, avaient demandé à Janeway d'écrire le texte de son choix sur le sujet de son choix. Il fit sensation avec son « *dirty little secret* », renvoyant au besoin incompris d'adjuvants pour enclencher de nombreuses réponses immunitaires. Cette introduction donna lieu au fameux « *Approaching the asymptote : Revolution and Evolution in Immunology* » (102) dont Janeway lui-même avouera être « *the best paper I've never published* » (9). Il y prédit qu'il devait exister des protéines codées par la lignée germinale reconnaissant la présence de molécules produites par de larges classes de pathogènes, qu'il appela PRR (**P**athogen **R**ecognition **R**eceptors). Il y postula que les PRRs auraient la capacité de reconnaître ce qui maintenant est connu

sous le nom de PAMPs (**P**athogen **A**ssociated **M**olecular **P**atterns). Il ne m'a toutefois pas été possible d'avoir directement accès à cet article.

Pour arriver à cette réflexion, Charles Janeway partit de l'idée que le système immunitaire ne peut pas reconnaître tous les pathogènes individuellement. La quantité d'information nécessaire serait énorme et deviendrait rapidement obsolète. De plus, les pathogènes évoluent constamment, rendant délicat la capacité du système immunitaire à les reconnaître. Les PAMPs sont des motifs simples en comparaison de la complexité d'un pathogène. Ils comprennent des structures moléculaires trouvées chez les micro-organismes et sont essentiels à leur survie ou leur pathogénicité. La liaison de PAMPs aux PRRs des APCs induirait l'expression de molécules contrôlant la décision des lymphocytes naïfs à répondre à l'antigène. Ces molécules seraient celles dites de costimulation dont l'induction avait été montrée essentielle à l'initiation de la réponse adaptative.

Au delà de fournir le principe général de reconnaissance par l'immunité innée, Janeway apporta une ossature conceptuelle d'intégration de l'immunité innée et acquise. Ces idées élaborent des principes qui servent toujours de guide pour notre compréhension actuelle du fonctionnement de l'immunité innée et sa connexion à l'immunité adaptative. Les APCs digèrent les antigènes bactériens, les présentent aux lymphocytes T circulants et régulent positivement des molécules costimulatrices.

Le modèle proposé par Janeway était révolutionnaire, à l'encontre du concept prévalent d'une surveillance perpétuellement active du système immunitaire inné. Pour maintenir une forme de discrimination SNS, Janeway suggéra que le système immunitaire possédait la capacité de distinction entre le « non-soi infectieux » et le « soi non-infectieux » (103). Il baptisa son modèle INS (Infectious Non Self).

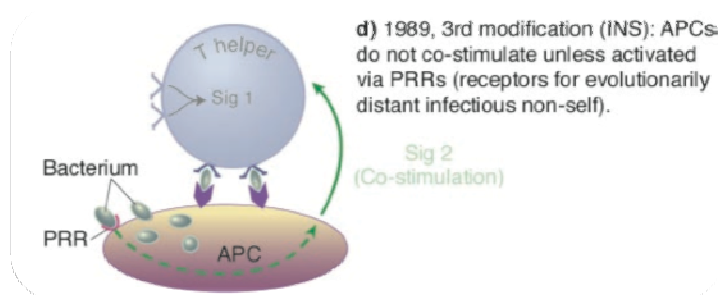


Figure 6d | Modèle « Infectious nonself » (33)
Des récepteurs, les PRRs, reconnaissent des PAMPs, signatures de l'étranger infectieux

Bien que l'essence du modèle de reconnaissance SNS fût temporairement préservée, le modèle INS créait de nouvelles complexités plutôt que de résoudre les anciens problèmes. Il ne pouvait expliquer pourquoi les virus stimulent l'immunité, pourquoi les greffes sont rejetées, comment est induite l'auto-immunité, pourquoi les tumeurs sont parfois spontanément rejetées ou encore comment les adjuvants non bactériens tel l'hydroxyde d'aluminium fonctionnent. Bien que très novatrice, cette théorie s'essouffla rapidement et n'attira que peu de retour concret au début.

La situation changea environ une décennie plus tard, lorsque de nouvelles études apportèrent de

nombreux éclaircissements. Le modèle original INS de Janeway évolua, clarifiant certaines zones d'ombres. Par exemple concernant l'immunité antivirale, il fut suggéré que l'ARNm double brin constituait une signature de l'étranger (104). Cependant Janeway avait lui-même écrit auparavant que l'addition des PRRs au modèle ne pouvait expliquer les réponses immunitaires face aux greffes ou tumeurs, ni les dysfonctionnements à l'origine des pathologies auto-immunes (105). Il éluda ces considérations, arguant que les transplantations étaient une invention moderne pour laquelle l'évolution du système immunitaire n'avait pas été confrontée. Il pensait par ailleurs que les tumeurs et les maladies auto-immunes avaient toutes deux tendances à apparaître suffisamment tard au cours de la vie pour ne pas empêcher la procréation et donc n'influaient pas les mécanismes de sélection évolutive.

A l'inverse et malgré ces apparentes imperfections, certains immunologistes pensaient que notre connaissance des mécanismes de reconnaissance du système immunitaire proche de la réalité. Ainsi il y en avait encore seulement 20 ans, Daniel E. Koshland Jr., éditeur du journal *Science* pendant 10 ans, n'hésita pas à écrire « *all the mysteries in modern science, the mechanisms of self versus nonself recognition in the immune system ranks at or near the top, the immune system is designed to recognize foreign invaders* » et « *when the immune system is working well it never gets activated by self substances, but unerringly responds to the nonself substances.* » (106).

c Des pommes à la grammaire

Polly Matzinger opposa une vue différente, signalant que les modifications des modèles SNS/INS ne suffisaient pas à rendre compte d'une façon satisfaisante plusieurs mécanismes fondamentaux de l'immunité. En 1994, elle écrivit « *For many years immunologists have been well served by the viewpoint that the immune system's primary goal is to discriminate between self and non-self. I believe that it is time to change viewpoints* » « *the immune system does not care about self and non-self, that its primary driving force is the need to detect and protect against danger* » (107).

Dans cette revue novatrice d'une cinquantaine de pages, Polly étaye sa vision du fonctionnement du système immunitaire. Elle discute essentiellement des bases fondamentales à l'origine de la tolérance au soi, des mécanismes d'activation des lymphocytes et de la costimulation (107). Il n'y a aucun détail sur les signaux de dangers de l'immunité innée. Matzinger cherche avant tout ici à intégrer sa vision du fonctionnement du système immunitaire dans le cadre de la mise en place de l'immunité adaptative.

Tout se bouscula lorsque Charles Janeway lui demanda de faire un parallèle qu'elle n'avait pour l'heure pas appréhendé. Polly Matzinger raconte (108) qu'intéressé par le sujet, Janeway lui demanda d'écrire un article sur les différences entre l'immunité innée et le modèle de danger. Elle écrit avoir été très surprise par la requête, « *I was stumped* », se demandant comment comparer un système de cellules et de molécules qui fabriquent la première ligne de défense contre les pathogènes

et un modèle qui essaient de composer avec les mécanismes d'immunité et de tolérance de l'immunité adaptative. Polly était désespérée, « *It seemed like a request to compare apples and the rules of grammar* » (108).

Elle réalisa ensuite qu'il existait une intersection pour laquelle une comparaison pouvait être établie. C'est de cette démarche que découle la théorie du danger telle qu'elle est présentée actuellement. Des indices s'étaient accumulés pour désigner le système immunitaire inné comme le contrôleur ultime des réponses adaptatives par leur régulation des molécules de costimulation. Cela avait conduit à l'extension du modèle SNS vers l'INS. Avec celui-ci, la définition du non-soi incluait non seulement les molécules étrangères reconnues par les cellules B et T, mais également celles reconnues par le système immunitaire inné, que ce soit par des cellules comme les macrophages et les cellules dendritiques mais aussi par des molécules humorales comme celles de la cascade du complément. Polly termine « *This new, expanded view of self and non-self leads to somewhat different predictions from the older versions and this I think is what Charlie wanted me to compare with the Danger model* » (108).

d De la critique du SNS à la théorie du danger

i Transplantation, tumeurs et auto-immunité

La version originale du SNS prédisait que les transplantations et les tumeurs doivent être rejetées parce que les antigènes du non-soi présents devraient initier la réponse. Sa version étendue INS prédisait que ni l'une ni l'autre ne seraient rejetées car elles ne possédaient pas de ligand à reconnaître par les PRRs. L'auto-immunité n'est prédite ni par le SNS, ni par le INS puisque les lymphocytes B et T auto-réactifs ne devraient pas exister (108).

Or, il est indéniable que les greffes sont couramment rejetées tandis que les tumeurs ne le sont pas et que l'auto-immunité existe. Ainsi, bien que le modèle INS crée un contexte favorable à la costimulation et explique pourquoi les tumeurs peuvent ne pas être rejetées, elle enlève également l'ancienne explication quant au rejet de greffe et offre peu pour expliquer l'auto-immunité.

La théorie du danger englobe une explication de ces trois phénomènes, avec l'avantage certain de ne pas avoir à ajouter d'autres croyances. C'est pour moi une théorie très élégante, partant de postulats simples pour appréhender des phénomènes éminemment complexes. Je m'aligne sur la pensée d'Antoine de Saint-Exupéry citée ci-dessous.

ii Les bases de la théorie du danger

« La vérité, ce n'est point ce qui se démontre, c'est ce qui simplifie ».

Antoine de Saint-Exupéry
Terre des Hommes

La théorie INS se basait toujours sur la dichotomie soi/non-soi où le soi était défini, fixe et inaltérable. Polly Matzinger s'interroge : qu'arrive t-il lorsque le soi change ? Comment les organismes réussissent-ils à s'adapter à la puberté, la métamorphose et au vieillissement sans attaquer aux changements des tissus. Lors de la grossesse, pourquoi les mères de mammifères ne rejettent t'elles pas leur fœtus et n'attaquent t'elles pas leur tissu mammaire, lequel produit des protéines de lait complètement nouvelles ne faisant pas parti du « soi » initial ? Pourquoi échouons nous à créer des réponses immunes à des vaccins composés de protéines étrangères inertes sans ajouter d'adjuvant ? Pourquoi la plupart d'entre nous possèdent des lymphocytes auto-réactifs sans aucun signe d'auto-immunité, alors que quelques individus y succombent ? Pourquoi faillions nous à rejeter des tumeurs, alors que la plupart expriment clairement des protéines mutées ou nouvelles (33) ?

Loin d'ignorer ces questions embarrassantes, la théorie du danger est incroyablement puissante par sa portée prédictive. Elle abandonne le concept selon lequel le système immunitaire est avant tout concerné par le non-soi et regarde en détail les éléments contrôlant l'immunité. Le modèle de danger est basé sur l'idée selon laquelle les signaux ultimes contrôlant l'immunité ne sont pas exogènes mais endogènes. Ce sont des signaux dits « de danger » émanant de cellules stressées ou lésées. Elle propose que de telles cellules envoient des signaux de danger ou d'alarme qui servent à activer les APCs environnant. Le non-soi qui ne provoque pas de lésion ne générera aucune réponse, sans égard à sa dissémination chez l'hôte. Le soi provenant d'une expression génique, causant un stress ou une lésion, peut être immunogénique en absence d'intervention de tout élément étranger.

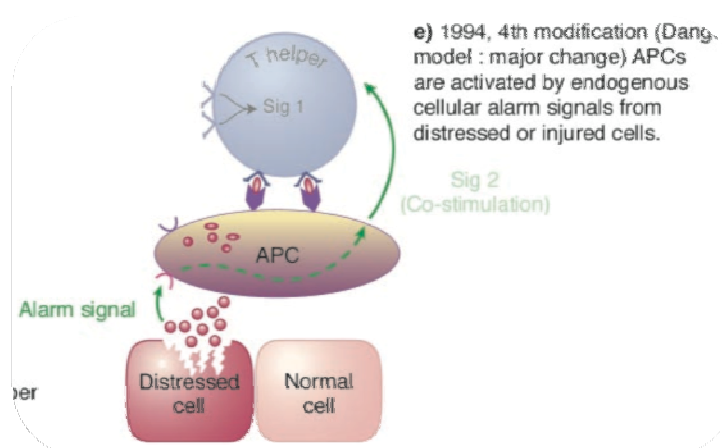


Figure 6e | Modèle de « danger » (33)
L'immunité est avant tout concernée par l'intégrité de l'hôte

Le modèle de danger conserve l'idée de Janeway selon laquelle les APCs ne sont pas constitutivement capable d'offrir des signaux de costimulation mais doivent en premier lieu être

Cette idée selon laquelle les APCs sont inactifs à la base et que les réponses immunitaires ne peuvent apparaître sans leur préalable activation est un point très important, seule véritable similarité entre le INS de Janeway et le Danger Model de Matzinger. C'est un écart consistant par rapport au concept de la suffisance du caractère étranger d'un antigène.

Cependant, à la différence du modèle INS qui supporte l'idée d'un antigène étranger obligatoire, le modèle de danger suggère que l'état d'activation d'un APC dépend de l'état des cellules avoisinantes. Les cellules saines n'émettent pas de signaux de danger et *a contrario* pourraient réprimer les APCs (109). Les cellules lésées, anormalement stressées, mourant d'une manière non physiologique doivent activer les APCs présents (109). A l'inverse les cellules qui meurent par apoptose envoient des signaux dits « *scavengers* » pour être digérées. Par exemple, le thymus est le siège d'une intense activité de sélection des lymphocytes qui ne laisse que très peu d'entre se développer. L'apoptose massive de centaines de milliers de cellules se réalise en absence de toute inflammation visible. A noter que dans d'autres cas, les cellules apoptotiques ne sont pas éliminées assez rapidement par l'environnement et dérivent en nécrose secondaire, laquelle est immunogénique.

La base de la théorie du danger, où les APCs sont activées par des signaux d'alarmes de cellules lésées telles celles exposées à des pathogènes, des toxines ou encore des lésions mécaniques, fut purement théorique au début. Dans l'histoire de l'immunologie, ce n'est pas la première fois qu'une telle situation se produit. Rappelons les cas Bretscher/Cohn (87) et Lafferty/Cunningham (89) qui se basèrent sur le comportement d'un système pour postuler l'existence de types cellulaires ou de signaux. Et que dire de Janeway qui, partant de l'effet d'adjuvant, déduit la nature non constitutivement active des APC et l'existence de PRRs (102).

De nombreux signaux de dangers ont été identifiés ces dernières années. Ils peuvent être notamment constitutifs ou inductibles, intracellulaires, sécrétés ou dérivés de la matrice extracellulaire. Les cellules en mort cellulaire programmée sont habituellement phagocytées avant de se désintégrer, tandis que les cellules en nécrose libèrent leur contenu, chaque produit intracellulaire pouvant être potentiellement un signal de danger (Cf. discussion). Les signaux inductibles sont des substances créées ou modifiées par des cellules stressées ou lésées. Dans le cadre de cette étude, deux signaux ont été étudiés, l'ATP (**A**denosine **T**ri-**P**hosphate) extracellulaire et l'acide urique. Ces deux molécules sont évidemment présentes en physiologie et apparaissent indispensables. Ce qui, on le verra plus tard, va faire d'eux des signaux d'alerte se joue en terme de présence de extracellulaire, de quantité émise, de cinétique, d'environnement moléculaire et cellulaire.

Cette vision nouvelle peut apparaître comme un simple pas de plus sur le chemin de l'appréhension des mécanismes immunitaires et des interactions cellulaires. Polly Matzinger y voit, moi aussi dans une bien moindre mesure, une avancée majeure, une rupture d'avec l'ancien modèle, une chute vers un terrain nouveau à explorer dans laquelle le caractère étranger d'un pathogène n'est

plus une caractéristique importante quant à l'émission d'une réponse et une composante du soi n'est plus une garantie de tolérance. Rappelons le pouvoir prédictif de cette vision, permettant une meilleure compréhension théorique de nombreux points chauds de l'immunité. L'allergie, par exemple, où de nombreux allergènes seraient des substances dangereuses reconnues comme potentiellement délétères. Der-p1, l'allergène principal contenu dans les « *house dust mites* » est une protéase qui attaque la surface des cellules B et de l'épithélium pulmonaire. Il en va de même du venin d'abeille, lequel n'est pas sans innocuité. La réponse aux allergènes s'intégrerait dans la théorie du danger, bien qu'il demeure obscur pourquoi certains individus fabriqueront des IgG tandis que d'autres feront des IgE, l'anticorps associé à l'allergie.

Auparavant la doxa scientifique voyait le contrôle de l'immunité gouverné par les cellules B et T. Puis la découverte du rôle des APCs et de la costimulation mena à l'idée que le contrôle initial de l'immunité était dévolu au système immunitaire inné. Le modèle de danger suggère que ni les systèmes immunitaires inné ou acquis en sont responsables. Cette fonction appartiendrait aux tissus eux mêmes, compréhensible au sens où « l'immunité innée » serait bien antérieure au « système immunitaire innée ».

Qui mieux que Polly elle-même pour résumer en quelques mots que « *the Danger model assumes that what really matters, from an evolutionary point of view, is whether that entity causes damage or not* » (108).

6 Nouvelles du front ; innate immunity : quo vadis

« *If you don't know where you are going, you will wind up somewhere else* »

YogiBerra, joueur de baseball américain

Cité par Ruslan Medzhitov (110)



Chris Sharp

Figure 7 | Immunité innée : quel devenir? (110)

Je crois fermement à la théorie du danger, dans le registre de ce qui pourrait s'apparenter à une conviction et qui ne tient pas de scientifique. Celle-ci devra sans conteste subir de nombreuses modifications et arrangements, voire servir de substrat à une autre théorie qui appréhendera mieux les découvertes récentes. Il arrive souvent que la démarche intellectuelle d'une théorie soit globalement correcte mais que certaines descriptions, certains raisonnements ou certaines explications de résultats se révèlent incorrectes. Il me semble que j'ai trop tendance à parfois schématiser à l'excès et ramener la théorie du danger à son détecteur cytosolique en vogue, l'inflammasome Nlrp3.

Prenons l'exemple de l'effet de l'alum. *In vitro*, il fut montré que cet adjuvant permettait la production de IL-1 β par l'inflammasome Nlrp3 (111). La présence de cet adjuvant lors de l'administration d'un antigène génère un environnement pro-inflammatoire qui permet d'amalgamer l'antigène comme potentiellement nuisible (112). Deux études plus abouties ont récemment remis sérieusement en question le rôle prépondérant de l'inflammasome Nlrp3 et de l'IL-1 β dans l'effet adjuvant de l'alum *in vivo*. Une étude montre le rôle critique de la prostaglandine E2 dans la l'établissement de la réponse Th2 et ceci en absence de Nlrp3 (113). Une autre équipe propose que l'effet de l'alum passe par la production endogène d'acide urique mais que celui-ci agit indépendamment de Nlrp3 pour aider à la création d'une réponse Th2 (114). De quoi brouiller les cartes ! Oui et non. L'acide urique produit est lui même un signal de danger endogène. Son indépendance apparente vis à vis de l'inflammasome complexifie la régulation de la mise en œuvre de l'immunité et ne fait que rendre cette étude plus intéressante.

Avant de rentrer plus en avant dans le vif du sujet de cette thèse, centralisée sur l'immunité innée et la théorie du danger, méditons quelques instants sur une métaphore de James Travis qui s'interroge : « *Did the innate and adaptive arms truly evolve to keep out harmful organisms? Or instead, are one or both more like bouncers at a nightclub, honed for the more subtle task of allowing the right microbes in and kicking the less desirable ones out?* » (12)

C. Nalp3, découverte et parallélisme. Désordres inflammatoires, apoptosome, inflammasome

1 Préambule

Dans la recherche des découvertes qui menèrent à l'identification de l'inflammasome, l'attention se porte sur la période couvrant le franchissement du millénaire. Les avancées conjointes de la biologie moléculaire et de l'informatique ont permis l'identification et la localisation massive de gènes, leur clonage, l'utilisation de cDNA, le séquençage de protéines, le tout compilé dans d'immenses banques de données souvent libre d'accès. L'analyse des séquences protéiques permet de caractériser des domaines structuraux ou fonctionnels, de réaliser l'assemblage en famille et d'obtenir des informations permettant une meilleure compréhension des voies de signalisation.

Au revers de la médaille, il n'est pas rare qu'un même gène, une même protéine ou l'un de ses domaines portent des noms différents, plusieurs équipes baptisant ce qu'ils croyaient être une découverte. Apparaît aussi la volonté de classer en une nomenclature propre et nouvelle, censée clarifier. Parfois l'un de ces noms a supplanté les autres, parfois plusieurs restent, dont les utilisations propres restent affectées au domaine de recherche ou à l'habitude. Souvent maintenant les chercheurs établissent de grandes listes épurées appelées à la simplification mais non à la mémorisation. L'étude de ce langage scientifique, au travers de son histoire, de son évolution, de son devenir, rehaussée d'anecdotes cocasses, serait de la même trempe que d'entreprendre l'assainissement des écuries d'Augias. La suite va en donner une illustration, dans le cadre de la découverte de l'inflammasome où je m'excuse par avance de l'opacité et l'enchevêtrement d'acronymes.

2 Découvertes des gènes de pathologies auto-inflammatoires

Comme souvent en science, des études *a priori* éloignées peuvent se voir regrouper aux lumières de l'amélioration des connaissances, aux moyens des technologies disponibles ou d'une synthèse des résultats. La maladie appelée « *Familial cold urticaria* » (FCU) ou « *Familial cold autoinflammatory syndrome* » (FCAS) est une maladie inflammatoire autosomale dominante rare caractérisée par des épisodes intermittents de crises avec fièvre, arthralgie, conjonctivite et leucocytose. Ces symptômes apparaissent après une exposition générale au froid et persistent généralement de 24 à 48h (115). Les composantes génétiques et environnementales de cette pathologie sont connues depuis longtemps. Il paraissait en 1948 l'article « *Familial Urticaria due to cold* » (116). Un demi-siècle plus tard, une équipe allemande utilisa la cartographie par microsatellites pour identifier la région chromosomique touchée sur deux larges familles atteintes de FCAS (117). Une liaison fut établie entre la pathologie et la région chromosomique 1q44. En outre l'une des deux familles de l'étude présentait les symptômes du syndrome de Muckle-Wells (MWS). Le MWS est une maladie également autosomale dominante générant des fièvres périodiques d'un phénotype similaire exceptée la non association à l'exposition au froid et la présence fréquente d'une perte de l'audition (118). Dans d'autres cas, certains individus souffrant de FCAS développent tardivement une amyloïdose rénale, ce qui renvoie au MWS. Selon les auteurs « *the similarity of clinical symptoms and the location in the same interval suggest that both entities [...] could be caused by the mutations in the same locus* » (115). Bien que leur antériorité n'est pas contestable sur le raisonnement, leur travaux ne semble avoir donné lieu qu'à la présentation d'un poster dont l'abstract est disponible dans les suppléments du volume 59 d'octobre 1996 de *l'American Journal of Human Genetics* (117). Il ne m'a pas été possible de trouver un article complet publié la même année ou un peu plus tard.

Le même journal vit la publication ultérieure de deux articles positionnant MWS et FCAS effectivement liés au chromosome 1q44. En 1999, Grasset et al. étudièrent 35 personnes réparties en trois familles et localisèrent le MWS (119) et en 2000, l'analyse de 69 individus appartenant à cinq

familles atteintes de FCAS permis à Hoffman et al. le ciblage de la même zone génétique 1q44 (115). Cherchant à caractériser les gènes affectés lors de la pathologie au sein du chromosome 1q44, Hoffman publia en 2001 une étude des exons codés par cette région à la recherche de mutations présentes chez les sujets affectés. Il identifia quatre mutations distinctes dans le gène qui ségrégait avec la pathologie dans trois familles atteintes de FCAS et une de MWS qu'il appela CIAS1 (**C**old-**I**nduced **A**utoinflammatory **S**ndrome **1**) (118).

De nombreuses autres études ont été réalisées et ont menées à l'identification d'autres mutations au sein de ce gène. Citons un article publié l'année suivante qui identifie 5 nouvelles mutations localisées dans l'exon 3 de CIAS1 au sein de 12 familles atteintes de MWS ou FCU (120).

La même année, une troisième et dernière pathologie fut identifiée comme causée par des mutations dans le même gène CIAS1 (121) chez 7 individus non apparentés. Il s'agit du syndrome CINCA (**C**hronic **I**nfantile **N**eurological **C**utaneous and **A**rticular syndrome), encore connu sous le nom de NOMID (**N**eonatal **O**nsset **M**ultisystemic **I**nflammatory **D**isease). Désordre congénital rare mais plus grave que MWS et FCAS, il se caractérise par des symptômes cutanés néonataux, des méningites chroniques et des manifestations articulaires associées à de la fièvre et de l'inflammation (122-124). Les membres sont plus courts et un retard de croissance s'installe, suivis de déficits visuel et auditif. Des cas familiaux ont été rapportés mais beaucoup plus rare que l'apparition sporadique, ce qui avait auparavant permis de suggérer un mécanisme autosomale dominant.

Au total, ce sont donc trois pathologies qui apparaissent être liées à la même déficience du gène CIAS1. D'autres gènes causant d'autres types de désordres auto-inflammatoires ont été identifiés durant la même période, étendant la possibilité de trouver des similarités dans les protéines ou les voies de signalisations associées. Parmi ces pathologies, la FMF (**F**amilial **M**editerranean **F**ever) est une maladie autosomique récessive très fréquente au sein de plusieurs populations du pourtour méditerranéen, avec un maximum d'une personne sur six pour les juifs nord-africains (125). Un regroupement d'équipes françaises, auto-baptisé « *The french FMF consortium* », identifia une région minimale de 60kb qui ségrége avec la maladie, laquelle permet la synthèse d'au moins quatre transcrits. Le candidat le plus probable code une protéine que le groupe baptisa Marenosttrin (*mare nostrum* en latin signifiant bassin méditerranéen). A un mois d'intervalle, un autre regroupement d'équipes internationales « *The International FMF Consortium* », identifia une protéine qu'ils nommèrent Pyrin, « *to connote its relationship to fever* », comme responsable de la pathologie (126).

Ainsi, les désordres de la même protéine appelée Pyrin ou Marenosttrin furent directement associés à la FMF, Fièvre Méditerranéenne Familiale. C'est sur la base d'un domaine protéique de la Pyrin, confusément appelé PYRIN, que la découverte de l'inflammasome s'appuiera.

3 Les « death domains »

a Quelques mots sur l'apoptose

L'apoptose, du grec signifiant « feuilles tombant de l'arbre », est une mort cellulaire programmée commune à tous les métazoaires (127). Elle maintient l'homéostasie en permettant aux cellules à éliminer d'enclencher leur propre mort activement, sans causer de dommage ni d'inflammation tissulaires. Sans apoptose pas de doigts formé, un humain de 80 ans cumulerait une masse de cellules de la moelle osseuse et des nœuds lymphatiques d'environ deux tonnes et l'intestin serait long de 16 km (127). Une cellule entre en apoptose suite à l'intégration de signaux extra- ou intra-cellulaires. Les situations sont légions, allant de l'ontogénèse au renouvellement cellulaire en passant par la sélection thymique ou encore des cas de cellules infectées, incapables de maintenir leur métabolisme ou de franchir correctement les étapes critiques du cycle cellulaire. Près de 60 000 articles référencés sur Pubmed ont le mot « *apoptosis* » dans leur titre, le premier datant de 1972.

Les premières études apparaissent très empiriques, rapportant les nombreuses situations où l'apoptose est observée sans pouvoir y adresser une signalisation moléculaire. Beaucoup de ces études de la première heure ont trait au cancer, à la transformation cellulaire et aux effets cliniques des radiations. On y apprend aussi à reconnaître les caractéristiques ultra-structurales de l'apoptose, telle la condensation de la chromatine (128). Il est intrigant pour moi de voir qu'une étude de 1991 montre que l'ATP extracellulaire est pro-apoptotique et que le mécanisme mis en jeu dépend d'une augmentation rapide la concentration cytoplasmique en calcium (129).

L'animal modèle de choix dans l'étude des mécanismes moléculaires a été *Caenorhabditis Elegans*. En plus d'être transparent, ce nématode a la particularité de présenter une croissance cellulaire depuis la cellule œuf extrêmement bien défini. Le jeune *C. elegans* possédera un maximum de 1030 cellules pendant son développement et en perdra très exactement 131 pour n'en posséder plus que 959 une fois adulte. Ce déficit cellulaire se réalise par apoptose comme l'ont montré les pères fondateurs de ce modèle, Sydney Brenner, John Sulston et Bob Horvitz, lauréat du prix Nobel en 2002.

La compréhension de mécanismes de bases de l'apoptose est fondamentale en ce sens que le modèle principal présenté dans les résultats de ce manuscrit utilise un inducteur de l'apoptose, la bléomycine (130).

b Découverte du death domain CARD

Simplifiant au maximum le champ très vaste d'études réalisées sur l'apoptose, notre regard s'arrête sur deux études publiées en 1992/93 qui identifient deux gènes, *ced-3* et *ced-4*, comme essentiels pour l'exécution de la mort cellulaire programmée chez *C. elegans* (131, 132). En 1997, l'homologue de *ced-4* chez les mammifères, Apaf-1, est identifié (133). Les diverses protéines

connues impliquées dans l'apoptose comprenaient des domaines protéiques dit « de mort » appelés DD « **Death Domain** » ou DED « **Death Effector Domain** » essentiels pour la communication protéine-protéine.

En 1997, Tschopp et al. font paraître un court article où ils annoncent la découverte d'un nouveau domaine de mort. Etudiant sur des bases de données la signalisation pro-apoptotique entre les récepteurs TNFR1 et TNFR2 (**Tumor Necrosis Factor Receptor**) en amont et l'activation de caspases en aval, ils ont identifié un nouveau module d'association homotypique qu'ils baptisèrent CARD pour **CA**spase **R**ecruitment **D**omain (134). Ils rapportent que toutes les protéines identifiées avec un CARD ont un lien avec l'apoptose. Bien que non référencée dans cet article comme protéine possédant un domaine CARD, Apaf-1 le sera par la suite.

c Découverte de NOD1

En mai 1999, outre le cas particulier de CIITA (**MHC Class II Transactivation Factor**), deux équipes identifient pour la première fois NOD1 (**N**ucleotide-binding **O**ligomerization **D**omain-1) un membre de la superfamille de ce qui deviendra les NLRs (**Nod-Like Receptors**).

i Par son domaine CARD

Un premier groupe dirigé par Peter DiStefano identifie par homologie et alignement de séquences, sur la base de CED-4 (*C. elegans*) et de Apaf-1 (mammifère), une protéine de la même famille des protéines de mort (135). Ils la baptisent CARD4 et montrent qu'elle coordonne à la fois l'activation de NFκB et l'apoptose, ce qui pourrait en faire un bon candidat impliqué dans la réponse immunitaire innée. CARD4 possède 3 domaines structuraux, deux communs avec Apaf1 et CED-4, CARD et NBS (**N**ucleotide-**B**inding **S**ite), et un domaine LRRs propre.

ii Par son domaine d'oligomérisation

La deuxième équipe, dirigée par Gabriel Núñez, identifie la même protéine en la baptisant Nod1 (136). Ils la nomment ainsi eu égard à la publication d'un article où était présenté un mécanisme conservé permettant à CED-4 d'activer CED-3 après oligomérisation d'un domaine putatif ATPase, NBS (**N**ucleotide **B**inding **S**ite)(137). Ce deuxième article de mai 1999 montre que Nod1 régule à la fois l'activation de NF-κB en se liant à Rick et l'apoptose.

Toutefois, la terminologie NOD pour rendre compte de ce domaine d'oligomérisation fut très vite remplacée par celle de NACHT, encore utilisée aujourd'hui. Outre CARD4/Nod1, NAIP (**N**euronal **A**poptosis **I**nhibitor **P**rotein) et CIITA (**MHC Class II Transcription Activator**) (138) d'autres protéines présentent un domaine central NTPase, telle la protéine de mammifère TP1 (**T**elomerase-associated **P**rotein-1) et celle d'un champignon, HET-E. Ce domaine fut appelé NACHT

comme acronyme des protéines **NAIP**, **CIIA**, **HET-E** et **TP1** en 2000 (139).

4 Découverte du death domain PYRIN

Une équipe nipponne identifia une protéine par la capacité qu'elle présente après lyse cellulaire au triton X-100 de s'agréger et d'apparaître comme une « tâche » (« *speck* ») lors de l'apoptose induite par des drogues anti-tumorales (140). Le clonage et le séquençage du cDNA permis de mettre en évidence la présence de deux domaines. Le domaine CARD aida à nommer la protéine ASC (**A**poptosis-associated **S**peck-like protein containing a **C**ARD). L'autre domaine qu'ils appellent *pyrin-like domain* est homologue à la partie N-term de la protéine Pyrin, dont rappelons que le dysfonctionnement est associé à la Familial Mediterranean Fever (126).

En 2000, trois domaines structuraux sont connus et reliés aux voies de signalisation de l'apoptose : les modules DD (**D**eath **D**omain), DED (**D**eath **E**ffector **D**omain) et CARD (**C**aspase-**A**ctivating **R**ecruitment **D**omain). Ils sont connus pour réaliser des interactions homotypiques permettant en aval l'activation d'effecteurs en réponse à des signaux de stress ou des stimuli de développement. Souhaitant aller plus loin dans l'étude de l'enchevêtrement de protéines liées à l'apoptose et de leurs signalisations, Bertin et DiStefano (141) ont fait preuve d'une démarche simple et élégante. Ils sont partis de la protéine nouvellement découverte CARD4/Nod1, membre de la même famille que Apaf-1, et ont réalisé une recherche d'alignement de séquence BLASTP. Leur attention fut soulevée par le fait que parmi les trois domaines composant Nod1, deux se retrouvent chez les plantes dans une famille de protéines connue pour être impliquée dans la mort cellulaire et le changement d'expression génique en réponse à l'infection. Nod1 comprend, en plus de CARD, un domaine central d'activation et l'oligomérisation NBS et un domaine C-term LRR qu'ils prédisaient pouvoir recevoir des signaux en amont.

Or la famille protéique NBS/LRR des plantes ne contient pas de CARD en N-term, mais soit un « *leucine zipper motif* », soit un « *Toll/interleukin-1 receptor (TIR)-homology domain* » permettant les interactions en aval. Les auteurs ont alors suggéré que des membres de la famille des protéines contenant NBS/LRR chez les animaux pourraient utiliser d'autres modules que CARD en N-term. Partant de la séquence de NBS de Nod1, une recherche BLASTP permit d'identifier deux autres protéines aux structures et fonctions inconnues. Ils nommèrent ces protéines NBS1 (**N**ucleotide-**B**inding **S**ite protein **1**) (futur NALP2) et CARD7 (futur NALP1). Un domaine CARD fut trouvé sur CARD7 mais pas sur NBS1.

Afin d'identifier les régions N-term de ces deux protéines, ils firent de nouveaux des BLASTP en partant cette fois de divers fragments situés en N-term des deux protéines. Aucun module référencé ne fut identifié. Cependant, les parties N-term des deux protéines CARD7 et NBS1 présentaient une très forte similarité avec la région N-term d'une protéine Pyrin. Bien que la fonction précise de cette

protéine fût encore inconnue, sa relation avec la FMF permet de supposer un lien avec la régulation de la signalisation inflammatoire dans les cellules myéloïdes. Ils nommèrent cette région N-Term commune entre les protéines NBS1, CARD7 et Pyrin, le domaine PYRIN. Sachant que les régions N-term des membres de la famille NBS/LRR précédemment identifiés sont des domaines d'interactions protéiques, ils supposèrent de même pour le domaine PYRIN. Ils rapportèrent également la présence du domaine PYRIN sur les protéines ASC humaine (140) et caspase-13 du poisson zèbre. ASC présente une structure bipartite avec PYRIN en N-term et CARD en C-term, ce qui leur permit de supposer qu'elle fonctionne comme une protéine FADD-like, protéine adaptatrice dans la voie de l'apoptose extrinsèque.

Des recherches similaires ont été effectuées par deux autres équipes, qui identifièrent toutes deux le motif PYRIN au sein de plusieurs protéines qui entretiennent un lien avec l'apoptose. Une équipe l'avait nommé DAPIN (**D**omain in **A**poptosis and **I**Nterferon response) (142) et la seconde PAAD (renvoyant aux noms des protéines identifiées avec ce domaine, **P**yrin, **A**IM, **A**SC, **C**ARD) (142).

Le nom PYRIN est aujourd'hui le mieux reconnu, avec toutefois des contre-exemples comme sur base de donnée suisse « *ExPASy Proteomics Server* » où c'est encore DAPIN qui prévaut. L'appartenance du domaine PYRIN au domaine de « mort » est résolument fixée cette même année 2001, d'abord de façon prudente par Tchopp et al. (143) puis catégorique par Dixit et al. (144) qui en outre y ajoute comme membres AIM2 (**A**bsent **I**n **M**elanoma-2), MNDA (**M**yeloid cell **N**uclear **D**ifferentiation **A**ntigen) et IFI16 (**I**nter**F**eron-**I**nductible protein-16). Partant du domaine PYRIN de CARD7, ces derniers ont construit un modèle de structures en 3D en comparant avec les domaines DD et CARD. La conclusion de leurs expériences accrédite l'appartenance du domaine PYRIN à la famille des domaines de mort.

5 Découverte des NALPs

La recherche de protéines impliquées dans l'inflammation et l'apoptose par le domaine PYRIN a permis la découverte ce qui deviendra bientôt les NALPs. Dans une lettre courte adressée aux éditeurs de *Cell Death and Differentiation* en 2000, Bertin et DiStefano présentent leur résultats et identifient deux protéines, CARD7 et NBS1 qui seront les futurs NALP1 et NALP2 (141). Ils sont les premiers à les avoir identifiés. Rappelons que c'était par homologie de séquence et non par étude fonctionnelle. La première réelle étude sur NALP1 viendra l'année suivante où la protéine qu'ils découvrent est appelée NAC pour Nucleotide-binding And Card (145). Les auteurs montrent que le domaine CARD de NAC interagit sélectivement avec le domaine CARD d'Apaf1. Il était connu qu'Apaf-1 active la procaspase-9 après liaison du cytochrome C libéré par les mitochondries. Or ici cette activation de caspases par le cytochrome C est augmentée en surexprimant NAC et diminuée lorsque celle-ci est atténuée. Aux vues de leurs résultats, les auteurs estiment que NAC/Nalp1 jouerait

un rôle important dans la régulation de l'activité de l'apoptosome mais n'interviendrait pas dans la régulation de la voie NF- κ B.

Une autre étude de la même année suggère également que NALP1 serait un nouveau membre de la famille Ced4/Apaf-1. La protéine identifiée est appelé DEFCAP (**D**eath **E**ffector **F**ilament-forming **C**ed-4-like **A**poptosis **P**rotein) (146). Les auteurs notent que tout comme Apaf-1 et Nod1, DEFCAP contient un domaine CARD et un domaine NB et que comme Nod1, mais à la différence de Apaf-1, DEFCAP contient de nombreux LRRs. Une caractéristique particulière est la présence en N-term d'un domaine Pyrin-like. Les deux isoformes étudiées de la protéine DEFCAP interagissent fortement avec la Casp-2 et plus faiblement avec la Casp-9, ce qui suggère que DEFCAP est un nouveau membre de la famille Ced-4/Apaf-1, capable d'induire l'apoptose.

La découverte de CIAS1/NALP3 en tant que protéine associée aux désordres auto-inflammatoires FCAS est attribuée selon moi au groupe de Hal Hoffman et de Richard Kolodner (115). Ils identifient le gène CIAS1 qui code pour la protéine Cryopyrin et montrent qu'elle contient plusieurs domaines prédictifs connus. En N-term un domaine PYRIN (141, 143, 147), un domaine central NB (NACHT) dans l'exon 3 (139) et un domaine C-term contenant plusieurs LRRs (148). Les auteurs mentionnent bien que deux autres protéines, NALP1/CARD7/DEFCAP et NALP2/NBS1 ont été récemment identifiées comme possédant les trois mêmes domaines. Ils font remarquer que NALP2 partagent la plus grande homologie avec cryopyrin.

Il existe plusieurs autres protéines impliquées dans l'apoptose ou l'immunité innée qui partagent des similarités de structures avec la protéine cryopyrin, incluant NOD1 (CARD4), NOD2 (CARD15), ASC ainsi que des protéines de gènes de résistance telles RPS2. Des mutations dans le gène codant pour NOD2 sont corrélées avec deux pathologies inflammatoires, le syndrome de BLAU et la maladie de Crohn (149-151). Toutes ces données suggéraient que cryopyrin était une protéine de signalisation impliquée dans la régulation de l'inflammation et de l'apoptose, bien que cela restait à démontrer expérimentalement.

6 Premiers pas vers la découverte de l'inflammasome

La revue précédemment citée par Tschopp et al. (143) montre pour la première fois que le domaine Pyrin (PYD) de NALP1 est capable d'interagir avec PYD de ASC (ici baptisé PYCARD). C'est également dans cette revue qu'est introduite la nomenclature NALP (**N**ACHT-, **L**RR- and **P**YD-containing proteins) avec comme seuls membres référencés Nalp1 et Nalp2.

Le nom de NALP3 à la place de Cryopyrin/PYPAF1 (cf. ci-dessous) apparaîtra en septembre 2002 dans un papier de Aganna et al. (152). Les auteurs retiennent la terminologie NALP considérant l'homologie de NALP3 avec les autres NALP identifiés. Il s'agit d'un article étudiant des familles portant des mutations de NALP3 en lien avec soit FCAS, soit MWS, soit les deux.

En janvier 2002, une équipe annonce avoir découvert une protéine qu'il nomme PYPAF1 (**PYRIN-containing APAF1-like protein-1**) membre de la famille des protéines de signalisations NBS/LRR (153). Il s'agit en réalité de la protéine NALP3, nouvellement décrite par Hofman et al. sous le nom de Cryopyrin et impliquée dans les FCAS. L'équipe localise leur découverte comme codée par un gène situé en 1q44 et cite le papier de Hoffman et al. (118), mais ne mentionne pas l'hypothèse qu'il pourrait s'agir de la même protéine. Cependant, leur découverte réellement nouvelle a été d'identifier le domaine PYD de PYPAF1/NALP3 capable de s'associer spécifiquement avec le domaine PYD de ASC. Leurs données supportent l'idée que PYPAF1/NALP3 et ASC fonctionnent comme des activateurs situés en amont de la signalisation NFκB.

La nouvelle de la découverte d'un inflammasome surviendra en août 2002 par Martinon et al. dans *Molecular Cell* (154). Les auteurs rapportent que la formation d'IL-1β mature nécessite l'activité de la caspase-1 mais que le mécanisme mis en œuvre reste vague. Or ils rappellent que l'IL-1β est la première cause de l'inflammation aiguë et chronique (155) et que son activité est finement régulée à plusieurs niveaux (156). Il sera important pour la suite de mentionner que toutes les expériences ont été réalisées, soit par surexpression dans la lignée cellulaire 293T, soit par incubation d'extraits cellulaires de monocytes humains THP1. Ils identifient l'inflammasome comme un complexe moléculaire capable d'activer des caspases et de maturer l'IL-1β. L'inflammasome est découvert sur cellules humaines comme comprenant les Casp-1 -5, ASC et Nalp1. D'autres activateurs de la Casp-1 étaient déjà connus. La kinase RIP-2 (157) et Ipaf/CARD12 (158) mais le mécanisme mis en jeu pour former de l'IL-1β n'avait pas été rapporté.

Il existait également des données indirectes qui tendaient à montrer que les membres de la famille NALP sont impliqués dans la maturation de l'IL-1β. Les auteurs, ainsi que d'autres groupes (152) (118) ont récemment identifié que des patients souffrant de MWS portaient des mutations dans le domaine NBS (NACHT). Or cette pathologie autosomale dominante est caractérisée par des épisodes intermittents de fièvres, souvent provoqués par une augmentation de la production d'IL-1β. En se basant sur les données présentées ici, les auteurs proposent que les mutations apparaissant dans NALP3 pourraient conduire à la dérégulation des caspases pro-inflammatoires causant les épisodes spontanés de fièvre.

7 De l'apoptosome à l'inflammasome

En prenant comme référence la manière dont Apaf-1 réalise la formation d'un complexe appelé apoptosome (159, 160), Tschopp proposa que NALP1 permet la formation d'un complexe qu'il appela inflammasome. L'inflammasome est un complexe moléculaire qui en s'activant conduit à la maturation par coupure protéolytique de la pro-interleukine 1 beta (proIL-1β), cytokine fortement pro-inflammatoire.

Pour Apaf-1, il a été montré que la libération de cytochrome C par les mitochondries permet le

recrutement et l'activation de la procaspase-9 (159). Il restait à définir quels mécanismes sont à l'origine de la liaison NALP1/ASC ainsi que du recrutement et de l'activation de la procaspase-1 et probablement de la procaspase-5. Leurs auteurs suggèrent que le domaine LRR de Nalp1, domaine également présent sur les TLRs et les NODs, pourrait reconnaître des PAMPs (161)(162, 163) et/ou des alarmines (33, 109, 164, 165) et pourrait être à l'origine de la formation de l'inflammasome. Le fait que la rupture de l'intégrité cellulaire, probablement résultant de signaux de dangers endogènes, est suffisante pour activer la maturation de IL-1 β supporte l'idée que les LRRs agissent comme unités régulatrices des NALPs. NALP1 fait partie de la famille des protéines contenant les domaines PYRIN, NBS et LRR qui comprend 14 membres chez l'homme. Puisque NALP2 et NALP3 interagissent également avec ASC (153), différents NALPs pourraient avoir évolués pour reconnaître un large panel de pathogènes et de molécules endogènes.

Rappelons par ailleurs que Nalp1 fut auparavant identifié comme interagissant avec Apaf1 et capable de réguler l'apoptose en prenant part à la formation de l'apoptosome (145).

8 La découverte de l'inflammasome NALP3

Si l'inflammasome a été découvert en étudiant NALP1, il ressort de la littérature actuelle que c'est l'étude de l'inflammasome NALP3 qui est maintenant au centre des recherches. Le premier article relatant l'intervention de NALP3 dans la formation d'un inflammasome paraît en 2004 par Agostini et al. (166).

Ils rapportent tout d'abord qu'en dehors de NALP1 (143), NALP2 et NALP3 s'associent aussi avec ASC et la caspase-1 (mais pas la caspase-5) et que la seule surexpression de l'une de ces trois protéines n'est pas suffisante pour la maturation de IL-1 β . Il est important de préciser qu'il s'agit ici encore d'expériences réalisées avec des extraits cellulaires d'une lignée de monocytes humains (THP-1) ou avec des cellules 293T surexprimant artificiellement les différents membres de l'inflammasome.

Sans prétraitement particulier, l'incubation d'extraits cellulaires de THP1 permet la formation spontanée de l'inflammasome NALP3. Le mécanisme mis en jeu est très différent de celui nécessaire pour engager une signalisation fonctionnelle au sein d'une cellule entière.

Les auteurs ont également testé l'hypothèse que les désordres auto-inflammatoires associés à NALP3 pourraient être due à une suractivité de la forme mutée. Ils ont isolé des monocytes du sang d'un patient souffrant du syndrome de Muckle-Wells et l'ont comparé aux mêmes cellules d'un sujet sain. Ils notèrent la présence d'IL-1 β mature dans le surnageant de culture des monocytes du sujet malade mais pas dans celui du sujet sain, pour lequel l'addition préalable de LPS étaient nécessaire. Il est maintenant très bien admis que cette stimulation au LPS appelée « priming » est nécessaire dans bon nombre de cas pour doser de l'IL-1 β mature in vitro à partir de macrophages/cellules dendritiques. Nous aurons l'occasion de revenir amplement sur cette étape qui n'est pas aussi trivial que le laisserait supposer la littérature.

Enfin, comme pertinence clinique de leur découverte, les auteurs rapportent que l'utilisation de l'antagoniste endogène du récepteur à l'IL-1 β , IL-1Ra (**R**eceptor **a**ntagonist) s'est montrée très efficace pour soigner des patients souffrant du syndrome de Muckle-Wells (166).

9 La famille des *Nod-like Receptors (NLRs)*

Les NLRs comprennent 22 gènes chez l'Homme et nettement plus chez la souris par duplications de gènes survenues ultérieurement à la séparation d'avec leur ancêtre commun (167).

Les protéines NLR ont toutes un domaine central NACHT d'oligomérisation et de liaison aux nucléotides. A l'exception de Nlrp10, tous les NLRs possèdent un domaine LRR en C-term. La région N-term est un peu plus variable, souvent pourvue d'un domaine dit de mort, CARD ou PYD.

La présence de LRRs est intrigante. Ce domaine est présent chez de très nombreux organismes, végétaux ou animaux. Il est connu comme capable de lier les ligands des TLRs. Malgré l'absence de données irréfutables, il reste supposé que ce domaine fonctionne comme détecteur de ligand des NLRs. En revanche, son rôle dans l'autorégulation de la protéine est mieux connu. En dehors de toute stimulation, la protéine est conformée de telle manière que le domaine d'oligomérisation NACHT est caché par le repliement du domaine LRRs. Après activation, un changement de conformation expose le domaine NACHT, ce qui initie la cascade de réaction à l'origine de la formation du complexe inflammasome.

L'étude phylogénétique du domaine NACHT révèle la présence de 3 sous-familles distinctes, les NODs, les NLRPs (anciennement NALPs) et celle regroupant Nlrc4 et NAIP. Pour mémoire la protéine CIITA (**C**lass **I**I **T**ransactivator) fut en 1993 le premier NLR décrit (168). CIITA appartient à la famille des NODs (169). Son action nucléaire de régulation de la transcription le distingue des autres NLRs. Les autres NLRs surveillent majoritairement le cytoplasme quant à la présence de PAMPs et de DAMPs (**D**anger **A**ssociated **M**olecular **P**attern).

A noter qu'à l'état basal, les NLRs ont souvent été associés avec des protéines qui les maintiendraient dans un état inactif mais prêtes à être activables. HSP90 et SGT1 interagissent avec Nlrp3 (170), Nlrc4, NOD1, NOD2 et Nlrp12 (171).

Les NOD

Les protéines Nod1 et Nod2 répondent à la présence dans le cytoplasme de produit de dégradation du peptidoglycane contenu dans les parois bactériennes. Nod1 répond à l'acide γ -D-isoglutamyl diaminopimelique (172) et Nod2 au muramyl dipeptide (173). La différence de structure entre les deux protéines tient au fait que Nod1 présente un domaine CARD en N-terminal alors que Nod2 en possède deux. Nod1 et Nod2 recrutent RIP2 par interaction CARD-CARD et conduisent finalement à l'activation de NF- κ B et à la synthèse de gènes pro-inflammatoires (174). Chez l'homme

les mutations dans NOD2 sont associées notamment à la maladie de Crohn et au syndrome de BLAU (151). Il existe d'autres NOD donc les fonctions exactes restent à définir dont NOD5 qui serait mitochondriale et servirait à la défense antivirale (175).

Les NLRPs

Il existe 14 NLRPs (anciennement Nalp) chez l'homme et au moins 20 chez la souris. Certains NLRP sont paralogues, c'est à dire qu'il existe un lien évolutif entre des gènes issus d'un événement de duplication. C'est par exemple le cas pour NLRP2 et NLRP7. Cependant d'autres NLRP ne se sont diversifiés que chez la souris, comme pour NLRP4 et NLRP9 avec respectivement 7 et 3 équivalents chez la souris (169). Les NLRP7, 8, 11 et 13 sont absents chez la souris. Les rôles de la majorité des NLRP ne sont pas bien documentés. Toutefois les expressions de NLRP4, 5, 7, 8, 10 et 11 sont quasi-restreintes aux cellules de la lignée germinales et aux embryons avant implantation (169).

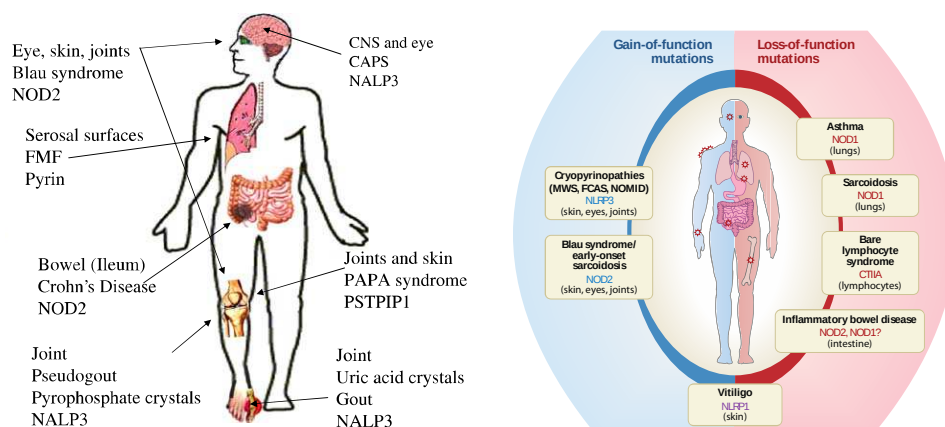


Figure 8 | Mutations dans les NLRs et associations avec des désordres auto-inflammatoires

A gauche (176) : dysfonctionnement de NLR et localisations anatomiques de pathologies associées

à droite (177) : Mutations perte de fonction (en bleu) ou gain de fonction (en rouge) de NLR et pathologies associées

De très nombreuses revues relatent plus en détail la grande famille des NLR, notamment le très exhaustif « *Annual Review of Immunology* » (169, 171, 177, 178). Le paragraphe suivant introduit les membres connus pour réguler l'activité de la casp-1 en formant des inflammasomes.

10 Les inflammasomes

Parmi tous les NLRs décrits, cinq ont été montré comme pouvant être à l'origine d'un complexe moléculaire appelé inflammasome. Il s'agit des inflammasomes charpentés autour de protéines Nlrp1, Nlrp3, AIM2, Nlrp4 et tout récemment Nlrp6. Un inflammasome est un complexe protéique cytoplasmique capable d'activer des caspases pro-inflammatoires et d'activer les cytokines IL-1 β et IL-18.

Etant donné la similarité de structure d'autres NLRs avec les précédents cités, il paraît raisonnable de spéculer sur la découverte future d'autres inflammasomes. Par exemple, Jenny Ting

rapporte que des études ont montré que les surexpressions ectopiques de NLRP2, NLRP12 et NOD2 associées à celles d'ASC et de la caspase-1 conduisent à l'activation de cette dernière et la production d'IL-1 β mature (171). Ces expériences hautement artificielles nécessitent une validation fonctionnelle.

Les associations fortes entre la dérégulation de l'activité des inflammasomes et des pathologies héréditaires inflammatoires acquises mettent en lumière l'importance de cette voie de signalisation dans les réponses immunitaires (169).

Inflammasome Nlrp4 (IPAF)

La protéine NLRC4 est principalement exprimée par les cellules hématopoïétiques. Son domaine CARD permet le recrutement direct de la pro-caspase-1 (158), une sécrétion de IL-1 β et IL-18 et une mort cellulaire rapide par pyroptose (171). Toutefois ASC semble jouer un rôle dans certains cas, parfois nécessaire pour la production de IL-1 β (179) mais pas pour la pyroptose (171). Cet inflammasome protège l'hôte contre des infections par les bactéries Gram⁻ *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* et *Legionella* (179). Ces bactéries possèdent un appareil de sécrétion de type III ou IV et sont flagellées. L'inflammasome NLRC4 reconnaît la flagelline intracellulaire (180) dont l'entrée dépendrait de l'intégrité des systèmes de sécrétions (181). Aucune preuve de liaison physique entre NLRC4 et la flagelline n'est rapportée. A noter que NLRC4 peut interagir avec NAIP5 pour un effet coopératif.

Inflammasome Nlrp1

NLRP1 fut initialement découverte pour son rôle dans le recrutement des caspase-2 et -9 et son aide à la formation de l'apoptosome (146). La protéine NLRP1 présente une expression large incluant les cellules hématopoïétiques, les cellules adaptatives et des cellules non-hématopoïétiques (182). Elle possède à la fois un domaine PYD nécessaire au recrutement de ASC mais également CARD qui permet de s'en affranchir en recrutant directement la pro-caspase-1 et -5 (154) pour les maturations de IL-1 β /IL-18 et la pyroptose. ASC n'est pas requise mais augmente l'activité enzymatique du complexe NLRP1 (183). A noter que les orthologues murins de NLRP1 ne possèdent pas de domaine PYD et fonctionneraient indépendamment de ASC (167).

Après translocation dans le cytoplasme, la toxine létale de *Bacillus anthracis* est considérée comme l'activateur principal de l'inflammasome Nlrp1 (171). Une étude a montré que la présence de MDP et de Nlrp1 purifiés activait l'inflammasome (183) mais sa pertinence *in vivo* n'est pas connue. L'existence d'un complexe Nlrp1/Nod2 a également été avancée (184).

Inflammasome AIM2

AIM2 est la seule protéine non NLR connue pour être capable de former un inflammasome. Elle appartient à la famille HIN-200. C'est la seule de cette famille qui possède un domaine PYD (171). Son inflammasome est composé d'AIM2, ASC et Casp-1. AIM2 reconnaît l'ADN double brin cytosolique et permet la maturation de IL-1 β et IL-18 (185, 186). L'oligomérisation de AIM2 prend

appuie, non sur un domaine de la protéine elle-même, mais sur les liaisons de chaque protéine à l'ADN double brin via le domaine HIN en C-term (185, 186).

La provenance de l'ADN importerait peu, qu'elle soit virale, bactérienne ou de l'hôte (186, 187). AIM2 fonctionnerait pour la surveillance cytosolique contre l'infection mais aussi contribuerait à des réponses auto-immunes dans le cas du lupus érythémateux systémique (167).

Inflammasome NLRP6

Récemment, trois articles sont parus sur le rôle de Nlrp6 dans la régulation de l'homéostasie intestinale en utilisant le modèle de colite induite par un sel de dextran (188-190). Nlrp6 est principalement exprimé dans l'intestin, le colon, le rein et le foie (189, 190) et en plus peut-être dans le poumon (188).

Un article montre que Nlrp6 régule positivement la réparation tissulaire, supprimant l'inflammation et la carcinogénèse. Nlrp6 agit principalement sur les myofibroblastes et favorisent le renouvellement cellulaire (190). Une autre étude pointe également la susceptibilité à la colite des souris déficientes en Nlrp6 puis à la tumorigénèse. Elle montre aussi un rôle critique de Nlrp6 au sein des cellules hématopoïétiques dans la protection contre l'apparition de tumeur suite à l'inflammation (189). La troisième accorde un rôle important à la production de IL-18 à la modification de la flore intestinale (188).

Inflammasome NLRP3

L'histoire de la découverte de l'inflammasome Nlrp3 et ses relations avec des désordres inflammatoires a été écrite précédemment. Rappelons que le complexe est inactif et nécessite le recrutement de ASC et Casp-1 pour la maturation de IL-1 β et IL18 (166). La formation de IL-1 α active ne dépend pas de l'inflammasome mais son excrétion dépend de la Casp-1 sur laquelle la cytokine se fixe (191).

Nlrp3 serait peu ou pas exprimée sur les lymphocytes, les NKs et les éosinophiles ; faiblement sur les neutrophiles et les macrophages. Son expression est très forte sur les DC conventionnels et sur les monocytes (192). Les macrophages résidents du système nerveux central, les cellules microgliales expriment également Nlrp3 (193)

Au sein des cellules non-hématopoïétiques, remarquons que l'activation de l'inflammasome Nlrp3 a été référencé au sein de kératinocytes humains (mais pas murin) (194), d'hépatocytes (195), de cellules épithéliales intestinales (196), des cellules des îlots de Langerhans pancréatiques (197). La production de IL-1 β est modeste dans ce dernier cas, intervient en réponse à l'hyperglycémie et apparaît essentielle à la régulation de son métabolisme. Il s'agit donc là d'un rôle physiologique de cette cytokine.

L'inflammasome Nlrp3 est capable de répondre à un nombre étonnamment élevé de molécules endogènes ou exogènes et de situations différentes. Le mécanisme d'activation, en premier lieu le dépliement du domaine LRR et l'exposition du domaine d'oligomérisation NACHT, n'est pas connu et fait l'objet d'intenses spéculations. Les principaux *scenarii* seront présentés lors de la discussion. La connaissance de son fonctionnement aiderait beaucoup à la meilleure compréhension des mécanismes intervenant en phase avec la théorie du danger de Polly Matzinger.

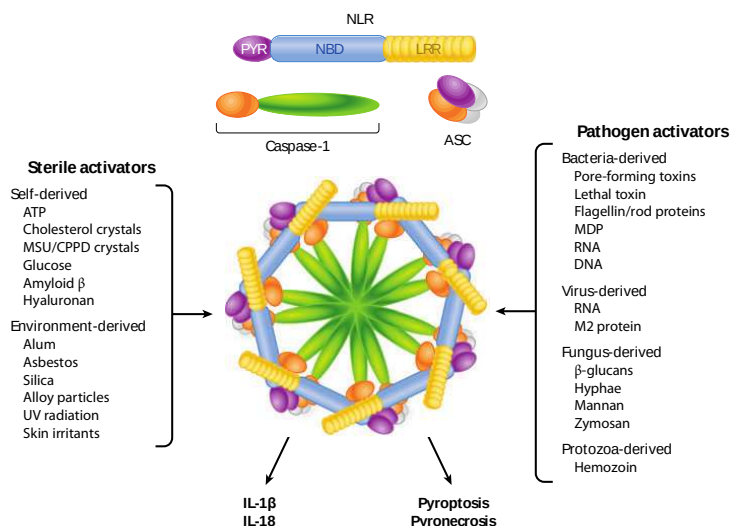


Figure 9 | Représentation théorique de l'inflammasome Nlrp3 et liste non exhaustive de ses activateurs (171)
Remarque la présence non confirmée du complexe protéique charpenté autour d'un heptamère de Nlrp3. La disposition physique des protéines permet l'autoactivation de la caspase-1

D. Purines et signalisation

Nos résultats au laboratoire, autant *in vitro* qu'*in vivo*, nous ont conduits à nous intéresser de plus en plus au rôle de la signalisation purinergique dans la régulation de l'immunité innée. Les purines impliquées sont multiples, les récepteurs également et le tout pourrait permettre une adaptation fine de la réponse immunitaire.

1 Les purines

a Purine et ATP, pour La vie

Les purines constituent une famille d'alcaloïdes dans laquelle outre adénine et guanine on retrouve notamment caféine et théobromine. Les purines sont constituées de la fusion de cycles pyrimidine et imidazole formant une molécule azotée hétérocyclique.

Les bases azotées, guanine et adénine, lie un ribose pour former guanosine et adénosine. Le ribose reçoit des groupements phosphates pour former de l'adénosine mono- di- ou tri-phosphate (AMP, ADP, ATP) ou guanosine mono- di- ou tri-phosphate (GMP, GDP, GTP). Les plantes synthétisent de l'ATP grâce à la photosynthèse et les organismes anaérobiques utilisent la fermentation. La source principale d'ATP des organismes aérobiques provient de la reconversion de l'ADP grâce au gradient de proton généré par les cytochromes de la chaîne respiratoire

Le catabolisme d'une molécule de glucose permet la régénération de 36 molécules d'ATP. Les liaisons entre les groupements phosphates sont des liaisons pyrophosphates très riches en énergie de très grand intérêt biologique. En effet, l'ATP est une molécule pourvoyeuse d'énergie essentielle à toute cellule vivante, procaryote ou eucaryote. Son hydrolyse en ADP ou AMP permet la libération de l'énergie contenue dans les liaisons pyrophosphates et son transfert pour former par exemple une liaison anabolique ou une production mécanique. Les liaisons pyrophosphates de l'ATP et du GTP permettent de stocker très temporairement de l'énergie indispensable au fonctionnement de tout organisme mais l'ATP lui-même ne peut être stocké et doit être en permanence régénérer.

Chaque molécule d'ATP est recyclée entre 1000 et 1500 fois par jour. L'hélicase est nécessaire pour dérouler le double brin d'ADN avant chaque duplication ou transcription. A chaque nucléotide déroulé un ATP est consommé or le génome humain comporte autour de $3 \cdot 10^9$ paires de bases. Un myocyte peut consommer (et régénérer) plus de 10^7 ATP/sec. Pour courir un marathon (42,3km) il a été établi qu'un homme de 55kg doit synthétiser environ 60 kg d'ATP (198) !

Les purines autorisent également le transfert d'un groupement phosphate créant un composé phosphorylé généralement peu stable mais fondamentale dans bon nombre de voie de signalisation cellulaire.

Outre ces fonctions essentielles mais assez indirectes, les purines participent en tant que telle à la signalisation intercellulaire en servant de ligand pour toute une gamme de récepteurs purinergiques, objet de l'étude présente.

b Libération d'ATP

La capacité des cellules à retenir des concentrations micro-(ou nano) molaires d'ATP en péri-cellulaire est importante à mémoriser pour la compréhension des mécanismes de régulation des voies de signalisations. Il en va de même de la capacité des cellules à libérer d'autres composés proches, adénosine, UTP, dinucléotides polyphosphates et sucres.

La concentration intracellulaire en ATP est élevée (~ 3 mM) (199). Sa libération en extracellulaire fut découverte en 1974 dans le cœur (200). Jusqu'à récemment il était estimé que la seule source d'ATP provenait de cellules mourantes. La libération d'ATP par des cellules intactes fut observée la première fois sur des neurones au niveau de synapses chimiques (201).

On sait aujourd'hui que cette excrétion a lieu dans de nombreux processus physiologiques mais les mécanismes du transport font toujours l'objet de débats.

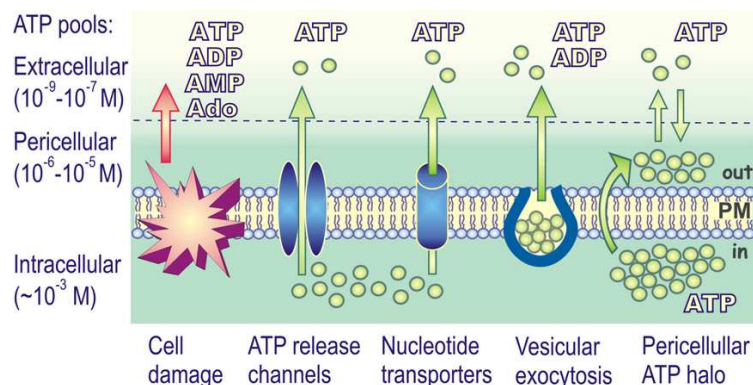


Figure 10 | Représentation des mécanismes permettant la libération d'ATP d'une cellule vers l'extérieur (202)

Une voie est passive et résulte de sa fuite suite à une lésion cellulaire. Trois voies sont actives et régulées : sortie de l'ATP par des transporteurs, des canaux ou des vésicules. De plus, la capacité des cellules à conserver un halo d'ATP en péri-cellulaire ferait intervenir d'autres mécanismes pas très bien compris

La libération d'ATP serait principalement vésiculaire dans les cellules nerveuses (203). Au sein des cellules non nerveuses, plusieurs mécanismes sont proposés, incluant la présence de transporteurs et des canaux voltage-dépendant, l'intervention de connexines/pannexines mais aussi l'excrétion vésiculaire.

i Excrétion vésiculaire

Outre les neurones, Les astrocytes peuvent libérer des nucléotides en condition physiologique par un mécanisme d'exocytose (204). L'inhibition de la sécrétion inhibe la libération plusieurs systèmes (205)(206). Selon certains chercheurs l'excrétion vésiculaire d'ATP serait un phénomène ubiquitaire, à l'exception des érythrocytes (207).

ii Présence de transporteur

- o Un pore anionique perméable aux nucléotides.

L'ATP est fortement excrété lors d'une augmentation du volume de la cellule (« swelling ») (208)(209)(210) et coïncide avec l'augmentation de la conductance anionique (211). Parmi les trois types de canaux étudiés celui dénommé « large ou 'maxi' anion chanel » ressemble fortement aux canaux VDAC (voltage-dependent anion conductance) de la mitochondrie. Un variant alternatif de VDAC serait également exprimé au niveau de la membrane plasmique. Or VDAC forme un pore mitochondriale perméable à l'ATP. Cependant et malgré certaines informations contradictoires, les données actuelles ne supportent pas cette hypothèse (207).

- o Le pore formé par P2X7

La stimulation de P2X7 par de forte concentration en ATP (>100–300 μ M) entraîne la perméabilisation de la membrane et l'entrée de molécule jusqu'à 900 Da (212). Il avait été avancé que ce récepteur pourrait être directement responsable de la libération d'ATP mais les preuves manquent. Cette hypothèse paraît maintenant peu vraisemblable au regard du rôle jouée par la

pannexine-1 (213). En outre, l'activation prolongée de P2X7 conduit à l'induction de la mort cellulaire (214) ce qui conduit à la libération massive du nucléotide indépendamment de ce

Cependant les preuves manquent et il reste possible qu'un changement conformationnel du récepteur P2X7 conduise à sa propre dilatation (215).

iii Intervention de connexines/pannexines

o Les connexines

Fonctionnant en hexamères, les connexines (Cxs) sont connues pour former des jonctions communicantes, « *gap junction* », fournissant une continuité entre cellules adjacentes. Cette forme directe de communication intercellulaire est fondamentale dans la propagation de l'information au travers d'ions et de petits métabolites pour l'établissement d'une réponse physiologiques coordonnée. Les molécules aqueuses d'une taille inférieure à 1 kDa peuvent franchir le pore formé par deux connexons d'un diamètre de 2nm (216).

Outre la formation de jonction communicantes de cellule à cellule, ces protéines pourraient également former des hémicanaux entre une cellule et le milieu extérieur (216). Une fois formés, ces hémicanaux permettraient la libération de petites molécules (217). La libération d'ATP et de glutamate a été mise en évidence sur des astrocytes via la connexine 43 (218). Un article montre également que la libération d'ATP par les neutrophiles activés se réalise par la connexine 43 (Cx43), par utilisation d'inhibiteurs chimiques mais aussi en supprimant ponctuellement le gène *ad hoc* (219). Cependant, les preuves de la formation d'hémicanaux par les connexines restent à venir.

Malgré le phénotype clair des souris hétérozygotes Cx43^{+/-}, pour lesquelles une diminution de moitié du nombre de neutrophiles recrutés suite à une infection pulmonaire est observée (220), il reste difficile de distinguer *in vivo* la nature de cette signalisation (hémicanaux et/ou jonctions communicantes). La libération d'ATP par les cellules épithéliales pulmonaires seraient principalement réalisées par la pannexine-1 (221).

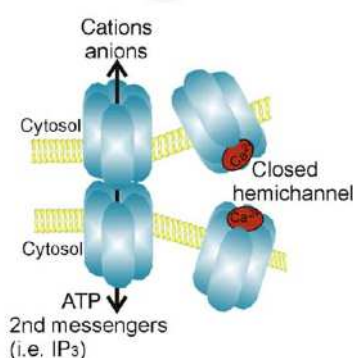


Figure 11 | Représentation classique des jonctions communicantes (222)

Une « *gap junction* » s'établit entre deux cellules adjacentes par formation et assemblage sur chacune d'un hexamère formant un connexon

Une revue atteste de la capacité par des Cxs stimulées de former des hémicanaux entre le cytoplasme et le milieu extérieur. Les auteurs mentionnent même que la Cx23 formerait préférentiellement des hémicanaux (223).

o Les pannexines

Auparavant, seuls les vertébrés avaient été montrés capables d'établir des jonctions communicantes, cela au travers de deux connexines adjacentes. Une famille équivalente chez les invertébrés a été découverte et nommée innexine (Inx). Par la suite, des orthologues d'innexines ont été trouvés chez les vertébrés et baptisés pannexines (Panx) (224). Les Panxs sont des homologues structuraux de connexines et capables de former des pores entre le cytoplasme d'une cellule et le milieu extérieur (225). Les Cxs et les Panxs ont évolué indépendamment et présentent une faible homologie de séquence (226).

Certains chercheurs estiment que les Panx peuvent dans certains cas former des hémicanaux et des jonctions communicantes (223) alors que d'autres les réfutent catégoriquement, estimant que le manque criant de données expérimentales convaincantes devraient nous prémunir pour l'heure d'utiliser confusément ou abusivement certains termes dont celui d'hémicanal (227).

Dans sa faculté de former un pore/canal transmembranaire, plusieurs qualités font de la Panx-1 un bon candidat dans la libération d'ATP cellulaire (228). Notamment, elle peut être activée par une dépolarisation physiologique de la membrane (229) et par une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium (230). Elle constituerait le pore longtemps associé à l'activation de P2X7 (213). L'augmentation de la perméabilité membranaire rapportée pour P2X2 et P2X4 pourrait être due à un mécanisme similaire (231, 232). Le rôle de la Panx-1 dans l'activation de l'inflammasome Nlrp3 a été fortement remis en question (233). Cependant son rôle critique dans la libération active d'ATP reste l'objet d'un consensus. Il a notamment été impliqué dans l'activation des neutrophiles (234) et des lymphocytes (235). Lors de mort cellulaire par apoptose, les cellules attirent les phagocytes en libérant de l'ATP par la Panx-1 (236).

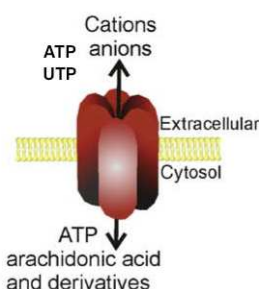


Figure 12 | Représentation du canal formé par la pannexine. Adapté de (222)

L'ouverture du canal permet l'échange non spécifique de petites molécules entre le cytoplasme d'une cellule et le milieu extérieur

i Libération constitutive

Une concentration non nulle (autour du nanomolaire) d'ATP est présente autour des cellules en culture. Puisque l'ATP exogène est rapidement dégradé par des ecto-ATPases présentes sur la membrane plasmique (Cf. infra), la stabilité de la présence d'ATP doit refléter un état d'équilibre entre une libération tonique d'ATP balancée de sa dégradation dans les mêmes proportions (237)(238). Cette libération spontanée et constitutive d'ATP semble avoir des fonctions physiologiques importantes. Par exemple les oscillations lentes de $[Ca^{2+}]_i$ observées dans des cellules épithéliales sont fortement diminuées en inhibant les récepteurs P2 ou en dégradant l'ATP (239).

ii Libération stimulée

La libération de nucléotides et en particulier d'ATP peut être stimulée et conduire à l'augmentation forte, rapide et transitoire de sa concentration extracellulaire. Deux principaux modes sont connus :

o La perturbation mécanique des cellules.

Elle peut résulter d'un stress important comme de piquer une cellule ou simplement de la faire tourner doucement dans une boîte de culture (240). L'augmentation du flux sur une assise de cellules endothéliales provoque une forte libération de nucléotides (241). Il est montré qu'un astrocyte mécaniquement stimulé envoie aux cellules avoisinantes une décharge de nucléotides résultant en une vague d'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ (242).

Des liens entre stimulation mécanique par augmentation du débit, régulation du tonus vasculaire (243) ou réponse rénale (244) ont été mis en évidence.

o La présence d'agonistes, dont les nucléotides eux mêmes.

De nombreuses études montrent un lien entre stimulation membranaire provoquant une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ et libération d'ATP. La plupart de ces récepteurs sont des GPCR couplés à l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ via la génération de IP3 (inositol triphosphate). L'activation de la protéine G serait un prérequis à la libération d'ATP (245). La suppression de la voie de l'IP3, par exemple via l'inhibition de la phospholipase C par le U73122, peut bloquer la libération d'ATP (205)(245). L'inhibition de la signalisation calcique intracellulaire bloque fortement la libération d'ATP (205) (245)(246). Par ailleurs l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ sans intervention de récepteurs, comme avec la ionomycine, provoque également la libération d'ATP (209). La libération d'ATP peut entraîner une boucle de régulation positive et conduire à l'amplification de la réponse cellulaire. A noter que la pannexine-1 est un pore sensible à $[Ca^{2+}]_i$ (207).

Une multitude de situations conduisent à la libération d'ATP. Pour bien en apprécier la portée, il est important de garder à l'esprit que ce nucléotide est activement métabolisé en extracellulaire et que chaque dérivé possède la capacité de signaler via toute une gamme de récepteurs.

e ATP et conversion

L'ATP présent en dehors des cellules est rapidement dégradé par des ecto-nucléotidases : les E-NTPDases (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases), les E-NPP (ecto-nucleotide pyrophosphatases), les ecto-5'-nucleotidases et l'alkaline phosphatase (AP) (247).

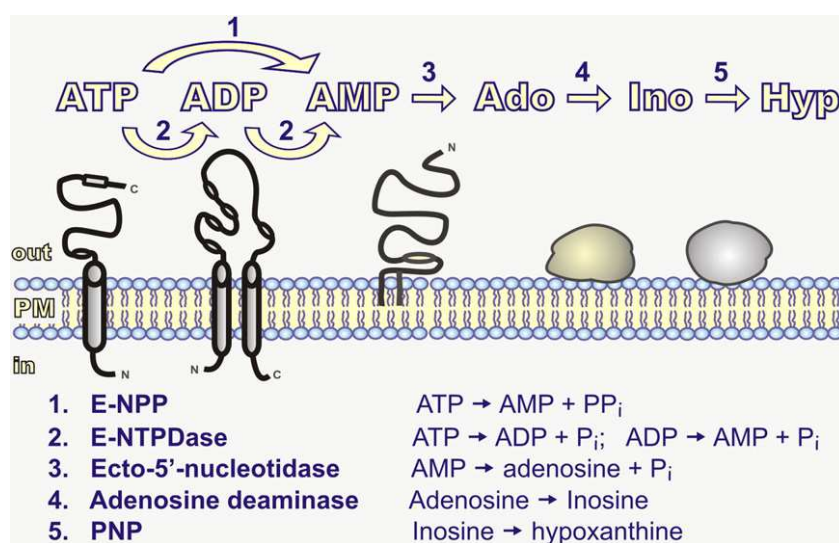


Figure 13 | Conversion de l'ATP par des enzymes membranaires

La présence des différentes formes de la purine est hautement dynamique et résulte de l'action conjointe d'ecto-nucléotidases (202)

i Famille des ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTDPase)

Plus connues sous les termes ectoATPase, CD39 ou apyrase, il existe 8 E-NTDPases différentes dont 4 sont exprimées à la surface des cellules (NTPDase1, 2, 3, et 8). Les autres sont localisées en intracellulaire notamment dans la lumière d'organites (202). Les ecto-enzymes contiennent deux domaines transmembranaires et une large boucle extracellulaire. Les NTDases extracellulaires 2, 3 et 8 seraient de faibles importances dans les phénomènes immunitaires à la différence de la NTDase 1(202).

La NTPDase1 fut identifiée en premier comme marqueur d'activation des cellules B et appelée CD39 (248). Deux ans plus tard une ATP-diphosphohydrolase fut identifiée chez la pomme de terre et appelée apyrase (249). L'homologie CD39 et apyrase fut mise en évidence la même année (250). L'abondance de l'expression de NTPDase-1 fut établie sur de nombreux types cellulaires dont les cellules dendritiques (251) et les lymphocytes (252). Une étude récente montra que NTPDase1 est l'ectonucléotidase dominante sur les macrophages péritonéaux et qu'elle y régule l'activité du récepteur purinergique P2X7 (253).

Les NTPDases hydrolysent non seulement l'ATP et l'ADP en AMP (247) mais aussi d'autres nucléotides ce qui rend trompeur le terme de ecto-ATPase. Les ratios d'activités d'hydrolyse ATP:ADP dépendent toutefois considérablement d'une enzyme à l'autre. En particulier, le ratio pour la NTPDase1 est de ~1–1,5:1 contre 10–40:1 pour la NTPDase2 (254). Certaines études montrent même que sur des cellules endothéliales (255) ou des lymphocytes (256) l'activité hydrolytique de l'ADP par la NTPDases1 peut être supérieure à celle de l'ATP.

ii La famille Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP)

Classés par ordre de découverte, 7 ecto-enzymes (NPP1-7) sont membres de cette famille. Selon ses membres, elle possède une très large gamme de substrats sur lesquelles elle hydrolyse les liaisons pyrophosphate et phosphodiester. Seules NPP1 à NPP3 sont capables d'hydrolyser des nucléotides et ainsi peuvent jouer dans la modulation de la cascade de signalisation purinergique (257). Ces enzymes agissent préférentiellement en convertissant l'ATP directement en AMP mais certaines NPP peuvent également réaliser la déphosphorylation en passant par l'intermédiaire ADP d'une manière "NTPDase-like".

Les membres mammaliens NPP1 et 3 sont des glycoprotéines à un domaine transmembranaire. NPP2 (autotaxine) est synthétisé sous forme de pré-enzyme avant d'être clivée puis sécrétée (258) et aurait un rôle primordial dans le développement vasculaire (259).

Malgré son implication démontrée dans différents phénomènes pathologiques, une recherche non exhaustive ne m'a pas permis de lier directement l'activité de cette enzyme au système immunitaire.

iii La famille ecto-5'-nucleotidase

Chez l'homme 7 membres ont été caractérisés, 5 dans le cytoplasme, 1 dans la matrice mitochondriale et 1 sur la face externe de la membrane plasmique (202). Cette dernière est plus connue sous le nom de CD73. Elle est capable d'hydrolyser l'AMP en adénosine (260) grâce à deux sous-unités glycoprotéiques liées par des liaisons non covalentes (261) et attachées à la membrane plasmique par une ancre GPI (260).

CD73 est exprimé dans de nombreux organes dont le poumon (262). L'enzyme présente une forte expression sur les cellules épithéliales (263) et endothéliales (264). Son expression sur les lymphocytes B et T circulants est restreinte à certains sous types et est corrélée avec leur état de maturité (265). Les érythrocytes, plaquettes, neutrophiles et autres cellules sanguines expriment peu ou pas CD73 (266). L'activité de CD73 apparaît très importante pour le trafic, l'adhérence et l'extravasation des leucocytes (267). Elle intervient nettement dans la création d'une balance régulatrice constitutive entre mécanismes pro- et anti-inflammatoires (268).

Elle est fortement exprimée sur de nombreux types de cellules cancéreuses humaines et murines. CD73 exprimée à la fois sur les cellules de l'hôte et sur les cellules tumorales coopère pour protéger la tumeur contre l'action des lymphocytes T anti-tumoraux (269).

L'adénosine formée par CD73 protège l'intégrité du poumon dans des modèles de lésions induite par ventilation mécanique (270) ou par la bléomycine (271).

Outre son activité principale de régulation de la cascade de signalisation purinergique, des fonctions non enzymatiques de CD73 ont été proposées, dans l'induction de la signalisation intercellulaire et la médiation de l'adhérence cellule-cellule (265)(272).

CD39 et CD73 sont co-exprimés sur la surface des T régulatrices ($CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$) et participent de façon importante à leur activité suppressive par la conversion d'ATP/ADP en AMP puis en adénosine, laquelle est anti-inflammatoire et inhibe la sécrétion de cytokines et la prolifération des cellules T (252)(273).

L'accumulation de neutrophiles dans les poumons en réponse au LPS est augmentée chez les souris déficientes en CD39 ou CD73, particulièrement dans l'interstitium et dans les alvéoles. Ce recrutement est réduit par administration d'apyrase. Ainsi, les actions conjointes de CD39 et CD73 permettent de réduire le recrutement de neutrophiles dans l'espace pulmonaire (274).

En résumé, l'expression des ecto-nucléotidases CD39, CD73 (et CD38) sur les cellules immunitaires et/ou endothéliales permet la régulation vasculaire et les réactions immunitaires aux sites de l'inflammation. En outre, l'expression de CD39 et CD73 chez la souris fait partie intégrante de la suppression de la réponse T (275).

L'activité des ecto-enzymes peut être reliée à de nombreux phénomènes largement méconnus, notamment cliniques. Par exemple les effets anti-inflammatoires du méthotrexate et de la sulfasalazine, largement utilisés dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde, pourraient reposer sur un mécanisme qui nécessite l'action de ecto-5'-nucleotidase puis l'activation des récepteurs à l'adénosine (276, 277).

iv Alkaline phosphatases (AP)

Les alcalines phosphatases sont présentes chez de nombreux organismes, des bactéries à l'Homme. Elles présentent une large spécificité de substrat envers différents phosphomonoesters et autres composés phosphatés. Son action est moins efficace que celle de l'ecto-5'-nucleotidase pour produire de l'adénosine à partir de l'AMP présent en quantité physiologique. Cependant, elle peut protéger la muqueuse pulmonaire lorsque que les concentrations en nucléotides s'élèvent, jouant un rôle non négligeable lors de périodes d'infection ou d'inflammation (202).

v Formes solubles

Des 5'-nucleotidases solubles existent (ATPase, ADPase et AMPase) (208, 278). Elles pourraient constituer des auxiliaires pour l'inactivation d'une concentration locale forte en nucléotides, spécialement aux sites inflammés (202).

vi Inactivation de l'adénosine et autres nucléosides par des ectoenzymes

Adenosine deaminase (ADA)

L'ADA est une enzyme importante dans l'inactivation des purines. Elle catalyse la déamination irréversible de l'adénosine en inosine. Elle est fortement exprimée entre autres dans les intestins, le thymus et la rate (262). L'ADA est exprimée dans le cytoplasme et également comme ecto-enzyme à la surface des lymphocytes (279) et des cellules dendritiques (280). Une isozyme, l'ADA2, se trouve dans le foie, le sérum et sur les monocytes/macrophages mais possède une affinité assez faible pour l'adénosine. Elle peut cependant être activée sur les sites inflammés par hypoxie et autour des tumeurs (281).

Etant donné l'action anti-inflammatoire puissante de l'adénosine, l'abondance de l'expression de l'ecto-ADA dans les tissus lymphoïdes peut fournir un moyen efficace de l'éliminer avec pour conséquence une activation soutenue des cellules dendritiques et des lymphocytes T pendant l'inflammation, en dépit de l'état général d'immunosuppression (280).

La déficience en ADA chez l'homme représente environ 20% des cas de SCID (severe combined immunodeficiency disease) caractérisé par une lymphopénie et une immunodéficiência sévères. Les fœtus déficients en ADA ne sont pas viables, certainement par accumulation cytotoxique de 2'-deoxyadenosine et d'adénosine (282).

Purine nucleoside phosphorylase (PNP)

La PNP est l'enzyme qui suit l'ADA dans la chaîne catabolique des purines. Elle est principalement localisée dans le cytoplasme des procaryotes et eucaryotes. Chez ces derniers, elle peut également être mitochondriale (262) (283).

Le rôle principale de la PNP mammalienne cytosolique est de phosphoryler la (déoxy) guanosine et (déoxy)inosine et guanine et hypoxanthine, lesquelles sont métabolisées ensuite en xanthine et en acide urique. A noter que l'homme et les autres primates ne possèdent pas d'uricase fonctionnelle (284) et ont ainsi tendance à l'hyper-uricémie. Cette particularité ferait de l'acide urique un bon signal de danger chez l'homme (285), au regard de l'hypothèse émise par Polly Matzinger (33). Le suivi d'adénosine radiomarquée incubées avec des cellules bronchiques (286) ou leucémiques (238) (287) humaines a montré la capacité des PNP à la convertir en inosine puis en hypoxanthine, sans assimilation significative de nucléoside par les cellules. Cela suggère que la PNP

est également exprimée à la surface des cellules où elle régule les niveaux locaux de nucléosides en harmonie avec ADA.

Les humains pourvus d'une déficience de PNP souffrent de dysfonctionnements immunitaires notamment des cellules T et de problèmes neurologiques. Les patients meurent durant l'enfance d'infection, d'auto-immunité ou de cancer (288).

vii Régénération de l'ATP en extracellulaire

Bien que peu connues, des enzymes extracellulaires sont capables de régénérer de l'ATP. Adenylate kinase, nucléoside diphosphate kinase et ATP synthase peuvent être co-exprimées à la surface cellulaire (256).

Adenylate kinase (AK)

L'AK catalyse de façon réversible la réaction $ATP + AMP \rightarrow 2ADP$. Ses isoformes sont principalement intracellulaires cytoplasmique, mitochondriale ou nucléaire (289). Des activités ecto-AK ont été rapporté sur de nombreuses lignées humaines, notamment endothéliale (255), épithéliale pulmonaire (290, 291) et lymphocytaires (256). Cela suggère un nouveau rôle de cette enzyme dans le contrôle des niveaux de nucléotides extracellulaires et la propagation de signalisation purinergique.

Nucleotide diphosphate (NDP) kinase

La NDP kinase est une enzyme ubiquitaire qui catalyse le transfert de phosphate en gamma de nucléosides triphosphates à des nucléosides diphosphates avec une large spécificité, purines comme pyrimidines (292)

Elle est principalement localisée dans la mitochondrie, le cytoplasme et le noyau où elle participe notamment à la synthèse protéique et la réplication de l'ADN (293). Plus récemment, il fut montré que la NDP kinase participe à la signalisation « *outside-in* » et « *inside-out* » par son recrutement à la membrane plasmique ou son expression constitutive comme ecto-enzyme et cela sur de nombreux types cellulaires, incluant cellules endothéliales (255) et lymphocytes (294).

ATP synthase

L'ATP synthase constitue un complexe enzymatique universel enchâssé dans les membranes cytoplasmiques des bactéries, internes des mitochondries et thylakoïdes des chloroplastes. Elle transforme l'énergie issue d'un gradient électrochimique de protons en une liaison anhydre d'acide phosphorique pour former de l'ATP (295).

Certains rapports font état d'une présence de composants de ce complexe enzymatique sur la face externe de la membrane plasmique, confirmée sur cellules endothéliales (296) (211) et cellules tumorales (297) notamment. Cependant, il n'y aurait pas de preuve directe confirmant la présence d'un complexe catalytique actif (202).

viii Contrôle de la dégradation/synthèse par les ectoenzymes

En principe, la durée et la magnitude de la signalisation purinergique sont coordonnées par deux voies opposées, l'une grâce à la dégradation de l'ATP, l'autre par sa reformation. Cependant, il est admis que la voie principale est celle qui conduit à la libération d'un nucléotide et son inactivation rapide par les réactions séquentielles des ecto-nucléotidases (202).

Les cellules à fortes activités NTPDases et ecto-5'-nucleotidase, telles l'endothélium vasculaire, tendent à rapidement inactiver l'ATP/ADP libéré et à produire de l'adénosine. Cela représente un moyen d'achever les réponses pro-inflammatoires et pro-thrombotiques dans le système cardiovasculaire (298, 299).

De même, les expressions des enzymes CD39 et CD73 des cellules endothéliales peuvent être augmentées pendant les phases d'hypoxie et d'inflammation afin d'accroître la concentration intravasculaire en adénosine et ainsi empêcher une réponse excessive en affectant l'adhésion et la transmigration des cellules lymphoïdes, l'expression de molécules impliquées dans la cascade d'adhésion (300, 301) notamment dans le poumon (302).

En plus de l'augmentation de la production d'adénosine, les réponses adaptatives à l'hypoxie peuvent inclure une diminution de son internalisation cellulaire par la diminution de l'expression des transporteurs équilibratifs aux nucléosides (303) et une induction de la transcription de récepteurs à l'adénosine (219, 304).

A l'inverse, la combinaison d'une activité ecto-nucléotidase relativement faible et forte en ADA au sein des leucocytes et autres cellules hématopoïétiques pourraient permettre au système immunitaire, soit de générer moins d'adénosine, soit de l'éliminer plus efficacement et donc de s'affranchir de ses effets inhibiteurs (256, 305).

La régulation des activités purinergiques intervenant pendant la progression d'un cancer permet aux tumeurs solides d'échapper aux effets cytostatiques de l'ATP et en même temps de maintenir de fortes concentrations d'adénosine immunosuppressive et favorisant la tumeur (306).

En plus activités faibles ecto-nucléotidases et forte ADA, les cellules lymphoïdes sont caractérisées par des activités relativement forte de l'ectoAK et de la NDP kinase (256). Elles peuvent maintenir un « halo » micromolaire en ATP (238, 307). Ce phénotype « reformation d'ATP / élimination d'adénosine » des cellules lymphoïdes, associée à leur capacité de suppression de ecto-5'-nucleotidase endothéliale (287, 308) peut représenter un forme de communication cellulaire entre leucocytes et endothélium pour faciliter leur migration du sang vers les tissus.

f Cas d'autres nucléotides/nucléosides

La stimulation de neutrophiles humains avec du PMA ou du fMLP (N-formyl-**Met-Leu-Phe**) est accompagnée de concentration micromolaires en AMP (263, 309). Il reste à savoir si l'AMP est libéré directement ou apparaît comme intermédiaire métabolique après libération d'ATP/ADP. Cela permet le chimiotactisme des neutrophiles, plus probablement grâce à la conversion en adénosine par CD73 et sa signalisation.

L'adénosine pourrait également apparaître dans le milieu extracellulaire soit par libération directe soit par réactions séquentielles des ecto-nucléotidases. Des mesures après hypoxie ont montré une libération en concentration micromolaire d'adénosine par l'hippocampe ou des astrocytes en culture (310, 311). Les données sur les niveaux très faibles d'adénosine libérés après stimulation de souris ecto-5'-nucleotidase/CD73 déficiente laisse penser que l'accumulation du nucléoside apparaît principalement grâce à la libération et le catabolisme de l'ATP.

La capacité de plusieurs types cellulaires de libérer de faible concentration nanomolaires d'UTP a été confirmée (312-314) et est corroborée par l'identification des récepteurs P2Y2, P2Y4 et P2Y6 capable de reconnaître l'UDP et/ou l'UTP. Des études chez l'homme ont révélé une augmentation d'UTP circulante lors d'infarctus du myocarde (315). Enfin, Il a été démontré que des cellules épithéliales pulmonaires entres autres pouvaient libérer de l'UDP-glucose (~5–10 nM) après stimulation mécanique (316). A la différence des autres, l'UDP-glucose est libérée beaucoup plus lentement et reste stable au minimum 3h et signale via P2Y14.

2 Les récepteurs

a Diversité et signalisation

L'action de l'ATP et de l'adénosine sur le cœur et les vaisseaux sanguins fut décrit par deux scientifiques en 1929 (317).

Le rôle de l'ATP en tant que neurotransmetteur fut publié en 1972 par G. Burnstock (318). Cet auteur extrêmement prolifique comptabilise plus de 1150 références bibliographiques sur Pubmed et a certainement contribué à l'état des connaissances actuelles sur la signalisation purinergique. Selon lui, sa découverte rencontra une forte résistance jusqu'au clonage de récepteurs purinergiques au début des années 90 (319). L'existence de récepteurs purinergiques fut annoncée par lui en 1976, toutefois dans « *the journal of theoretical biology* » (320). Deux ans plus tard, une première tentative de distinction des récepteurs fut énoncé, identifiant les P1 à l'adénosine et P2 à l'ATP/ADP (321). Après de nombreux ajustements au fil des découvertes, la nomenclature fait état aujourd'hui de :

- 4 récepteurs à l'adénosine (couplés à des protéines G, GPCR)
- 7 récepteurs P2X ionotropiques (récepteurs canaux)
- 8 récepteurs P2Y métabotropiques (couplés à des protéines G, GPCR)

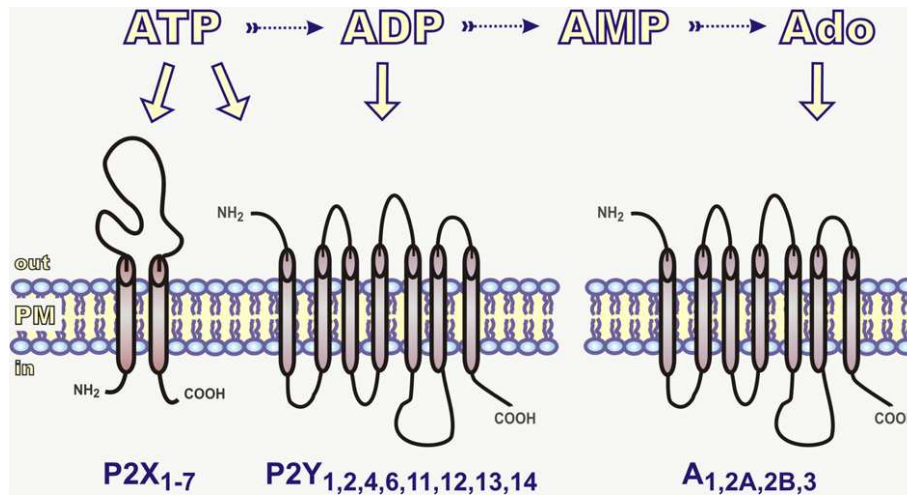


Figure 14 | Représentation des récepteurs purinergiques et de leurs ligands associés
 Noter que les ligands dérivés de l'uridine ne sont pas indiqués (202)

Ces récepteurs présentent un rôle évident dans la stimulation neuronale et bien au delà. Burnstock distingue (319):

- Une signalisation « rapide » qui intervient notamment dans la sécrétion exo- et endo-crine, dans l'agrégation plaquettaire, la vasomodulation et la transduction nociceptive. Elle agit en tant que co-transmetteur et immunorégulateur dans la plupart, sinon tous les nerfs aussi bien centraux que périphériques.
- Une signalisation « lente » qui est impliquée dans le renouvellement, la prolifération et la migration cellulaire, le développement embryonnaire, la réparation tissulaire, la neuroprotection ainsi que l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer et certains cancers. Cette signalisation purinergique intervient en premier plan dans l'immunité innée et adaptative et sera l'objet principal de l'étude ultérieure exposée ici.

i Les récepteurs P1

Les récepteurs P1 à l'adénosine comprennent 4 membres : A1, A2A, A2B et A3. Ce sont des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) membres de la famille « *Rhodopsin-like* ». Les P1R sont principalement couplés à l'adénylate cyclase,

- positivement par une protéine Gs pour A2a et A2b
- négativement par Gi/o pour A1 et A3 (322).

Les divers effets physiologiques de l'activation des récepteurs apparaissent dans la modulation des systèmes cardiovasculaire, nerveux et immunitaire. Les récepteurs P1 et P2Y sont souvent exprimés sur la même cellule.

D'une manière générale, la signalisation par les récepteurs A2A et A2B inhibe les réponses cellulaires en augmentant les taux intracellulaire d'AMPC. A l'inverse, les récepteurs A1 et A3 favorisent l'activation cellulaire (323).

L'adénosine extracellulaire peut être transportée dans la cellule par des transporteurs équilibratifs (324) ou être directement inactivée à la surface des cellules en inosine par la ADA (ecto-adenosine deaminase) et en hypoxanthine par la PNP (purine nucleoside phosphorylase) (325, 326).

L'adénosine possède souvent la capacité de contrecarrer les effets des nucléotides en atténuant l'inflammation et réalisent diverses réponses immunosuppressive (327), cardioprotectrice, neuroprotectrice et angiogénique. Son action se réalise souvent en association avec les activités de CD39 et CD73.

Receptor	Ligands ^{5,7}	Ligand binding affinities EC ₅₀ (μM) ⁷	Desensitization rate or G-protein coupling ^{16,45}	Main downstream signalling events ¹⁶	Expression in different immune cell types ⁷						
					Neutrophils ¹²	Mono-cytes	Macro-phages	Dendritic cells	T cells	B cells ⁸⁵	NK cells ⁸
<i>P1 adenosine receptors</i>											
A1	adenosine	0.2–0.5	G _{I/o}	cAMPinhibition	+	+	+	+	ND	ND	ND
A2A	adenosine	0.6–0.9	G _s	cAMPproduction	+	+	+	+	+	+	+
A2B	adenosine	16–64	G _s	cAMPproduction	+	+	+	+	+	ND	+
A3	adenosine	0.2–0.5	G _{I/o} , G _{q/11}	cAMPinhibition, InsP ₃ generation	+	+	+	+	+	ND	+

Tableau 1a | Caractéristiques principales des récepteurs à l'Adénosine (323)

ii Les récepteurs P2X

Le premier cDNA codant pour un récepteur P2X fut isolé en 1994 (328). Les 7 récepteurs de cette famille sont codés par des gènes différents. Les P2XR possèdent deux régions transmembranaires et une large boucle extracellulaire avec 10 cystéines conservées formant des ponts disulfures, des sites de N-glycosylation et un site de liaison à l'ATP. Les régions N- et C-terminales sont intracellulaires et possèdent des motifs consensus de liaison à des protéines kinases. L'ATP constitue l'agoniste naturel des P2X et de nombreux variants ont été produits. Tous possèdent des affinités et des cinétiques de désensibilisations différentes selon les sous-types (329, 330).

Les P2X fonctionnent comme récepteurs canal ligand ATP-dépendant. Ils facilitent l'influx de cations dont le Ca²⁺ avec des perméabilités très différentes selon les sous-types. Des deux sous-types principaux en immunologie, P2X4 possède une conductance calcique bien supérieure au P2X7 (communication personnelle avec François Rassendren).

La stœchiométrie impliquerait trois sous-unités formant une trimère ou un hexamère par association de deux trimères pour la formation d'un pore perméable aux ions (212). Il est toutefois important de considérer que l'expression recombinante de P2XR est souvent différente de la pharmacologie naturelle (331). Il existe des homo et hétéro-multimères dans la formation des pores

(332). Des associations P2X1/2, P2X1/4, P2X1/5, P2X2/3, P2X2/6, P2X4/6 ont été montrées. P2X6 ne fonctionne pas en homomultimère et P2X7 ne forme pas d'hétéromultimère. En outre il existe différents variants de P2R qui peuvent grandement influencer leur fonctionnement (329).

Il n'existe pas de séquences homologues chez les invertébrés malgré de fortes évidences fonctionnelles que l'ATP et les autres nucléotides peuvent directement générer des courants ioniques (333).

Receptor	Ligands ^{5,7}	Ligand binding affinities EC ₅₀ (μM) ⁷	Desensitization rate or G-protein coupling ^{16,45}	Main downstream signalling events ¹⁶	Expression in different immune cell types ⁷						
					Neutrophils ¹²	Mono-cytes	Macro-phages	Dendritic cells	T cells	Bcells ⁸⁵	NK cells ⁸⁶
P2X ATPreceptors											
P2X1	ATP	0.05–1	<1 s	Ca ²⁺ and Na ⁺ influx	+	+	+	+	+	+	+
P2X2	ATP	1–30	>20 s	Ca ²⁺ influx	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND
P2X3	ATP	0.3–1	<1 s	Cation influx	ND	ND	ND	ND	ND	+	+
P2X4	ATP	1–10	>20 s	Ca ²⁺ influx	+	+	+	+	+	+	+
P2X5	ATP	1–10	>20 s	Ion influx	+	+	+	+	+	+	ND
P2X6	ATP	1–12	-	Ion influx	ND	ND	ND	ND	ND	+	+
P2X7	ATP	>100	>20 s	Cation influx and pore formation	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 1b | Caractéristiques principales des récepteurs canaux P2X (323)

Parmi les récepteurs P2X, le sous type P2X7 retiendra notre attention particulière de part sa capacité bien connu à activer un complexe moléculaire pro-inflammatoire, l'inflammasome Nlrp3 (334), et sous de forte concentration en ATP à induire la formation d'un pore de large conductance impliqué dans l'apoptose (323).

En réalité le mode d'activation de P2X7 et sa capacité, directe ou non, d'induire l'entrée de colorant (213) par la formation d'un pore reste mal compris. L'attention principale s'est focalisée sur la pannexine-1 (Panx-1), protéine apparentée au connexine formant des jonctions communicantes de cellule à cellule. Les toxines bactériennes nigéricine et maitotoxine s'insèrent dans la membrane plasmique et induisent un efflux de potassium, comme P2X7 (335). Toutes trois ont été montrées comme activant l'inflammasome Nlrp3 et cela d'une manière dépendante de la Panx-1 (335). Or l'entrée de colorant n'est pas présente lors de la stimulation par la nigéricine, supposant des moyens alternatifs indépendants de la panx-1 (335). En outre, une forte augmentation de la perméabilité a été mise en évidence après stimulation prolongée de P2X2 et P2X4 (231, 232). Enfin, le rôle de la panx-1 elle même a été fortement remise en question par l'absence de phénotype quant à l'activation de l'inflammasome sur des cellules issues de souris déficientes en Panx-1 (233).

Un modèle synthétique d'hypothèse d'activation liant P2X7 à l'inflammasome récemment repris par Pablo Pelegrin (215). Il se base notamment sur un modèle mathématique et nécessite l'approfondissement des données empiriques. Dans ce modèle, l'homotrimère formé par l'ATP fonctionne différemment lors de la liaison d'une, deux ou trois molécules d'ATP, réalisée sous des concentrations de plus en plus élevées en ATP.

A noter que P2X7 peut être activé par modification covalente post-traductionnelle. Elle se réalise par une ecto-enzyme, ART2 (ADP-ribosyltransferase-2), laquelle greffe un groupe ADP-ribosyl formé à partir de NAD (Nicotinamide-Adénine Dinucléotide). Le NAD est libéré par les cellules et agit comme signal de danger. Au sein du système immunitaire, ART2 est principalement exprimé sur les cellules T régulatrices (Treg) et est responsable d'une mort cellulaire appelée NICD (NAD-induced cell death) (336). Le rôle du NAD dans l'activation irréversible de P2X7 ne sera pas développé plus en détail dans ce manuscrit. Il apparaît cependant fondamental dans la modulation de la réponse immunitaire adaptative. *In vivo*, une injection de NAD est suffisante pour induire efficacement un rejet tumoral en détruisant par NICD principalement les Treg inhibitrice de la réponse anti-tumorale (337).

ART2 ne serait pas exprimé par les cellules immunitaires innées types macrophages ou cellules dendritiques.

iii Les récepteurs P2Y

Le premier P2YR fut cloné en 1993 (338). Chez l'homme les 8 membres sont P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 et P2Y14 (339). Les nombres manquant correspondent soit à des orthologues non mammaliens, soit des récepteurs ayant bien une homologie de séquence mais pas d'évidence d'une réponse fonctionnelle aux nucléotides. Par exemple, P2Y7 est le récepteur au LTB₄, impliqué dans le chimiotactisme (340).

Il existe une divergence assez nette entre P2Y1, 2, 4, 6, 11 et P2Y12, 13, 14 (323). D'un point de vue pharmacologique, les récepteurs P2Y peuvent être subdivisés selon leurs affinités pour ATP, ADP, UTP, UDP et UDP-glucose (329):

Les P2YR sont souvent exprimés sur les mêmes cellules. Les différences d'affinités aux ligands et le couplage à différentes protéines G permettent une modulation fine de la réponse.

Receptor	Ligands ^{5,7}	Ligand binding affinities EC ₅₀ (μM) ⁷	Desensitization rate or G-protein coupling ^{16,45}	Main downstream signalling events ⁴⁶	Expression in different immune cell types ⁷						
					Neutrophils ¹²	Mono-cytes	Macrophages	Dendritic cells	T cells	B cells ⁸⁵	NK cells ⁸⁶
<i>P2Y nucleotide receptors*</i>											
P2Y1	ADP	8	G _{q/11}	PLCβ activation	+	+	+	+	+	+	+
P2Y2	ATP, UTP	0.1 (ATP), 0.2 (UTP)	G _{q/11} , G _{i/o}	PLCβ activation, cAMP inhibition	+	+	+	+	+	+	+
P2Y4	UTP (ATP, UDP)	2.5	G _{q/11} , G _{i/o}	PLCβ activation, cAMP inhibition	ND	+	+	+	+	+	ND
P2Y6	UDP, UTP	0.3 (UDP), 6 (UTP)	G _{q/11}	PLCβ activation	+	+	+	+	+	+	ND
P2Y11	ATP	17	G _s , G _{q/11}	cAMP production, PLCβ activation	ND	+	+	+	+	+	ND
P2Y12	ADP	0.07	G _{i/o}	cAMP inhibition	+	+	+	ND	+	+	ND
P2Y13	ADP, ATP	0.06 (ADP), 0.26 (ATP)	G _{i/o}	cAMP inhibition	+	+	ND	+	+	+	ND
P2Y14	UDP-glucose	0.1–0.5	G _{q/11}	PLCβ activation	+	ND	ND	+	+	+	+

Tableau 1c | Caractéristiques principales des récepteurs métabotropiques P2Y (323)

b Focus sur le système immunitaire

La libération d'ATP par les cellules et sa signalisation peuvent provenir de deux mécanismes très différents qu'il est important de considérer.

D'un côté, il y a la détection d'un stimulus par une cellule et l'utilisation de la voie purinergique pour une régulation et/ou une amplification du signal qui va conduire à son activation. Il s'agit d'un mode d'action en autocrine ou « j'y vais ».

De l'autre, l'ATP est libéré par des cellules lésées ou mourantes. S'il s'agit d'une voie d'apoptose, l'environnement ne développera pas de réponse pro-inflammatoire. Si la mort cellulaire est nécrotique, il y aura alors établissement d'une inflammation avec recrutement de leucocytes et synthèses de nombreux médiateurs. Ici, la libération purinergique constitue un signal « trouve moi » afin de maîtriser au plus vite la source et les raisons de l'émission des signaux de dangers. Bien qu'assez caricaturale ce modèle s'inspire de nombreuses découvertes récentes.

i "I act" signals, signalisation autocrine

Afin d'appuyer la réalité mais aussi la complexité de la signalisation purinergique, notons que les macrophages péritonéaux sont connus pour exprimer P2X1, P2X4, P2X7, P2Y1, P2Y2, P2Y6, P2Y12, A2a, A2b et A3 mais aussi les ectonucléotidases CD39 et CD73, le tout permettant au moins neuf boucles d'autorégulation possibles (341).

Dans ce modèle les cellules reçoivent et intègrent des informations de nature diverse qui permettent leur activation. La signalisation purinergique est principalement autocrine, la cellule libère de l'ATP qui va engager les récepteurs placés à sa surface. Ce « feedback » est un mécanisme essentiel des réponses immunitaires.

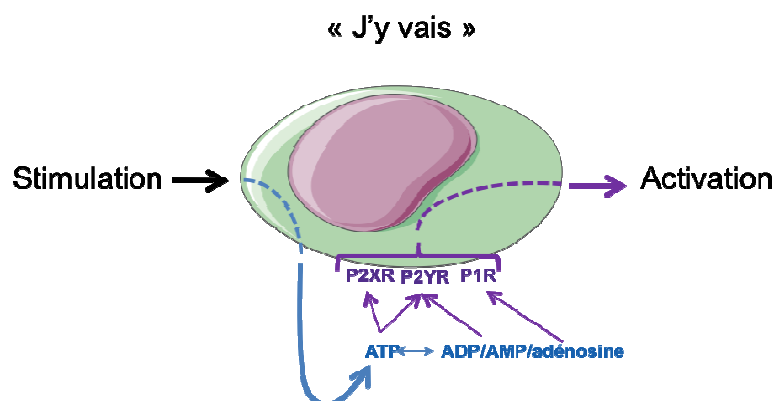


Figure 15 | Représentation de la signalisation purinergique autocrine

Les cellules immunitaires reçoivent des signaux activateurs qu'elles intègrent et amplifient au moyen d'une libération de purines et leur signalisation autocrine

- Immunité innée

Exemple des neutrophiles (234)(342)

Les neutrophiles quiescents sont des cellules circulant dans le sang. Lors d'une inflammation tissulaire ces cellules migrent sur le site où elles exercent leur fonction avant de mourir rapidement.

En réponse à un agent chimio-attractant, le neutrophile va libérer de l'ATP via la pannexine-1 de façon polarisée du côté de la stimulation. La signalisation autocrine focalisée va d'abord engager les récepteurs P2Y2 adjacents qui vont amplifier le signal introduit par le chimio-attractant. Cela induit la translocation de récepteurs A3. En parallèle l'ATP extracellulaire est dégradé notamment en adénosine, ligand des récepteurs A3. Ceux ci vont, avec d'autres mécanismes, induire le chimiotactisme du neutrophile, c'est à dire sa migration dans le sens du gradient.

Exemple des macrophages (341)

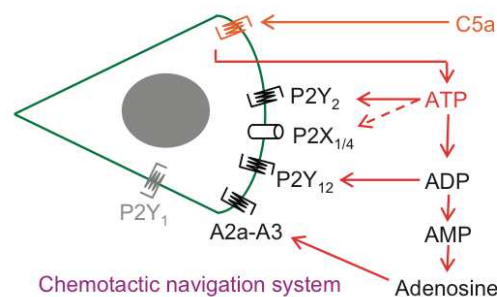


Figure 16 | Représentation de la signalisation purinergique autocrine après détection d'un facteur chimio-attractant (C5a) par un macrophage (341)

Les macrophages sont attirés notamment par un gradient de la protéine du complément C5a. Cette protéine chimio-attractrice se fixe sur son récepteur et induit la libération d'ATP. Le mécanisme d'excrétion n'a pas été élucidé mais n'est pas influencé par l'absence de la pannexine-1. L'ATP va agir en autocrine sur P2Y2, son dérivé ADP sur P2Y12 et adénosine via A2a, A2b et A3. Le chimiotactisme n'est pas inhibé en absence simple de pannexine-1, P2Y2 ou P2Y12 mais se trouve bloqué par un traitement à l'apyrase ou une inhibition large des récepteurs purinergiques. L'apyrase influence également négativement le recrutement de monocytes dans un modèle de péritonite induite par le C5a.

Les auteurs mettent ainsi en lumière un mécanisme de signalisation purinergique autocrine complexe qui permet d'amplifier la perception du gradient chimiotactique et d'induire une motilité directionnelle.

- Immunité adaptative

En 1990 fut établie pour la première fois une libération d'ATP par les cellules T et son influence possible sur ses fonctions effectrices (343).

L'activation des cellules T nécessite la reconnaissance par le TCR de l'antigène présenté sur une molécule de CMH des APCs au sein d'un espace entre les deux cellules appelé synapse immunologique. La signalisation intracellulaire est dépendante de l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$, indispensable pour l'activation du facteur de transcription NFAT et la synthèse du facteur de croissance IL-2.

Il est établi que l'activation des cellules T induit la libération d'ATP par la pannexine-1(235), laquelle est transloquée avec différents P2XR au niveau de la synapse immunologique. Les récepteurs P2X1, P2X4 (344) et P2X7 (345) sont des canaux qui permettent l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ et l'activation du lymphocyte.

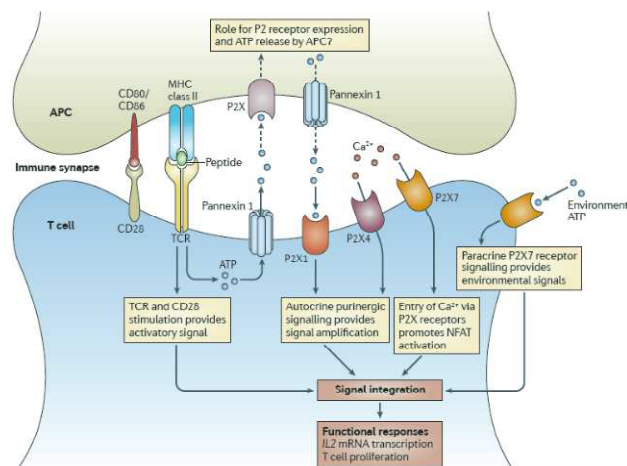


Figure 17 | Intervention de la signalisation purinergique dans la synapse immunologique (323)

La signalisation calcique est en réalité beaucoup plus complexe. Grassi (235) propose que l'association CMH/TCR conduit en premier lieu à l'entrée de Ca^{2+} via des canaux CRAC localisés dans la membrane plasmique. Cette première vague d'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ est suivie de son stockage dans la mitochondrie. L'augmentation de la $[Ca^{2+}]$ dans la mitochondrie favorise la production d'ATP qui est ensuite libérée par la pannexine-1. La signalisation purinergique autocrine via au minimum P2X7 viendrait ensuite pour amplifier le signal.

En outre, P2X7 pourrait être activé non pas en autocrine mais par des fortes teneurs en ATP dans l'environnement immédiat (323) et influencer la « pertinence d'activation ». La forte teneur en ATP dans l'environnement a également été montrée comme génératrice d'une différenciation Th17 au niveau de la lamina propria intestinale. Toutefois la signalisation de l'ATP semble principalement dépendante d'un sous type particulier d'APC (346).

D'autres études ont mis en évidence que les lymphocytes B libèrent également de l'ATP et que celui-ci favorise leur prolifération (347)

ii La libération d'ATP par une cellule en active une autre

L'ATP libéré par les cellules stressées, endommagées ou en apoptose sert de signal important dans l'induction de la réponse immunitaire. Cet ATP libéré agit comme un signal « *find me* » qui guident les phagocytes au site inflammatoire et favorisent la clairance des cellules atteintes (348). L'ATP libéré dans le milieu ne peut pas diffuser sur de longues distances et est rapidement métabolisé. Son action directe est locale par au moins deux actions distinctes qui vont conduire à la production de messenger type cytokines et chimiokines qui vont propager l'information et promouvoir l'établissement d'une inflammation

- l'ATP libéré, en synergie avec d'autres molécules de danger (HMGB1, HSP70...), va permettre l'activation de l'inflammasome Nlrp3 sur les phagocytes résidents et la production de IL-1 β . D'autres signalisations sont induites, notamment l'expression de molécules de co-stimulation sur les cellules dendritiques. La production locale de cytokines et chimiokines va induire des gradients chimioattractant qui vont diffuser en empruntant notamment la voie sanguine (**Cas numéro 1**)
- Les cellules apoptotiques libèrent de l'ATP qui constitue un signal « *find me* » pour les cellules immunitaires alentours. Les phagocytes internalisent et digèrent la cellule apoptotique sans création d'un environnement inflammatoire (**Cas numéro 2**)

Cas numéro 1 : Activation locale et production pro-inflammatoire

Les exemples *in vitro* du rôle du couple ATP/P2X7 dans l'activation de l'inflammasome Nlrp3 et la maturation de IL-1 β par les cellules types macrophages ou dendritiques sont légions. Des exemples de la pertinence de ce phénomène *in vivo* dans des cas d'inflammation stérile existent.

Un article élégant montre que lors d'une nécrose hépatique localisée, l'ATP libéré par les cellules nécrotiques va signaler sur P2X7 exprimé sur les macrophages résidents, les cellules de Küpfer, qui activent alors leur inflammasome Nlrp3 et produisent de l'IL-1 β (349). L'IL-1 β produite va notamment agir sur les cellules endothéliales qui vont alors favoriser le recrutement de neutrophiles au niveau de l'inflammation (349). L'ATP libéré n'attire donc pas directement les neutrophiles. De plus, la phase ultime du recrutement des neutrophiles, nérotactisme, n'est là encore pas réalisé principalement par l'ATP mais par des peptides mitochondriaux (349).

Une autre étude a montré que la réponse inflammatoire provoquée par l'injection de cellules nécrotiques est dépendante de l'inflammasome Nlrp3 (350). C'est principalement l'ATP issue des mitochondries des cellules nécrotiques qui constitue le principal signal de danger conduisant à l'activation de Nlrp3, la production de IL-1 β et le recrutement de neutrophiles (350). L'ATP signale en partie via P2X7 mais sa déficience ne modifie pas le recrutement de neutrophiles, excluant un rôle prépondérant de celui-ci (350).

Dans ces deux études, l'ATP libéré en forte concentration suite à une mort cellulaire agit à courte distance dans l'initiation de l'inflammation. La signalisation purinergique via par le couple ATP/P2X7 est importante pour l'activation de l'inflammasome Nlrp3 et la libération de l'IL-1 β .

Les greffes sont associées à des lésions et une mortalité cellulaire importante. Une étude montra que la libération de signaux de dangers peut être une des causes de la réponse immunitaire et du rejet du greffon (351). Ils ont montré une augmentation de la concentration en ATP de plusieurs manières et que celle-ci est importante pour favoriser l'activation des cellules dendritiques en conduisant à l'augmentation de l'expression de molécules de co-stimulation. Les auteurs montrent une dépendance de ce système en P2X7. Sa déficience diminue la réponse immunitaire et favorise la survie des animaux. Les auteurs montrent bien une diminution de la production de IL-1 β mais le lien avec la libération d'ATP et l'activation de l'inflammasome n'a pas été directement présenté (351). La découverte est centrée sur le rôle de l'ATP dans activation des cellules dendritiques qui vont ensuite activer plus efficacement les lymphocytes CD4 ou les CTL. Des expériences d'irradiation montrent l'intérêt de ces recherches dans les études sur les effets et les conséquences de la radiothérapie.

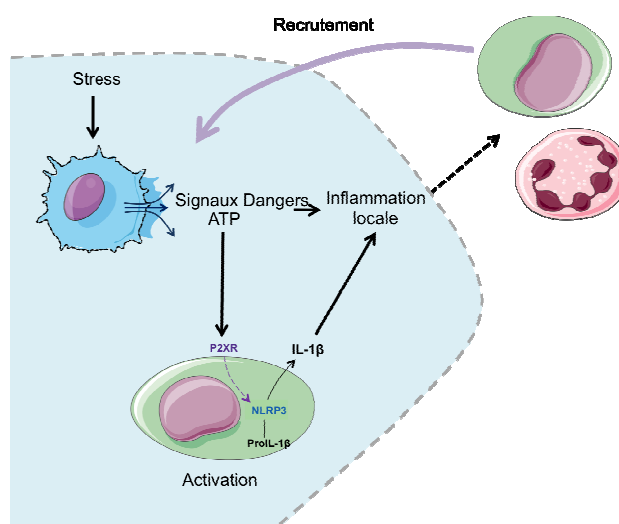


Figure 18 | ATP pro-inflammatoire

Les cellules stressées libèrent de l'ATP qui va activer localement les macrophages, notamment au travers de leur inflammasome Nlrp3 et la production d'IL-1 β . L'environnement cytokinique favorise le recrutement de cellules sanguines au site inflammatoire.

Cas numéro 2 : « *Find me* »

Les cellules apoptotiques après traitements aux UV ou anti-Fas libèrent précocement en quantité équivalente de l'ATP et de l'UTP qui agissent comme signaux « *find me* » sur les phagocytes (348). L'inhibition des connexines ou de l'excrétion vésiculaire n'a aucun effet significatif. Par contre, la pannexine-1 est identifiée comme essentielle (236). Cette protéine serait présente sous forme inactive à l'état basal et ne deviendrait active qu'en cas d'apoptose, devenant un substrat des caspases 3 et 7 qui la clivent de manière spécifique. Son clivage la rend compétente pour former un pore perméable aux nucléotides jouant le rôle de signal « *find-me* » (236). Une inhibition des caspases empêche

totale la fuite de nucléotides suite à l'induction de l'apoptose. La libération précoce de signaux par la cellule apoptotique se réalise sans augmentation de la perméabilité membranaire ou fuite de marqueurs cytoplasmiques (348). Le site de coupure est conservé chez l'homme, la souris et le poisson zèbre, suggérant un mécanisme maintenu de régulation de l'apoptose via la pannexine-1.

Sur les phagocytes, le principal récepteur impliqué est P2Y2, sensible à l'ATP/UTP (348). *In vivo*, le recrutement de monocytes est sensiblement diminué lorsque les nucléotides sont digérés par l'apyrase ou chez des souris déficientes en P2Y2 (348). Par ailleurs, L'élimination efficace des très nombreux thymocytes apoptotiques est également dépendante de la libération de nucléotides et de l'activation conjointes des phagocytes présents via P2Y2 et est bloquée par l'action de l'apyrase (348). En défaveur d'un mécanisme pléiotropique, le recrutement des phagocytes en réponse à la chimiokine CCL2 (MCP1) apparaît totalement indifférente à l'action de l'apyrase ou à l'inhibition des P2Rs (suramine) (348).

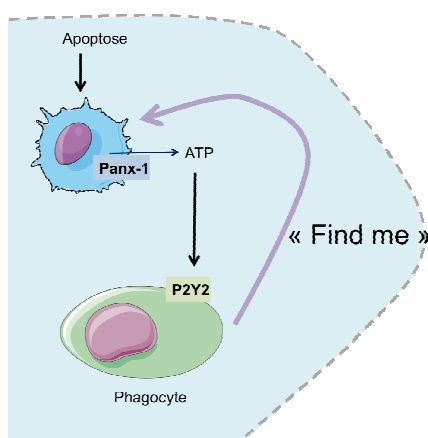


Figure 19 | Représentation de la voie « *find me* »
Les cellules apoptotiques attirent les phagocytes par la libération d'ATP

L'ajout exogène d'une quantité $\leq \mu\text{M}$ d'ATP ou d'UTP, dans une moindre mesure d'ADP ou d'UDP, mais pas d'adénosine, induit le recrutement de monocytes THP-1. L'inhibition des récepteurs à l'adénosine n'affecte pas la migration des monocytes en direction des cellules apoptotiques et l'ajout d'adénosine exogène n'induit pas leur migration (348).

Des concentrations extracellulaires fortes en ATP, au delà de $1\mu\text{M}$, sont considérées comme pro-inflammatoire comme dans le cas de mort cellulaire par nécrose (352). Il apparaît ici que des concentrations moindres en ATP sont anti-inflammatoires (353) et favorisent la clairance des cellules apoptotiques.

Les nuances, parfois ténues, entre apoptose et nécrose et leur implication sur la promotion d'une réponse immunitaire seront vues dans la partie discussion. On peut s'interroger sur la quantité et la cinétique de nucléotides libérés et la présence concomitante ou non d'autres signaux de dangers endogènes, IL-1 α ou HMGB1 notamment.

iii Distinction chimiotactisme / chimiocinétique : cas de l'ATP

Le rôle de l'ATP, dans le chimiotactisme et/ou la chimiocinétique, manque de clarté. Rappelons :

- Chimiotactisme : migration d'une cellule vers une source définie d'un agent qui l'attire
- Chimiocinétique : variation de la vitesse de déplacement d'une cellule sans notion de direction

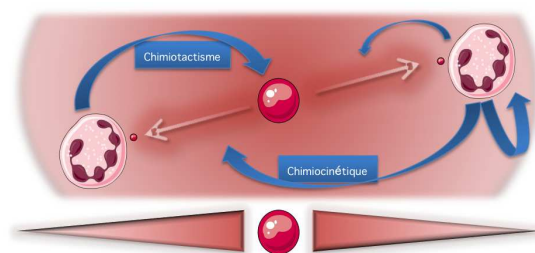


Figure 20 | Représentation de la différence entre chimiotactisme et chimiocinétique

Certaines expériences tendent à montrer que ces nucléotides exercent non pas une activité chimiocinétique (342) mais chimiotactique (341), ce qui est différent des données sur les neutrophiles montrant que l'ATP est chimo-cinétique et induit leurs migrations aléatoires (342).

Il est important de considérer que les nombreuses expériences de migration *in vitro* réalisées en *transwell* peuvent apporter des conclusions biaisées. En effet dans ce système on observe la capacité de cellule à se rendre d'un compartiment à l'autre, le déplacement peut être la conséquence d'un véritable gradient attracteur (chimiotactisme) ou de la promotion de la motilité (chimiocinétique, migration au hasard).

La somme non exhaustive des informations à disposition et la connaissance de la labilité de l'ATP sont en défaveur d'un pouvoir chimiotactique *in vivo*. Des expériences convaincantes ont montré dans un modèle de nécrose hépatique que l'administration d'apyrase en systémique réduit fortement le nombre absolu de neutrophiles recrutés au niveau proche de la zone lésée mais pas la capacité de ses neutrophiles en nombre restreint à se diriger ensuite sur le site précis (349).

D'une manière similaire, l'utilisation de l'antagoniste oATP des récepteurs purinergiques ou plus spécifiquement l'emploi de souris déficientes en P2X7 montre une réduction du recrutement de neutrophiles vers la lésion tissulaire sans altérer cependant le chimiotactisme de ceux parvenus sur le site (349).

La Pièce Jouée : unité de lieu, d'action et de temps

« *Science is like art and true scientists are like artists* »
« *Science is about describing nature, and so is art:
We're painting nature* »

Polly Matzinger
New York Times, 16 juin 1998

A. Unité de Lieu : Architecture Pulmonaire et fibrose

1 Architecture pulmonaire

a Anatomique et physiologique

L'appareil respiratoire se compose des voies aériennes supérieures (nez, bouche, fosses nasales, pharynx et larynx), de la trachée, des bronches puis des bronchioles débouchant sur les alvéoles. Il a pour fonction l'apport d'oxygène au corps et l'élimination du dioxyde de carbone contenu dans le sang.

La trachée débute au niveau du larynx et se termine par les bronches. Elle réalise la jonction entre voie aérienne supérieure et poumons. La surface interne des bronches est recouverte par un tapis de cils vibratiles et de mucus permettant de filtrer et rejeter à l'extérieur poussières et débris. Les 2 bronches principales se subdivisent dans les poumons au niveau du hile en bronches plus petites dites lobaires, qui elles-mêmes se subdivisent en bronches segmentaires puis en bronchioles. Les alvéoles constituent la partie terminale des bronchioles. Chaque alvéole établit des contacts avec un capillaire sanguin, facilitant les échanges gazeux. En contact direct avec le milieu extérieur, l'épithélium pulmonaire possède des mécanismes de défenses contre les microorganismes et les particules inhalées. Il combine notamment une fonction sécrétoire et une fonction ciliée afin de maintenir une clairance mucociliaire efficace.

La fonction de barrière

Tout épithélium est une juxtaposition de cellules polarisées reposant sur une lame basale. Les jonctions cellulaires entre les cellules épithéliales sont fermes, notamment au moyen de jonctions serrées (tight junction), ce qui assure une barrière physique entre l'environnement et le milieu intérieur. Rappelons que les alvéoles pulmonaires établissent une liaison étroite entre les milieux extérieur et intérieur.

La clairance mucociliaire

Le mucus forme un réseau gélifié riche en mucines, glycoprotéines de haut poids moléculaire ($>10^3$ kDa) qui ont la propriété de capter de façon non spécifique des particules environnementales. Le mucus contient des substances antibiotiques (IgA, lysozyme, complément, surfactant), des antioxydants (lactoferrine, glutathion, catalase, surfactant) et des antiprotéases. Le mucus assure une

protection des voies respiratoires. Une part importante des particules environnementales, virus ou microorganismes inhalés se retrouvent pris au piège et expulsée par l'activité des cellules ciliées et de la toux. L'importance de la clairance mucociliaire apparaît lors des maladies pulmonaires obstructives (asthme, bronchites chroniques...) avec dyskinésie ciliaire primaire où les cils ne battent plus correctement et le mucus n'est pas évacué.

b Cellulaire

i Non myéloïdes

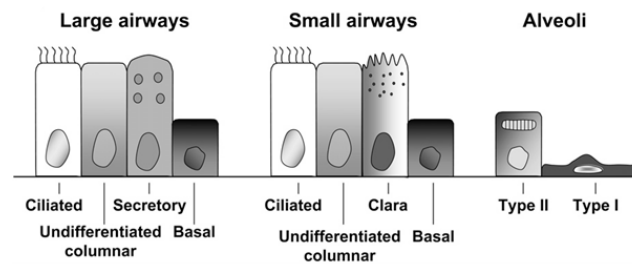


Figure 21 | Représentation des types cellulaires dans les différentes parties du poumon (354)

Les voies aériennes les plus larges d'un homme adulte sont recouvertes d'un épithélium prismatique pseudostratifié. Il est constitué de cellules ciliées, de cellules sécrétrices de mucus, de cellules indifférenciées et de cellules basales de renouvellement. Dans les voies aériennes plus petites, les bronchioles, l'épithélium devient cubique avec une présence accrue de cellules ciliées et une diminution de cellules muqueuses. Il est à noter également l'apparition des cellules de Clara à fonction sécrétrice. Les alvéoles sont quant à elles composées de pneumocytes de type I et de type II. (**Figure 21**)

Les pneumocytes

Les pneumocytes de type I couvrent au moins 90% de la surface alvéolaire totale, bien que moins nombreux que les pneumocytes de type II. Ce sont de très fines cellules qui se développent en une sorte de film souple et fragile permettant les échanges gazeux. Ces cellules sont étroitement accolées aux capillaires sanguins dont elles ne sont séparées que par la membrane basale, la diffusion de O_2 et du CO_2 se faisant ainsi aisément. Les pneumocytes de type I sont des cellules fragiles, sans capacité de se dupliquer. Leur endommagement par des polluants ou des microorganismes conduit à leur perte.

Les pneumocytes de type II sont des cellules cubiques ou arrondies sans extension cytoplasmique. Elles possèdent des microvillosités au pôle apical. Leur cytoplasme est riche en organites, témoin d'un métabolisme actif. Ces cellules sont caractérisées par un organite spécifique appelé corps lamellaire et composé de granules qui sécrètent un film phospholipidique, le surfactant. Le surfactant est essentiel car il permet de diminuer la tension superficielle en permettant ainsi une

distension pulmonaire plus facile. Sans lui les poumons s'effondreraient lors de l'expiration et l'organe perdrait sa fonction. Dans certains cas pathologiques, les pneumocytes de type II peuvent se transformer en cellules intermédiaires. Ils perdent leur corps lamellaire, modifient leur forme pour acquérir des extensions cellulaires, augmentent leur volume et leur surface cellulaire, adoptant la forme de pneumocytes de type I (355).

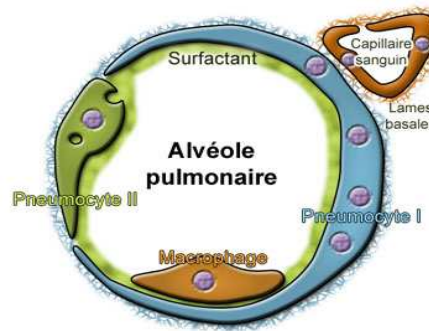


Figure 22 | Représentation d'un alvéole (source : Wikipédia)

Les fibroblastes interstitiels

Les fibroblastes interstitiels représentent 30 à 40% des cellules d'un poumon humain adulte sain. Ce sont les cellules productrices des composants de la matrice extracellulaire. Leur différenciation en myofibroblastes contribue de façon majeure au développement de pathologies pulmonaires fibrosantes notamment via la synthèse d' α -SMA (alpha-smooth muscle actin). Le TGF- β (Transforming Growth Factor beta) est un des facteurs les plus connus agissant sur l'activation et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et également pour son action profibrotique.

ii Myéloïdes innées

Les macrophages alvéolaires

De nombreux organes possèdent des phagocytes résidents et spécialisés. La peau contient les cellules de Langerhans, le foie les cellules de Kupfer, le cerveau les cellules microgliales. Les poumons possèdent les macrophages alvéolaires (356). Elles sont issues des monocytes sanguins et jouent le rôle de sentinelle. Elles protègent notre organisme de l'agression d'éléments extérieurs en assurant une surveillance continue des alvéoles pulmonaires. Elles phagocytent des dérivés endogènes (débris cellulaires, surfactant) et exogènes (polluants, particules minérales, micro-organismes) et peuvent initier l'inflammation avec les pneumocytes.

Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques forment une population hétérogène dont la distinction, basée parfois sur plus d'une dizaine de marqueurs, manque sensiblement de clarté (357). Toutefois, il est important de faire la différence entre les cellules dendritiques localisées dans les voies aériennes larges et celles localisées dans le parenchyme pulmonaire. Ces dernières envoient des prolongements cytoplasmiques dans la lumière des alvéoles pour capter des antigènes. Ces cellules vont ensuite les présenter sur leur CMH, migrer vers les nœuds lymphatiques drainant où elles pourront stimuler l'activation et la prolifération des lymphocytes particuliers.

2 La fibrose pulmonaire idiopathique (IPF)

a Description

La fibrose pulmonaire regroupe des maladies chroniques caractérisées par une inflammation plus ou moins importante, une cicatrisation pathologique des alvéoles et des tissus interstitiels. Sa forme idiopathique (IPF, **I**diopathic **P**ulmonary **F**ibrosis) est une des pathologies interstitielles pulmonaires les plus fréquentes. Le terme « idiopathique » signifie l'absence d'une causalité bien définie. L'IPF constitue un problème majeur de santé publique. Le nombre de nouveaux cas par an n'aurait cessé d'augmenter au cours de ces dernières années. Cela pourrait être dû à l'augmentation réelle de l'incidence (nombre de nouveaux cas par an) ou à un meilleur diagnostic. L'incidence est estimée en France autour de 5 pour 100 000. Les hommes sont plus touchés que les femmes et l'âge médian du début de la maladie est de 66 ans. 80% des cas de pneumopathies interstitielles diffuses se déclarent après 55 ans. Aux États-Unis, la prévalence (nombre de cas totaux) est estimée de 4 pour 100 000 pour les 18/34 ans à 227 pour 100 000 chez les 75 ans et plus (358).

En résumé, l'IPF associe un endommagement des cellules épithéliales alvéolaires, une inflammation chronique et une dérégulation des processus de réparation évoluant vers une fibrose pulmonaire irréversible.

b Etat des causes

Les causes de fibroses pulmonaires sont légions. Plus de 140 ont été référencées (359).

- Exogènes
 - o Inhalation de toxiques chimiques (tabagisme, mercure, chlore, ammoniac, essence, gaz industriels)
 - o Inhalation de composés organiques (pneumopathies d'hypersensibilité dans la maladie du poumon de fermier)
 - o Inhalation de poussières minérales (pneumoconioses par la silice, asbeste).
- Iatrogènes (radiothérapie pulmonaire, médicaments) et infectieuses (bactéries, virus).

- Intrinsèques

- o Pathologies pulmonaires prédisposantes (carcinomes pulmonaires, granulomatoses (sarcoïdose, histiocytose à cellules de Langerhans), sclérodermie, maladie rhumatoïde, lupus érythémateux disséminé, dermatomyosite, vascularites, maladie de Wegener, pneumopathies lipidiques)
- o Maladies génétiques (sclérose tubéreuse, neurofibromatose)

Dans la moitié des cas environ l'étiologie n'est pas connue et sera renseignée comme fibrose pulmonaire idiopathique. Elle peut évidemment être associée à des causes mentionnées ci-dessus sans que cela soit établi avec précision. Par exemple des études récentes suggèrent que 75% des patients présentant une IPF serait des fumeurs ou d'anciens fumeurs (360).

Plusieurs évidences dans la littérature pointent le rôle de l'auto-immunité comme un des mécanismes de l'endommagement alvéolaire responsable de l'IPF en parallèle avec la récurrence des agressions et expositions extérieures. La réparation tissulaire y serait dérégulée, la prolifération des fibroblastes exacerbée. La présence d'auto-anticorps dans le sérum des patients atteints de IPF et notamment d'anticorps spécifiques de collagènes et de ribonucléoprotéines a été démontrée dans plusieurs études (361). Certains patients atteints de maladies auto-inflammatoires telles que le lupus érythémateux systémique, l'arthrite rhumatoïde ou la sclérose progressive présentent des traits caractéristiques de maladies pulmonaires interstitielles (362).

c Symptômes

Les signes cliniques de l'IPF se manifestent généralement autour de cinquante ans et peuvent masquer une lente évolution asymptomatique antérieure. Ces signes se recoupent avec d'autres pathologies pulmonaires rendant difficile le diagnostic. Selon l'*American Thoracic Society* les caractéristiques histologiques sont proches de la pneumonie interstitielle commune (130). Les symptômes sont graduels avec notamment un essoufflement inhabituel au cours d'un effort physique (dyspnée à l'effort) et une toux sèche. La fibrose atteint ensuite une plus grande proportion du poumon. Dyspnée au repos, douleurs poitrinaires diffuses et signes cardiaques apparaissent (130). C'est trop souvent à ce moment, c'est à dire après l'installation de la pathologie qui a pu prendre plusieurs décennies, que le patient consulte et que le diagnostic s'établit.

d Traitements et pronostic

Le pronostic moyen des patients est mauvais, inférieur à certaines tumeurs malignes. Après diagnostic, l'état de la majorité des patients décline alors rapidement et des crises appelées « exacerbations » sont souvent mortelles (130). La survie est de deux à quatre ans (363). Les

possibilités de traitements sont limitées et se focalisent généralement sur les complications de type crise cardiaque ou infection. Des médicaments anti-inflammatoires comme la prednisone (corticostéroïde) peuvent apporter un confort mesurable mais ne perturbe pas la progression de la fibrose. Les drogues cytotoxiques du type cyclophosphamide n'ont pas apporté de preuve d'amélioration de la fonction pulmonaire ou de l'espérance de vie et peuvent être associé à de lourds effets secondaires (363). L'éviction des causes connues de fibrose est fortement recommandée (tabagisme, médication, oiseaux). Un traitement symptomatique peut être utilisé, telle l'oxygénothérapie. La transplantation pulmonaire est le dernier recours et ne concerne que les Pneumopathies Interstitielles Diffuses sévères touchant des sujets jeunes. Aucun traitement curatif contre l'IPF n'est disponible une fois la fibrose installée.

B. Unité de Temps :

Chez l'homme la fibrose pulmonaire est caractérisée par des épisodes séquentiels d'inflammation aiguë avec accumulation de cellules inflammatoires et endommagement du parenchyme. Cette phase d'inflammation répétée se traduit par la mise en place de processus de réparation tissulaire excessifs avec dépôt de composants de la matrice extracellulaire et notamment de collagène. Les fibroblastes et/ou myofibroblastes prolifèrent et des foci de lymphocytes apparaissent. Après plusieurs années, la formation de tissus cicatriciels fibreux, la perte d'élasticité et l'altération plus ou moins importante de l'architecture pulmonaire se traduisent par une fibrose pulmonaire qui est associée à la perte progressive de la fonction de l'organe.

Une période d'exacerbation constitue une complication majeure caractérisée par une réactivation des paramètres de l'inflammation aiguë. L'exacerbation est fréquemment fatale, le décès survenant dans une période de quelques semaines à quelques mois soulignant le rôle prépondérant de l'inflammation dans l'évolution de l'IPF (364).

1 La phase inflammatoire aiguë

Dans le modèle Bléomycine (BLM) de la fibrose pulmonaire utilisé au laboratoire chez la souris, la phase d'agression initiale est caractérisée par une mort cellulaire massive avec la présence de nombreux débris cellulaires dans le lavage broncho-alvéolaire (BAL) après 24h. La BLM agit principalement en provoquant une apoptose. Or une apoptose physiologique où les cellules sont internalisées et digérées par des phagocytes est non-inflammatoire. Il est probable que la forte mortalité cellulaire dans le poumon ne puisse pas être prise en charge et se répercute en mort par nécrose secondaire, laquelle est immunogénique. Dans notre hypothèse de travail, en droite ligne avec l'hypothèse du danger théorisée par Polly Matzinger (33) les cellules, en mourant de façon mal contrôlées, vont libérer des signaux à l'origine de l'activation du système immunitaire innée. La dégradation de la matrice cellulaire va également conduire à la production de molécules répertoriées

comme alarmines, notamment acide hyaluronique et activerait les macrophages, les DCs et les cellules endothéliales par l'engagement de TLR4 (365, 366) et TLR2 (367) ou encore le protéoglycane biglycan (368).

Chez l'homme la question de l'origine de la pathologie reste le plus souvent indéterminée. La présence d'une inflammation chez l'homme reste l'objet de débat et à mettre en parallèle avec celle bien nette déclenchée par la BLM. Cependant, des travaux récents montrent la présence de cellules inflammatoires dans les aires fibrotiques de patients (données présentées par Bruno Crestani lors du 10th World Congress of Inflammation, Paris, 2011).

2 La phase inflammatoire chronique et la fibrose

Suite à l'endommagement cellulaire les mécanismes de réparation cellulaires et histologiques sont fondamentaux. Une balance essentielle entre les protéases (MMPs, **M**atrix **M**etallo**P**roteinases) et leurs inhibiteurs (TIMPs, **T**issus **I**nhibitors of **M**etallo**P**roteinases) contrôle le renouvellement de la matrice extracellulaire (ECM, **E**xtracellular **M**atrix). En schématisant, une dérégulation en faveur des MMPs va conduire à une pathologie pulmonaire de type emphysème alors que celle en faveur des TIMPs va conduire à une fibrose. Ceci-dit il s'agit bien d'un équilibre où des protéines des deux familles sont fortement induites dans les deux pathologies. Dans certains cas pathologiques, il peut se produire dans deux zones différentes d'un poumon des lésions de type emphysème et fibrose (369). Dans le protocole d'induction de la fibrose utilisé au laboratoire, la MMP-9 et le TIMP-1 sont exprimés précocement et se retrouve lors de la phase fibrotique.

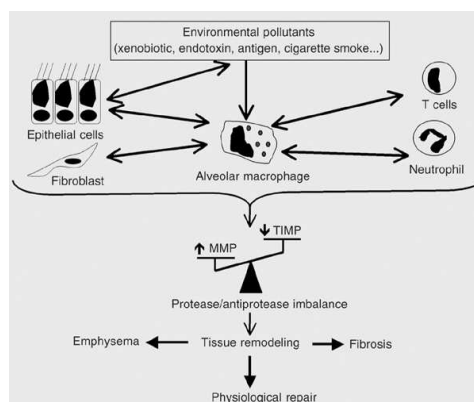


Figure 23 | Représentation de la balance MMP/TIMP et pathologies associées (370)

Les MMPs sont des protéases ayant la capacité de cliver les constituants de la MEC. Il existe 25 MMPs différentes dont les collagénases, les gélatinases et les élastases (371). Les TIMPs regroupent 4 membres structuralement. Ils se lient avec une haute affinité au site catalytique des MMPs et entraîne la perte de leur l'activité protéolytique (372).

Les MMPs sont faiblement exprimées dans les tissus adultes sains. Le lavage bronchoalvéolaire de patients atteint de fibrose pulmonaire présente une nette augmentation du taux de collagénases (373). Toutefois dans le cadre de la fibrose, les balances d'expressions et d'activités

pencheraient en faveur des TIMPs avec un défaut de dégradation de la ECM et inhibitions des MMPs (374).

Les pneumocytes de type II vont proliférer et prendre la place des pneumocytes de type I, incapables de se renouveler suite à l'endommagement. Lors de la phase de fibrose, on observe une diminution du nombre de cellules inflammatoires, un remaniement des structures alvéolaires avec activation et prolifération des fibroblastes, différenciation en myofibroblastes et remplacement du tissu interstitiel par des fibres de collagène. Dans le modèle BLM, il y a également un très fort recrutement de lymphocytes.

C. Unité d'action :

1 La Bléomycine et modèle murin de l'IPF

a Nature, découverte et utilisation

La bléomycine (BLM) est naturellement produite par la bactérie gram positive *Streptomyces verticillus*. C'est un antibiotique utilisé en chimiothérapie (375-378) comme antinéoplasique en combinaison avec d'autres molécules dans le traitement de lymphomes, de certains carcinomes, des tumeurs germinales ou encore en cas d'épanchement pleural malin (379). La BLM comprend plusieurs composés de structures proches. La BLM, utilisée généralement en thérapeutique comporte majoritairement de la bléomycine A2 et B2 (379). Les structures et propriétés communes et spécifiques des différentes formes de BLM ont beaucoup été analysées que ce soit par étude du substrat ou par dégradation chimique.

Son utilisation comme modèle de fibrose pulmonaire est basée sur la constatation que cette pathologie est un des effets secondaires indésirables principaux associée à son utilisation en thérapie anticancéreuse. Le risque associé dépend de la dose administrée, de l'âge du patient, du tabagisme ou de la préexistence de pathologie pulmonaire. Environ 10% des patients développent une toxicité pulmonaire au bout de plusieurs semaines et environ 10% d'entre eux développeront une fibrose (130, 380).

La bléomycine agit en causant des coupures au sein des ADN simple et double brins ce qui stopperait le cycle cellulaire notamment dans les cellules tumorales (130). Il fut démontré que la BLM pouvait également réaliser la dégradation oxydative des ARN cellulaires. La BLM est un glycopeptide qui contient au moins quatre domaines fonctionnels incluant un domaine de fixation de métaux (Fe^{2+} Cu^{2+}) et un domaine d'activation de l'oxygène moléculaire essentiel pour la captation d'un atome d'hydrogène présent sur les acides nucléique (381). Un motif sucré est présent et bien que peu compris, il pourrait participer à la reconnaissance de la cible cellulaire, à son internalisation et à la coordination de la fixation de l'ion métallique (381).

Au final, il est important de retenir qu'il existe plusieurs formes de BLM, que ses structures et mécanismes d'actions ne sont pas parfaitement élucidés et que cela peut grandement influencer les résultats expérimentaux en fonction de l'utilisation. Il est admis que les coupures des acides nucléiques se réalisent en chélatant des ions métalliques et conduisent à la production de radicaux libres (382). La superproduction de ROS serait en partie responsable de la réponse inflammatoire et de la toxicité pulmonaire, de l'activation des fibroblastes et finalement de la fibrose (383).

Une enzyme naturelle, la bléomycine hydrolase, inactive la bléomycine ce qui influence fortement les effets de la drogue suivant le tissu considéré. Les poumons maintiennent de faibles doses de cette enzyme et serait en conséquence susceptibles à l'action de la bléomycine (384).

b Bléomycine et fibrose

Modèle

La Bléomycine fournit 15 000 entrées sur la base de données Pubmed dont plus de douze cents revues. Plus de 5000 publications comportent ce mot dans leur titre dont environ 150 ont moins d'un an. La première référence date de 1965, publiée par le japonais Hamao Umezawa qui fait état de son activité anti-tumorale (375).

En 1974, il fut établi que chez la souris une dose de 1mg/kg en IP deux fois par semaine était fatale à tous les animaux dans les 5 semaines. A 0,1 et 0,5mg/kg, la BLM entraîne le décès de la moitié des animaux et la majorité présente des lésions pulmonaires dont une fibrose (385). Le modèle bléomycine reste chez les rongeurs le modèle le plus courant pour l'étude chez l'homme de la fibrose pulmonaire idiopathique (130).

La bléomycine peut être administrée en intratrachéale ou en intranasale. L'intratrachéale nécessite une petite chirurgie et provoque une réponse généralement plus forte que l'intranasale, voie d'administration utilisée en laboratoire. A noter que même en injection IV ou IP, il se produit des lésions pulmonaires et pleurales (386).

En administration orale, la BLM va causer la mort des cellules dans lesquelles elle rentre en contact, principalement les cellules épithéliales, endothéliales et les macrophages alvéolaires. Les premières lésions apparaissent dans les régions périvasculaires et péribronchiques. Un œdème interstitiel diffus ainsi qu'une augmentation du nombre de macrophages présent dans les alvéoles sont observés. Dans une tentative de préservation de l'homéostasie les pneumocytes de type II vont perdre leur corps lamellaire, dont les débris vont s'accumuler dans les alvéoles, vont proliférer et prendre la place des pneumocytes de type I nécrotiques. La fibrose va s'installer progressivement après invasion des alvéoles par les fibroblastes et formation de nodules de collagène et de foyers fibroblastiques au

niveau de l'interstitium. Toutes ces caractéristiques sont également observées chez les patients atteints d'IPF comme indiqué ci-dessous.

ii Mode d'action

Les mécanismes exacts de la mort cellulaire en réponse à la BLM font toujours l'objet d'intenses tractations. Notre hypothèse de travail basée sur l'inflammation en condition stérile et la théorie du danger développée par Polly Matzinger. Celle-ci stipule que les cellules endommagées libèrent des alarmines qui vont prévenir l'hôte qu'une rupture de l'homéostasie potentiellement délétère est en cours et dont la prise en charge doit être évaluée.

L'essentiel des travaux sur la toxicité de la BLM montre que les cellules meurent principalement par apoptose et non par nécrose. Or une différence principale d'intérêt ici est que l'intégrité de la membrane plasmique est perdue précocement dans la nécrose alors qu'elle peut persister longtemps dans l'apoptose. Cela pourrait largement conditionner l'émission de signaux de dangers propre à notre hypothèse.

L'apoptose en réponse à la BLM emprunterait les deux voies, intrinsèque (387)(388) et extrinsèque (389). Marquant la complexité du système, d'autres voies de signalisation apparaissent cruciales, notamment celle de la Cathepsine D (390) et l'angiotensine (391).

Il est envisageable de penser que bien que la BLM induise par elle-même une mort cellulaire qui emprunte les voies non immunogènes connues de l'apoptose, les dommages dans l'organisation tissulaire, l'intensité de stress oxydatif, la mort des phagocytes résidents eux-mêmes peuvent conduire au final, en moins en partie, à une nécrose secondaire et à la libération de signaux de dangers pro-inflammatoires.

iii Atouts

Les avantages du modèle résident en partie dans la correspondance de nombreuses caractéristiques retrouvées chez les patients, avec endommagement de l'épithélium alvéolaire, recrutement de cellules inflammatoires, production de médiateurs, activation/prolifération anormale des fibroblastes et dépôts de composés de la matrice extracellulaire au niveau de l'interstitium et de l'espace alvéolaire. Deux autres avantages sont la reproductibilité du modèle et l'apparition rapide de la fibrose, du 14^{ème} au 28^{ème} jour selon les doses et la BLM utilisées, ce qui facilite la répétabilité et minimise les coûts. Le modèle souris permet l'utilisation d'un grand nombre d'animaux génétiquement modifiés ce qui joue un rôle majeur dans la mise en évidence de certaines voies de signalisations et leur régulation.

iv Critiques

Depuis plusieurs décennies de très nombreux agents ont été montré comme capables d'inhiber la fibrose expérimentale. Outre l'attrait parfois volontairement promotionnelle, il est important de noter qu'aucun d'entre eux (en 2008 (130)) n'est utilisé en clinique dans le traitement de l'IPF. Entre 1980 et 2006, 240 études ont décrit le bénéfice de tel ou tel composé aux vertus antifibrotiques dans le modèle bléomycine. 222 études ont utilisé le composé en préventif et seulement 13 en traitement thérapeutique (130). Il est critique de distinguer les drogues qui interfèrent avec les phases inflammatoires et fibrogéniques précoces de celles qui préviendraient la progression de la fibrose, cette dernière étant beaucoup plus significative en clinique. Malgré l'absence de bénéfice direct pour les patients, le modèle bléomycine a nettement contribué à élucider le rôle de voies de signalisation de cytokines et de facteurs de croissance impliqués dans le développement de l'IPF. Par exemple, cela a permis de découvrir le rôle clé du TGF β (392).

Le modèle BLM est considéré comme très inflammatoire en comparaison de la maladie observée chez l'homme ce qui laisse penser que les mécanismes sont différents. On peut opposer le caractère irréversible chez l'homme et pas chez la souris ou la fibrose peut se résorber et également la chronologie des événements : expositions répétées et années d'un côté contre administration unique et semaines de l'autre.

v Autres modèles

Le tableau ci-dessous rapporte les principaux moyens expérimentaux d'induction de fibrose pulmonaires, le type de lésions occasionnées et les espèces utilisées. Le modèle BLM reste le plus

Exogenous Agent/Approach	Nature of Tissue Damage	Animal Species Used
Bleomycin	Oxidant-mediated DNA scission leading to fibrogenic cytokine release	Mice, rats, hamsters, rabbits, dogs, primates, pheasants
Inorganic particles (silica, asbestos)	Type IV hypersensitivity reactions with or without granuloma formation	Mice, rats, hamsters, sheep, rabbits
Irradiation	Free radical-mediated DNA damage	Mice, rats, rabbits, dogs, hamsters, sheep, primates
Gene transfer (TGF- β , IL-1 β , GM-CSF)	Downstream activation of specific cytokine pathway/s	Mice, rats
Fluorescein isothiocyanate	Incompletely understood. Presumed T-cell-independent.	Mice
Vanadium pentoxide	Incompletely understood. An inorganic metal oxide.	Mice, rats
Haptenic antigens (e.g. trinitrobenzene sulphonic acid compounds)	Recall cell-mediated immune response	Mice, hamsters

Tableau 2 | Approches expérimentales pour l'induction de fibrose pulmonaire (386)

2 Les particules

La bléomycine permet d'étudier l'inflammation en condition stérile et le rôle des signaux de dangers endogènes. Les résultats du laboratoire et la littérature nous ont conduit à nous intéresser en profondeur au dogme de la théorie du danger et à étudier les voies de signalisation associées. Aujourd'hui le rôle prépondérant des NLRs et plus spécifiquement de l'inflammasome Nlrp3 apparaît central. Nous avons nous sommes ainsi intéressés aux mécanismes d'activation de cet inflammasome en utilisant comme stimulateurs des agents particuliers. Les études ont été majoritairement réalisées *in vitro* sur macrophages et cellules dendritiques mais *in vivo* l'instillation de ces particules s'accompagne d'une inflammation pulmonaire et plus rarement d'une fibrose dans nos conditions expérimentales à court terme. L'avantage comme le point faible de l'approche *in vitro* est l'utilisation d'un système biologique réduit donc plus simple dans son approche causale mais difficilement extrapolable à la complexité d'un organisme pluricellulaire.

a Macroscopiques

De nombreuses particules sont connues pour activer l'inflammasome Nlrp3. Elles peuvent être de nature :

- exogène : les particules de silice, d'asbeste (amiante) ou d'hydroxyde d'aluminium,
- endogène : les particules formées par l'agrégation de protéine beta-amyloïde (maladie d'Alzheimer), les cristaux de cholestérol (athérosclérose) ou les cristaux de MSU (goutte)

L'exposition répétée, notamment professionnelle, à des particules de silice ou d'asbeste conduit à de graves pathologies pulmonaires, respectivement silicose et asbestose. L'accumulation de dérivés endogènes métaboliques ou pathologiques apparaît dans de nombreuses maladies. Ainsi, la meilleure compréhension des mécanismes immunitaires impliquée dans la détection de matériel particulaire présente une pertinence clinique non négligeable.

Au laboratoire nous disposons de particules de MSU, de silice, d'alum

A noter que la nature particulaire ne suffit à l'activation de cellules de l'immunité innée. Assez étonnamment, les cristaux de diamant (393), d'allopurinol (393) mais aussi des particules d'échappements diesel (394), des condensés de fumée de cigarette (394) ou des billes inertes de polystyrène (394) n'activent pas Nlrp3.

b Nanoscopiques

Les nanoparticules sont des molécules comportant jusqu'à quelques centaines d'atomes et dont l'un des faces n'est longue que de quelques nanomètres. A titre de comparaison, un alignement de 10 atomes d'hydrogène fait 1nm et un virus moyen 50nm. L'industrie utilisant des nanoparticules est en plein essor et pourrait représenter un marché de 1000 milliards d'euros en 2015. Il existe une

pléthore d'intérêts à l'utilisation de tels composés dont une des caractéristiques principales est l'augmentation du pourcentage d'atomes à la surface par rapport à sa « taille standard ». Ainsi, les matériaux peuvent être plus légers et plus résistants, les conductivités, solubilités, activités catalytiques et bien d'autres propriétés peuvent être bouleversées à souhait.

On retrouve le fruit des nanotechnologies dans la vie courante, aussi bien dans l'équipement, la santé que la nourriture. Cependant la majorité de la recherche s'est penchée sur les applications des nanoproducts mais pas sur leurs implications sur la santé et l'environnement.

Au laboratoire nous avons à l'heure actuelle trois nanoparticules à l'étude. Leur taille est approximativement de 20nm. Il s'agit de TiO_2 (dioxyde de titane), SiO_2 (dioxyde de silicium) et ZnO (oxyde de Zinc). Les deux premiers activent l'inflammasome Nlrp3 mais pas le dernier. Toutefois leur tendance à s'agréger perturbe grandement l'appréciation de leurs effets pro-inflammatoires.

Résultats

I. Article 1 : Rôle de l'acide urique et de sa forme cristalline MSU dans l'inflammation Nlrp3-dépendante et la fibrose pulmonaire

Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis

Gasse P*, Riteau N*, Charron S, Girre S, Fick L, Pétrilli V, Tschopp J, Lagente V, Quesniaux VF, Ryffel B, Couillin I. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 May 15;179(10):903-13.

* These authors contributed equally to this work.

Certains résultats publiés dans cet article ont été obtenus avant mon arrivée au laboratoire, les expériences réalisées principalement par Pamela Gasse. J'ai participé à ces travaux lors de mon stage de 8 mois en Master 2.

Deux ans auparavant, Gasse et al. publiaient le rôle critique de l'axe MyD88/IL-1R1 dans la réponse à la BLM (395). Les souris déficientes en IL-1R1 présentent une inflammation et une fibrose très réduite. Fort de ce phénotype, l'équipe du laboratoire s'est intéressée à la régulation de la production d'IL-1 β et donc à l'inflammasome, n'ayant montré pour l'heure que des résultats sur la protéine adaptatrice ASC, commune à plusieurs inflammasomes.

Ici, nous confirmons le rôle de l'inflammasome Nlrp3 dans l'inflammation cellulaire et cytokinique en réponse à la BLM. Les souris déficientes en Nlrp3, ASC, Casp-1 ou celles traitées par un inhibiteur la caspase (Z-yvad-fmk) présentent toute une inflammation diminuée. L'implication de l'inflammasome Nlrp3 dans l'évolution vers la fibrose est également exposée.

Cherchant à connaître les signaux capables d'activer Nlrp3 dans ce modèle en conditions stérile, notre attention s'est tournée vers les signaux de dangers et en premier lieu l'acide urique. Produit de dégradation des bases azotées, l'acide urique est libéré par les cellules mourantes et constitue un signal pro-inflammatoire (396). Sa forme cristallisée, le MSU, active l'inflammasome Nlrp3 pour la production de IL-1 β dans un modèle de goutte (393).

Nous montrons tout d'abord que le contenu en acide urique dans le poumon est augmenté quelques heures après l'instillation de BLM, confortant la crédibilité de l'hypothèse. Afin de savoir si le surcroît d'acide urique libéré dans le poumon pouvait être immunogénique, nous avons cherché à moduler sa quantité par deux moyens. Soit un traitement des souris à l'uricase, enzyme favorisant sa dégradation, soit un traitement à l'allopurinol, enzyme qui inhibe sa formation. Les résultats montrent que les deux types de traitements permettent une diminution de l'inflammation et de la fibrose.

Dans les fluides organiques l'acide urique à tendance à s'agréger sous forme de cristaux de MSU (397). Bien que nous n'ayons jamais pu observer directement de cristaux endogènes, l'administration de MSU provoque une inflammation pulmonaire largement dépendante de l'axe Nalp3/IL1-R1.

Au final, cet article identifie pour la première fois le rôle essentiel de l'acide urique et de sa signalisation au travers de l'inflammasome Nlrp3 dans le modèle murin de la fibrose pulmonaire idiopathique.

Uric Acid Is a Danger Signal Activating NALP3 Inflammasome in Lung Injury Inflammation and Fibrosis

Pamela Gasse^{1*}, Nicolas Riteau^{1*}, Sabine Charron¹, Sandra Girre¹, Lizette Fick², Virginie Pétrilli³, Jürg Tschopp³, Vincent Lagente⁴, Valérie F. J. Quesniaux¹, Bernhard Ryffel¹, and Isabelle Couillin^{1,5}

¹University of Orleans and CNRS, Orleans, France; ²Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, Cape Town, South Africa;

³Department of Biochemistry, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland; ⁴INSERM U620, Université de Rennes 1, Rennes, France; and

⁵Key-Obs S. A., Orleans, France

Rationale: Lung injury leads to pulmonary inflammation and fibrosis through myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) and the IL-1 receptor 1 (IL-1R1) signaling pathway. The molecular mechanisms by which lung injury triggers IL-1 β production, inflammation, and fibrosis remain poorly understood.

Objectives: To determine if lung injury depends on the NALP3 inflammasome and if bleomycin (BLM)-induced lung injury triggers local production of uric acid, thereby activating the NALP3 inflammasome in the lung.

Methods: Inflammation upon BLM administration was evaluated *in vivo* in inflammasome-deficient mice. Pulmonary uric acid accumulation, inflammation, and fibrosis were analyzed in mice treated with the inhibitor of uric acid synthesis or with uricase, which degrades uric acid.

Measurements and Main Results: Lung injury depends on the NALP3 inflammasome, which is triggered by uric acid locally produced in the lung upon BLM-induced DNA damage and degradation. Reduction of uric acid levels using the inhibitor of uric acid synthesis allopurinol or uricase leads to a decrease in BLM-induced IL-1 β production, lung inflammation, repair, and fibrosis. Local administration of exogenous uric acid crystals recapitulates lung inflammation and repair, which depend on the NALP3 inflammasome, MyD88, and IL-1R1 pathways and Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 for optimal inflammation but are independent of the IL-18 receptor.

Conclusions: Uric acid released from injured cells constitutes a major endogenous danger signal that activates the NALP3 inflammasome, leading to IL-1 β production. Reducing uric acid tissue levels represents a novel therapeutic approach to control IL-1 β production and chronic inflammatory lung pathology.

Keywords: uric acid; inflammasome; lung inflammation; fibrosis; bleomycin

Recurrent episodes of acute lung injury of unknown origin lead to interstitial pulmonary fibrosis with respiratory failure, and no effective therapy is available (1). Bleomycin (BLM) causes oxidative damage and cell death of alveolar macrophages and epithelial cells, leading to experimental lung fibrosis (2). In this experimental model, we demonstrated that inflammation, repair, and fibrosis are dependent upon IL-1 β production and IL-1R1/myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) signaling and that the ASC adaptor molecule of the inflammasome complex is required

AT A GLANCE COMMENTARY

Scientific Knowledge on the Subject

Reducing uric acid tissue levels represents a novel therapeutic approach to control IL-1 β production and chronic inflammatory lung pathology.

What This Study Adds to the Field

Uric acid released from injured cells exposed to bleomycin constitutes a major endogenous danger signal that activates the NALP3 inflammasome leading to IL-1 β product leading to lung inflammation and fibrosis.

for BLM-induced inflammation (3). However, the upstream mechanisms leading to caspase-1 activation and IL-1 β secretion upon lung injury are largely unknown. Abnormal self or cell damage provide signals that alert the immune system to danger, triggering innate immunity that results in inflammation and repair (4). The mechanisms of innate immunity activation in response to tissue injury are just emerging (5). Dying cells release danger signals that alert the immune system and stimulate innate and adaptive immunity (6). The danger signals are recognized via membrane receptors, such as TLRs (7–9), or cytosolic receptors, such as NLRs. In particular, NALP3 (also called cryopyrin or NLRP3) is a major proinflammatory danger receptor (10–14) activated by uric acid in gout arthritis (10, 15). Uric acid, a product of purine catabolism, was identified in dying cells and enhanced dendritic cell maturation and the CD8–T-cell response (16). Large amounts of uric acid are produced from injured tissue *in vivo* after tumor chemotherapy, leading to tumor lysis syndrome characterized by hyperuricemia (17). At high local concentration, uric acid precipitates and forms crystals that cause inflammation, as observed in clinical gout, and activate the caspase-1-containing NALP3 inflammasome, resulting in the production of active IL-1 β (10). Based on the fact that cell/tissue injury and necrosis result in the production of uric acid, we hypothesized that uric acid crystals formed at the injury site might represent a key danger signal activating the inflammasome to release IL-1 β , thereby causing inflammatory lung pathologies.

Some of the results of these studies have been previously reported in the form of an abstract (18).

METHODS

Mice

The following mice deficient for MyD88 (19), IL-1R1 (20), IL-18R (21), Casp-1 (22), TLR4 (23), TLR2 (24), NALP3 (10), or ASC (25) were used in this study. MyD88^{−/−}, Casp-1^{−/−}, TLR2^{−/−}, ASC^{−/−}, TLR4^{−/−},

(Received in original form August 13, 2008; accepted in final form February 12, 2009)

Supported by the French Conseil Général du Loiret and Fondation de la Recherche Médicale.

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Isabelle Couillin, M.D., Molecular Immunology and Embryology, UMR6218, 3B rue de la Férollerie, 45071 Orleans, France. E-mail: couillin@cnrs-orleans.fr

Am J Respir Crit Care Med Vol 179, pp 903–913, 2009

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.200808-1274OC on February 12, 2009
Internet address: www.atsjournals.org

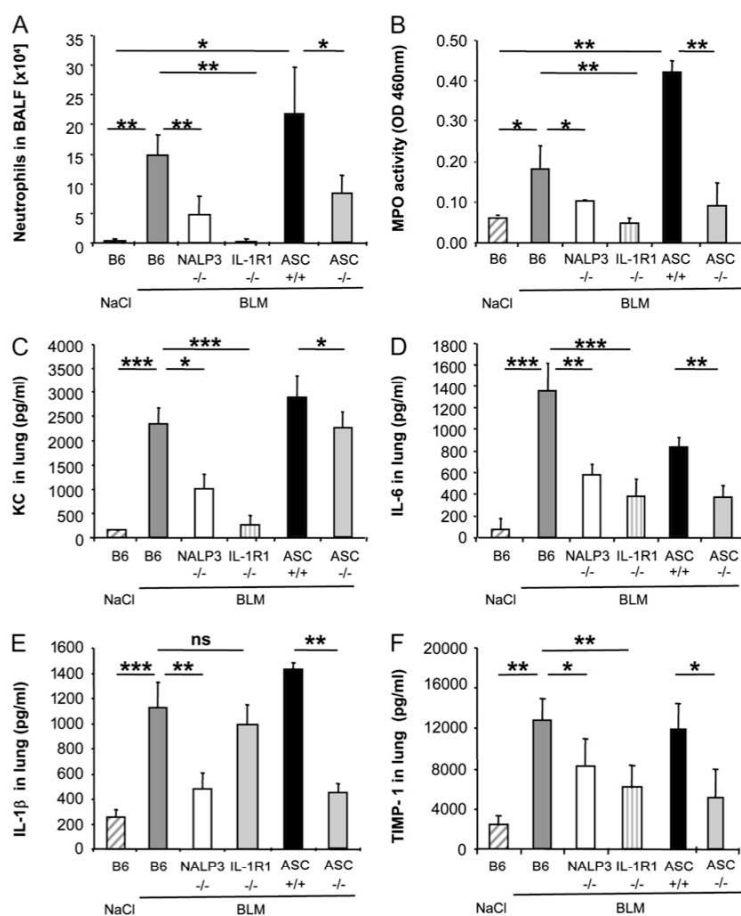


Figure 1. Bleomycin (BLM)-induced pulmonary inflammation and remodeling are dependent on NALP3 and ASC proteins. (A) Neutrophil counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). (B) Myeloperoxidase activity in lung homogenates. (C) KC, (D) IL-6, (E) IL-1 β , and (F) TIMP-1 concentrations in lung homogenates 24 hours after intranasal instillation of BLM (10 mg/kg) of wild-type or NALP3^{-/-}, IL-1R1^{-/-}, or ASC-deficient mice. In this experiment, ASC^{-/-} backcrossed four times, were compared with their ASC^{+/+} littermates. These data were reproduced with ASC^{-/-} backcrossed on 10 generations onto a C57BL/6. Data represent mean values $\pm$ SD from four independent experiments (n = 5 mice per group). **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001; ns = nonsignificant.

double-deficient TLR2^{-/-}TLR4^{-/-}, and IL-18R^{-/-} mice were backcrossed 10 times on the wild-type C57BL/6 genetic background, except in Figure 1, where ASC^{-/-}, backcrossed four times, were compared with their ASC^{+/+} littermates. IL-1R1^{-/-} mice were backcrossed seven times, and NALP3^{-/-} mice were directly generated on the C57BL/6 genetic background. All mice, including control C57BL/6, were bred in our animal facility at the Transgenese Institute (CNRS, Orleans, France). For experiments, adult (6–10 wk old) animals were kept in sterile, isolated, ventilated cages. All animal experiments complied with the French Government's ethical and animal experiment regulations.

Uric Acid or Allopurinol Crystals Preparation

Uric acid or allopurinol crystals were obtained by dissolving 1.68 mg of powder in 0.01 M NaOH preheated to 70°C and added as required to maintain pH between 7.1 and 7.2. The solution was filtered and incubated at room temperature under slowly and continuously agitation until crystals formed. Crystals were washed twice with ethanol 100%, dried, autoclaved, and kept sterile. The weight of dry crystals was determined under sterile conditions. The crystals were resuspended in PBS by sonication and examined under phase microscopy.

Lung Inflammation Model Experimental Design

BLM sulfate (10 mg/kg) from Bellon Laboratories (Montrouge, France), uric acid, or allopurinol crystals (5–50 mg/kg) in saline or vehicle alone were administered by intranasal instillation under light ketamine-xylazine anesthesia, and bronchoalveolar lavage (BAL) and lung tissue were assayed after 6 hours (for uric acid crystal) or 24 hours (for BLM) for markers of inflammation, including cell recruitment and in particular neutrophil influx, chemokine, and cytokine levels, including KC, IL-6, and IL-1 β and 14 days later for markers of tissue remodeling, such as gelatinases MMP9 and MMP2 and their inhibitor TIMP-1. Allopurinol

(Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) was injected at 25 mg/kg subcutaneously, and uricase (Fasturtec; Sanofi Synthelabo, Paris, France) was given at 0.2 mg/kg intraperitoneally or intranasally with similar efficacy. IL-1Ra (Anakinra; Amgen Thermo Shandon, Cergy Pontoise, France) was injected at 10 mg/kg subcutaneously. Optimized doses of allopurinol or uricase were tested, and repeated administrations were more effective than higher doses (data not shown).

Bronchoalveolar Lavage Fluid

After incision of the trachea, a plastic cannula was inserted, and airspaces were washed using 0.3 ml of PBS solution heated to 37°C. The rib cage was gently massaged to enable maximum cell collection. The fluid was collected by careful aspiration. This procedure was performed 10 times, and the recovery of the total lavage exceeded 95%. The samples collected were dispatched in two fractions: the first sample (1 ml corresponding to the two first lavages) was used for mediator measurement, and the second sample was used for cell determination (4 ml). The first fraction was centrifuged (600 $\times$ g for 10 min), and the supernatant was fractionated and kept at -80°C until mediator determination. The cell pellet was resuspended in 0.4 ml PBS, pooled with the second fraction, and maintained at 4°C until cell determination.

Lung Homogenization

After BAL was performed, the whole lung was removed and placed inside a microtube (Lysing matrix D; Q Bio Gene, Illkirch, France) with 1 ml of PBS. Total lung tissue extract was prepared using a Fastprep system (FP120; Q Bio Gene). The extract was centrifuged, and the supernatant was stored at -80°C before mediator measurement, myeloperoxidase (MPO), or collagen assay with Sircol Collagen Assay (France Biochem Division, Meudon, France).

MPO Activity in Lung

Lung tissue MPO activity was evaluated as described (3). In brief, the right heart ventricle was perfused with saline to flush the vascular content, and lungs were frozen at -20°C until use. Lung tissue was homogenized by polytron and centrifuged, and the supernatant was discarded. The pellets were resuspended in 1 ml PBS containing 0.5% hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HTAB) and 5 mM ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA). After centrifugation, 50 μL of supernatants were placed in test tubes with 200 μL PBS-HTAB-EDTA, 2 ml Hanks' balanced salt solution, 100 μL of o-dianisidine dihydrochloride (1.25 mg/mL), and 100 μL H_2O_2 0.05%. After 15 minutes of incubation at 37°C in an agitator, the reaction was stopped with 100 μL NaN_3 1%. The MPO activity was determined as absorbance at 460 nm against medium.

Cell Count and Determination

Total cell count was determined in BAL fluid (BALF) using a particle counter (Z2 Coulter; Beckman Coulter, Paris, France). Differential cell counts were performed on cytospin preparations (Cytospin 3; Thermo Shandon) after staining for 4 minutes with May-Grünwald stain (MG-1L; Sigma Chemical, St. Louis, MO) and 8 minutes in 95% Giemsa stain (GS-500; Sigma Chemical). Differential cell counts were made on 100 cells using standard morphologic criteria.

Mediator Measurements

IL-1 β , KC, IL-6, and TIMP-1 levels in BALF or lung homogenate were determined using ELISA assay kits according to the manufacturer's instructions (Mouse DuoSet; R&D Systems, Minneapolis, MN). An IL-1 β ELISA assay kit (mouse IL-1 β /IL-1F2) specific for natural and recombinant mouse IL-1 β exhibited no cross-reactivity or interference with recombinant mouse IL-1 α , IL-1 γ , IL-1RI/Fc chimera, or IL-1RII/Fc chimera (mouse IL-1-specific polyclonal goat IgG and monoclonal rat IgG1, clone #30,311).

Uric Acid Measurement

Uric acid concentration was determined in BAL samples and lung homogenates using an Amplex Red Uric Acid/Uricase Assay Kit (Molecular Probes, Eugene, OR). Briefly, uricase catalyzes the conversion of uric acid to allantoin, hydrogen peroxide (H_2O_2), and carbon dioxide. In the presence of horseradish peroxidase, H_2O_2 reacts stoichiometrically with Amplex Red reagent to generate the red-fluorescent oxidation product, resorufin, which is measured spectrophotometrically.

Zymographic Analysis of MMPs

MMP-2 and MMP-9 levels were determined by gelatin zymography. Briefly, nonreduced supernatant samples of BALF (15 μL) and standards (161-0305; Bio-Rad, Hercules, CA) were loaded onto 7% polyacrylamide gels (wt/vol) incorporating 0.1% (wt/vol) gelatin substrate. The MMP in the gelatinolytic bands were evaluated using recombinant murine Pro-MMP-9 (100 kD) and recombinant murine Pro-MMP-2 (72 kD) as references. Proteins were subjected to electrophoresis at 20 to 30 mA for 3 hours. The gel was washed twice in 2.5% Triton (vol/vol), rinsed three times quickly with distilled water, and placed three times for 20 minutes in distilled water. Each wash was performed under gentle stirring. Gels were incubated overnight at 37°C in 50 mM Tris buffer containing 5 mM CaCl_2 and 2 μM ZnCl_2 . Finally, gels were stained in Coomassie Blue and then destained progressively until bands of lysis (enzyme activity) in the gels showed up as regions of negative staining. The areas of lysis in the gels were analyzed using a densitometric analyzer (Bioprofil; Vilbert Lournet, Marne la vallée, France), images were taken, and band densities were measured. After treatment with BLM, we observed an increase in the activity of Pro-MMP-9 (100 kD), Pro-MMP-2 (72 kD), and active MMP-2 (65 kD). Only these MMP were quantified.

Total Lung Collagen Measurements

Aliquots of lung homogenate (50 μL) were assayed for lung collagen levels and compared with a standard curve prepared from bovine skin

using the Sircol collagen dye binding assay according to the manufacturer's instructions (Biocolor Ltd, Carrickfergus, UK).

α -I Collagen mRNA Measurement

Quantification of α -I collagen was described previously (26). Briefly, frozen lung samples were ground to a fine powder and homogenized in 2 ml of Trizol reagent (Invitrogen Life Technology, Paisley, UK). After vigorous shaking, chloroform was added, and the samples were centrifuged at $12,000 \times g$ for 20 minutes. Total RNA was precipitated with isopropanol and dissolved in RNase-free water. RNAs were reverse-transcribed into cDNA using SuperScriptTMII (Invitrogen Life Technology). Real-time quantitative PCR was performed by fluorescent dye SYBR Green methodology using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the ABI Prism 7000 apparatus (Perkin-Elmer, Foster City, CA). The relative quantification of the steady-state of the target mRNA levels was calculated by an active reference, GAPDH.

Histology

After BAL and lung perfusion, the large lobe was fixed in 4% buffered formaldehyde for standard microscopic analysis. Sections (3- μm) were stained with hematoxylin and eosin or Chromotrope Aniline Blue as described previously (3). The severity of the morphologic changes (infiltration by neutrophils and mononuclear cells, destruction and thickening of the alveolar septae, and fibrosis) were assessed semiquantitatively using a numeric fibrotic scale (Ashcroft score) (27). The mean score was considered the fibrotic score (0–8) by two independent observers (I.C., B.R.).

Statistical Analysis

Statistical evaluation of differences between the experimental groups was determined by Mann Whitney test using Prism software. *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

BLM Activates the Inflammasome NALP3 Leading to IL-1 β Production and Inflammation in Lung

Intranasal administration of a single dose of BLM induces a rapid inflammation of the airways within 24 hours, followed by tissue remodeling and lung fibrosis within 14 days. Because we showed that BLM-induced lung injury causes an inflammation dependent of IL-1R1 and IL-1 β (3), we investigated the upstream mechanisms leading to IL-1 β release and in particular the role of the inflammasome, a cytosolic multiprotein complex composed of receptors, adaptors, and cysteine proteases, which cleaves pro-IL-1 β into IL-1 β (28). Twenty-four hours after BLM administration, neutrophil recruitment in BALF and lung (Figures 1A and 1B), production of the neutrophil attracting proinflammatory chemokine KC, and the inflammatory mediator IL-6 (Figures 1C and 1D), and, of the profibrotic mediators, IL-1 β (Pro-IL-1 β plus mature IL-1 β) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMP-1) (Figures 1E and 1F) were significantly reduced in NALP3- and ASC-deficient mice. BLM-induced inflammation was reduced in caspase-1-deficient mice (Figure 2A) or in wild-type mice treated with the inhibitor of caspase-1 z-YVAD-fmk with reduced neutrophil recruitment in BALF (Figure 2B), production of IL-1 β (Figure 2C), KC (Figure 2D), and TIMP-1 (Figure 2E) in the lung. The difference in IL-1 β measured in lung of wild-type versus Casp-1-deficient mice or wild-type mice treated with the inhibitor of caspase-1 z-YVAD-fmk after BLM likely represents the maturation of IL-1 β by the caspase-1 protease. Therefore, the data indicate that the NALP3 inflammasome is activated upon BLM lung injury, resulting in enhanced production of IL-1 β and subsequent inflammation.

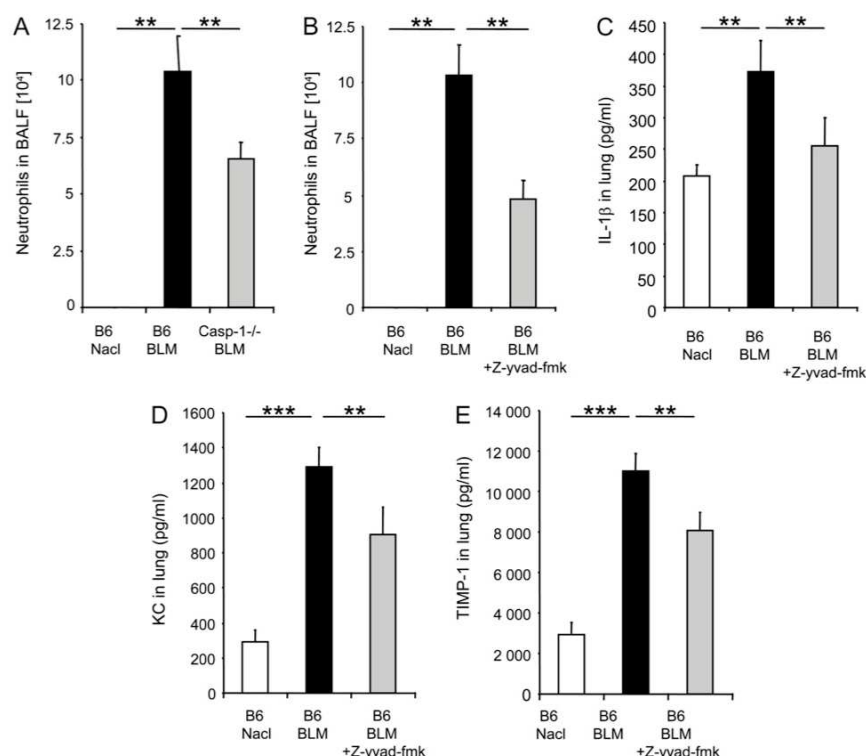


Figure 2. Bleomycin (BLM)-induced inflammation is dependent on caspase-1. (A) Neutrophil counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) 24 hours after intranasal BLM instillation (10 mg/kg) of wild-type mice or caspase-1 (Casp-1)-deficient mice. (B) Neutrophil counts in BALF, (C) IL-1 β , (D) KC, and (E) TIMP-1 concentrations in lung homogenates 24 hours after intranasal BLM instillation (10 mg/kg) of wild-type mice injected intraperitoneally with vehicle or an inhibitor of Casp-1 Z-vvad-fmk (10 mg/kg) just before and 4 and 8 hours after BLM administration. Data represent mean values from three independent experiments.

NALP3 Inflammasome Is Critical for BLM-Mediated Late Inflammation and Tissue Remodeling

To evaluate the involvement of NALP3 inflammasome in late inflammation and tissue remodeling in lung inflammation induced by BLM, we analyzed cell recruitment and gelatinase activities 14 days after a single intranasal BLM administration by the measurement of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9, or gelatinase A) and matrix metalloproteinase 2 (MMP-2, or gelatinase B) by zymography of the BALF. BLM promoted lymphocyte recruitment into the BALF of wild-type mice, which was markedly decreased in NALP3 and Casp-1-deficient mice (Figure 3A). MMP-9 was shown to be largely produced by neutrophils, and its activity was associated with neutrophil recruitment, whereas MMP-2 was produced by fibroblasts and associated with fibrosis (29). Fourteen days after BLM administration, Pro-MMP-9 (100 kD) and Pro-MMP-2 (71 kD) activities were measured after activation, and active MMP-2 (65 kD) activity were up-regulated in the BALF of wild-type mice but were significantly reduced in NALP3 and Casp-1-deficient mice (Figure 3B). Because the balance of TIMPs and MMPs is an important factor in the fibrotic process, we analyzed the late production of TIMP-1, a hallmark for the evolution to fibrosis (26), and showed that TIMP-1 was up-regulated at 14 days in lung homogenates of wild-type mice but decreased in NALP3 and Casp-1-deficient mice (Figure 3C). Enhancement of total pulmonary collagen content upon BLM administration was attenuated in NALP3 and Casp-1-deficient mice (Figure 3D). Therefore, late inflammation and repair processes depend on the NALP3 inflammasome.

BLM-induced Inflammation Is Mediated by Uric Acid

We then asked about the danger signals triggering NALP3 inflammasome activation leading to IL-1 β maturation and lung

inflammation upon BLM lung injury. NALP3 inflammasome activation is triggered by many microbial or danger stimuli (30–36). In particular, NALP3 is a major proinflammatory danger receptor activated by uric acid in the gout arthritis model (10). Because uric acid was identified as a principal endogenous danger signal released from injured cells, we hypothesized that uric acid can be important in the induction of immunity after lung injury (16). We first assessed whether uric acid is released upon BLM-induced lung injury in mice. Uric acid production was enhanced in the BALF (Figure 4A) and in the lung (Figure 4B) 24 hours after intranasal BLM administration. We next assayed whether modulation of lung uric acid levels in mice airway can influence BLM-induced inflammation and remodeling. We demonstrated that subcutaneous administration of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol, which impairs uric acid synthesis, prevented uric acid increases in the lung upon BLM administration (Figure 4B). Allopurinol greatly inhibited BLM-induced acute inflammation, resulting in reduced total cell (Figure 4C) and neutrophil recruitment in the BALF (Figure 4D) and reduced production of KC in the lung (Figure 4E). The profibrotic cytokine IL-1 β (Figure 4F) and TIMP-1, which are involved in repair processes and are characteristic of the evolution to fibrosis, were diminished in the lung (Figure 4G) and in the BALF (data not shown) upon allopurinol treatment. We administered mice with uricase used to treat hyperuricemia in tumor lysis syndrome associated with cancer chemotherapy (17). Intraperitoneal or intranasal administration of uricase, which rapidly degrades uric acid into soluble allantoin, also reduced BLM-induced lung uric acid increase (Figure 5A), neutrophil influx (Figure 5B), and pulmonary IL-1 β production (Figure 5C). Therefore, BLM-induced lung inflammation and remodeling are largely mediated by uric acid, which represents a major danger signal likely released from dying pulmonary cells upon injury and a new target to control inflammation upon lung injury.

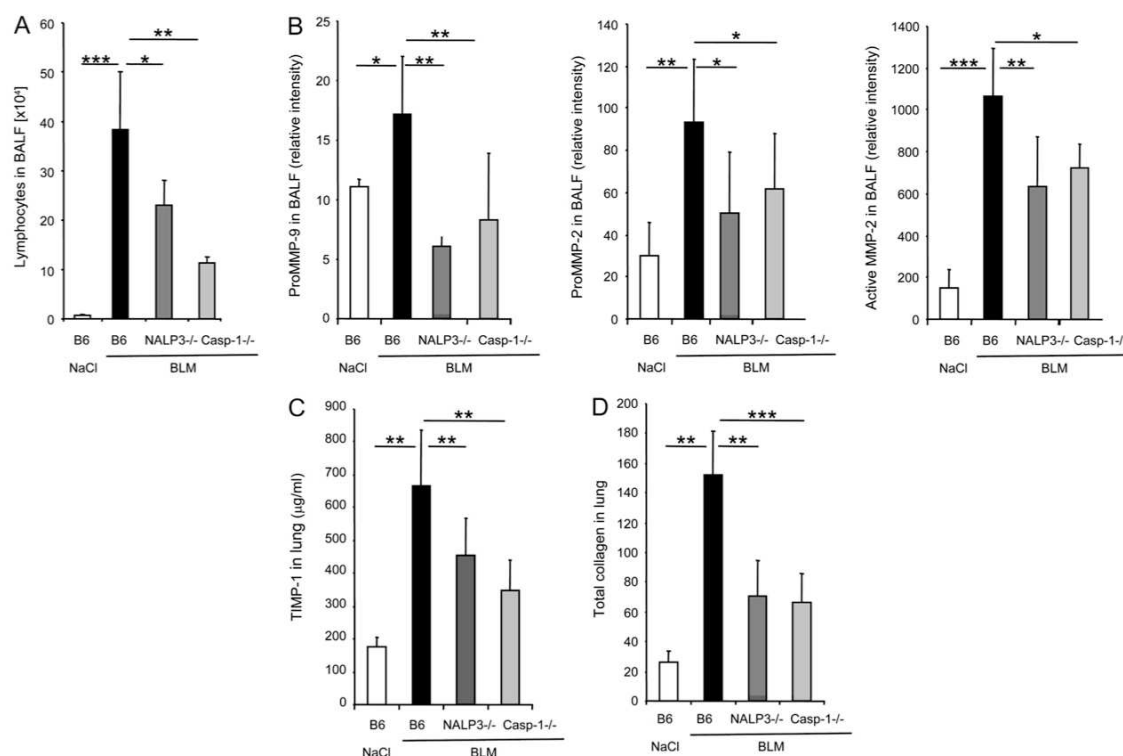


Figure 3. Late inflammation and remodeling depend on the NALP3 inflammasome. Late inflammation and tissue remodeling were evaluated in wild-type and deficient mice 14 days after intranasal administration of bleomycin (BLM) (5 mg/kg). (A) Late inflammation measured as lymphocytes in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF). (B) Pro-MMP-9 (100 kD), Pro-MMP-2 (71 kD), and active MMP-2 (65 kD) gelatinase activities were analyzed by zymography in the BALF. (C) TIMP-1 as an indicator of a fibrotic process was measured in the lungs by ELISA. (D) Total collagen in the lung was analyzed by Sircol assay. Data represent mean values $\pm$ SD from three independent experiments ($n = 6$ mice per group). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = not significant.

BLM-induced Repair and Fibrosis Are Mediated by Uric Acid

We extended our investigation to test whether the inhibition of uric acid synthesis reduces BLM-induced repair and fibrosis. Subcutaneous administration of allopurinol reduced BLM-induced late lymphocyte and neutrophil recruitment in the BALF at Day 8 (Figure 6A). Gelatinase activities were assessed by the measurement of MMP-9 (gelatinase A) and MMP-2 (gelatinase B) by zymography. Pro-MMP-9 and active MMP-2 activities, which were up-regulated in BALF 14 days after BLM administration, were significantly reduced by allopurinol or uricase treatment (Figure 6B). We then analyzed the late production of TIMP-1 and showed that TIMP-1 was up-regulated at 8 days in the lung homogenates (Figure 6C) and BALF (data not shown) of BLM-treated mice but inhibited by allopurinol administration. Pulmonary α -I collagen mRNA content was increased 14 days after BLM administration but was inhibited by uricase or allopurinol treatment (Figure 6D). Lung sections showed that BLM-induced alveolar wall destruction, collagen deposition, and lung fibrosis at 14 days were significantly reduced when uric acid synthesis was inhibited or after uricase administration (Figure 6E). The fibrosis induced by BLM was assessed semiquantitatively. Fibrosis with thickening of alveolar septae and inflammation were significantly reduced in mice treated with uricase or allopurinol in comparison to B6 mice (Figure 6F). Therefore, not only inflammation, but also repair processes and fibrosis depend on the danger signal uric acid, bridging early events to late pathology development.

Exogenous Uric Acid Causes Acute Lung Inflammation and Remodeling

Uric acid released from the lung upon BLM injury (see Figure 4A) might trigger NALP3 inflammasome activation. To validate this point, we asked whether exogenous uric acid administration in the airways causes similar lung inflammation. Upon intranasal administration, uric acid crystals were found engulfed by alveolar macrophages (Figure 7A). They induced dose-dependent cell recruitment in the BALF with macrophages and neutrophils and few lymphocytes (Figure 7B), whereas the chemically and structurally similar allopurinol crystals caused only little neutrophil recruitment into the BALF (Figure 7C). The inflammation was transient, reaching a maximum at 6 hours, decreasing at Day 1, and being resolved at Day 14 (Figure 7D). Uric acid crystals dose-dependently induced pulmonary TIMP-1, a marker of incipient fibrosis (Figure 7E), which returned to basal levels at Day 14 (data not shown), as reported after exogenous IL-1 β , whereas BLM administration induced a long-lasting production of TIMP-1 (3). Rapid degradation of uric acid occurs in mice due to their functional uricase, in contrast to humans (37), and repeated uric acid crystal administration may be required to develop lung fibrosis. Thus, local administration of uric acid crystals triggers inflammation and repair in the lung, similar to BLM.

Uric Acid-induced Acute Lung Inflammation Is Dependent upon Inflammasome and MyD88/IL-1R1

We investigated whether the NALP3 inflammasome was involved in the lung inflammation triggered by uric acid crystals.

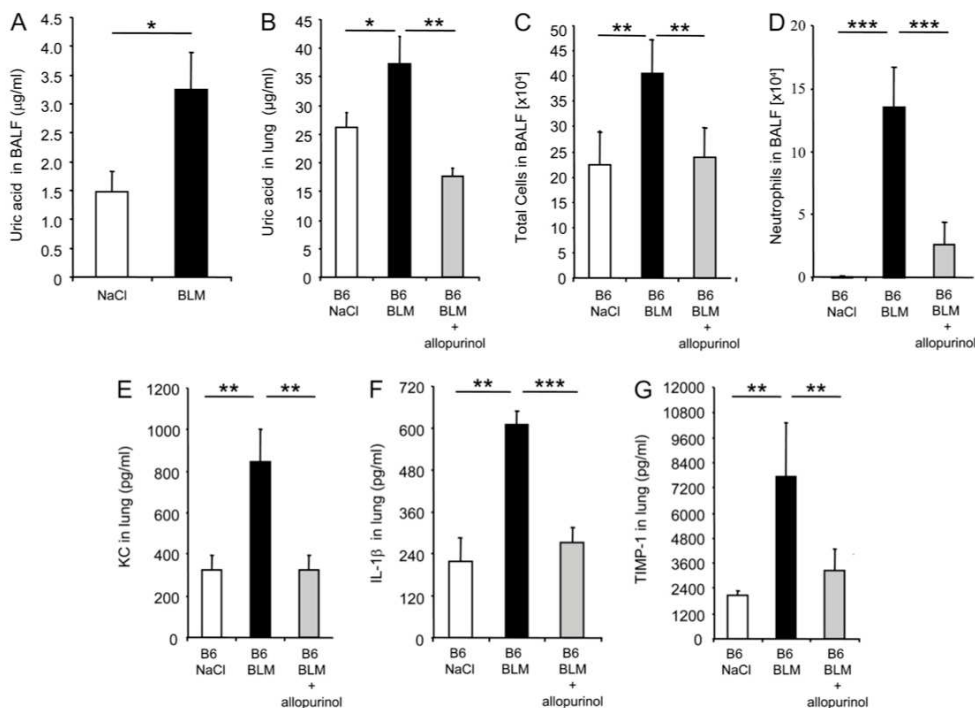


Figure 4. Bleomycin (BLM)-induced inflammation is reduced by uric acid synthesis inhibition. (A) Uric acid levels in BALF of mice 6 hours after saline or intranasal instillation of BLM (10 mg/kg). (B) Uric acid levels in lung of mice 24 hours after saline or BLM treatment. Mice received a subcutaneous injection of vehicle or allopurinol (25 mg/kg) before BLM instillation and 6 and 9 hours after. (C) Total cell and (D) neutrophil counts in BALF after subcutaneous injection of vehicle or allopurinol and saline or BLM instillation. KC (E) or IL-1β production (F) in lung 24 hours after or TIMP-1. (G) Production in lung homogenates 24 hours after subcutaneous injection of vehicle or allopurinol and BLM instillation. Data represent mean values ± SD from three independent experiments (n = 6 mice per group). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Acute lung neutrophil recruitment (Figures 8A and 8C) and IL-1β production (Figures 8B and 8D) induced 6 hours after exogenous uric acid crystals administration were significantly reduced in mice deficient for the inflammasome NALP3 receptor or ASC adaptor in comparison to wild-type mice. Moreover, the inflammatory response to uric acid crystals was drastically reduced in MyD88 and IL-1R1-deficient mice (Figure 8E) or after IL-1 neutralization by IL-1Ra administration (Figure 8F), as evidenced by reduced neutrophil influx in BALF. The inflammatory mediators IL-6 (Figure 8G) and KC (Figure 8H) and the fibrotic mediator TIMP-1 (Figure 8I) induced by uric acid crystals were reduced in the lung of MyD88 and IL-1R1-deficient mice. IL-1β was significantly decreased in lungs from MyD88-deficient mice but not from IL-1R1-deficient mice (Figure 8J), suggesting that other receptors using the common MyD88 adaptor, such as TLR or IL-18R, may be involved. Previous works proposed that uric acid crystals activate TLR2 and TLR4 receptors (38), whereas others showed that these receptors are not involved in uric acid crystals-induced inflammation (11). We show here that mice deficient for TLR2 or TLR4 developed inflammation in re-

sponse to uric acid crystals (Figures 9A and 9B), as did IL-18R-deficient mice (Figures 9C and 9D). However, mice deficient for both TLR2 and TLR4 displayed an attenuated inflammatory response (Figures 9A and 9B), showing that the combined action of TLR2 and TLR4 may be required for optimal inflammation in response to uric acid crystals. Therefore, uric acid crystals-induced-inflammation is likely TLR2/TLR4 dependent but is also IL-18R independent and activates the NALP3 inflammasome and signals via IL-1R1/MyD88.

DISCUSSION

Present knowledge suggests that tissue injury may cause sterile inflammation (15, 39), and several mediators such as uric acid, ATP, high mobility group box1 protein, heat shock protein 70, lysophosphatidic acid (40), and others have been identified (41). These danger signals may be produced after lung damage, triggering inflammation, remodeling, and fibrosis. Here, using lung injury induced by BLM, we present evidence that uric acid is locally released and activates the NALP3 inflammasome, resulting in IL-1β production. We show that BLM-induced lung

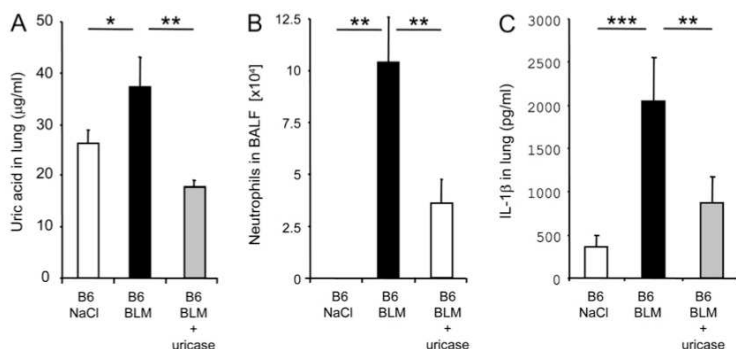


Figure 5. Bleomycin (BLM)-induced inflammation is reduced by uric acid neutralization. (A) Uric acid levels in lung, (B) neutrophil counts in bronchoalveolar lavage fluid, and (C) IL-1β production in lung 24 hours after BLM instillation (10 mg/kg). Mice were injected intraperitoneally with vehicle or uricase (0.2 mg/kg) just before instillation with BLM and 6 and 9 hours thereafter. Data represent mean values ± SD from four independent experiments (n = 6 mice per group). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

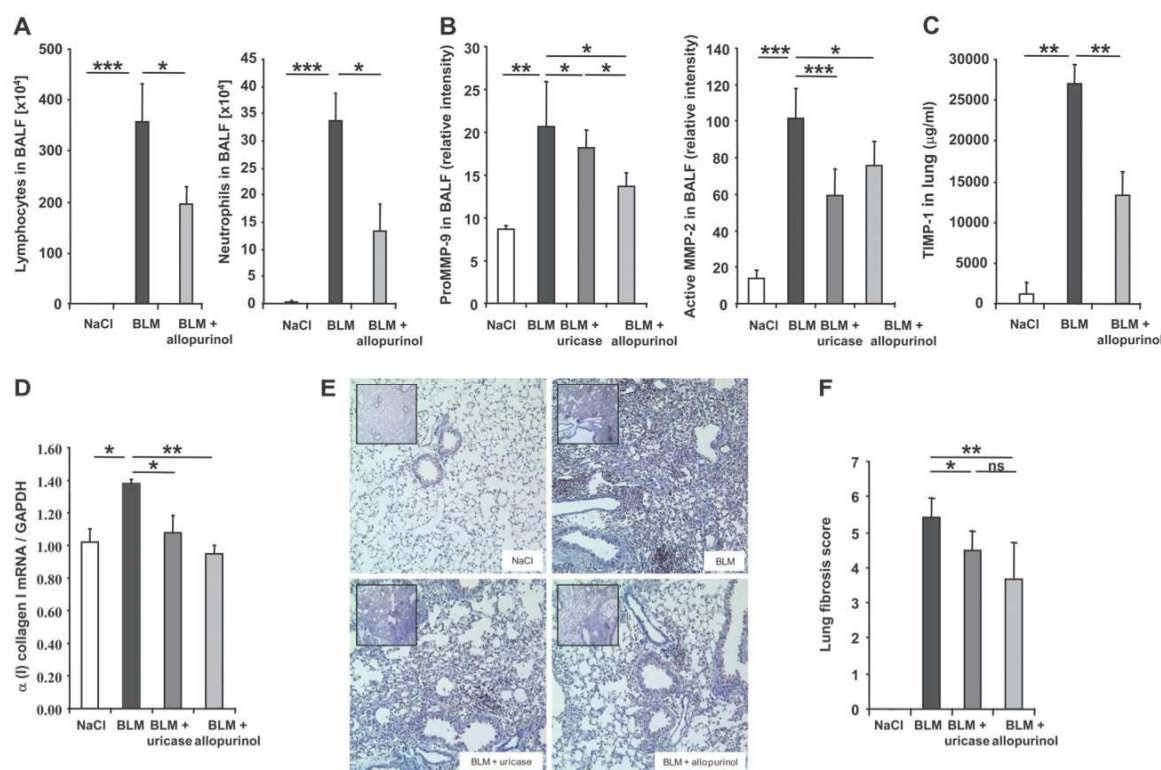


Figure 6. Bleomycin (BLM)-induced repair and fibrosis are mediated by uric acid. Mice were injected at Day 0 with allopurinol (15 mg/kg, subcutaneously), uricase (0.2 mg/kg, intraperitoneally), or saline at 0, 6, and 9 hours after BLM instillation (5 mg/kg, intranasally) and every second day over 8 or 14 days to evaluate remodeling and fibrosis. (A) Late inflammation measured as lymphocytes and neutrophils in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) at Day 8. (B) Pro-MMP-9 (100 kD) and Pro- and active MMP-2 (65 kD) gelatinase activities, analyzed by zymography, were up-regulated in the BALF of vehicle-treated mice but less in the BALF of allopurinol- or uricase-treated mice at Day 14. (C) TIMP-1 as an indicator of a fibrotic process was up-regulated in the lungs 8 days after BLM administration of saline-treated mice but not in allopurinol-treated mice. (D) Alpha1 (I) collagen I mRNA in lung was analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction amplification after uricase or allopurinol treatment 14 days after BLM administration. Data represent mean values $\pm$ SD from three independent experiments ($n = 6$ mice per group). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, not significant. (E) Lung microscopic sections showed extensive fibrotic areas at Day 14 with collagen deposition in wild-type mice treated with BLM in comparison to saline control mice. Fibrosis induced by BLM was significantly reduced by allopurinol. Chromotrope Aniline Blue staining, 20 $\times$ and 200 $\times$ magnification. (F) The lesions induced by BLM were assessed semiquantitatively (see METHODS). Lung destruction, thickening of the alveolar septae, and fibrosis were reduced in mice treated with uricase or allopurinol. Results are expressed as mean lung fibrotic score $\pm$ SD. Data represent mean values $\pm$ SD from three independent experiments ($n = 6$ mice per group).

injury resulting in IL-1 β production and subsequent inflammation is dependent on the inflammasome NALP3 and ASC. The partial decrease in IL-1 β measured in lung of NALP3-deficient versus wild-type mice after BLM administration may represent a direct defect in the maturation of IL-1 β by the NALP3 inflammasome or some indirect effects. Indeed, production of Pro-IL-1 β , known to be independent on NALP3 inflammasome, maturation in IL-1 β (which depends on inflammasome activation) and secretion of mature IL-1 β are separate processes that regulate the production of such a powerful inflammatory cytokine. Because NALP3 and ASC were recently implicated in the formation of other multiprotein complexes than inflammasomes leading to a caspase-independent cell death called pyro necrosis (42), we verified the implication of caspase-1 in the BLM-induced inflammation and confirmed the role of the NALP3 inflammasome in this pathology. Nevertheless, pyro necrosis may also be involved, leading to pulmonary tissue cell death and amplifying the inflammatory response by the release of inflammatory intracellular contents of dying cells, as shown in familial autoinflammatory diseases associated with mutations in NALP3 (43). Moreover, late inflammation and

repair processes depend on the NALP3 inflammasome. We demonstrate that lung injury results in the local accumulation of uric acid, which acts as an endogenous danger signal, probably activating the NALP3 inflammation and leading to IL-1 β -dependent inflammation. Recently, uric acid was shown to be the endogenous danger signal released after necrosis induced by the adjuvant alum used for vaccination (44). Nevertheless, these results were not confirmed in another study of the same group (45). Indeed, the adjuvant alum was shown to activate directly NALP3 inflammasome, but it is possible that uric acid may be released upon alum-induced cell death, amplifying the activation of NALP3 inflammasome (33, 45). Here we show that regulation of uric acid levels by xanthine oxidase inhibition with allopurinol or degradation of uric acid by uricase abrogate inflammation and reduce remodeling and fibrosis upon BLM-induced lung injury. Although allopurinol is known to decrease the uric acid levels, it may also reduce oxygen species, which play a role in BLM-induced inflammation and fibrosis (46). Nevertheless, treatment with uricase confirms that reducing local uric acid levels attenuates inflammation and remodeling. Inflammation, but also repair processes and fibrosis, depend

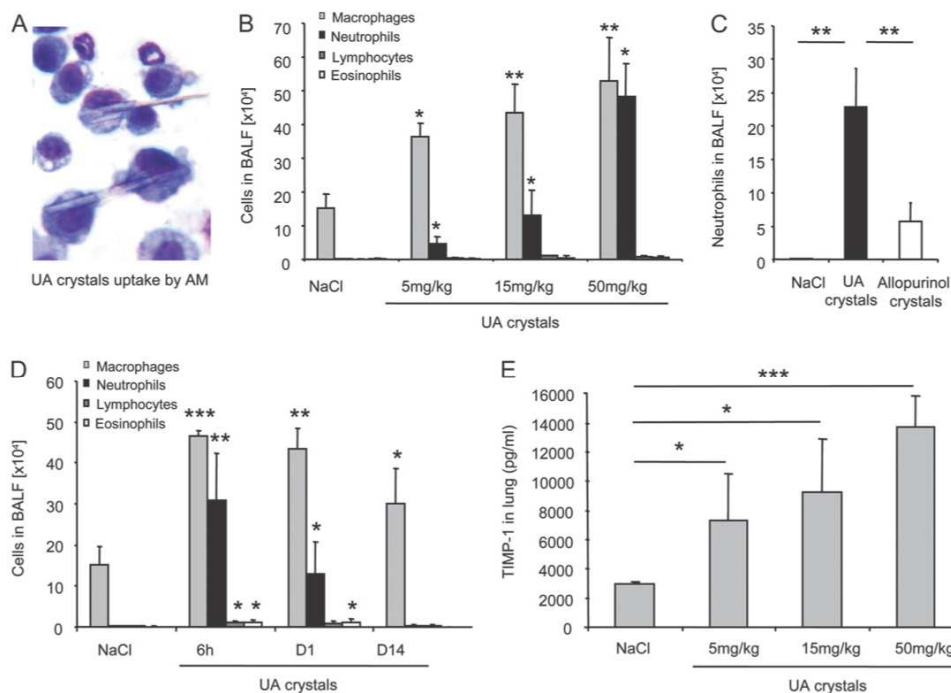


Figure 7. Exogenous uric acid (UA) crystals cause acute lung inflammation and remodeling. (A) Alveolar macrophages (AM) uptake of UA crystals 6 hours after UA crystals instillation (15 mg/kg intranasally). (B) Dose response of UA crystals-induced cell recruitment in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). (C) Neutrophil counts in BALF 6 hours after UA or allopurinol crystals instillation (15 mg/kg intranasally). (D) Kinetics of cell recruitment in BALF upon UA crystals instillation (15 mg/kg intranasally). (E) TIMP-1 in lung homogenates after intranasal administration of increasing doses of UA crystals. Data represent mean values $\pm$ SD from three independent experiments ($n = 4$ mice per group). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

on the danger signal uric acid, bridging early events to further pathology development. Our data provide evidence that the NALP3 inflammasome is activated by uric acid, as shown previously in the gout arthritis model (10), although it is not excluded that other danger signals may be involved in the

pathology, such as extracellular ATP, which also activates NALP3. However, the fact that uricase and allopurinol inhibit BLM-induced inflammation and fibrosis represents compelling evidence that uric acid plays a critical role in BLM-induced lung pathology.

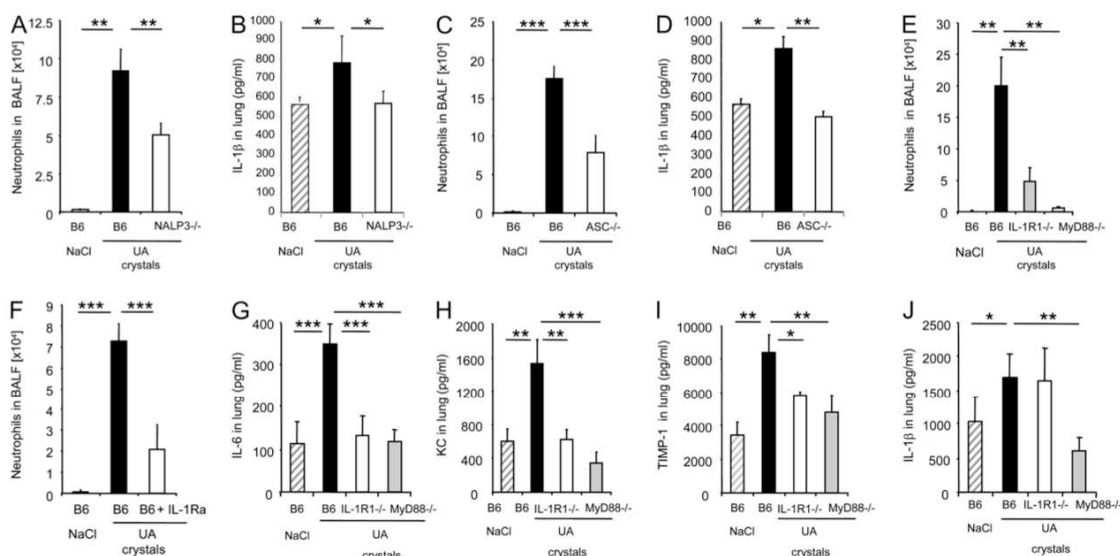


Figure 8. Pulmonary inflammation upon instillation of exogenous uric acid (UA) crystals is dependent upon NALP3 inflammasome and IL-1R1/MyD88 pathways. Neutrophil counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from mice deficient for (A) NALP3, (C) ASC, (E) IL-1R1, or MyD88 and (F) in BALF from wild-type mice pretreated intraperitoneally with anakinra (10 mg/kg), 6 hours after exogenous UA crystals instillation (15 mg/kg). IL-1 β dosages in lung homogenates 6 hours after exogenous UA crystals administration for (B) NALP3^{-/-}, (D) ASC^{-/-}, (J) IL-1R1^{-/-}, or MyD88^{-/-} mice in comparison to wild-type mice. (G) IL-6, (H) KC, and (I) TIMP-1 dosages in lung homogenates 6 hours after exogenous UA crystals administration of wild-type or IL-1R1 or MyD88 gene-deficient mice. Data represent mean values $\pm$ SD from three independent experiments ($n = 4$ mice per group). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

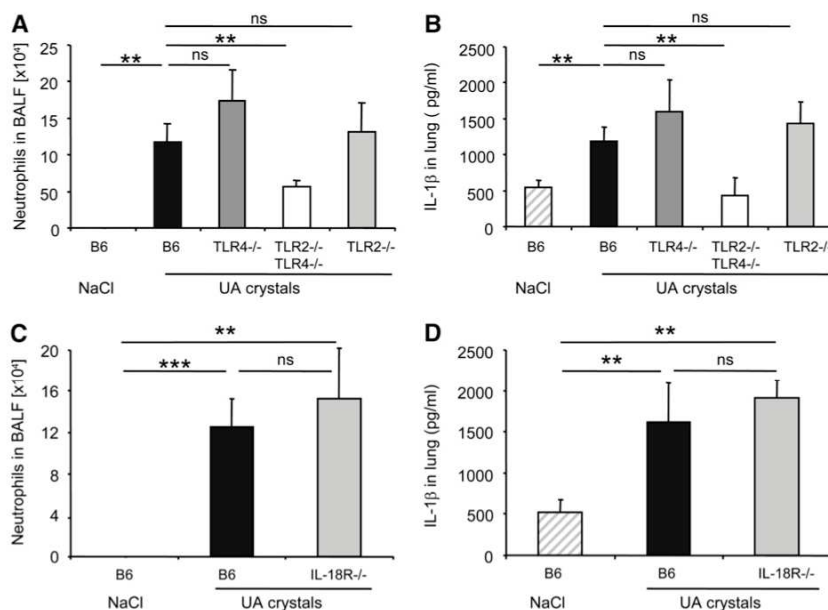


Figure 9. Pulmonary inflammation upon instillation of exogenous uric acid (UA) crystals is independent of IL-18R but requires TLR2 or TLR4 for optimal inflammation. (A) Neutrophil count in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and (B) IL-1 β in lung homogenates of TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, or TLR2/TLR4-deficient mice. (C) Neutrophil counts in BALF and (D) IL-1 β in lung homogenates of IL-18R-deficient mice. Mice were killed 6 hours after instillation of exogenous UA crystals (15 mg/kg). Data represent mean values $\pm$ SD from three independent experiments ($n = 4$ mice per group). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = non-significant.

Exogenous uric acid crystals have been shown to activate the NALP3 inflammasome, leading to IL-1 β -dependent inflammation in the peritoneal cavity (10, 11). Here we demonstrate that exogenous uric acid crystals given by the airways cause NALP3 inflammasome activation, the production of IL-1 β , IL-1R1/MyD88-dependent lung inflammation, and TIMP-1 expression, a hallmark for the evolution to fibrosis (26). IL-18R, TLR2, and

TLR4 are dispensable for lung inflammation to exogenous uric acid crystals. Nevertheless, we observed that the combined action of TLR2 and TLR4 is required for optimal inflammation in response to uric acid crystals, as shown in lung inflammation caused by airway administration of dying cells (47). This requirement for either TLR2 or TLR4 was also shown in response to peritoneal administration of dying cell (15), which

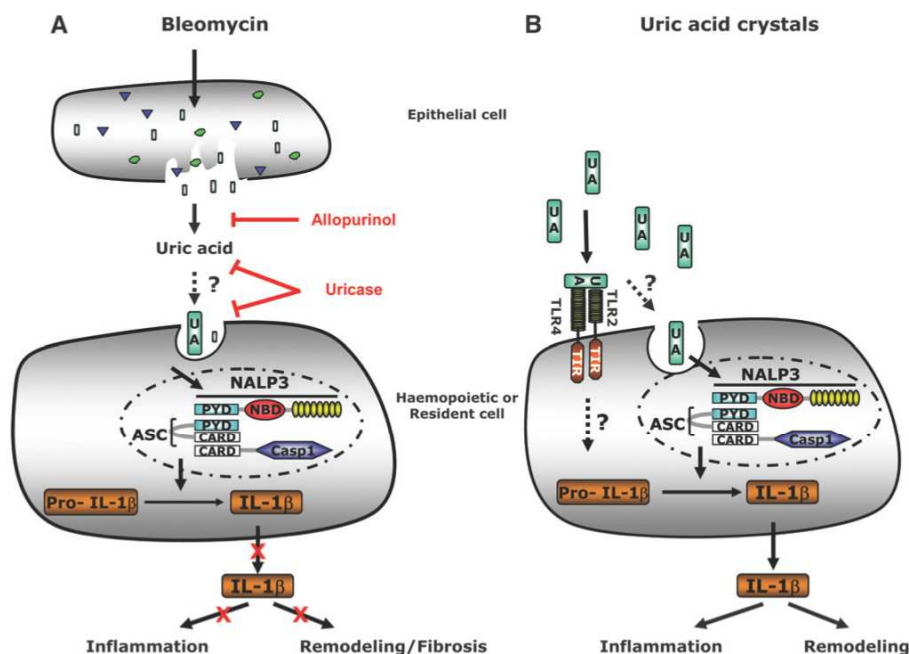


Figure 10. Schematic diagram illustrating the specific cascades and signaling pathways (A) after bleomycin (BLM)-induced lung injury or (B) after lung exposition to exogenous uric acid crystals. (A) BLM-induced injury of lung cells (probably epithelial cells) leads to lung IL-1 β production, inflammation, and remodeling, which are dependent on the NALP3 receptor, the ASC adaptor, and the Casp-1 effector molecules. Pulmonary BLM administration induces the release of uric acid in the lung, which represents a danger/stress signal likely generated from dying lung cells upon injury. The activation of a NALP3 protein leads to the recruitment of ASC and Casp-1, which are known to interact via PYR-PYR and CARD-CARD homotypic interactions. Local concentration increase probably induces uric acid crystallization. *In vivo* treatment with the xanthine oxidase inhibitor allopurinol, which impairs uric acid synthesis, or treatment with uricase, which rapidly degrades uric acid into soluble allantoin, prevents uric acid

concentration increase in the lung upon BLM administration and yields decreases in IL-1 β production, inflammation, remodeling, and fibrosis. (B) Lung exposition to exogenous uric acid crystals induces inflammation and remodeling typical of evolution toward fibrosis with TIMP-1 accumulation. Uric acid crystals-induced IL-1 β production, inflammation, and remodeling are dependent on the NALP3 inflammasome. The presence of TLR2 or TLR4 is necessary for IL-1 β production and cellular influx. TLR2 and/or TLR4 may be involved in crystal-induced production of Pro-IL-1 β or in uric acid crystals uptake by alveolar macrophages and/or resident cells.

probably releases uric acid (16). TLR2 and TLR4 may be involved in the generation of the Pro-IL-1 β upon uric acid crystals stimulation and matured after uric acid crystal-mediated activation of the NALP3 inflammasome (10). TLR2 and TLR4 via CD14 may also play a role in uric acid crystal uptake by alveolar macrophages (48). Nevertheless, a recent publication showed that dendritic cell activation by uric acid crystals is receptor independent but depends on direct membrane binding of crystals, which leads to cell-surface lipid sorting, Syk kinase activation, and topological membranes changes resembling to phagocytosis (49). Thus, the role of TLR2 and TLR4 in inflammatory response to uric acid crystal is unclear and may depend on the cell type, on endogenous or exogenous origin of uric acid crystals, and on different experimental conditions. Our data raise the possibility that regulating uric acid production at the level of synthesis or metabolism might be useful in limiting chronic lung inflammation, repair, and fibrosis. Indeed, allopurinol is used to treat gout, and uricase is an alternative therapy of acute gout arthritis (50) or hyperuricemic syndromes (17). The model presented in Figure 10 summarizes our data. BLM-induced injury of lung cells (probably epithelial cells) induces activation of the NALP3 inflammasome, leading to lung IL-1 β production, inflammation, and remodeling. BLM-induced cell injury results in the release of uric acid, which represents a major danger/stress signal likely generated from dying pulmonary cells upon injury. Local increase probably induces uric acid crystallization. The xanthine oxidase inhibitor allopurinol, which impairs uric acid synthesis or uricase (which rapidly degrades uric acid into soluble allantoin), prevents uric acid release in the lung upon BLM and decreases IL-1 β production, inflammation, remodeling, and fibrosis, suggesting that uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome, leading to the processing and maturation of Pro-IL-1 β into biologically active IL-1 β . Administration of exogenous uric acid crystals induces pulmonary inflammation and remodeling that are typical of the evolution toward fibrosis with TIMP-1 accumulation. IL-1 β production, inflammation, and remodeling upon administration of uric acid crystals are dependent on the NALP3 inflammasome. TLR2 and TLR4 double deficiency impairs IL-1 β production and cellular influx upon administration of uric acid crystals and may be involved in crystal-induced production of Pro-IL-1 β or in uric acid crystals uptake by alveolar macrophages and/or resident cells.

Our findings provide insight into the molecular mechanisms linking tissue injury, inflammation, and lung fibrosis. Mechanisms of inflammation and lung fibrosis resulting in pneumoconiosis after inhalation of airborne pollutants, such as asbestos or silica, have been partially elucidated recently (31, 32, 51). In these very different lung pathologies with known origin and focal fibrosis, NALP3 inflammasome activation and IL-1 β production are essential for inflammation and fibrosis. The role of reactive oxygen species (ROS), generated by NADPH oxidase upon particle phagocytosis in NALP3 inflammasome activation, was proposed, along with other possible mechanisms that may activate NALP3 inflammasome (31, 35, 52, 53). Indeed, ROS generation has been implicated in the activation of NALP3 inflammasome in response to uric acid crystals using ROS inhibitors (31, 52). Thus, in our model, we cannot exclude that allopurinol or uricase, in decreasing uric acid levels, act by reducing oxidative stress. Uric acid may indirectly activate the NALP3 inflammasome by induction of ROS. Nevertheless, the role of ROS in NALP3 activation after administration of uric acid crystals was contested in experiments with mice lacking a subunit of the phagosomal NADPH oxidase (35). Future studies need to address this question further.

Our findings support a crucial role of the NALP3 inflammasome in interstitial pulmonary fibrosis from unknown origin. We propose another mechanism whereby uric acid formation may play a pivotal role in NALP3 activation upon tissue damage-associated idiopathic lung fibrosis. Therefore, local accumulation of uric acid may act as an endogenous danger signal that activates the NALP3 inflammasome with the production of IL-1 β , causing lung inflammation, repair, and fibrosis. Others danger signals released in response to unknown toxic agents are probably involved in NLR-dependent production of mature IL-1 β or in NLR-dependent induction of cell death, depending on the cause of lung injury and on the type of cell death, triggering the innate immune response. Because the development of idiopathic lung fibrosis depends on unknown environmental factors associated with genetic predispositions, mutations in NALP3 or NALP12 similar to those that cause hereditary periodic fever syndromes may also predispose patients to developing idiopathic lung fibrosis (54).

In conclusion, the identification of a critical role of uric acid as the driving force of NALP3 inflammasome complex activation with the production of IL-1 β represents a novel and promising therapeutic target to control inflammation and fibrosis by reducing uric acid levels with xanthine oxidase inhibitors such as allopurinol or uricase, which deserve to be tested in interstitial pulmonary fibrosis.

Conflict of Interest Statement: None of the authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript.

Acknowledgment: The authors thank Virginie Vasseur, Isabelle Maillet (UMR6218 IEM, Orleans), and Isabelle Guenon (INSERM U620, Université de Rennes 1) for their skilful assistance and la Fondation de la Recherche Médicale (France) and MRC South Africa for support. The authors thank Drs. V.M. Dixit (Genetech, San Francisco) for the gift of ASC^{-/-} mice and Dr. S. Akira (Osaka University, Japan) for TLR and MyD88^{-/-} mice. The authors are grateful to François Erard for scientific discussion.

References

- Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2001;345:517–525.
- Hamilton RF Jr, Li L, Felder TB, Holian A. Bleomycin induces apoptosis in human alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1995;269: L318–L325.
- Gasse P, Mary C, Guenon I, Noulain N, Charron S, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Akira S, Quesniaux VF, Lagente V, et al. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2007;117:3786–3799.
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296:301–305.
- Zedler S, Faist E. The impact of endogenous triggers on trauma-associated inflammation. *Curr Opin Crit Care* 2006;12:595–601.
- Rock KL, Hearn A, Chen CJ, Shi Y. Natural endogenous adjuvants. *Springer Semin Immunopathol* 2005;26:231–246.
- Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 2007;8:487–496.
- Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, Fenton MJ, Tracey KJ, Yang H. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock* 2006;26:174–179.
- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002;418:191–195.
- Martinson F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006;440:237–241.
- Chen CJ, Shi Y, Hearn A, Fitzgerald K, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *J Clin Invest* 2006;116:2262–2271.
- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006;440:228–232.

13. Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M, Lara-Tejero M, Lichtenberger GS, Grant EP, Bertin J, Coyle AJ, Galan JE, Askenase PW, *et al.* Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* 2006;24:317–327.
14. Watanabe H, Gaide O, Petrilli V, Martinon F, Contassot E, Roques S, Kummer JA, Tschopp J, French LE. Activation of the IL-1 β -processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 2007;127:1956–1963.
15. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med* 2007;13:851–856.
16. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003;425:516–521.
17. Cammalleri L, Malaguarnera M. Rasburicase represents a new tool for hyperuricemia in tumor lysis syndrome and in gout. *Int J Med Sci* 2007;4:83–93.
18. Gasse P, Riteau N, Petrilli V, Tschopp J, Lagente V, Quesniaux VF, Ryffel B, Couillin I. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. J2R Congress, 10–11 October 2008, Grenoble, France.
19. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;11:115–122.
20. Labow M, Shuster D, Zetterstrom M, Nunes P, Terry R, Cullinan EB, Bartfai T, Solorzano C, Moldawer LL, Chizzonite R, *et al.* Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. *J Immunol* 1997;159:2452–2461.
21. Hoshino K, Tsutsui H, Kawai T, Takeda K, Nakanishi K, Takeda Y, Akira S. Cutting edge: generation of IL-18 receptor-deficient mice: evidence for IL-1 receptor-related protein as an essential IL-18 binding receptor. *J Immunol* 1999;162:5041–5044.
22. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Flavell RA. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 β converting enzyme. *Science* 1995;267:2000–2003.
23. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999;162:3749–3752.
24. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999;11:443–451.
25. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, Roose-Girma M, Erickson S, Dixit VM. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 2004;430:213–218.
26. Manoury B, Caulet-Maugendre S, Guenon I, Lagente V, Boichot E. TIMP-1 is a key factor of fibrogenic response to bleomycin in mouse lung. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006;19:471–487.
27. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol* 1988;41:467–470.
28. Mariathasan S, Monack DM. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007;7:31–40.
29. Corbel M, Belleguic C, Boichot E, Lagente V. Involvement of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in the development of airway inflammation and pulmonary fibrosis. *Cell Biol Toxicol* 2002;18:51–61.
30. Martinon F, Gaide O, Petrilli V, Mayor A, Tschopp J. NALP inflammasomes: a central role in innate immunity. *Semin Immunopathol* 2007;29:213–229.
31. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 2008;320:674–677.
32. Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Sadler JJ, Colegio OR, Tephly LA, Carter AB, Rothman PB, Flavell RA, Sutterwala FS. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:9035–9040.
33. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 2008;453:1122–1126.
34. Muruve DA, Petrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, Parks RJ, Tschopp J. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 2008;452:103–107.
35. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 2008;9:831–833.
36. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nat Immunol* 2008;9:857–865.
37. Wu X, Wakamiya M, Vaishnav S, Geske R, Montgomery C Jr, Jones P, Bradley A, Caskey CT. Hyperuricemia and urate nephropathy in urate oxidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:742–746.
38. Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A, Rose DM, Terkeltaub R. Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum* 2005;52:2936–2946.
39. Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 2000;191:423–434.
40. Tager AM, Lacamera P, Shea BS, Campanella GS, Selman M, Zhao Z, Polosukhin V, Wain J, Karimi-Shah BA, Kim ND, *et al.* The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:363.
41. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007;81:1–5.
42. Ting JP, Willingham SB, Bergstralh DT. NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol* 2008;8:372–379.
43. Willingham SB, Bergstralh DT, O'Connor W, Morrison AC, Taxman DJ, Duncan JA, Barnoy S, Venkatesan MM, Flavell RA, Deshmukh M, *et al.* Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host Microbe* 2007;2:147–159.
44. Kool M, Soullie T, van Nimwegen M, Willart MA, Muskens F, Jung S, Hoogsteden HC, Hammad H, Lambrecht BN. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 2008;205:869–882.
45. Kool M, Petrilli V, De Smedt T, Rolaz A, Hammad H, van Nimwegen M, Bergen IM, Castillo R, Lambrecht BN, Tschopp J. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol* 2008;181:3755–3759.
46. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* 2006;58:87–114.
47. Wang L, Scabilloni JF, Antonini JM, Rojanasakul Y, Castranova V, Mercer RR. Induction of secondary apoptosis, inflammation, and lung fibrosis after intratracheal instillation of apoptotic cells in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L695–L702.
48. Scott P, Ma H, Viriyakosol S, Terkeltaub R, Liu-Bryan R. Engagement of CD14 mediates the inflammatory potential of monosodium urate crystals. *J Immunol* 2006;177:6370–6378.
49. Ng G, Sharma K, Ward SM, Desrosiers MD, Stephens LA, Schoel WM, Li T, Lowell CA, Ling CC, Amrein MW, *et al.* Receptor-independent, direct membrane binding leads to cell-surface lipid sorting and syk kinase activation in dendritic cells. *Immunity* 2008;29:807–818.
50. Moolenburgh JD, Reinders MK, Jansen TL. Rasburicase treatment in severe tophaceous gout: a novel therapeutic option. *Clin Rheumatol* 2006;25:749–752.
51. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 2008;9:847–856.
52. Petrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 2007;14:1583–1589.
53. Meissner F, Molawi K, Zychlinsky A. Superoxide dismutase 1 regulates caspase-1 and endotoxin shock. *Nat Immunol* 2008;9:866–872.
54. Jeru I, Duquesnoy P, Fernandes-Alnemri T, Cochet E, Yu JW, Lackmy-Port-Lis M, Grimpel E, Landman-Parker J, Hentgen V, Marlin S, *et al.* Mutations in NALP12 cause hereditary periodic fever syndromes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:1614–1619.

II. Article 2 : Rôle de l'ATP extracellulaire dans l'inflammation et la fibrose pulmonaire

Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis

Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, Kanellopoulos J, Quesniaux VF, Marchand-Adam S, Crestani B, Ryffel B, Couillin I. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Sep 15;182(6):774-83.

L'inflammasome Nlrp3 est connu pour répondre à un grand nombre de situations et de composés différents. Les résultats publiés dans l'article 1 montrent un rôle important de l'acide urique. Le laboratoire s'est intéressé à l'intervention d'autres signaux de dangers et s'est rapidement focalisé sur l'ATP.

In vitro, le rôle de l'ATP dans l'activation de l'inflammasome est connu depuis. En 2007, il avait été établie que l'ATP extracellulaire favorise la réponse asthmatique (398).

Nous montrons que les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (IPF) présentent une augmentation de la concentration en ATP dans leur fluide bronchoalvéolaire. Les patients en phase d'exacerbation, souvent létale, présente une augmentation encore plus nette. Dans modèle murin d'IPF induit par la BLM, l'augmentation d'ATP apparaît précocement et transitoirement. Elle précède le recrutement de neutrophiles dans le BAL.

Afin de savoir si les fortes quantités d'ATP libérées pouvaient être pro-inflammatoires, nous avons cherché à les moduler de deux manières par des traitements en plus de l'administration de BLM. L'hydrolyse de l'ATP par ajout d'apyrase diminue les paramètres inflammatoires. A l'inverse, l'ajout d'une forme peu hydrolysable (ATP γ S) en plus de la BLM les augmente. L'ensemble confirme que l'ATP libéré par les cellules mortes constitue un signal de danger qui favorise l'inflammation.

L'ATP et ses dérivés purinergiques sont connus pour signaler en extracellulaire via toute une gamme de récepteurs, les P2Rs. L'inhibition large des P2Rs par la suramine diminue l'inflammation. Toutefois, le seul récepteur connu pour être activé spécifiquement en présence de fortes concentrations de ATP (au delà de 100 μ M) est le sous-type P2X7. Les souris déficientes en P2X7 ont une inflammation et une fibrose diminuées, jugées par exemple en histologie et sur l'accumulation de collagène dans le poumon.

Enfin, notre article essaye de savoir comment l'ATP est libérée des cellules, soit passivement par mort cellulaire incontrôlée et/ou activement, utilisant des protéines permettant un transport transmembranaire. Par l'utilisation d'inhibiteurs, récemment contesté, nous identifions le couple P2X7/panx-1 comme impliquée dans la libération active d'ATP.

Au final, cette étude identifie l'ATP extracellulaire comme un acteur endogène important dans la mise en place de la réponse inflammatoire stérile et la fibrose induite par la BLM. Sa libération est en partie active par le couple P2X7/panx-1 et l'ATP libéré peut ensuite agir localement sur différents récepteurs purinergiques, dont P2X7.

Extracellular ATP Is a Danger Signal Activating P2X₇ Receptor in Lung Inflammation and Fibrosis

Nicolas Riteau¹, Pamela Gasse¹, Louis Fauconnier¹, Aurélie Gombault¹, Marion Couegnat¹, Lizette Fick², Jean Kanellopoulos³, Valérie F. J. Quesniaux¹, Sylvain Marchand-Adam⁴, Bruno Crestani^{5,6}, Bernhard Ryffel¹, and Isabelle Couillin¹

¹University of Orleans and National Center for Scientific Research UMR6218, Molecular Immunology and Embryology, Orleans, France;

²Department of Pulmonary Medicine, and Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, University of Cape Town, Cape Town, South Africa; and ³National Center for Scientific Research, UMR 8619, University of South Paris, France; ⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U 618, Faculté de Médecine, Université François Rabelais, Tours; ⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U 700, Université Paris Diderot-Paris 7, Unité de Formation et de Recherche de Médecine-site Bichat, Paris, France; and ⁶Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat, Service de Pneumologie A, Centre de Compétence pour les Maladies Pulmonaires Rares, Paris, France

Rationale: Pulmonary fibrosis is a devastating as yet untreatable disease. We previously investigated the endogenous mediators released on lung injury and showed that uric acid is a danger signal activating Nod-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome in lung inflammation and fibrosis (Gasse et al., *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:903–913).

Objectives: Here we address the role of extracellular adenosine triphosphate (eATP) in pulmonary inflammation and fibrosis.

Methods: ATP was quantified in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of control subjects and patients with idiopathic pulmonary fibrosis. The contribution of eATP as a danger signal was assessed in a murine model of lung fibrosis induced by airway-administered bleomycin (BLM), an intercalating agent that causes DNA strand breaks.

Measurements and Main Results: Fibrotic patients have elevated ATP content in BALF in comparison with control individuals. In mice, we report an early increase in eATP levels in BALF on BLM administration. Modulation of eATP levels with the ATP-degrading enzyme apyrase greatly reduced BLM-induced inflammatory cell recruitment, lung IL-1 β , and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 production, while administration of ATP- γ S, a stable ATP derivative, enhanced inflammation. P2X₇ receptor-deficient mice presented dramatically reduced lung inflammation, with reduced fibrosis markers such as lung collagen content and matrix-remodeling proteins TIMP-1 and matrix metalloproteinase-9. The acute inflammation depends on a functional pannexin-1 hemichannel protein. *In vitro*, ATP is released by pulmonary epithelial cells on BLM-induced stress and this is partly dependent on the presence of functional P2X₇ receptor and pannexin-1 hemichannel.

Conclusions: ATP released from BLM-injured lung cells constitutes a major endogenous danger signal that engages the P2X₇ receptor/pannexin-1 axis, leading to IL-1 β maturation and lung fibrosis.

Keywords: ATP; lung fibrosis; inflammation; P2X₇ receptor; pannexin-1

Pulmonary fibrosis is a fatal disorder of the lower respiratory tract, characterized by inflammation and fibrosis of the interstitium, leading to destruction of the alveolar histoarchitecture. Pulmonary fibrosis is the consequence of recurrent epithelial damage with destruction of alveolar epithelial cells and epithelial-mesenchymal transition together with scattered foci of

AT A GLANCE COMMENTARY

Current Scientific Knowledge on the Subject

Extracellular ATP is a potent mediator of inflammation, but its role in lung inflammation and fibrosis is unknown.

What This Study Adds to the Field

Using the bleomycin model of pulmonary inflammation and fibrosis in mice, we demonstrate that extracellular ATP released from injured cells acts as a major danger signal promoting pulmonary inflammation. Extracellular ATP engages the P2X₇ receptor/pannexin-1 axis leading to lung IL-1 β maturation, inflammation, and evolution to fibrosis. Blockade of the P2X₇ receptor represents a novel, potential therapeutic approach to control IL-1 β and fibrosis in lung injury.

fibroblast accumulation and scant inflammation (1, 2). Overwhelming evidence emphasizes that in response to damage, many host molecules known as danger signals potentiate the immune system. However, they may set up a detrimental uncontrolled response (3). In an attempt to identify the danger signals released by stressed cells (4) after lung injury that may contribute to lung fibrosis, we addressed the role of extracellular ATP (eATP). Transient increase in eATP is ubiquitously used for cell-to-cell communication in the nervous, vascular, and immune systems (5, 6). In healthy tissues, ATP released from cells is tightly regulated and its concentration is kept low by extracellular ATP/ADPases (7, 8). In damaged tissues, ATP is a natural endogenous adjuvant released from injured cells that initiates inflammation and further amplifies and sustains cell-mediated immunity through P2 receptor-mediated purinergic signaling (9–12). Among P2 receptors, P2X allow the nonselective passage of cations across the plasma membrane, resulting in K⁺ efflux and Ca²⁺ influx. Extracellular ATP was shown to be a crucial signal to trigger synthesis and release of mature IL-1 β after macrophage priming by an inflammatory signal such as LPS (13). It activates the P2X₇ receptor, leading to Nod-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) activation and mature IL-1 β production (14). ATP binding to P2X₇ receptor causes the oligomerization and opening of the channel and intracellular potassium depletion necessary for inflammasome activation (11, 12). Nevertheless, both caspase-1 activation and mature IL-1 β release by macrophages require functional pannexin-1 (Panx-1), a protein that associates with P2X₇ receptor on ATP stimulation and induces the formation of a large nonselective pore (15, 16). However,

(Received in original form March 5, 2010; accepted in final form June 3, 2010)

Supported by the French Conseil Général du Loiret, Fondation de la Recherche Médicale, and Agence Nationale de la Recherche.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Isabelle Couillin, Ph.D., Molecular Immunology and Embryology, UMR 6218, 3B rue de la Férollerie, 45071 Orleans, France. E-mail: couillin@cns-orleans.fr

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org

Am J Respir Crit Care Med Vol 182, pp 774–783, 2010

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.201003-0359OC on June 3, 2010
Internet address: www.atsjournals.org

the role of ATP in pulmonary inflammation and fibrosis has not yet been explored. Here, we show that ATP levels are significantly increased in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). In mice, using the bleomycin-induced pulmonary fibrosis model, we report early increase in eATP content in BALF. Blocking airway P₂ receptors or neutralizing eATP in the airways potently inhibits BLM-induced lung inflammation. P2X₇ receptor-deficient mice have less neutrophil airway influx and inflammatory cytokine production with reduced pulmonary fibrosis in terms of lung collagen and matrix-remodeling proteins. An inhibitor of Panx-1 hemichannel partially prevents neutrophil airway influx and cytokine production. These data demonstrate that eATP is a key mediator of pulmonary inflammation on lung injury that may lead to lung fibrosis. Some of these results have been previously reported in the form of abstracts (17, 18).

METHODS

Patients and Control Subjects

Patients with IPF and control patients are described in the online supplement. Bronchoalveolar lavage was performed as previously described (19).

Mice

Wild-type C57BL/6 mice or mice deficient for P2X₇ receptor (20), backcrossed 10 times on the C57BL/6 genetic background, were used. Mice were bred in our animal facility (Centre National de la Recherche Scientifique, Orleans, France). Six- to 10-week-old animals were kept in sterile isolated ventilated cages. All animal experiments complied with the French government's ethics and animal experiment regulations.

Intranasal and Intravenous Administration

Bleomycin sulfate (5 or 10 mg/kg; Bellon Laboratories, Montrouge, France) in saline, or saline alone, was given by nasal instillation in a volume of 20 μ l under light ketamine-xylazine anesthesia. Apyrase (40 μ g/kg), ATP γ S (100 μ M), and suramin (100 μ M) were from Sigma-Aldrich (L'isle d'Abeau Chesnes, France). All of these were instilled in 20 μ l of saline buffer, simultaneously and 4 hours after BLM as mentioned. ¹⁰panx-1 mimetic peptide (WRQAAFVDSY; Polypeptide Group, Strasbourg, France) was injected intravenously at 2 mM in 200 μ l, concomitantly with BLM instillation.

Bronchoalveolar Lavage Fluid

BALF was sampled as previously described (21).

Lung Homogenization and Analysis

After BAL, lungs were homogenized and lung tissue myeloperoxidase (MPO) activity was evaluated as described (22).

ATP Measurement

Extracellular ATP in BALF supernatant was quantified with an ATPlite 1step kit (PerkinElmer, Waltham, MA). To avoid ATP catabolism, BALF sampling was performed with Hanks' balanced salt solution without calcium and magnesium (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) and 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma-Aldrich). Luminescence produced was measured with a luminometer (Victor 3V; PerkinElmer).

Cell Count and Determination

Total cell and differential cell counts were determined in BAL fluid as previously described (21).

Mediator Measurements by ELISA

IL-1 β , matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 levels in lung homogenates were determined with

ELISA kits (Mouse DuoSet; R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions.

Total Lung Collagen Measurements

Aliquots of lung homogenate (50 μ l) were assayed for lung collagen levels, using the Sircol collagen dye-binding assay according to the manufacturer's instructions (Biocolor Ltd, Carrickfergus, Northern Ireland).

Determination of Protein in BAL Fluid

BALF protein concentration was determined by the Bio-Rad Protein assay according to the instructions of the manufacturer (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany).

Histology

After BAL and lung perfusion, the large lobe was fixed and 3- μ m sections were stained as described previously (23).

Cell Culture

MLE12 murine lung epithelial cells (LGC Promochem, Molsheim, France) and BEAS-2B human bronchial epithelial cells were used. Cells were cultured in RPMI 1640 medium with antibiotics, L-glutamine, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethane sulfonic acid, and 10% fetal calf serum, plated in 96-well microculture plates, and stimulated without (medium) or with BLM (0.5 to 1,000 μ g/ml) in the presence of the P2X₇ receptor inhibitor A438079 (200 μ M) or A740003 (1–100 μ M), the pannexon inhibitor carbenoxolone (CBX, 50 μ M), or the mimetic peptide ¹⁰panx1 WRQAAFVDSY (100 μ M), and inactive control peptide ¹⁴panx1 SGILRNDSTVPDQF (100 μ M) (Polypeptide Group). Cell death was monitored by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay, using a standard protocol.

Statistical Analysis

Statistical evaluation of differences between the experimental groups was determined by nonparametric one-way analysis of variance and the Bonferroni post test, using Prism software (Graphpad Software, La Jolla, CA). *P* < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Increased ATP Levels in BALF of Fibrotic Patients

To investigate the potential role of extracellular ATP as a danger signal in lung fibrosis, ATP levels were measured in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of 13 patients with stable idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), 2 patients with acute IPF exacerbation, and 7 control patients with no identified respiratory disease. We found significantly increased BALF ATP levels in patients with stable IPF as compared with control individuals and, importantly, ATP contents were four- to five-fold higher in two patients with exacerbated IPF than in patients with stable IPF (Figure 1). These data show that increased extracellular ATP levels are associated with IPF.

Bleomycin-treated Mice Have Increased ATP Levels in BALF

To assess the functional relevance of increased airway eATP in fibrotic patients, we used the murine bleomycin (BLM) model of lung inflammation and fibrosis. Single BLM instillation resulted in a rapid and profound increase in ATP levels in the BALF compared with saline counterparts corresponding to initial injury induced by BLM (Figure 2A). Early kinetic analysis showed that the ATP increase was transient and peaked at 4 hours (Figure 2B). ATP release was dose dependent (data not shown) and preceded neutrophil recruitment into the BALF (Figure 2B). This demonstrates that tissue injury causes the early release of ATP in the airways, correlated with further neutrophil recruitment. Thus we showed that the early events after BLM administration lead to increased ATP in BALF in mice. We may assume that there is a first wave of lung cell damage on BLM

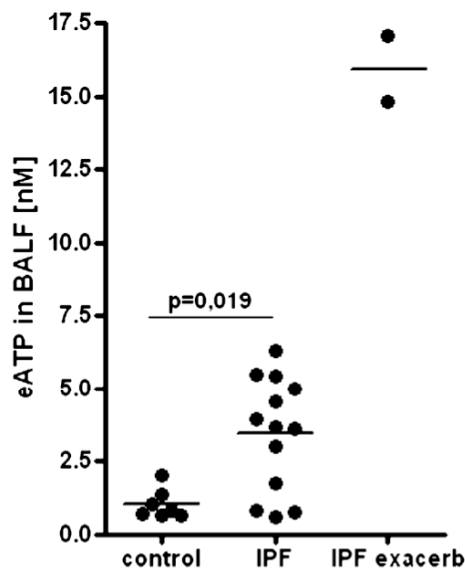


Figure 1. ATP level in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and control patients. ATP concentrations were determined in BALF of 13 patients with IPF, 2 patients with exacerbated IPF, and 7 control patients without identified respiratory disease. $*P < 0.05$ by Mann-Whitney test when comparing IPF patients with control patients. ATP concentrations in the BALF of the two patients with exacerbation are 4.6 times higher than in BALF from patients with IPF. Bars represent mean values. eATP = extracellular ATP.

with ATP release and neutrophil influx, which is probably followed by additional ATP release due to the presence of inflammatory cells known to trigger tissue destruction and inflammation. Nevertheless, we were unable to measure ATP levels 14 days after BLM administration because of the presence of blood in the BALF, which disturbs ATP dosage.

Diminution or Increase in Local Airway ATP Modulates BLM-induced Airway Inflammation

On cell injury ATP is released and may cause inflammation (14). To test our working hypothesis that eATP is a danger signal involved in lung inflammation, we performed local ATP depletion experiments in mice. Using apyrase, an ectoenzyme catalyzing the conversion of ATP/ADP into AMP, we observed that local or systemic treatment reduced BLM-induced acute inflammation, resulting in markedly reduced neutrophil recruitment into the BALF (Figure 3A) and neutrophil activity in the lung, as assessed by MPO activity measurement (Figure 3B). Lung proinflammatory IL-1 β production was also decreased (Figure 3C). To evaluate the role of eATP in the balance

between proteases and protease inhibitors implicated in the regulation of lung tissue remodeling, we measured tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) levels. TIMP-1 was significantly reduced in the lung by apyrase treatment (Figure 3D). Therefore, lowering local airway eATP diminished both BLM-induced markers of lung inflammation and remodeling.

Conversely, to investigate directly the proinflammatory effect of eATP, we administered locally the stable, nonhydrolyzable ATP analog ATP γ S. Although ATP γ S had little effect on its own, it significantly enhanced the neutrophil attractant effect of BLM (Figures 3E and 3F). Pulmonary levels of IL-1 β (Figure 3G) and TIMP-1 (Figure 3H) were also increased by ATP γ S treatment. Thus, local exogenous eATP exacerbates BLM-induced lung inflammation.

P2R Inhibition Reduces Airway Inflammation and Remodeling

We next investigated the signaling pathway by which endogenous released eATP contributes to injury-induced lung inflammation. Extracellular ATP activates receptors of the purinergic family (P2R), leading to leukocyte recruitment (24, 25). To examine the role of P2R we treated BLM-instilled mice with suramin, a broad-spectrum P2R antagonist. Local administration of suramin significantly reduced neutrophil mobilization into the BALF (Figure 4A) and neutrophil activity in the lung (Figure 4B). This was accompanied by a decrease in lung IL-1 β (Figure 4C) and TIMP-1 (Figure 4D) production. Thus, this implicates the ATP purinergic receptor family P2R in mediating BLM-induced lung inflammation.

IL-1 β Release, Inflammation, and Remodeling Are Dependent on the P2X $_7$ Receptor

Within the P2R family, the subtype most likely acting especially in response to high eATP levels is the ionotropic P2X $_7$ receptor. Using mice deficient for the P2X $_7$ receptor (P2X $_7$ R $^{-/-}$) (20, 26), we show that neutrophil recruitment in the BALF (Figure 5A) and neutrophil activity in the lung (Figure 5B), as well as pulmonary IL-1 β (Figure 5C) and TIMP-1 release (Figure 5D), were significantly decreased. Therefore the ATP P2X $_7$ receptor is an essential purinergic receptor involved in BLM-induced lung inflammation. In contrast to Figure 3E, where ATP γ S administration increased neutrophil influx in the BALF of BLM-instilled B6 mice, ATP γ S had no effect in P2X $_7$ R $^{-/-}$ mice (Figure 5E).

Late Inflammation, Remodeling, and Fibrosis Are Dependent on P2X $_7$ Receptor

To further assess the involvement of P2X $_7$ receptor in late pulmonary disease, we analyzed lung inflammation, remodeling and lung fibrosis 14 days after airway-administered BLM. Both wild-type and P2X $_7$ R $^{-/-}$ mice lost about 10% of body weight 5 days after BLM treatment but only P2X $_7$ R $^{-/-}$ mice had

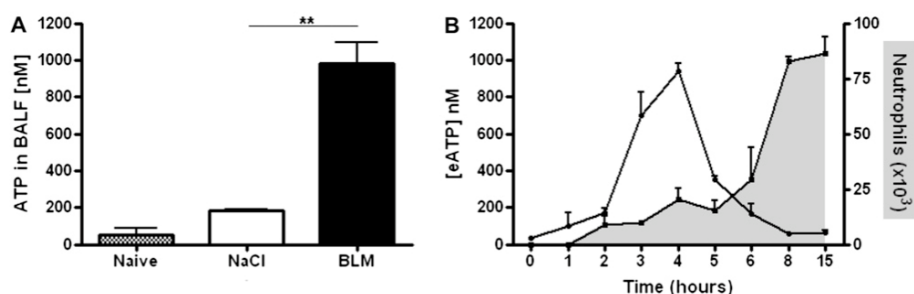


Figure 2. Release of ATP after bleomycin (BLM)-induced lung injury in mice. (A) ATP levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of mice 4 hours after BLM (10 mg/kg) or saline solution instillation. Naive mice had no intranasal administration, giving basal BALF ATP content. (B) Kinetics of the release of ATP in BALF from BLM-instilled mice (10 mg/kg) and correlation with slightly delayed neutrophil influx into the BALF. Results

are representative of three independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD ($n = 4$ mice per group; $**P < 0.01$). eATP = extracellular ATP.

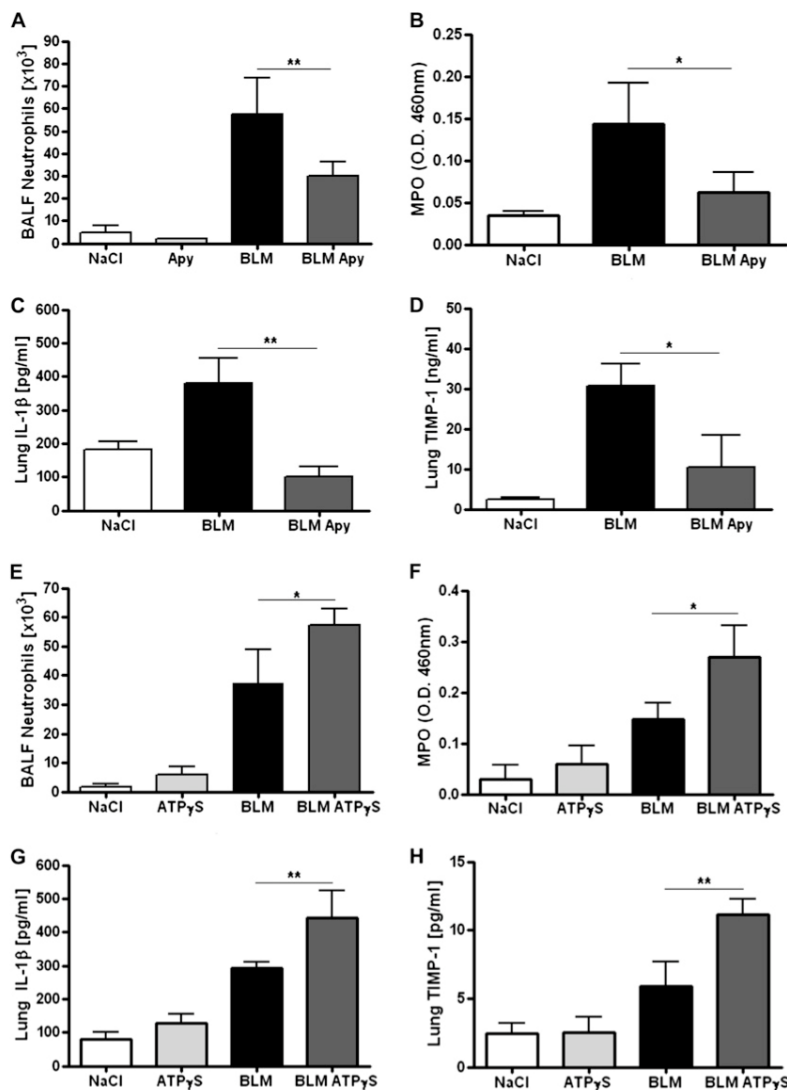


Figure 3. Modulation of extracellular ATP on bleomycin (BLM)-induced inflammation. Twenty-four hours after intranasal administration of BLM (10 mg/kg), (A) neutrophil counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and (B) neutrophil myeloperoxidase (MPO) activity in lungs were reduced after two treatments (0 and 6 h) with the ATP-conversion enzyme apyrase (Apy, 40 μ g/kg intranasal). Proinflammatory (C) cytokine IL-1 β and (D) tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)-1 levels, measured by ELISA, were also decreased in the lungs after apyrase treatment. Twenty-four hours after a low dose of intranasal BLM (5 mg/kg), (E) neutrophil counts in BALF and (F) lung MPO were increased after two treatments (0 and 4 h) with nonhydrolyzable ATP γ S (100 μ M/mouse, intranasal). (G) IL-1 β and (H) TIMP-1 were also increased in the lungs after ATP γ S treatment. Results are representative of two or three independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD ($n = 4$ or 5 mice per group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

a trend to recover thereafter (Figure 6A). Total cell, macrophage, and lymphocyte recruitment into the BALF was decreased in P2X₇R^{-/-} mice in comparison with wild-type mice (Figure 6B). Lung IL-1 β production (Figure 6C) was strikingly

reduced in P2X₇R^{-/-} mice, and so were the remodeling-involved enzymes matrix metalloproteinase-9 (Figure 6D) and TIMP-1 (Figure 6E). Representative lung histology sections from BLM-treated wild-type mice show outspread cellular

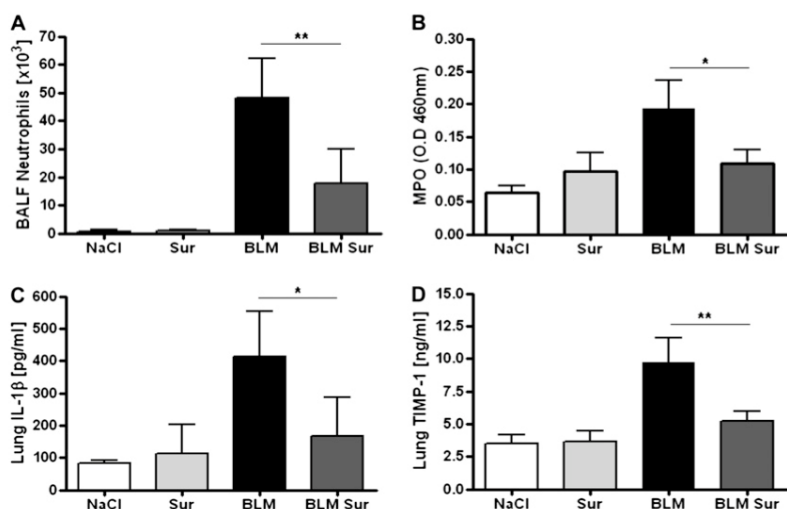


Figure 4. P2R inhibition reduces airway inflammation. Intranasal treatment with suramin (Sur, 100 μ M), a broad-spectrum P2R antagonist, 0 and 4 hours after instillation of bleomycin (BLM, 10 mg/kg), reduced (A) neutrophil counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), (B) myeloperoxidase (MPO) activity, and (C) IL-1 β and (D) tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)-1 levels in lungs. Results are representative of two independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD ($n = 4$ mice per group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

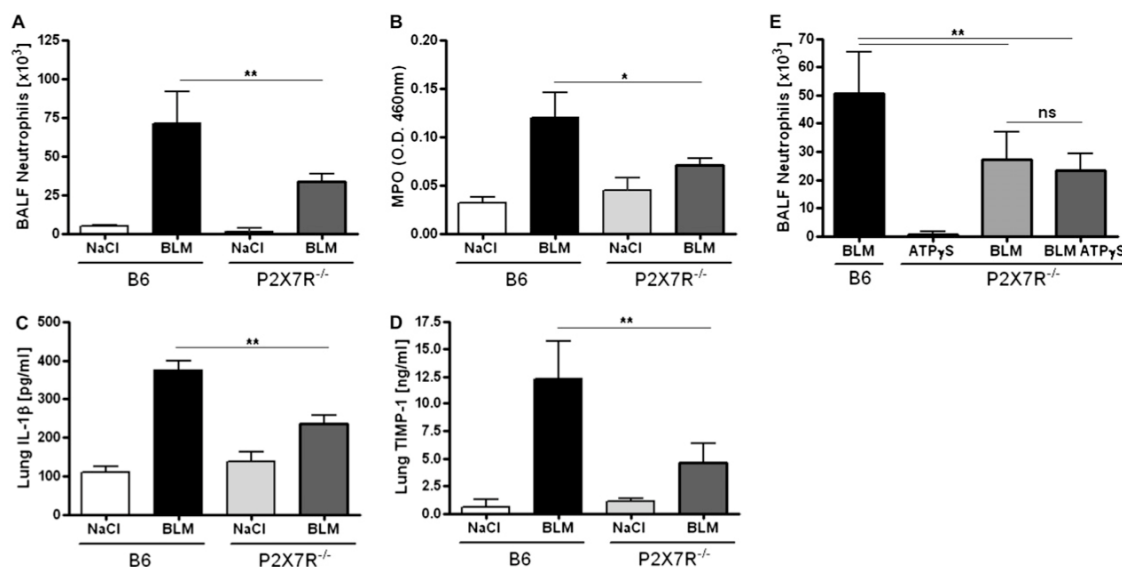


Figure 5. Lung inflammation depends on P2X₇ receptor (P2X₇R). (A) Neutrophil recruitment into the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and (B) myeloperoxidase (MPO) activity in lungs were reduced in BALF from P2X₇R^{-/-} mice in comparison with wild-type mice 24 hours after bleomycin (BLM) instillation (10 mg/kg). (C) IL-1 β and (D) tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)-1 levels were also greatly reduced in lung homogenates of P2X₇R^{-/-} in comparison with wild-type mice. (E) Neutrophil recruitment into the BALF of P2X₇R^{-/-} mice administered BLM (5 mg/kg) was not increased after two treatments with ATP γ S (0 and 4 h; 100 μ M/mouse, intranasal). Data are representative of three independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD (n = 4 or 5 mice per group; *P < 0.05, **P < 0.01). ns = not significant.

infiltrations and fibrotic areas with poorly recognizable alveolar walls. P2X₇R^{-/-} mice, however, presented more limited lung fibrosis foci with some free airspace and distinct alveolar walls (Figure 6F). Lung collagen, an indicator of fibrosis, was strongly reduced in BLM-treated P2X₇R^{-/-} mice (Figure 6G). In addition, BALF protein concentration was also diminished in these mice, suggesting attenuated leakage from a damaged epithelial barrier (Figure 6H). Therefore, remodeling and lung fibrosis were greatly reduced in the absence of P2X₇ receptor signaling, outlining a critical role of the eATP–P2X₇ receptor axis in the establishment of lung fibrosis.

Acute Inflammation Is Dependent on Pannexin-1 Hemichannel

Caspase-1 activation and mature IL-1 β production by macrophages *in vitro* required functional pannexin-1 (Panx-1), a channel that associates with the P2X₇ receptor on ATP stimulation (15, 16). We addressed the role of Panx-1 pore formation in our *in vivo* model by investigating the effect of ¹⁰panx-1 peptide, a mimetic peptide blocking the Panx-1 pore. Intravenous administration of ¹⁰panx-1 attenuated BLM-induced acute inflammation, resulting in reduced neutrophil recruitment into the BALF (Figure 7A) and decreased lung IL-1 β (Figure 7B) and TIMP-1 (Figure 7C) production. We observed a similar effect on systemic treatment with carbenoxolone (CBX), an inhibitor of connexins and pannexins (data not shown). Our data support the idea that high eATP acts on the P2X₇R, which does need a functional Panx-1 pore to trigger its proinflammatory effects.

BLM Triggers P2X₇ Receptor–Pannexin-1–dependent ATP Release by Lung Epithelial Cells

To further investigate the mechanism of lung injury–induced inflammation at the molecular level, we analyzed *in vitro* the release of ATP by lung cells on BLM stimulation. Extracellular nucleotides such as ATP, ADP, UTP, or UDP are released into

the extracellular space from mechanically stressed cells, in particular endothelial and epithelial cells (27–29). Using the murine lung epithelial type II cell line 12 (MLE12), we show that BLM causes a dose-dependent release of ATP by lung epithelial cells (Figure 8A) peaking at 6 hours, which was detectable as early as 30 minutes and lasted 8 hours (data not shown). The slight reduction in cell viability observed after stimulation with all the doses of BLM tested was not correlated with the measured eATP levels, suggesting that somehow active mechanisms of ATP release may exist and that eATP increases were not a mere consequence of passive delivery after cell death (Figure 8B). Similar results were obtained with a human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B) (Figures 8C and 8D). Because the P2X₇ receptor and Panx-1 hemichannel are involved in ATP release from various cell types after stress (30–32) or activation, we next investigated their role in BLM-induced ATP release. The P2X₇ receptor has been described as a marker for lung alveolar epithelial type I and type II cells (33) and Panx-1 was shown to be expressed at the apical pole in airway epithelial cells (34). The presence of specific inhibitors of either P2X₇R (A438079 and A740003 [35]) or Panx-1 (CBX and ¹⁰panx-1) resulted in a 30 to 40% decrease in ATP release by MLE12 cells in response to BLM stimulation (Figure 9A). A similar inhibition of ATP release was observed with BEAS-2B cells (Figure 9B). Regarding the MTT assays (Figures 9C and 9D), the inhibitors had no cytotoxic effect at the concentrations used. However, to prevent high-dose uncontrolled effect, we used smaller doses of A740003 and checked the effect of ¹⁰Panx-1 mimetic peptide by using the control peptide ¹⁴Panx-1 (16). One and 10 μ M A740003 were efficient in inhibiting eATP release by MLE12 cells by 10 to 20%, respectively (Figure 9E). An inhibition of eATP release was observed with ¹⁰Panx-1 (100 μ M) whereas control ¹⁴Panx-1 at the same concentrations had no effect (Figure 9F). These data suggest that ATP release by lung epithelial cells on BLM-induced stress

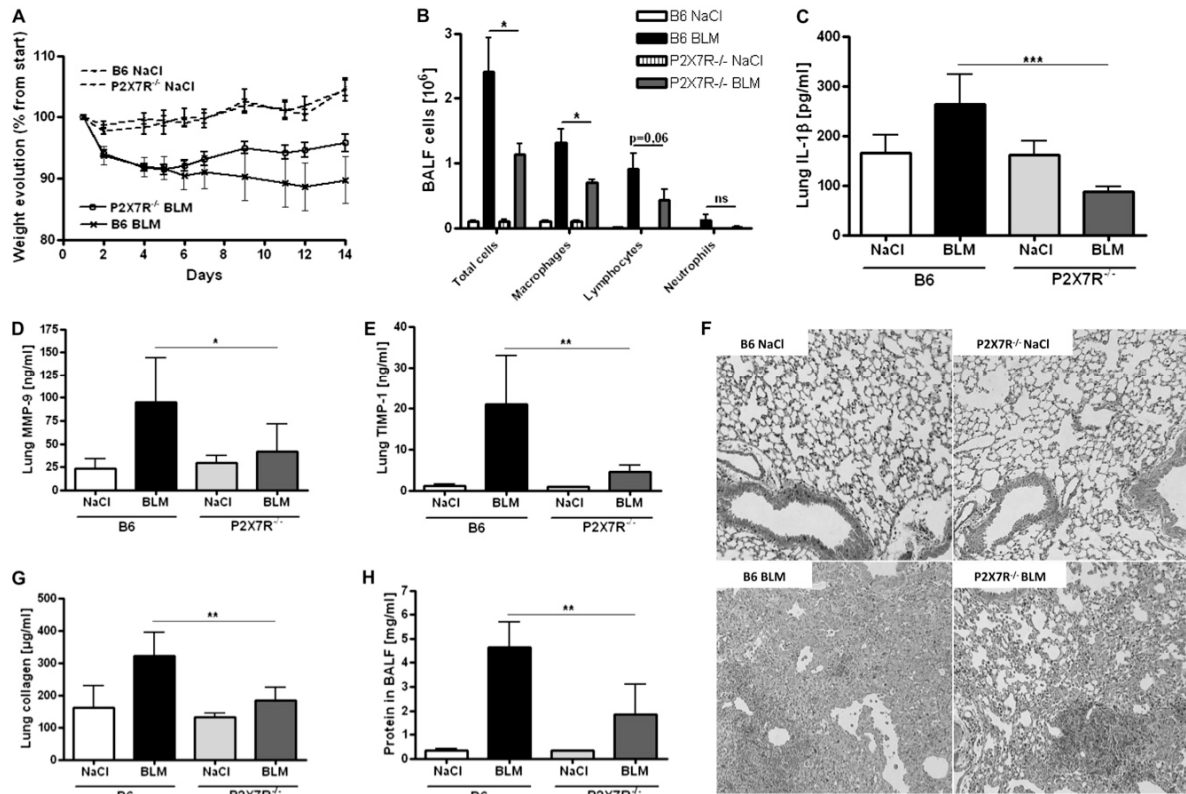


Figure 6. Chronic inflammation, remodeling and fibrosis are diminished in P2X₇ receptor (P2X₇R)-deficient mice. (A) Body weight loss after bleomycin (BLM) instillation (5 mg/kg) and (B) cell recruitment on Day 14 were reduced in P2X₇R^{-/-} mice in comparison with wild-type mice. Pulmonary levels of (C) IL-1 β , (D) matrix metalloproteinase (MMP)-9, and (E) tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)-1 as indicators of a fibrotic process were also reduced in P2X₇R^{-/-} mice. (F) Fibrosis was significantly reduced in P2X₇R^{-/-} mice in comparison with wild-type mice 14 days after BLM treatment (hematoxylin and eosin staining; original magnification, $\times 200$; $n = 5$). (G) Total collagen in the lung analyzed by Sircol assay and (H) protein content in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were reduced in P2X₇R^{-/-} mice. Data are representative of three independent experiments ($n = 4$ or 5 mice per group; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$). ns = not significant.

is partly dependent on functional P2X₇ receptor and Panx-1 pore formation.

DISCUSSION

To maintain host integrity, the innate immune system has evolved to sense not only microbial conserved molecules in

a pathogenic context but also many endogenous molecules produced in situations such as uncontrolled cell death (36). In the latter, massive ATP escape from cells results in high local concentration of extracellular ATP (eATP). This refers to a danger signal and has potent proinflammatory properties. Patients with chronic lung pathology such as allergic asthma or chronic obstructive pulmonary disease were reported to present

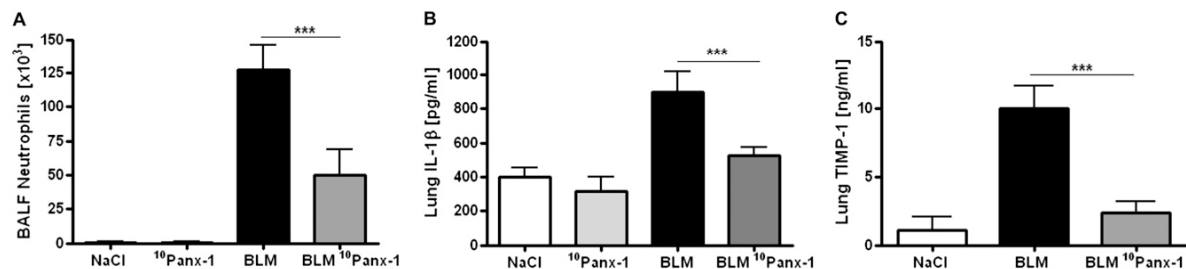


Figure 7. Acute inflammation is dependent on the pannexin-1 channel. Twenty-four hours after intranasal bleomycin (BLM, 10 mg/kg) administration, (A) neutrophil counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), (B) proinflammatory cytokine IL-1 β levels in lungs, and (C) lung tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)-1 were reduced after treatment with the ¹⁰panx-1 mimetic inhibitory peptide (1 mg/kg, intravenous). Data are representative of three independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD ($n = 4$ or 5 mice per group; $***P < 0.001$).

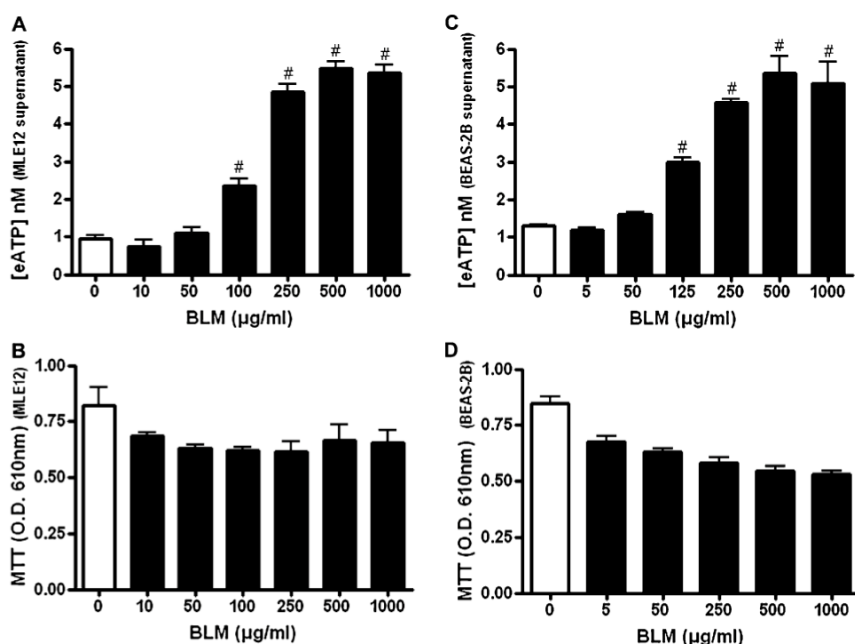


Figure 8. Bleomycin (BLM) induces the release of ATP by lung epithelial cells. extracellular ATP (eATP) levels in supernatants from (A) murine lung epithelial type II cell line 12 (MLE12) or (C) a human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B) cultured for 6 hours with increasing doses of BLM (0 to 1,000 μg/ml) were determined. Results represent the ATP concentration (nM) in supernatants in a 96-well plate in the presence of 2×10^5 cells (MLE12) or 1×10^5 cells (BEAS-2B). Cell viability of (B) MLE12 or (D) BEAS-2B cells was monitored by methylthiazolylidiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay, using a standard protocol. Data represent means $\pm$ SD of triplicates and are representative of five different experiments (* $P < 0.001$ in comparison with medium).

enhanced ATP levels in the bronchoalveolar space (25, 37). However, the prominent role of eATP in both inflammation and evolution to pulmonary fibrosis was not explored. Here we give the first evidence of an increased concentration of ATP in the BALF of patients with IPF, suggesting that extracellular ATP may be involved in the pathogenesis of pulmonary fibrosis in humans. Interestingly, ATP levels were dramatically in-

creased in the BALF of two patients with IPF exacerbation. Ten percent of patients with IPF present these aggravations of unknown origin. Exacerbated patients present alveolar damage, inflammation, and areas of edema that become new fibrotic areas, and have a poor prognosis (50% of them die). Measured ATP concentrations are probably underestimated because of rapid ATP degradation in biological liquids and because of the

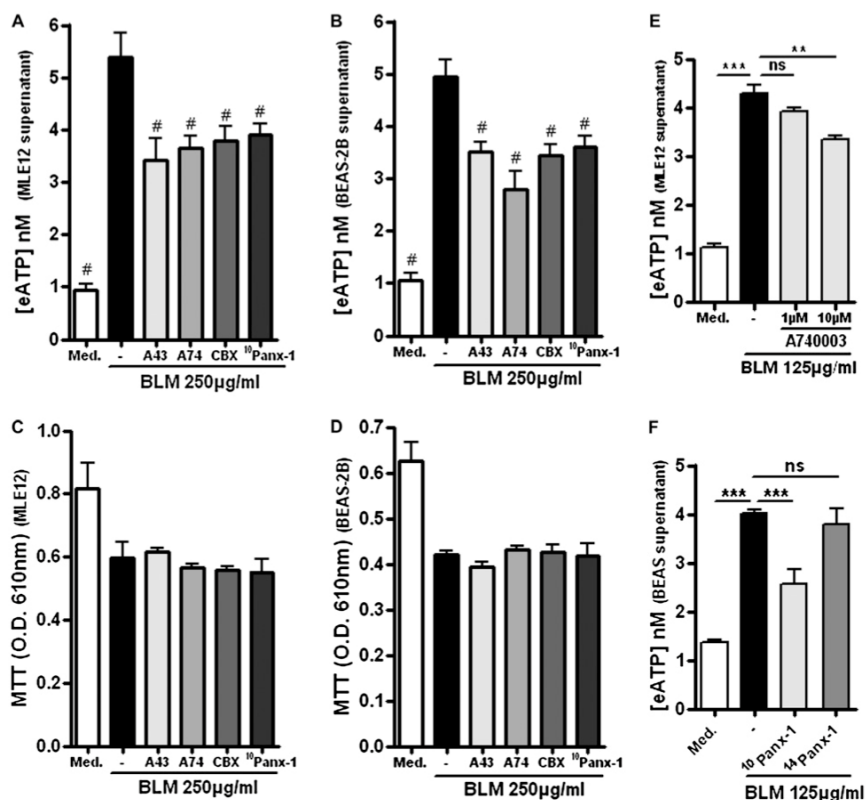


Figure 9. Bleomycin (BLM)-induced ATP release by lung epithelial cells depends on P2X₇ receptor and pannexin-1 pore ATP content in supernatants from (A) murine lung epithelial type II cell line 12 (MLE12) or (B) BEAS-2B cells cultured for 6 hours with medium (Med.) or with BLM (250 μg/ml) in the presence of the specific P2X₇ receptor inhibitor A438079 (A43, 200 μM) or A740003 (A74, 100 μM), or in the presence of the pannexon inhibitor carbenoxolone (CBX, 50 μM) or the mimetic peptide 10panx1 inhibitor of Panx-1 activity (100 μM). Cell viability of (C) MLE12 or (D) BEAS-2B cells was monitored by methylthiazolylidiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay, using a standard protocol. ATP levels in supernatants from MLE12 cells cultured without (Med.) or with BLM (125 μg/ml) in the presence of (E) A740003 (A74, 1–10 μM) or (F) 10panx-1 or 14panx-1 peptides (100 μM) were determined. Results are expressed as nM of ATP released per 2×10^5 (MLE12) or 1×10^5 (BEAS-2B) cells. Data represent the mean $\pm$ SD of triplicates and are representative of four independent experiments (* $P < 0.001$ compared with BLM positive control; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

1:50 or 1:100 dilution of the liquid covering alveolar epithelium during the lavage. ATP concentrations in the close vicinity of cells are probably higher, able to reach concentrations required for purinergic receptor activation. ATP is probably released by stressed and/or damage cells and in particular by epithelial cells after alveolar injury (29). A possible correlation between acute IPF exacerbation and high ATP concentrations must be further investigated, as strongly elevated ATP levels might represent a prognostic marker for exacerbated IPF. Neutrophil percentage in the BALF of patients with IPF was shown to be an independent predictor of early mortality, whereas lymphocytes and eosinophils were not (38). In mice, lung injury induced by bleomycin (BLM), a cell stress-inducing agent leading to lung fibrosis, promoted a marked early release of ATP in the bronchoalveolar space. Bleomycin probably induces a first wave of cell damage with ATP release leading to lung inflammation, but the presence of inflammatory cells may trigger additional cell damage, ATP release, and inflammation with dysregulated repair leading to lung fibrosis. We demonstrate that ATP is involved in BLM-induced inflammation and remodeling processes because enzymatic ATP degradation by apyrase reduced neutrophil influx, IL-1 β , and TIMP-1, whereas the coadministration of a stable ATP analog increased these parameters. Further, by treating wild-type mice with a receptor antagonist or by using gene-deficient mice, we present compelling evidence that ATP released on BLM-induced injury activates the P2 purinergic receptors and in particular P2X₇. We show *in vivo* that the engagement of P2X₇ receptor is required for fully mature IL-1 β production and lung inflammation, suggesting that the ATP-P2X₇ receptor axis activates the NLRP3 inflammasome. Moreover, we observed that mature IL-1 β production by macrophages and dendritic cells in response to ATP stimulation *in vitro* is strictly dependent on the P2X₇ receptor, NLRP3 receptor, and apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) adaptor molecule (our unpublished data). Our results suggest that the P2X₇ receptor is directly activated by ATP released after BLM-induced cell injury, leading to activation of the NLRP3 inflammasome and mature IL-1 β production. Nevertheless, other receptors may be involved in the establishment of ATP release and/or inflammation. Moreover, the P2X₇ receptor should also directly interact with other danger signals than ATP, such as extracellular matrix components generated after tissue injury, to form multireceptor complexes as shown with the biglycan danger signal (39). Other purinergic receptors may also play a role in lung inflammation and fibrosis. In particular, the contribution of the P2X₄ receptor, also expressed on alveolar epithelial type I cells (40), will deserve further investigation because a structural (41) and functional interaction between P2X₄ and P2X₇ was shown (39). Reduced body weight loss, collagen deposition, and fibrotic pathology in the lungs of P2X₇ receptor-deficient mice demonstrate that early events due to lung damage such as ATP release and P2X receptor signaling triggering the inflammatory response are also involved in the late pulmonary disease. Increased ATP levels were observed in the airways of cigarette smoke-exposed mice with lung emphysema and in patients with chronic obstructive pulmonary disease, underlining the role of ATP and purinergic receptors in the pathogenesis of chronic pulmonary diseases (37, 42). Interestingly, we show that BLM-induced acute lung inflammation with cell recruitment and IL-1 β and TIMP-1 production depends on the pannexin-1 hemichannel, suggesting that ATP-mediated P2X₇ receptor stimulation activates the formation of the large pannexin-1 pore, leading to inflammasome activation as reported in other systems (16, 43–45). On lung injury, Panx-1 might be implicated in the establishment of lung inflammation

at various levels, in particular in NLRP3 inflammasome activation leading to IL-1 β maturation and secretion, but also in danger signal release such as here in the active release of ATP from injured cells. Indeed, ATP release from cells may be either vesicular, channel-mediated, or by membrane leaking. Panx-1 proteins have been shown to form hemichannels called pannexons that are able to release ATP from several cell types on stress (30–32, 46) and in particular by airway epithelia (29, 34, 47). We show that cellular stress induced by BLM triggers the *in vitro* release of ATP from epithelial cells and that this process is partly dependent on the P2X₇ receptor–Panx1 axis, suggesting that ATP is released through the Panx-1 hemichannel opening after activation by P2X₇ receptor interaction. Other purinergic receptors may be involved in ATP release through Panx-1 hemichannel stimulation. We observed only a partial dependence on the P2X₇ receptor–Panx-1 axis, because ATP should also be released by passive delivery due to BLM-induced DNA damage resulting in cell death. Indeed, excessive Panx-1 pore opening may lead to further cell death, consisting of an amplification mechanism for BLM-mediated cell death through ATP release. The NLRP3 inflammasome is also known to induce cell death via caspase-1 activation. Nevertheless, our data show that Panx-1 is implicated in active danger signal delivery from pulmonary cells on lung injury.

In conclusion, we identified extracellular ATP as a new danger signal involved in the establishment of lung inflammation leading to the fibrotic process. We propose that ATP released on lung epithelial injury acts as an early signal via P2X₇ receptor activation to trigger pulmonary cell responses including inflammasome activation leading to mature IL-1 β and remodeling factor expression. Our data are compatible with a scenario in which ATP is released via the P2X₇ receptor-activated Panx1 hemichannel in injured lung cells, leading to sustained P2X₇ receptor activation on alveolar macrophages, thereby somehow furnishing the second signal necessary for NLRP3/ASC/caspase-1 inflammasome aggregation, proteolytic maturation/activation of caspase-1, proIL-1 β cleavage, and subsequent IL-1 β release. Interstitial pulmonary fibrosis has no effective therapy, in part because of the late diagnosis in patients suffering from an already established pathology. Our study proposes new targets for IPF, in particular the P2X₇ receptor, for which inhibitors were shown to be efficient in animal models of neurological human diseases (48, 49). Targeting the P2X₇ receptor by specific inhibitors in patients with pulmonary fibrosis may be a promising approach to improve their life span and life condition.

Author Disclosure: N.R. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript. P.G. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript. L.F. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript. A.G. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript. M.C. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript. L.F. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript. J.K. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript. V.F.J.Q. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript. S.M.-A. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript. B.C. served as a consultant for Genkyotex, received lecture fees from AstraZeneca (\$1,001–\$5,000), and received grant support from Novartis (\$50,001–\$100,000). B.R. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript. I.C. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript.

Acknowledgment: The authors are grateful for the support of the Conseil Général du Loiret (France) and the Fondation de la Recherche Médicale (France). The authors acknowledge the skilled technical assistance of Rachel Vacher (UMR6218 IEM, Orleans). The authors thank Dr. L. Apetoh (INSERM, U805, Villejuif, France,

and Center for Neurological Diseases, Boston, MA) for the kind gift of P2X₇ receptor-deficient mice, Dr. M. Pichavant (Harvard Medical School, Boston, MA) for the gift of the MLE12 cell line, and Dr. François Rassendren (UMR 5203, INSERM U661, IGF, Montpellier, France) for the gift of the specific P2X₇ receptor inhibitor A740001. The authors are grateful to François Erard and Marc Le Bert for scientific discussion and correction of the manuscript.

References

- Willis BC, duBois RM, Borok Z. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:377–382.
- Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Degryse AL, Li B, Han W, Sherrill TP, Plieth D, Neilson EG, Blackwell TS, et al. Contribution of epithelial-derived fibroblasts to bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:657–665.
- Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, Tsung A. HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med* 2008;14:476–484.
- Ishii KJ, Akira S. Potential link between the immune system and metabolism of nucleic acids. *Curr Opin Immunol* 2008;20:524–529.
- Schenk U, Westendorf AM, Radaelli E, Casati A, Ferro M, Fumagalli M, Verderio C, Buer J, Scanziani E, Grassi F. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal* 2008;1:ra6.
- Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, Yagita H, Ishii N, Evans R, Honda K, et al. ATP drives lamina propria T_H17 cell differentiation. *Nature* 2008;455:808–812.
- Kaczmarek E, Koziak K, Sevigny J, Siegel JB, Anrather J, Beaudoin AR, Bach FH, Robson SC. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem* 1996;271:33116–33122.
- Picher M, Burch LH, Hirsh AJ, Spychala J, Boucher RC. Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase: two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J Biol Chem* 2003;278:13468–13479.
- Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006;112:358–404.
- Kanneganti TD, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Whitfield J, Franchi L, Taraporewala ZF, Miller D, Patton JT, Inohara N, et al. Critical role for cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem* 2006;281:36560–36568.
- Kanneganti TD, Ozoren N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, Whitfield J, Barchet W, Colonna M, Vandenabeele P, et al. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 2006;440:233–236.
- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006;440:228–232.
- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F. The p2 × 7 receptor: A key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* 2006;176:3877–3883.
- Di Virgilio F. Liaisons dangereuses: P2x₇ and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:465–472.
- Locovei S, Scemes E, Qiu F, Spray DC, Dahl G. Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2x₇ receptor death complex. *FEBS Lett* 2007;581:483–488.
- Pelegri P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1β release by the ATP-gated P2X₇ receptor. *EMBO J* 2006;25:5071–5082.
- Riteau N, Gasse P, Lagente V, Erard F, Quesniaux VF, Ryffel B, Couillin I. Extracellular ATP is and fibrosis [abstract]. Presented at WIRM IV, Innate and Adaptive Immunoregulatory Mechanisms, March 29–April 1, 2010, Davos, Switzerland.
- Riteau N, Gasse P, Lagente V, Kanellopoulos J, Quesniaux VF, Ryffel B, Couillin I. Extracellular ATP is a danger signal activating P2X₇ receptor and inflammasome in lung inflammation and fibrosis [abstract]. Presented at the 13th International Conference on Lymphocyte Activation and Immune Regulation Inflammasome and Inflammation, February 5–7, 2010, Newport Beach, CA.
- Crestani B, Dehoux M, Hayem G, Lecon V, Hochedez F, Marchal J, Jaffre S, Stern JB, Durand G, Valeyre D, et al. Differential role of neutrophils and alveolar macrophages in hepatocyte growth factor production in pulmonary fibrosis. *Lab Invest* 2002;82:1015–1022.
- Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA. Altered cytokine production in mice lacking P2x₇ receptors. *J Biol Chem* 2001;276:125–132.
- Gasse P, Riteau N, Charron S, Girre S, Fick L, Petrilli V, Tschopp J, Lagente V, Quesniaux VF, Ryffel B, et al. Uric acid is a danger signal activating Nalp3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:903–913.
- Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25:187–191.
- Gasse P, Mary C, Guenon I, Noulain N, Charron S, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Akira S, Quesniaux VF, Lagente V, et al. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2007;117:3786–3799.
- Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 2009;461:282–286.
- Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Willart MA, Muskens F, Hoogsteden HC, Luttmann W, Ferrari D, Di Virgilio F, et al. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med* 2007;13:913–919.
- Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, Brissette W, Wicks JR, Audoly L, Gabel CA. Absence of the P2X₇ receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol* 2002;168:6436–6445.
- Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol* 2003;64:785–795.
- Di Virgilio F, Borea PA, Illes P. P2 receptors meet the immune system. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:5–7.
- Okada SF, Nicholas RA, Kreda SM, Lazarowski ER, Boucher RC. Physiological regulation of ATP release at the apical surface of human airway epithelia. *J Biol Chem* 2006;281:22992–23002.
- Bao L, Locovei S, Dahl G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett* 2004;572:65–68.
- Iglesias R, Dahl G, Qiu F, Spray DC, Scemes E. Pannexin 1: the molecular substrate of astrocyte “hemichannels.” *J Neurosci* 2009;29:7092–7097.
- Locovei S, Bao L, Dahl G. Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:7655–7659.
- Chen Z, Jin N, Narasaraaju T, Chen J, McFarland LR, Scott M, Liu L. Identification of two novel markers for alveolar epithelial type I and II cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:774–780.
- Ransford GA, Fregien N, Qiu F, Dahl G, Conner GE, Salathe M. Pannexin 1 contributes to ATP release in airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;41:525–534.
- King BF. Novel P2X₇ receptor antagonists ease the pain. *Br J Pharmacol* 2007;151:565–567.
- Rock KL, Hearn A, Chen CJ, Shi Y. Natural endogenous adjuvants. *Springer Semin Immunopathol* 2005;26:231–246.
- Lommatsch M, Cicko S, Muller T, Lucatelli M, Bratke K, Stoll P, Grimm M, Durk T, Zissel G, Ferrari D, et al. Extracellular adenosine triphosphate and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:928–934.
- Kinder BW, Brown KK, Schwarz MI, Ix JH, Kervitsky A, King TE Jr. Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2008;133:226–232.
- Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W, Zeng-Brouwers J, Fickelberg O, Young MF, Bruckner P, Pfeilschifter J, Schaefer RM, Groene HJ, et al. Biglycan: a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via Toll-like and P2X receptors. *J Biol Chem* 2009;284:24035–24048.
- Barth K, Weinhold K, Guenther A, Linge A, Gereke M, Kasper M. Characterization of the molecular interaction between caveolin-1 and the P2X receptors 4 and 7 in E10 mouse lung alveolar epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:2230–2239.
- Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD. Evidence for functional P2X₄/P2X₇ heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 2007;72:1447–1456.
- Mortaz E, Braber S, Nazary M, Givi ME, Nijkamp FP, Folkerts G. ATP in the pathogenesis of lung emphysema. *Eur J Pharmacol* 2009;619:92–96.
- Pelegri P, Surprenant A. Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1β release through a dye uptake-independent pathway. *J Biol Chem* 2007;282:2386–2394.

44. Kanneganti TD, Lamkanfi M, Kim YG, Chen G, Park JH, Franchi L, Vandenabeele P, Nunez G. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* 2007;26:433–443.
45. Marina-Garcia N, Franchi L, Kim YG, Miller D, McDonald C, Boons GJ, Nunez G. Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2. *J Immunol* 2008;180:4050–4057.
46. Locovei S, Wang J, Dahl G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett* 2006; 580:239–244.
47. Seminario-Vidal L, Kreda S, Jones L, O'Neal W, Trejo J, Boucher RC, Lazarowski ER. Thrombin promotes release of ATP from lung epithelial cells through coordinated activation of Rho- and Ca²⁺-dependent signaling pathways. *J Biol Chem* 2009;284:20638–20648.
48. Diaz-Hernandez M, Diez-Zaera M, Sanchez-Nogueiro J, Gomez-Villafuertes R, Canals JM, Alberch J, Miras-Portugal MT, Lucas JJ. Altered P2X₇-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB J* 2009;23:1893–1906.
49. Peng W, Cotrina ML, Han X, Yu H, Bekar L, Blum L, Takano T, Tian GF, Goldman SA, Nedergaard M. Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X₇ improves recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:12489–12493.

III. Article 3 : Etablissement d'un lien entre signalisation purinergique autocrine et réponse aux particules

L'article précédent établit qu'une forte libération d'ATP endogène dans le milieu extracellulaire est pro-inflammatoire *in vivo* dans un modèle de fibrose pulmonaire induit par la Bléomycine. Afin de modéliser le phénomène *in vitro*, nous avons cherché à mesurer une libération d'ATP endogène après stimulation de lignées de cellules épithéliales par la Bléomycine. Lors de la mise au point, nous obtenions généralement de meilleurs résultats en incubant les cellules avec deux types de particules, de la silice ou du MSU. Nous ne nous sommes pas intéressés plus en détail au phénomène à ce moment là mais l'utilisons habituellement comme « contrôle positif ».

Par ailleurs, nous avons publié précédemment en utilisant le modèle de fibrose induite par la Bléomycine que les cristaux de MSU constituent également un signal de danger libéré par les cellules stressées. Sachant que ATP et MSU sont deux activateurs bien connu de l'inflammasome Nlrp3, c'est ainsi que nous avons été amené à faire l'hypothèse d'un lien entre signalisation induite par l'ATP et celle par les cristaux.

Les résultats présentés dans ci-dessous n'ont pas encore été soumis à publication. Ils établissent, par différentes approches, l'existence d'une nécessité de signalisation au travers de plusieurs récepteurs purinergiques pour l'activation de l'inflammasome Nlrp3 et la production d'IL-1 β mature en réponse aux particules. La majorité des études précédentes avaient clairement établie que les particules (MSU, silice, protéine- β amyloïde, cristaux de cholestérol) empruntaient sensiblement la même voie afin d'enclencher l'activation de Nlrp3. D'abord, elles doivent être phagocytées au sein de vésicules qui fusionnent avec les endosomes puis les lysosomes. La présence des cristaux provoque une destabilisation de la membrane des lysosomes et une fuite du contenu dans le cytoplasme. Parmi les protéases libérées, la cathepsine B aurait un rôle particulier qui engendrerait par un mécanisme inconnu l'activation spécifique de l'inflammasome Nlrp3 et la maturation de la pro-IL-1 β . Nos résultats s'accordent sur ceux-ci avec les trois particules testées, MSU, silice et hydroxyde d'aluminium. Cependant, nous montrons que ces particules engendrent une libération active d'ATP qui se réalise en partie au moyen du système connexine/pannexine. L'ATP libéré, l'ADP qui en dérive, mais aussi l'UTP vont ensuite activer différents récepteurs purinergique, P2X et P2Y. L'inhibition large de la signalisation des récepteurs purinergiques conduit à une inhibition quasi-complète de la production de IL-1 β (mais pas de TNF- α), ce qui leur donne un rôle primordiale dans la possibilité d'activation de l'inflammasome en réponse aux particules. A l'inverse, l'utilisation de cellules déficientes pour P2X4, P2X7 ou P2Y2 ne permet aucune modification de la production d'IL-1 β . Le rôle du pore formé par la pannexine-1 est controversé dans l'activation de l'inflammasome. Nous excluons également son rôle dans la réponse aux particules en utilisant des cellules déficientes pour cette protéine.

Enfin, nous montrons un effet de synergie avec une incubation combinée de faibles doses de purines et des cristaux. La production d'IL-1 β induite par des particules est fortement augmentée en

ajoutant quelques centaines de μM d'ATP, d'ADP ou d'UDP, qui seuls ne permettent aucune production d'IL-1 β .

Au final, nous montrons que l'activation de l'inflammasome en réponse à des particules empruntent non seulement la voie de la déstabilisation des lysosomes mais également celle d'une libération active d'ATP et de sa signalisation en autocrine/paracrine sur des récepteurs P2X et P2Y.

ATP-mediated purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation

Nicolas Riteau¹, Aurélie Gombault^{1*}, Ludivine Baron^{1*}, Bérengère Villeret¹, Noëlline Guillou¹, Florence Savigny¹, Bernard Robaye, Bernhard Ryffel¹, Marc Le Bert¹ and Isabelle Couillin¹

University of Orleans and CNRS, UMR6218, Orleans, France¹ and University of Paris V and CNRS, UMR8147, Paris, France² and IGF, CNRS UMR 5203, INSERM U661, University of Montpellier I & II, France²

* These authors contributed equally to this work

Grant support by the French «Conseil Général du Loiret», «Fondation de la Recherche Médicale» and «Agence Nationale de la Recherche».

Key words: ATP, Danger signal, Inflammasome, P2R, NLR.

Running Title: Purinergic signaling fundamental for particle-mediated IL-1 β production

Address of correspondence to Isabelle Couillin[¶], Molecular Immunology and Embryology, UMR6218, 3B rue de la Férollerie 45071 Orleans, France. Phone: 0033 238 25 54 43 Fax: 0033 238 25 79 79.

E-mail: couillin@cnrs-orleans.fr

Abbreviations used in this paper: ATP: Adenosine triphosphate; IL-1 β , Interleukin-1 beta; NLR, Nod-Like Receptor; MSU, monosodium urate crystal; PAMP, pathogen-associated molecular patterns; DAMP, danger-associated molecular patterns; ROS, reactive oxygen species

Deposition of uric acid crystals in joints causes acute and chronic inflammatory disease known as gout and prolonged airway exposure to silica crystals leads to the development of silicosis, an irreversible fibrotic pulmonary disease. Aluminum hydroxide (Alum) salts are frequently used as vaccine adjuvant. The mechanisms by which crystals and particles activate immune cells are not well understood. Here we show that uric acid, silica and Alum particles trigger the delivery of endogenous ATP, which depends on the functional P2X7 receptor and on channel and hemichannel proteins. Moreover, we observed that ATP release precedes the secretion of mature IL-1 β which is dramatically impaired in presence of purinergic receptors or connexin/pannexin inhibitors. This demonstrates that these crystals are competent to induce maturation and secretion of IL-1 β through a process that involves as a first event the extracellular release of endogenous ATP through connexin/pannexin and as second event ATP stimulation of purinergic receptors. We show that not only ATP but also ADP and UTP are able to stimulate IL-1 β production by involvement of multiple purinergic receptor signaling. These data demonstrate that nucleotides are endogenous danger signal generated in response to exogenous crystals exposure and provide a new molecular mechanism to explain how chemically and structurally diverse stimuli can activate the Nlrp3 inflammasome and trigger IL-1 β maturation and secretion.

Endogenous or environmental particulate dangers such as uric acid crystals (MSU) or silica particles are known to trigger innate immunity through activation of the Nlrp3 inflammasome, an intracellular molecular platform which under activation allows the cleavage of the potent pro-inflammatory cytokine IL-1 β (1). A first signal triggers synthesis of pro-IL-1 β and Nlrp3 by transcriptional induction, whereas a second stimulus leads to inflammasome oligomerization, caspase-1 auto-activation, and caspase-1-dependent cleavage and release of the biologically active, mature IL-1 β . This second signal is triggered by a group of chemically and biologically unrelated pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (2, 3), toxins (4) or danger-associated molecular patterns (DAMPs) (5). DAMPs originate from physical UV-B exposition (6), chemical skin irritants (7), or environmental pollutants, such as silica and asbestos (8, 9), or endogenous metabolic stresses such as high glucose (10), cholesterol (11), β -amyloid protein (12), biglycan (13), ATP (14) and MSU (15). Understanding the common mechanisms of Nlrp3 inflammasome activation is the object of intensive studies since 2002 but they remain poorly understood. Different models are currently proposed to explain the activation of the Nlrp3 inflammasome, such as membrane disruption with direct cytoplasmic delivery of activators (soluble ATP, bacterial toxins) or internalization of particulate activators by phagocytosis (16). Extracellular ATP or bacterial toxins (Nigericin, Maitotoxin) lead to K⁺ efflux and pannexin-1 (Panx-1) pore formation, both required for Nlrp3 activation (4). Phagocytosis of particles such as silica, Aluminum hydroxide (Alum) salts, fibrillar amyloid- β or MSU were shown to result in lysosomal destabilization/permeabilization with release of the endosomal-lysosomal protease cathepsin B into the cytoplasm (9, 12) and/or to mediate reactive oxygen species (ROS) (8). The microbial component MDP has been shown to activate Nlrp3 in a Panx-1 dependant manner, suggesting a more direct sensing of stimuli by the inflammasome (17).

However, considering the ever-increasing number of activators, it may render unlikely any direct binding of specific stimuli. All DAMPs and PAMPs, including ATP and particulate/crystalline activators, trigger the generation of ROS leading to Nlrp3 inflammasome activation (18, 19). Recently, accumulation of damaged, ROS-generated mitochondria by blockade of the mitophagy/autophagy pathway was shown to activate the Nlrp3 inflammasome, indicating that Nlrp3 inflammasome senses mitochondrial dysfunction (20).

Here we investigate intracellular ATP release and further purinergic signaling as a corner stone of Nlrp3 inflammasome activation. ATP signaling is emerging as an important mechanism to control various cell functions (21). The purinergic signaling hypothesis is that cellular stimulation releases ATP and subsequently activates nucleotide receptors at the cell surface (autocrine activation) and/or in adjacent cells (paracrine activation), thereby regulating or modulating cellular functions. Purinergic signaling is no longer restricted to neurotransmission but is regarded as a general intercellular communication system of many, if not all, tissues. Growing evidence supports the concept that essentially all cells are able to release nucleotides. Mechanisms of nucleotide release in epithelia, endothelial cells, or other non-excitabile cell types are poorly understood (21, 22). After release, nucleotides interact with specific receptors (P2) either on the releasing cell itself or in neighboring cells. In the mammalian system seven ligand-gated P2X receptors (P2X1–7) and eight G protein-coupled P2Y receptors (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13,14) have been identified. In parallel ATP is degraded via different ecto-ATPases to di- and monophosphates and then to adenosine (23). Adenosine interacts with adenosine receptors and has been shown to dampen many inflammatory processes. Extracellular ATP was shown to play a role in activation of T cells (24) and neutrophils (25) in physiological or stressed conditions and

ATP release guides neutrophils (26) and macrophage chemotaxis (27). ATP and UTP nucleotides are released by apoptotic cells as a *find me* signal to promote phagocytic clearance (28) through the plasma membrane channel pannexin-1 (29). Purinergic signaling seems to be central in physiological cell functions such as chemotaxis, activation and programmed cell death. In more pathological conditions, high level of ATP is released from necrotic cells and act as a pro-inflammatory danger signal, activating the Nlrp3 inflammasome through binding to the ionotropic receptor P2X7 causing potassium efflux (30). Potassium efflux has shown to be essential to different families of Nlrp3 activators since blocking it results in inhibition of IL-1 β production in response to ATP, uric acid crystals (5), silica (9) (31), Alum (32), asbestos (8) (9), Toxins (5) and bacteria (33).

Here we show that uric acid, silica and Aluminum particles induce the release of intracellular ATP by epithelial cells or macrophages dependent on functional P2X7 receptor and connexin/pannexin channels. Moreover upon crystals stimulation, ATP release is correlated to maturation and secretion of IL-1 β by macrophages or dendritic cells, which depend on purinergic receptor signaling with the involvement of multiple autocrine purinergic receptor loops.

We propose a new mechanism for crystals-mediated Nlrp3 inflammasome activation and mature IL-1 β release through multiple purinergic receptors and connexin/pannexin pore activation. We provide a link between ATP-mediated and crystals-induced Nlrp3 inflammasome activation and propose a new hypothesis allowing understanding how chemically and structurally diverse stimuli can activate inflammasome leading to IL-1 β production.

RESULTS

Uric acid crystals and silica microparticles trigger active release of endogenous ATP by epithelial cell

We showed recently that stimulation of lung epithelial cells by bleomycin caused a rapid release of ATP partly dependent on functional P2X7 receptor and Panx-1 pore formation (34). Since activated or stressed cells in particular endothelial and epithelial cells were shown to release ATP, we investigate whether crystals or particles known as activators of the Nlrp3 inflammasome may act in this way inducing ATP release (22, 35) (36). Using the murine lung epithelial type II cell line 12 (MLE12), we show that MSU or silica cause a dose-dependent release of ATP by lung epithelial cells (**Fig. 1A**) 6 hours after crystal exposure. The slight reduction in cell viability observed after stimulation with all the doses of crystals tested was not correlated with the measured eATP levels, suggesting that somehow active mechanisms of ATP release may exist and that eATP increases were not a mere consequence of passive delivery after cell death (**Fig. 1A**). Similar results were obtained using human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B) (**Fig. 1B**). Since P2X7 receptor and Panx-1 hemichannel were involved in ATP release from different cell types after stress (37-39) or activation, we next investigated their role in a particle-induced context. P2X7 receptor has been described as a marker for lung alveolar epithelial type I and type II cells (40) and Panx-1 was shown to be expressed at the apical pole in airway epithelial cells (41). Inhibitors of either P2X7 receptor A438079 and A740003 (42), or connexin/pannexin family (CBX) resulted in decreased ATP release by BEAS cells stimulated with uric acid crystals or silica (**Fig. 1C**). Kinetic analysis shows time-dependent release of ATP after uric acid crystals stimulation peaking at 4h hours and inhibitory effects of P2X7 receptor and pannexin/connexin blockade (**Fig. 1D**). These data indicate that two different particulate activators of the

Nlrp3 inflammasome trigger the active *in vitro* release of ATP by pulmonary epithelial cells, which depends on purinergic receptors and pannexin/connexin channels.

Microparticles trigger active endogenous ATP release, which precedes secretion of mature IL-1 β by macrophages and depend on purinergic signaling and channel activity

To determine whether particulate Nlrp3 inflammasome activators were able to trigger release of endogenous ATP by the monocyte/macrophage lineage, the human macrophage cell line THP1 was stimulated with several concentrations of uric acid crystals and during various times. Luciferase assays revealed that uric acid crystals trigger the release of ATP by human macrophages which peaks at 4h hours (**Fig. 2A**). Since the extracellular accumulation of ATP reflects the balance between ATP release by cells and ATP hydrolysis by ectonucleotidases (43) we also treated the cultures with the ecto-ATPase inhibitor ARL67156 (44, 45). In presence of ARL67156, the levels of ATP detected in the different supernatants increased up to 6-fold (**Fig. 2B**). Then we analyzed the release of ATP and mature IL-1 β by the same macrophages in presence of ARL67156 at different times after stimulation. ATP release is correlated with IL-1 β secretion both with the kinetic and strength of endogenous ATP release (**Fig. 2C**). The rise of ATP was not related to cell death, as MTT was only slightly decreased (data not shown). Hence, ATP release is transient and precedes sustained IL-1 β production by the same macrophages.

Phagocytosis or cystein protease inhibition block both IL-1 β production and ATP release

Particle phagocytosis is known to be essential for inflammasome activation and mature IL-1 β production (9). However, cytoskeleton is not required for IL-1 β secretion (32). Here, using cytochalasin D we confirmed that actin polymerisation is required for IL-1 β production (**Fig. 3B**) and showed that ATP release is also completely impaired (**Fig. 3A**), demonstrating that particle phagocytosis is necessary for active ATP release by human macrophages.

Cysteine proteases, e.g. cathepsin B and L, were shown to be involved in Nlrp3 activation in response to particles (9, 11). E-64d, a broad inhibitor of cystein proteases, also dramatically reduced ATP release (**Fig. 3A**) and IL-1 β (**Fig. 3B**) production whereas the acidic protease inhibitor pepstatin A had no effect. (**Fig. 3A and B**). Altogether, these data suggest that particle internalization/lysosome destabilisation precede ATP release and IL-1 β production by human macrophages.

P2X7R or Pannexin/Connexin hemichannel are required for ATP release and IL-1 β secretion

We then investigated the mechanisms of particle-induced ATP release leading to IL-1 β secretion.

To that aim, we considered three potential mechanisms for regulated nucleotide release after cell stimulation, exocytosis, blebbing or passage via a plasma membrane channel (46). Treatment of microparticle-stimulated macrophages with the drug brefeldin A, blocking exocytosis (47), or Y27632, inhibiting the Rho kinase ROCK critical for membrane blebbing (48) had no effect on ATP release and IL-1 β production (not shown). Therefore, we focused on potential channel(s) that might mediate nucleotide release.

Among the channels suggested to conduct ATP across the plasma membrane are the connexin and pannexin family channels (44, 45). Connexins primarily form gap junctions between cells, mediating intercellular communication, but emerging literature reports direct hemichannel activity (49, 50), hence able to act similarly as pannexin channels that are thought to function in conducting intracellular molecules to the extracellular space (44, 45). Using pharmacological inhibitors known to inhibit these channels (11), we showed that the connexin/pannexin channel blocker carbenoxolone (CBX) and the connexin channel blocker flufenamic acid (FFA) reduced very significantly both ATP and IL-1 β release suggesting that connexin and/or pannexin hemichannels are involved in ATP release and IL-1 β production (**Fig 4A and B**). Moreover, Specific inhibition of the P2X7R 10 μ M by A740003 led to partial inhibition of ATP release but no inhibition of IL-1 β production whereas higher concentrations were efficient both in ATP release and IL-1 β production (**Fig 4A and B**). These results suggest a role for P2X7R in ATP release probably through action of ATP on P2X7R by an autocrine positive loop and that IL-1 β production depends on signaling through purinergic receptors but not on the particular P2X7 receptor. In conclusion, particles induce ATP release partially through connexin and/or pannexin channels. Inhibitions of these proteins lead to inhibition of IL-1 β secretion in the same extend.

Particle-induced IL-1 β secretion is dependant on Nlrp3 inflammasome and lysosome destabilization pathway

In an attempt to better delineate particle-mediated IL-1 β production, we performed experiments with macrophages from mice deficient in Nlrp3, the 'downstream' adaptor molecule ASC or the effector molecule caspase-1 (Casp-1). Consistent with published reports (9) (8), IL-1 β but not TNF- α secretion by uric acid crystals, silica or Alum was

Nlrp3 inflammasome dependent (**Suppl Fig. 1A and B**) whereas deficiency for Nlrp4 in macrophages (**Suppl Fig. 1C**) or dendritic cells (**Suppl Fig. 1D**) had no effect, as previously shown (8, 9, 15). We also confirmed that IL-1 β secretion by murine macrophages required particle phagocytosis, lysosomal acidification and depend partially on the cysteine protease cathepsin B but not cathepsin D (**Suppl Fig. 2**).

IL-1 β production by murine macrophages upon MSU, silica or Alum depend on purinergic signaling and panx-1

Conversely to THP-1 human macrophage cell line, we were not able to measure significant ATP increase in the supernatant of stimulated murine bone marrow derived macrophages (BMDM) or dendritic cells (BMDC) even adding ecto-ATPase inhibitor ARL67156. This may be due to fastest degradation of ATP by these cells and to limitation of our measurement assay.

According to this, P2X7 receptor specific inhibitor A740003 and the more potently broad-spectrum P2 receptor inhibitor oATP were able to strikingly suppressed IL-1 β production induced by silica microparticles or Alum salts in murine bone-marrow derived macrophages (BMDM) (**Fig. 5A**) and BMDC (not shown) in a dose dependent manner. Carbenoxolone (CBX), a broad inhibitor for connexin and pannexin family, was also efficient in inhibiting IL-1 β secretion upon silica or Alum stimulation by murine macrophages (**Fig. 5A**). P2Rs requirement for IL-1 β secretion by uric acid crystals, Alum salts or silica particles was confirmed in a dose dependent manner by the broad inhibitor suramin (**Fig. 5B**). The use of oATP or A740003, CBX or by the blocking peptide ¹⁰panx-1 but not by the negative control ¹⁴panx-1 blocked IL-1 β whereas TNF- α production was not affected (**Suppl Fig. 3**). This demonstrates a specific effect of purinergic/pannexin inhibition without toxic effect. Altogether, purinergic receptors

and connexins/pannexins are required for IL-1 β production by the three tested Nlrp3 inflammasome activators.

IL-1 β production by murine macrophages upon MSU, silica or Alum is not impaired in single P2R or pannexin-1 deficiency

In contrast to chemical inhibitors, particle-exposed macrophages from tested single purinergic receptor deficient mice did not lead to significant decrease of IL-1 β production. P2X7 was as expected fully required for Nlrp3 activation in response to high exogenous ATP exposure (**Fig. 6B**) but was also dispensable in case of particle-mediated activation (**Fig. 6A**). Similarly, other P2R candidates do not lead to significant impairment. This was true for P2X4 (**Fig. 6A**), shown to act together with P2X7 (13) and P2Y2 (**Fig. 6C**), metabotropic receptor essential for immune cells chemotaxis (26).

In addition and in contrast to previously published papers using indirect methods, the use of knock-out mice recently excluded Panx-1 pore formation to be necessary for Nlrp3 activation in response to different activators such as ATP (51). We also used Panx-1 deficient cells and confirmed the dispensability in the case of MSU, silica and Alum in macrophages (**Fig. 6D**) and dendritic cells (not shown). Discrepancies between strong effect of the inhibitors and the data with single KO mice might likely reflect redundancy with multiple proteins involvement.

ATP, ADP and UTP nucleotides are involved in particle-mediated inflammasome activation

In order to better understand the involvement of multiple purinergic receptors signaling in sensing Nlrp3 inflammasome particulate activators, we stimulated macrophages with particles in presence of different nucleotides or purinergic receptor agonists. We found

that addition of small amounts of either ATP, the P2R agonist MeATP or the P2Y agonist UTP were not able to induce IL-1 β production but potentiate the response to both uric acid and silica crystals (**Fig. 7B**). Addition of ATP, UTP and ADP at 500 μ M to macrophages did not lead to IL-1 β secretion but exacerbate MSU, silica or alum-induced production of IL-1 β (**Fig. 7A**). Stable ATP γ S or ADP β S agonists were more potent than ATP or ADP to enhance particles-induced IL-1 β production (**Fig. 7A**). Similarly, THP-1 stimulated with 200 μ M of ATP, ADP or their stable derivatives did not lead to IL-1 β secretion. Minimal quantity of silica or Alum was able to little induce IL-1 β , however the addition of purines strikingly exacerbated the response (**Fig. 7C**). In addition, P2Y specific ligand ADP dose dependently increases the response to uric acid or silica particles further suggesting an involvement of this purine receptor family (**Fig. 7D**). By contrast, the purine catabolism product adenosine inhibited MSU and silica-induced production of IL-1 β by dendritic cells (**Fig. 7E**) or macrophages (not shown). These data demonstrate that not only ATP but its metabolic derivative ADP and also UTP play an active role in inflammasome activation in response to microparticles. Particulate stimulation generated a pool of different extracellular nucleotides, which signal through multiple purinergic receptors from both P2X and P2Y receptor families and leading to IL-1 β secretion. In conclusion, purinergic signaling by P2X and P2Y receptors is necessary for efficient IL-1 β production in response to particulate activators of the Nlrp3 inflammasome.

DISCUSSION

Autocrine ATP signaling is emerging as an important mechanism to control various cell functions (21). Fine-tuned purinergic signaling through various ionotropic P2X and metabotropic P2Y receptors is associated with many physiological and pathological

processes. We here show that particles such as uric acid crystals and silica trigger ATP release from pulmonary epithelial cells and THP-1 human macrophages. The release partially depends on purinergic receptors and pannexin/connexin channels. ATP was previously shown to be actively released from human monocytes stimulated with different PAMPs or by uric acid crystals in amounts correlating with the production of IL-1 β by these cells (52). The authors mainly focused on PAMPs-derived mechanism on Nlrp3 activation with no data referred to Panx-1.

Our data demonstrate that IL-1 β maturation and secretion by the uric acid, silica or Alum particles, able to activate the Nlrp3 inflammasome, depend on purinergic signaling. However, P2X4, P2X7 or P2Y2 receptors appear to have a moderate role. The innate deficiency of P2X7 expression does not change the cells capacity to produce IL-1 β whereas temporary inhibition with the so-called specific inhibitor A740003 is able to severely impair the cytokine production. Conversely, the use of broad-spectrum P2X and P2Y inhibitors suramin or oATP was able to prevent up to hundred percent maturation of IL-1 β , highlighting the importance of the P2 purinergic receptor family. Our results are different from Rubartelli et al, who assumed a role for P2X7R in IL-1 β production by human monocytes upon uric acid crystals (52). Most of the previous observations reported that blocking or deletion of P2X7R did not affect uric acid (15), silica (Iyer et al., 2009 or Alum (32) crystals-induced IL-1 β production. In the opposite, Alzheimer disease related amyloid- β protein aggregates was shown to promote IL-1 β release through P2X7R mediated ATP release (53).

Importantly, all particles affecting inflammasome activity are fully dependent on potassium efflux, suggesting a role for the P2X7R or other ionotropic P2XR involved in potassium efflux. To note, among the more studied inflammasome activation pathways,

e.g. ROS production and lysosomal destabilization, potassium efflux appears to be the only one unanimously admitted.

Large amount of ATP (5mM) in presence of LPS was shown to induce Nlrp3 activation *in vitro* dependently of the P2X7 receptor. This constitutes an *in vitro* model of inflammasome activation but do not correspond to physiological activation of macrophages. Prolonged ATP stimulation of P2X7R results in membrane disruption and cell death underlying the non-physiological or pathological impact of high ATP levels. Our major discovery here is the first time demonstration that mild dose of ATP, and unexpectedly also ADP and UTP, albeit having no effect by themselves synergize with particles for highest IL-1 β production. We also strongly suggest that the two purinergic receptor family P2X and P2Y are involved since both ADP and UTP act only on P2Y. Further experiments need to be performed to better decipher the role of each receptor. Also the role of UDP would be interesting to investigate, as it binds only to P2Y4 and P2Y6 subtypes.

It is known that not only ATP but other nucleotides such as ADP, UTP, or UDP are released into the extracellular space from mechanically stressed cells, in particular endothelial and epithelial cells (22, 35, 36). These compounds may act on different purinergic receptors and generate a fine tuned response. In particular we showed here that ADP adding has no effect by itself in promoting IL-1 β production but is able to increase particle-induced effect. Moreover, mild dose of P2XR agonist MeATP or P2YR agonist UTP were more potent than ATP to increase IL-1 β . In our protocol, we were not able to detect ATP release on stimulated macrophages likely due to a high level of ecto-ATPase activity, suggesting a local increase of ADP/AMP/adenosine and possible action on IL-1 β production pathway. It is worth to note that the derivative compound

adenosine has been shown to act as an anti-inflammatory mediator and could hence counter-balance ATP/ADP activity (54).

We provide a new attempt on the understanding of Alum adjuvanticity in relation with active endogenous ATP release and purinergic signalling feedback. In another hand, MSU crystals appear to mediate its pro-inflammatory effect through P2Rs.

Extracellular ATP release has been shown to be involved in many lung pathology. We previously published a role of P2X7R in idiopathic pulmonary fibrosis (55). In allergic asthma, ATP release has been firstly shown to act via multiple purinergic receptors (56) and further work focused on P2Y2 (57) and P2Y6 (58). Another study showed a correlation between ATP content in bronchoalveolar lavage fluid of smokers and chronic obstructive pulmonary disease (59). Murine models of COPD showed critical role of purinergic signalling in the development of the disease (60). To note, ATP release was shown to be mediated trough P2X7 activity (61).

We assume that environmental or occupational airway exposition to silica particles or other mineral dusts likely induce ATP release and purinergic signaling that could play a role in the evolution toward chronic lung pathology.

Our hypothesis is that different purinergic receptors and not only P2X7 can act together in response to many known activators and play a central role upstream of Nlrp3 inflammasome activation. This does not rule out the requirement of phagocytosis followed by endosomal acidification and cathepsin B release as shown here and elsewhere reports (9) (8).

In conclusion, our results suggest that particle sensing requires active ATP release through pannexin/connexin and a multiple redundant purinergic feedback loops. ATP

delivery in a particle-induced stress condition potentiate the Nlrp3 inflammasome activation and maturation of pro-inflammatory IL-1 β .

METHODS

Reagents

MSU crystals (home made), silica (gift from François Huaux) and Alum (Imject Alum) were used at 125-500 μ g/ml as mentioned. Particles were sonicated 15 min prior use.

A740003 is a gift from François Rassendren. ADP, ADP β S, ATP, ATP γ S, MeATP, UTP, A438079, oATP, suramin, carbenoxolone, bafilomycin A1, pepstatin A were from Sigma, Ca074-Me and cytochalasin D from Calbiochem, ¹⁰Panx-1 and ¹⁴Panx-1 from Polypeptide Group.

Epithelial cell culture and stimulation

MLE12 murine lung epithelial cells (a gift of Muriel Pichavant) and BEAS-2B human bronchial epithelial cells (Reddel et al., 1989) were used at low passage number. Cells were cultured in RPMI1640 media with antibiotics, L-glutamine, Hepes and 10% FCS and maintained in 75 cm² flasks at 37°C and 5% CO₂. Media was replaced every second day, and cells were passed at confluent by washing with Ca- and Mg-free PBS and dislodging with 0.05% trypsin. Cells were plated in 96-well microculture plates (2.10⁵ cells/well for MLE12 and 10⁵ cells/well for BEAS-2B) containing 0.2 ml of media per well, and stimulated without (medium) or with particles and inhibitors when mentionned. Experiments used at least triplicate wells for each treatment level and allocated six or nine wells per culture plate as controls. All experiments were replicated with at least two independent cell passages. Cell death was monitored by MTT using standard protocol.

ATP measurement

Extracellular ATP in cell culture supernatant was quantified using ATP Lite One Step kit (Perkin Elmer). Quick centrifugation of the plates was performed to avoid any cell debris contamination.

Luminescence produced was measured by a luminometer (Mithras, Berthold Technologies).

Bone Marrow Derived Cells culture and stimulation

Primary bone marrow-derived macrophages (BMDM) and dendritic cells (BMDC) were obtained as described (62). In brief, femurs and tibias cells from C57BL/6 mice or mice deficient for P2X4, P2X7, P2Y2, Nlrc4, Nlrp3, ASC, Casp-1 and Panx-1 were isolated.

BMDM were cultured at 10⁶ cells/mL for 7 days in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM, Sigma) supplemented with L-glutamine (2 μ M, Invitrogen), penicillin (100 U/ml, Invitrogen), streptomycin (100 μ g/ml, Invitrogen), 20% horse serum and 30% L929 cell conditioned medium as a source of M-CSF. Three days after washing and reculturing in fresh medium, the cell preparation contained a homogenous population of >95% macrophages. BMDC were cultured in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% FCS (Hyclone), L-glutamine (2 μ M, Invitrogen), β -Mercaptoethanol (50 nM, Invitrogen), penicillin (100 U/ml, Invitrogen), streptomycin (100 μ g/ml, Invitrogen) and 5% of J558L cells supernatant (source of GM-CSF). On days 3, 6 and 8 the medium was refreshed and GM-CSF was added. At day 10, non-adherent cells were harvested. The purity of BMDCs was greater than 90%.

BMDM and BMDC were plated in 96-well microculture plates (2.105 cells/well) and primed 3h with 100 ng/mL ultrapure LPS (*Escherichia coli*, serotype O111:B4, Invivogen) then washed and stimulated by particles and compounds listed for 6hours or 30-45min prior collecting supernatant with ATP 5mM. Supernatants were collected and IL-1 β or TNF- α cytokines were assayed by ELISA assay.

Cytokine measurement by ELISA

IL-1 β and TNF α levels in cell supernatant were determined using ELISA assay kits (R&D system, Minneapolis, USA) according to manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

Statistical evaluation of differences between the experimental groups was determine by Mann Whitney test using Prism software. P values of <0.05 were considered statistically significant.

REFERENCES

1. F. Martinon, K. Burns, J. Tschopp, The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* **10**, 417 (Aug, 2002).
2. O. Gross, M. Weber, J. W. Fries, G. A. Muller, Living donor kidney transplantation from relatives with mild urinary abnormalities in Alport syndrome: long-term risk, benefit and outcome. *Nephrol Dial Transplant* **24**, 1626 (May, 2009).
3. S. B. Willingham *et al.*, NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. *J Immunol* **183**, 2008 (Aug 1, 2009).
4. P. Pelegrin, A. Surprenant, Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1beta release through a dye uptake-independent pathway. *J Biol Chem* **282**, 2386 (Jan 26, 2007).
5. V. Petrilli *et al.*, Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* **14**, 1583 (Sep, 2007).
6. L. Feldmeyer *et al.*, The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Curr Biol* **17**, 1140 (Jul 3, 2007).
7. F. S. Sutterwala *et al.*, Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* **24**, 317 (Mar, 2006).
8. C. Dostert *et al.*, Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* **320**, 674 (May 2, 2008).
9. V. Hornung *et al.*, Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*, (Jul 11, 2008).
10. R. Zhou, A. Tardivel, B. Thorens, I. Choi, J. Tschopp, Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* **11**, 136 (Feb, 2010).
11. P. Duewell *et al.*, NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* **464**, 1357 (Apr 29, 2010).

12. A. Halle *et al.*, The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol* **9**, 857 (Aug, 2008).
13. A. Babelova *et al.*, Biglycan: A danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *J Biol Chem*, (Jul 21, 2009).
14. S. Mariathasan *et al.*, Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**, 228 (Mar 9, 2006).
15. F. Martinon, V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel, J. Tschopp, Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**, 237 (Mar 9, 2006).
16. S. L. Cassel, S. Joly, F. S. Sutterwala, The NLRP3 inflammasome: a sensor of immune danger signals. *Semin Immunol* **21**, 194 (Aug, 2009).
17. N. Marina-Garcia *et al.*, Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2. *J Immunol* **180**, 4050 (Mar 15, 2008).
18. K. Schroder, J. Tschopp, The inflammasomes. *Cell* **140**, 821 (Mar 19, 2010).
19. J. Tschopp, K. Schroder, NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol* **10**, 210 (Mar, 2010).
20. R. Zhou, A. S. Yazdi, P. Menu, J. Tschopp, A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, (Dec 1, 2010).
21. H. A. Praetorius, J. Leipziger, ATP release from non-excitabile cells. *Purinergic Signal* **5**, 433 (Dec, 2009).
22. E. R. Lazarowski, R. C. Boucher, T. K. Harden, Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol* **64**, 785 (Oct, 2003).
23. G. G. Yegutkin, Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 673 (May, 2008).
24. U. Schenk *et al.*, Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal* **1**, ra6 (2008).
25. Y. Chen *et al.*, Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation. *Sci Signal* **3**, ra45 (2010).
26. Y. Chen *et al.*, ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* **314**, 1792 (Dec 15, 2006).
27. M. Kronlage *et al.*, Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis. *Sci Signal* **3**, ra55 (2010).
28. M. R. Elliott *et al.*, Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* **461**, 282 (Sep 10, 2009).
29. F. B. Chekeni *et al.*, Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* **467**, 863 (Oct 14, 2010).
30. S. S. Iyer *et al.*, Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20388 (Dec 1, 2009).
31. S. L. Cassel *et al.*, The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (Jun 24, 2008).
32. S. C. Eisenbarth, O. R. Colegio, W. O'Connor, F. S. Sutterwala, R. A. Flavell, Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* **453**, 1122 (Jun 19, 2008).
33. C. S. Arlehamn, V. Petrilli, O. Gross, J. Tschopp, T. J. Evans, The role of potassium in inflammasome activation by bacteria. *J Biol Chem* **285**, 10508 (Apr 2, 2010).
34. N. Riteau *et al.*, Extracellular ATP is a Danger Signal Activating P2X7 Receptor in Lung Inflammation and Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, (Jun 3, 2010).
35. F. Di Virgilio, P. A. Borea, P. Illes, P2 receptors meet the immune system. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 5 (Jan, 2001).
36. S. F. Okada, R. A. Nicholas, S. M. Kreda, E. R. Lazarowski, R. C. Boucher, Physiological regulation of ATP release at the apical surface of human airway epithelia. *J Biol Chem* **281**, 22992 (Aug 11, 2006).
37. L. Bao, S. Locovei, G. Dahl, Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett* **572**, 65 (Aug 13, 2004).
38. R. Iglesias, G. Dahl, F. Qiu, D. C. Spray, E. Scemes, Pannexin 1: the molecular substrate of astrocyte "hemichannels". *J Neurosci* **29**, 7092 (May 27, 2009).
39. S. Locovei, L. Bao, G. Dahl, Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7655 (May 16, 2006).

40. Z. Chen *et al.*, Identification of two novel markers for alveolar epithelial type I and II cells. *Biochem Biophys Res Commun* **319**, 774 (Jul 2, 2004).
41. G. A. Ransford *et al.*, Pannexin 1 Contributes to ATP Release in Airway Epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, (Feb 12, 2009).
42. B. F. King, Novel P2X7 receptor antagonists ease the pain. *Br J Pharmacol* **151**, 565 (Jul, 2007).
43. S. M. Joseph, M. R. Buchakjian, G. R. Dubyak, Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. *J Biol Chem* **278**, 23331 (Jun 27, 2003).
44. A. L. Harris, Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog Biophys Mol Biol* **94**, 120 (May-Jun, 2007).
45. E. Scemes, D. C. Spray, P. Meda, Connexins, pannexins, innexins: novel roles of "hemi-channels". *Pflugers Arch* **457**, 1207 (Apr, 2009).
46. G. G. Yegutkin, Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et biophysica acta* **1783**, 673 (May, 2008).
47. T. Fujiwara, K. Oda, S. Yokota, A. Takatsuki, Y. Ikehara, Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **263**, 18545 (Dec 5, 1988).
48. M. Sebbagh *et al.*, Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* **3**, 346 (Apr, 2001).
49. H. K. Eltzschig *et al.*, ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ Res* **99**, 1100 (Nov 10, 2006).
50. J. A. Orellana *et al.*, ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *J Neurochem*, (Feb 5, 2011).
51. Y. Qu *et al.*, Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *Journal of immunology* **186**, 6553 (Jun 1, 2011).
52. A. Piccini *et al.*, ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8067 (Jun 10, 2008).
53. J. M. Sanz *et al.*, Activation of microglia by amyloid {beta} requires P2X7 receptor expression. *J Immunol* **182**, 4378 (Apr 1, 2009).
54. M. J. Bours, E. L. Swennen, F. Di Virgilio, B. N. Cronstein, P. C. Dagnelie, Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* **112**, 358 (Nov, 2006).
55. N. Riteau *et al.*, Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **182**, 774 (Sep 15, 2010).
56. M. Idzko *et al.*, Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med* **13**, 913 (Aug, 2007).
57. T. Muller *et al.*, The purinergic receptor P2Y2 receptor mediates chemotaxis of dendritic cells and eosinophils in allergic lung inflammation. *Allergy* **65**, 1545 (Dec, 2010).
58. R. Paula Vieira *et al.*, P2Y6 Receptor Contributes to Airway Inflammation and Remodeling in Experimental Allergic Airway Inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine*, (Apr 21, 2011).
59. M. Lommatzsch *et al.*, Extracellular adenosine triphosphate and chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* **181**, 928 (May 1, 2010).
60. S. Cicko *et al.*, Purinergic receptor inhibition prevents the development of smoke-induced lung injury and emphysema. *J Immunol* **185**, 688 (Jul 1, 2010).
61. M. Lucattelli *et al.*, P2X7 Receptor Signalling in the Pathogenesis of Smoke-induced Lung Inflammation and Emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*, (May 27, 2010).
62. M. Muller *et al.*, Correction or transfer of immunodeficiency due to TNF-LT alpha deletion by bone marrow transplantation. *Mol Med* **2**, 247 (1996).

FIGURE LEGENDS

Figure 1

Uric acid crystals (MSU) and silica trigger active release of ATP by lung epithelial cells, partially through P2X7 and connexin and/or connexin pathway

Dose dependent increase of eATP content 6h after MSU or silica exposed murine lung epithelial cells (Fig. 1A) or human bronchial epithelial cells (Fig. 1B). MTT viability assay show no major difference at this time point, suggesting active ATP release mechanism (Fig. 1A). P2X7 inhibitors A438079 and A740003 or pannexin/connexin inhibitor carbenoxolone partially inhibit active ATP release from BEAS cells exposed to MSU or Silica (Fig. 1C). The kinetic of inhibition is depicted after MSU incubation on BEAS (Fig. 1D) or MLE-12 (Fig. 1E) cells.

Data are representative of 3 independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD.

Figure 2

Uric acid crystals, silica or alum trigger active release of ATP by human macrophages

THP-1 incubated with MSU crystals release ATP in the supernatant that peaks after 2 hours and rapidly return to baseline (Fig. 2A). Higher concentrations were obtained using the ecto-ATPase inhibitor ARL67146 (ARL) to preserve ATP (Fig. 2B). In presence of ARL67146, there is a strong correlation between MSU, silica and Alum-induced ATP release and IL-1 β production (Fig. 2C).

Data are representative of 2 independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD.

Figure 3

Phagocytosis or cysteine proteases inhibitors block both IL-1 β production and ATP release

Phagocytosis inhibitor cytochalasin D (Cyt D) and cysteine proteases inhibitor E-64d but not acidic protease inhibitor pepstatin A were able to strikingly decrease both silica- or Alum-induced ATP release (Fig. 3A) and IL-1 β production (Fig. 3B).

Data are representative of 3 independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD. (***, $p < 0.001$; ns, non significant).

Figure 4

P2X7R or Pannexin/Connexin hemichannel are required ATP release and IL-1 β secretion

Connexin/pannexin channel blocker carbenoxolone (CBX) and connexin channel blocker flufenamic acid (FFA) significantly reduced both ATP and IL-1 β release induced by silica and Alum (**Fig 4A and B**). Specific inhibition of the P2X7R with 10 μ M A740003 leads to partial inhibition of ATP release without inhibition of IL-1 β production whereas higher concentrations are efficient both in ATP release and IL-1 β production but might be non-specific (**Fig 4A and B**).

Data are representative of 3 independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD. (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non significant).

Figure 5

IL-1 β production by murine macrophages upon MSU, silica or alum depend on purinergic signaling and panx-1

IL-1 β production by LPS-primed macrophages stimulated with silica or Alum is dose-dependently decreased using P2X7 inhibitor A740003 or more potently with the broad-spectrum purinergic inhibitor α ATP (Fig. 5A). The same effect is observed with the connexin/pannexin inhibitor carbenoxolone (CBX) (Fig. 5A). Purinergic inhibitor suramin also decreases in a dose dependent manner IL- β production in response to MSU, Silica and Alum (Fig. 5B).

Data are representative of 2 independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD.

Figure 6

Single P2R or pannexin-1 deficiency does not lead to reduced IL-1 β production

IL-1 β production in LPS-primed macrophages stimulated by MSU, silica or ALUM is not decreased in absence of purinergic receptors P2X4 (Fig. 6A), P2X7 (Fig. 6A) or P2Y2 (Fig. 6C). In contrast, high exogenous ATP-mediated IL-1 β production is fully dependent of P2X7 (Fig. 6B). Pannexin-1 deficiency also shows no IL-1 β production impairment in response to the three particles (Fig. 6D).

Data are representative of 3 independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD.

Figure 7

LPS-primed macrophages followed by 500 μ M of ATP, ADP or stable derivatives, respectively ATP γ S and ADP β S do not lead to production of IL-1 β . However it strongly enhances particle-mediated IL-1 β production (Fig. 7A). Similarly, 600 μ M of P2XRs agonist MeATP or P2YRs agonist UTP are able to increase from 25 to 50% the amount of IL-1 β (Fig. 7B). The same synergistic effect of ATP, ATP γ S, ADP and ADP β S are observed with THP1 cells stimulated with Alum or silica (Fig. 7C). ADP up to 5mM alone is not sufficient for IL-1 β maturation, but it highly exacerbates MSU or Silica effects to LPS-primed BMDM (Fig. 7D). On the contrary, adenosine is able to dampen the effect of MSU or silica (Fig. 7E).

Data are representative of 2-3 independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD.

Supplementary figure 1

Uric acid, silica and alum salt crystals-induced IL-1 β production depend on NLRP3 inflammasome

MSU, silica and Alum-induced IL-1 β on LPS-primed BMDM is dependent on Nlrp3 inflammasome (Suppl Fig. 1A) and not Nlrp4 inflammasome as shown for bone marrow-derived γ -macrophages (Suppl Fig. 1C) and γ -dendritic cells (Suppl Fig. 1D). By contrast, TNF- α secretion is Nlrp3-independent (Suppl Fig. 1B).

Data are representative of 2 independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD.

Supplementary figure 2

Uric acid, silica and alum salt crystals-induced IL-1 β production depend on NLRP3 inflammasome

Inhibitions of phagocytosis by cytochalasine D (Cyt D), lysosome acidification by bafilomycin or cathepsin B activity by Ca074-Me blocked IL-1 β production induced by MSU, silica or Alum on LPS-primed macrophages (Suppl Fig. 2A). In contrast, the negative control pepstatin A (Pepst A) that inhibits acidic proteases has not effect on IL-1 β (Suppl Fig. 2A).

Data are representative of 2-3 independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD.

Supplementary figure 3

Specific requirement of P2Rs and connexin/pannexin for IL-1 β production by murine macrophages by MSU, silica or alum

Pannexin-1 inhibitor ¹⁰Panx-1 and its control ¹⁴Panx effects are shown together with A740003, oATP and CBX on IL- β production and unrelated TNF α as a toxicity control (Suppl Fig. 3).

MSU, Silica and Alum used at 250 μ g/ml and A740003 : 100 μ M, oATP : 500 μ M, Carbenoxolone (CBX) : 50 μ M, ¹⁰Panx-1 and ¹⁴Panx : 200 μ M.

Data are representative of 2 independent experiments and are expressed as mean values $\pm$ SD.

Figure 1: Uric acid crystals or silica trigger active release of ATP by lung epithelial cells partially through P2X7 and connexin and/or connexin pathway

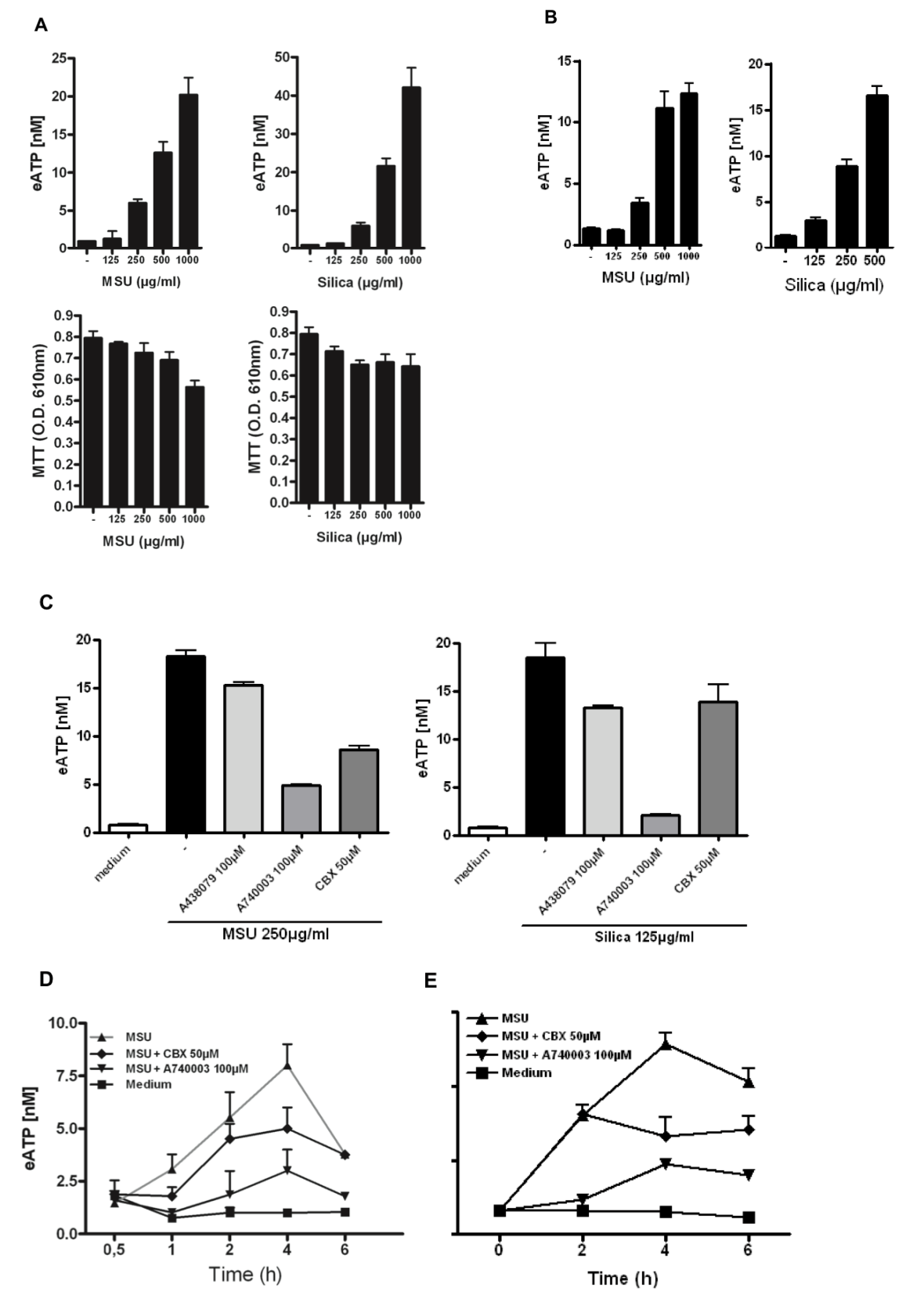


Figure 2: Uric acid crystals, silica or alum trigger active release of ATP by human macrophages

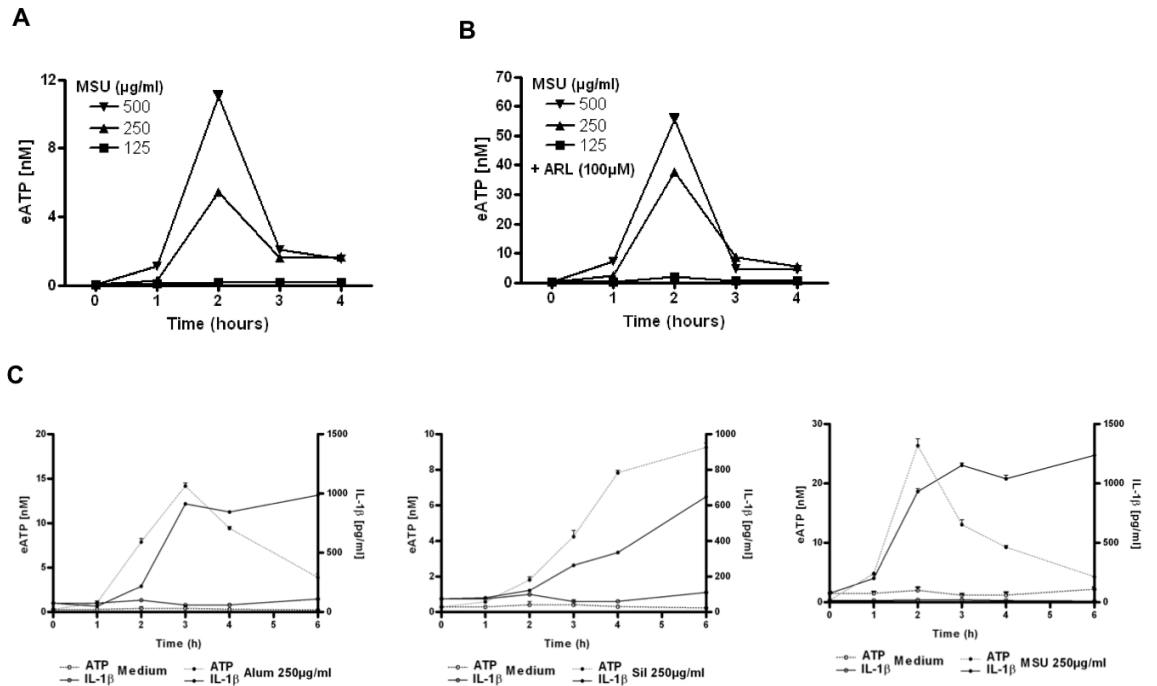


Figure 3: Phagocytosis or cysteine proteases inhibitors block both IL-1β production and ATP release

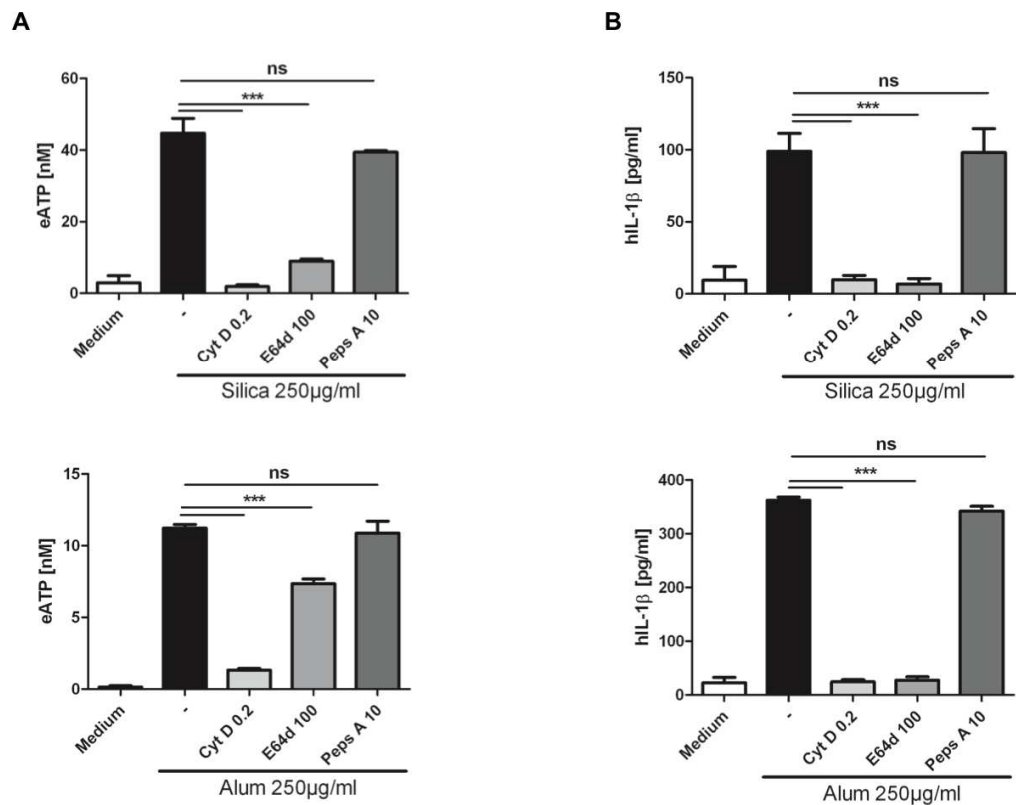


Figure 4: P2X7R or Pannexin/Connexin hemichannel are required ATP release and IL-1 β secretion

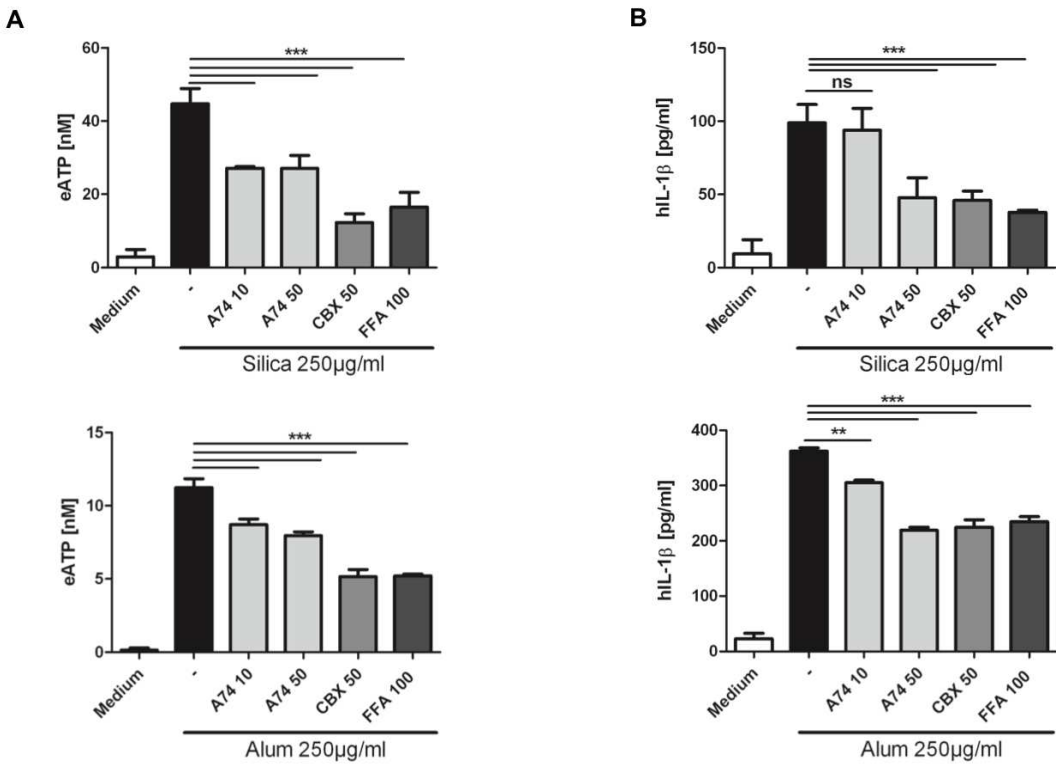


Figure 5 IL-1 β production by murine macrophages upon MSU, silica or alum depend on purinergic signaling and panx-1

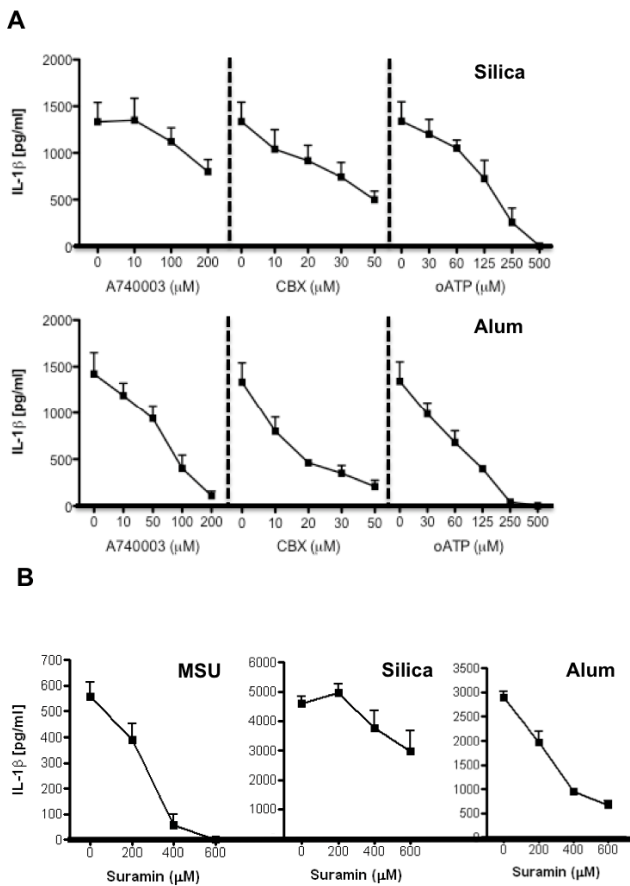


Figure 6: Single P2R or pannexin-1 deficiency does not lead to reduced IL-1 β production

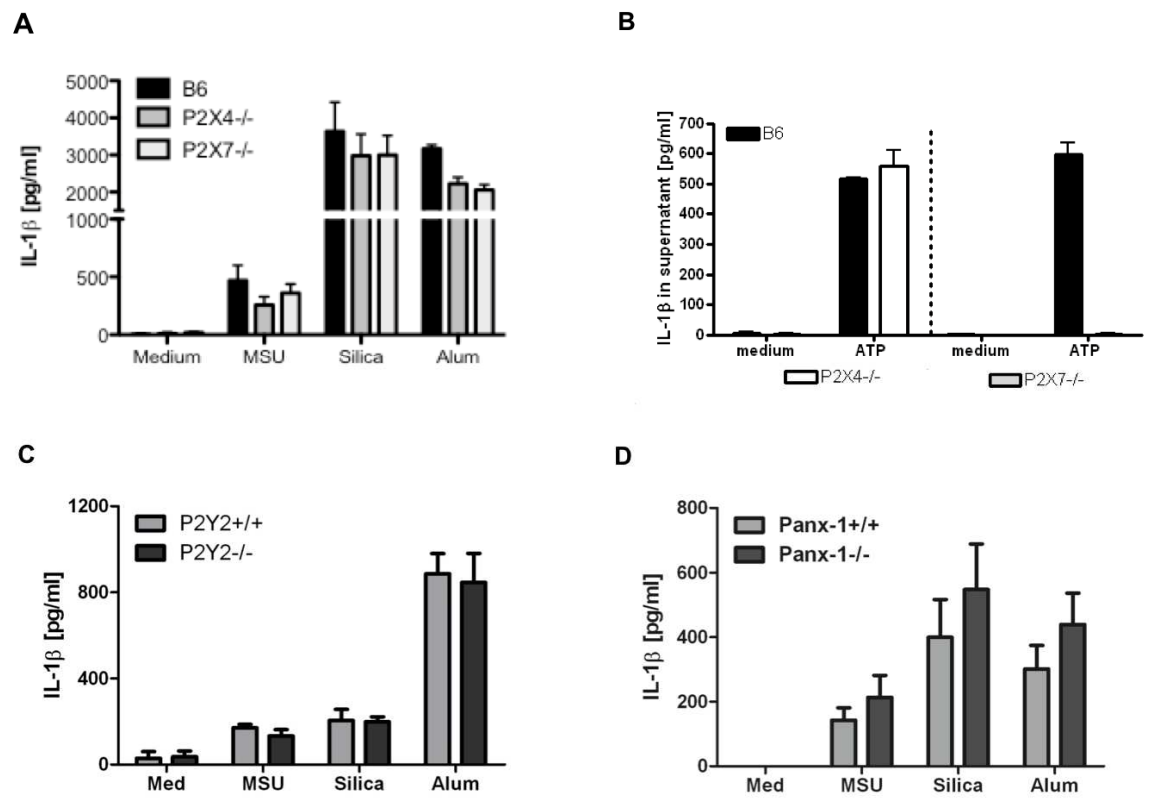


Figure S1 : Uric acid, silica and alum salt crystals-induced IL-1 β production depend on NLRP3 inflammasome

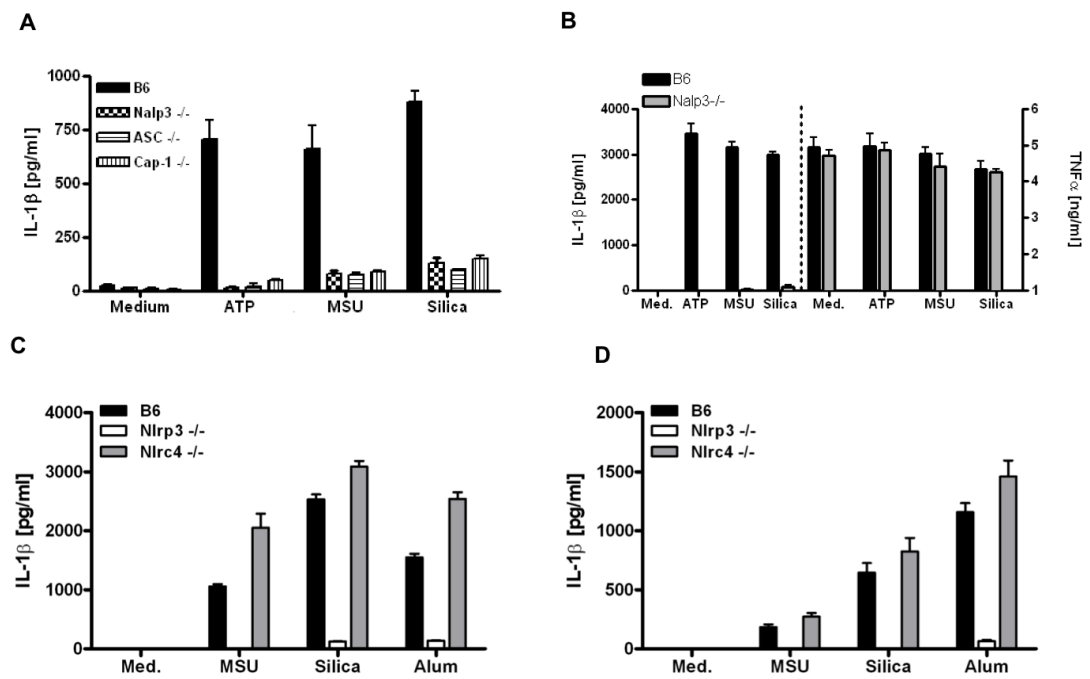


Figure S2 Uric acid, silica and alum salt crystals-induced IL-1 β production depend on NLRP3 inflammasome

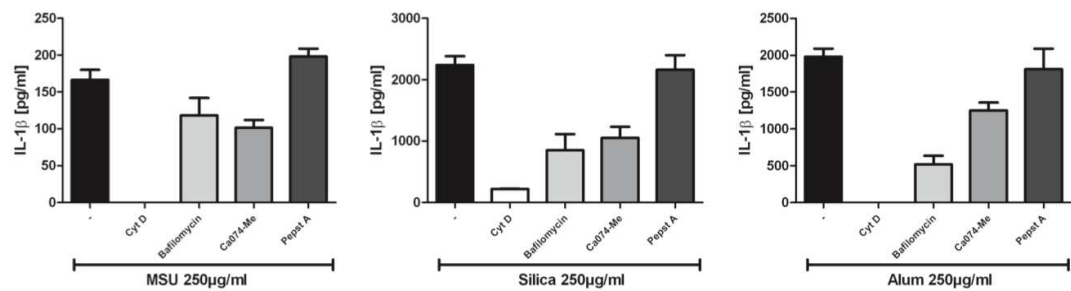


Figure S3 : Specific requirement of P2Rs and connexin/pannexin for IL-1 β production by murine macrophages by MSU, silica or alum

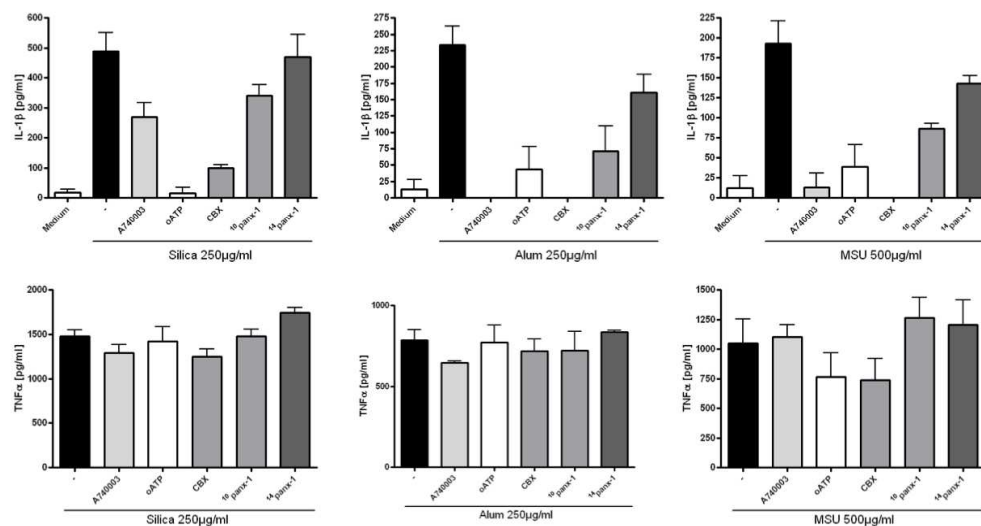
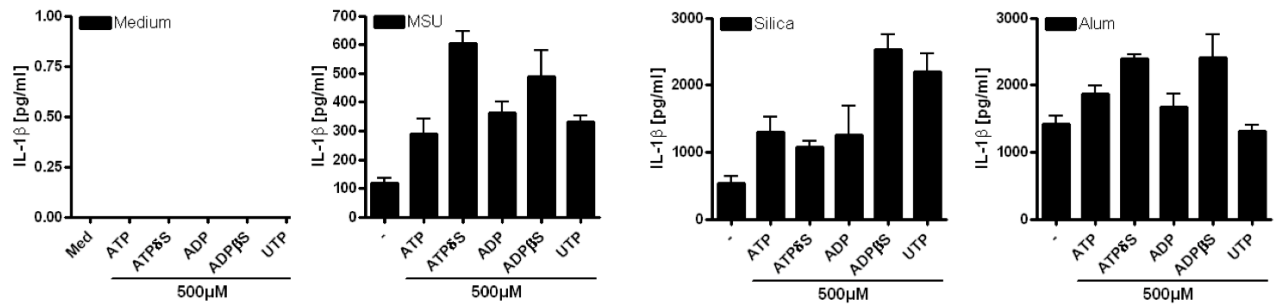
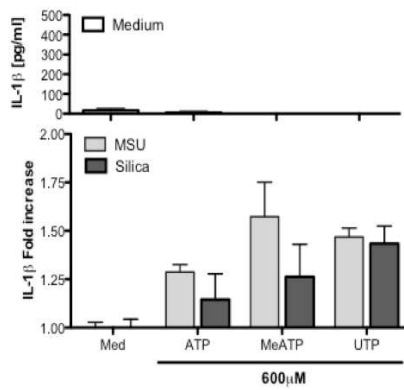


Figure 7 Other Purinergic ligands involved in particle-mediated inflammasome activation in macrophages

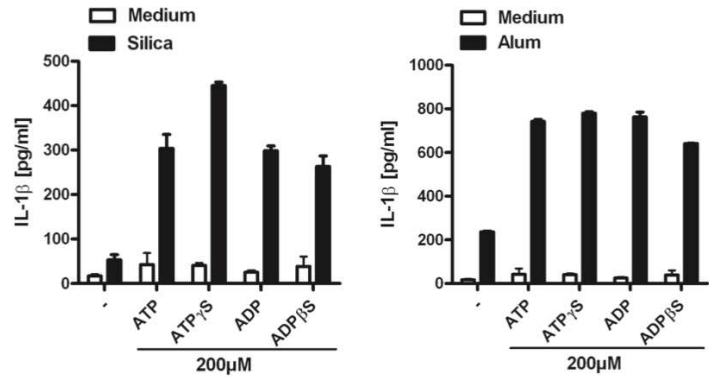
A



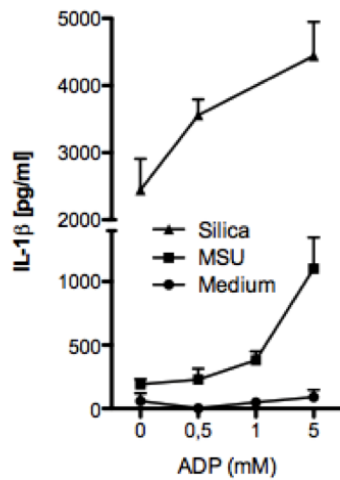
B



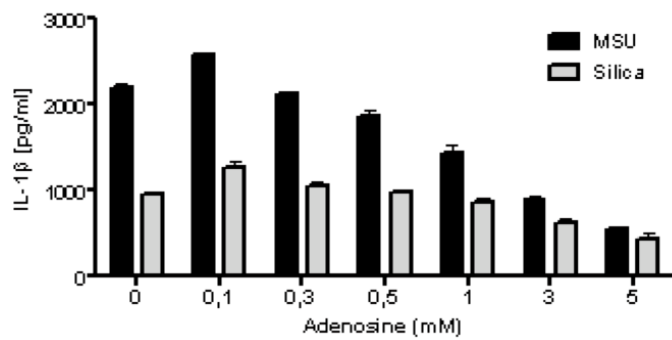
C



D



E



Discussion

A. Signaux de dangers et Pathogénèse

1 Signaux de dangers et poumon

a Acide urique

Lorsque des cellules mourantes sont co-injectées avec un antigène, elles fournissent un effet adjuvant pour l'élaboration de la réponse adaptative (399, 400). Il fut montré en 2003 que c'est majoritairement l'acide urique provenant des cellules irradiées qui constitue un adjuvant endogène capable de stimuler la maturation des cellules dendritiques et favoriser la réponse des lymphocytes T cytotoxiques. Dans ce modèle, l'élimination de l'acide urique dans les cellules mortes réduit l'activation de CTLs d'environ 90% (396). L'administration dans les voies aériennes d'un antigène protéique en présence de MSU est suffisant pour induire une réponse de type Th2 et une réponse de type asthmatique (114).

Dans l'endommagement pulmonaire induit par la BLM chez la souris, nous avons montré que le taux d'acide urique est augmenté dans les voies respiratoires et que l'instillation d'acide urique sous forme cristalline (MSU) est pro-inflammatoire. Les traitements visant à diminuer la quantité d'acide urique s'accompagne d'une diminution de l'inflammation et plus tardivement de la fibrose (401). La signalisation passe par l'axe Nlrp3/IL-1R1 (401). Or c'est en absence du récepteur IL-1R1 que nous avons observé l'inhibition la plus forte de la pathologie (395). *In vitro*, les cristaux de MSU induisent une forte production d'IL-1 β via Nlrp3 qui se fixe ensuite sur IL-1R1. Ainsi, notre étude montre le rôle de l'acide urique en tant que signal de danger dans la mise en place de la réponse immunitaire en condition stérile.

Cependant une critique majeure, sans cesse soulevée, est l'absence d'observation après BLM dans les poumons d'une forme cristallisée de l'acide urique. Or les concentrations d'acide urique nécessaires pour stimuler les cellules dendritiques sont celles qui permettent sa précipitation en MSU (396). L'acide urique soluble ne permettrait pas cet effet adjuvant, notamment du fait de son incapacité à activer l'inflammasome Nlrp3. La forme immuno-stimulatrice de l'acide urique est celle cristalline (396), comme pour l'alum (402). Une autre étude a montré *in vitro* que les éosinophiles humains sont attirés de façon dose-dépendante et dans les mêmes proportions par de l'acide urique soluble ou cristallisé en MSU. Toutefois, seule cette dernière permet la production de IL-6 et IL-8 par les mêmes cellules (403).

On peut opposer à ces remarques que l'acide urique est relativement insoluble dans les fluides biologiques (70 μ g/ml) (397) et aurait tendance à micro-cristalliser facilement, ceci en fonction du pH et de la température. Les mammifères possèdent une concentration basale élevée en acide urique dans

le sang (40-60 µg/ml) (397). La concentration est bien plus élevée dans le cytoplasme et encore davantage lorsque la cellule est lésée et dégrade ses acides nucléiques. L'environnement local autour des cellules mortes pourrait ainsi facilement atteindre le seuil de saturation et favoriser la cristallisation en MSU.

Cet adjuvant endogène pourrait être incriminé dans certaines pathologies auto-immunes où une forte incidence de l'hyper-uricémie a été rapportée (404). Le rôle de l'acide urique et sa potentialité à cristalliser pourrait être particulièrement important chez l'homme qui ne possède pas d'uricase fonctionnelle (284).

Cependant l'action de l'acide urique/MSU semble dépendre des situations. Il a été montré que de l'acide urique est libéré dans les voies aériennes de patients ou de souris asthmatiques stimulés par l'allergène HDM (House Dust Mite) (114). Cet acide urique est nécessaire pour générer le recrutement des éosinophiles, une hyperactivité bronchique et une réponse Th2. De façon surprenante, les effets adjuvants de l'acide urique sont indépendants de l'inflammasome Nlrp3 et de la voie de l'IL-1. L'administration de MSU active les cellules dendritiques via les kinases Syk et PI3K. Ainsi, l'acide urique serait également un initiateur et amplificateur important dans l'inflammation allergique (114).

S'écartant du modèle pulmonaire, mais toujours en lien direct avec l'étude du rôle de l'acide urique, des chercheurs convaincus des limites des traitements cherchant à diminuer les concentrations sériques et tissulaires en acide urique ont généré des modèles génétiques. Ils ont créé deux modèles de souris transgéniques, l'une exprimant une uricase en intracellulaire dans le peroxysome et l'autre une forme sécrétée dans le milieu (405) permettant une déplétion en acide urique de 30% dans le sérum à 60% dans le péritoine. Les auteurs ont utilisé le modèle d'hépatotoxicité induite par une dose forte d'acétaminophène (AAP) afin d'examiner le rôle de l'acide urique dans le cadre d'une inflammation en réponse à la mort cellulaire. L'AAP est converti en un composé fortement toxique pour le foie créant ainsi une nécrose péri-lobulaire en moins d'une journée. Il se produit une mort cellulaire massive qui induit une robuste réponse inflammatoire principalement neutrophilique. L'afflux de neutrophiles et les productions de MIP-2, KC et IL-1 β sont fortement réduites dans deux modèles de souris transgéniques avec toutefois quelques variations. A noter que la nécrose elle-même n'est pas modifiée, ni la production d'enzymes caractéristiques de la lésion hépatique (405).

Dans un autre modèle, l'injection de cellules nécrotiques issues des souris transgéniques possédant moins d'acide urique provoque une inflammation moindre que celle produite par l'injection de cellules nécrotiques sauvages. Cela montre bien le rôle exercé par l'acide urique dans la promotion de l'inflammation stérile dans le cadre de mort cellulaire par nécrose. Dans les cas d'inflammation résultant de l'injection dans le péritoine de particules de silice, de zymosan ou de LPS, l'acide urique ne semble jouer aucun rôle significatif (405). En conclusion, les résultats indiquent que la déplétion en acide urique ne cause pas un défaut généralisé d'induction d'inflammation aiguë mais affecte

sélectivement l'inflammation résultant d'une mort cellulaire en condition stérile. Il serait très intéressant de transposer ces recherches dans le modèle BLM.

b ATP

Le rôle de l'ATP extracellulaire en tant que signal de danger potentiel dans les poumons date de 2007 (398). Les données publiées montrent que la concentration en ATP dans les voies aériennes est augmentée chez les patients asthmatiques ainsi que chez les souris où l'asthme est induit expérimentalement. Chez la souris, les paramètres principaux de la pathologie sont diminués lorsque l'ATP est neutralisé et au contraire exacerbés lorsque la signalisation purinergique P2R est altérée. Les auteurs signalent que les effets adjuvants de l'ATP sont en partie dus aux meilleurs recrutement et activation des cellules dendritiques myéloïdes pulmonaires qui induisent une plus forte réponse Th2 au niveau des ganglions médiastinaux (398).

Une étude publiée récemment reprend et affine certains aspects mécanismes reliant purine et asthme (406). Les auteurs montrent que la déficience dans le récepteur P2Y2 réduit modérément les caractéristiques cardinales de l'asthme allergique au point de vue du recrutement cellulaire, de la production des cytokines Th2 et de l'hyperréactivité bronchique. La présence de P2Y2 sur les DCs est en grande partie responsable de leur migration au niveau des poumons mais elle n'est pas nécessaire pour la production de cytokines et de facteurs de co-stimulation. De même, la co-incubation avec l'antigène OVA de DCs déficients en P2Y2 ne modifie pas le profil Th2 des lymphocytes OVA-spécifique. Les monocytes et les éosinophiles extraits du sang de patients asthmatiques, restimulés par un antigène présent dans HDM (Der1), présentent une expression de P2Y2 très supérieure aux mêmes cellules provenant de sujets sains. *In vitro*, le chimiotactisme des cellules des patients en réponse à l'ATP et l'UTP est augmenté par rapport aux sujets sains et réduit des deux tiers en absence de P2Y2. Au final le récepteur P2Y2 semble bien avoir un rôle sur le recrutement des cellules inflammatoires mais pas directement leur activation (406).

La même équipe a publié un article sur le rôle de P2Y6, seul récepteur répondant à l'UDP, dans la mise en place de la l'asthme allergique. A la différence du précédent, P2Y6 aurait un rôle très important au niveau des cellules épithéliales. Son activation permet la synthèse de cytokines (IL-6) et chimiokines (IL-8), favorisant fortement le recrutement des cellules immunitaires dans le poumon et l'hyperréactivité bronchique (407).

D'autres modèles de pathologies ont appuyé le rôle assez général de la signalisation purinergique dans l'immunité pulmonaire. La COPD (**C**hronic **O**bstuctive **P**ulmonary **D**isease) est la cause principale de mortalité et de morbidité mondiale (408). La fumée de cigarette constitue le facteur de risque principal de développement de COPD. Il a été montré que la concentration en ATP est significativement augmentée dans le BAL de souris exposées à de la fumée de cigarette (409) ou

chez les fumeurs (410). Chez l'homme, la consommation de cigarette peu de temps avant le prélèvement exacerbe fortement la teneur en ATP (410). La concentration en ATP est maximale chez les patients fumeurs ou anciens fumeurs souffrant de COPD (410). Il existe une corrélation négative entre l'ATP et la fonction pulmonaire (410). A noter que la libération même d'ATP est en partie dépendante de la présence de P2X7 (411). Chez les souris, la neutralisation de l'ATP (Apyrase) ou l'inhibition non spécifique des P2Rs (Suramine, PPADS) réduit l'inflammation en termes de recrutement cellulaires, production de cytokines et chimiokines dans un modèle de COPD (412). Plus étonnant, un traitement retardé de plusieurs jours après le début des expositions à la fumée de cigarette (au 4^{ème} jour sur 6) suffit pour diminuer fortement l'inflammation cellulaire mais aussi le contenu du BAL en ATP (412). Les expériences d'exposition chronique comme modèle d'emphysème montrent une forte augmentation de l'ATP dans le BAL après 7 mois. Un traitement oral par la suramine ou le PPADS est suffisant pour bloquer significativement le développement de la pathologie en termes d'architecture pulmonaire et d'analyse morpho-métrique. L'augmentation des lymphocytes CD4⁺ et des cellules productrices d'IFN γ ou de IL-13 observée en cas d'emphysème est également fortement atténuée lors de traitements bloquant la signalisation P2R (412).

Les auteurs ont noté l'existence d'une corrélation entre recrutement de neutrophiles et concentration en ATP dans le BAL. En outre, l'addition seule d'ATP ou d'ATP γ S en intratrachéal induit le recrutement de neutrophiles dans le BAL mesuré 24h après (412). Ce recrutement est dépendant du récepteur P2Y2 puisque la même expérience chez des souris qui en sont déficientes limitent fortement l'effet de l'ATP γ S. Dans le modèle d'exposition aiguë à la fumée de cigarette, les données montrent que les souris déficientes en P2Y2 présentent moins d'ATP dans le BAL ainsi qu'une inflammation cellulaire et cytokinique diminuée. Des expériences sur souris irradiées concluent que c'est principalement l'expression de P2Y2 sur les cellules hématopoïétiques qui est importante pour le développement de la pathologie (412).

Les neutrophiles sériques de patients avec une COPD présentent une chimio-attraction par différentes doses d'ATP (1-100 μ M) supérieure à celle des cellules issues de sujets sains (410). Similairement, ces neutrophiles libèrent une plus grande quantité d'élastase en réponse aux doses mêmes d'ATP. Les macrophages alvéolaires de sujets atteints de COPD stimulés par de l'ATP (1-1000 μ M) sans LPS produisent significativement plus de IL-1 β et de MMP9 et moins de TIMP-1 (410). Il a récemment été montré que P2X7 est impliqué dans le recrutement de neutrophiles dans les poumons. Son activation module l'expression de MAC-1 sur les neutrophiles, intégrine importante dans le recrutement des neutrophiles vers l'inflammation (413). En outre, l'inhibition de P2X7 peut également affecter indirectement la migration des neutrophiles en diminuant les chimiokines qui les attirent. Les concentrations dans le BAL en KC et MIP-2 sont fortement réduites lorsque P2X7 est inhibé par le KN-62 (411).

La signalisation P2X7 intervient dans la mise en place de l'inflammation et la formation de

l'emphysème. Son inhibition ou son absence montrent une diminution de l'inflammation et prévient l'apparition de l'emphysème. L'inhibition pharmacologique de P2X7 apparaît également effective lorsque que l'inflammation induite par la fumée de cigarette est déjà installée. Des expériences d'irradiations montrent que dans le cadre de l'emphysème l'expression de P2X7 est importante au sein des cellules immunitaires (411).

Il existe une forte surexpression de P2Y2 sur les neutrophiles et de P2X7 sur les macrophages de patients avec une COPD (410). Au final L'ATP extracellulaire persiste dans le BAL des fumeurs et est impliqué dans la pathogénèse de la COPD en favorisant l'inflammation et la dégradation tissulaire (410). Il existe un rôle évident de plusieurs récepteurs purinergiques, dont P2X7 et P2Y2.

Les travaux publiés par le laboratoire s'intéressent au rôle de l'ATP extracellulaire dans la promotion de l'inflammation et la fibrose en réponse à la BLM (414). Ils s'accordent avec la littérature où la forte libération d'ATP constitue un signal d'alerte facilement produit en réponse à différents types d'agression pulmonaires. Nos résultats sont appuyés par une certaine pertinence clinique, puisque la concentration en ATP dans l'espace alvéolaire est augmentée chez les patients souffrant de fibrose pulmonaire et plus élevé encore chez les patients en phase critique d'exacerbation (414). Nous avons identifié le rôle de P2X7 sans pour autant exclure le rôle des autres récepteurs purinergiques, qui mériteraient notre attention. Notamment P2Y2 qui semble jouer un rôle particulier dans le recrutement de neutrophiles, type cellulaire principale dans BAL lors de la phase aiguë.

Il est à parier que de nombreuses autres études à venir vont présenter les rôles d'autres récepteurs purinergiques dans la régulation de la réponse immunitaire. Par exemple, l'exposition aiguë à la fumée de cigarette conduit à l'augmentation significative de P2X1, P2X4, P2X7 et P2Y2 dans les neutrophiles sanguins, de P2X7 et P2Y2 dans les neutrophiles du BALF, de P2X7 P2Y2 et P2Y13 dans les macrophages du BALF et de P2Y4, P2Y6, P2Y13, P2X1, P2X4 et P2X7 dans l'homogénat de poumon (412), ce qui laisse présumer des découvertes importantes.

c Autres signaux de dangers

HMGB1

HMGB1 (**H**igh **M**obility **G**roup **B**ox1) est une protéine nucléaire impliquée dans les phénomènes de courbures de l'ADN pour le recrutement de protéines *ad hoc*. Son nom vient de l'observation de sa capacité à migrer rapidement dans un gel (415). HMGB1 est présente chez tous les mammifères. Elle peut être libérée par les cellules nécrotiques ou activement sécrétée par les macrophages, les cellules dendritiques ou NK activées (416). La capacité des leucocytes à sécréter activement un composant nucléaire peut paraître surprenante. Certains estiment qu'il s'agirait de

recréer un environnement associé à la nécrose et donc à l'activation immunitaire (417).

A noter que HMGB1 peut subir de nombreuses modifications post-traductionnelles. Il fut notamment montré sur des neutrophiles que sa méthylation la rend moins efficace dans la liaison à l'ADN et favorise ainsi sa diffusion passive vers le cytoplasme (418). Il y aurait une régulation fine de l'action de la protéine suivant son état de modification.

HMGB1 *per se* possède des activités mitogénique et chimioattractante (419). Cependant elle forme *in vivo* des complexes moléculaires relativement stables avec des PAMPs, des acides nucléiques mais aussi certaines cytokines et chimiokines (415). LPS et HMGB1 interagissent physiquement et permettent une production de cytokines inflammatoires plus fortes que les deux séparément (420). HMGB1 se complexe aussi avec l'IL-1 β et leur association exacerbe les productions de IL-6 (421), MIP-2 (422) ou TNF- α (422).

La sécrétion d'une forme biologiquement active de HMGB1 est nécessaire pour l'activation des DCs. En présence d'inhibiteur de la protéine ou d'un de ces récepteurs les mieux caractérisés, RAGE (**R**eceptor for **A**dvanced **G**lycation **E**nd-products), l'incubation de DCs avec des PAMPs ou de cytokines n'est plus suffisante pour provoquer leur maturation (423).

Le rôle de HMGB1 en tant que signal de danger ou DAMP est souvent cité dans la littérature. De nombreux exemples suggèrent que HMGB1 agit comme un régulateur clé de l'immunité innée, orchestrant l'inflammation, le recrutement, l'activation cellulaire et le remodelage tissulaire (415, 424). Par exemple sa liaison aux récepteurs active les cellules endothéliales pour favoriser l'expression de molécules d'adhésion et les macrophages pour la production de TNF- α et de IL-1 β (425).

A noter que la signalisation entraînée par des DAMPs dont HMGB1 sur CD24 peut permettre de diminuer l'inflammation. En l'absence de cette signalisation anti-inflammatoire, une nécrose cellulaire massive peut devenir létale (426).

HMGB1 est connu pour se lier à TLR2, TLR4 et RAGE (424) et jouer de multiples fonctions dans l'infection, l'inflammation, les dommages tissulaires et l'apoptose (416) agissant aussi en aval de lésions tissulaires persistantes (415). Chez l'homme HMGB1 est un marqueur tardif de lésion pulmonaire associée au sepsis et corrèle avec le pronostic des patients (425).

Des rôles de HMGB1 dans la pathogénèse pulmonaire sont connus. HMGB1 joue un rôle important dans le modèle ALI (**A**cute **L**ung **I**njury) induite par le LPS chez la souris (427). L'injection d'une forme soluble de RAGE non signalisante permet de diminuer en partie l'inflammation dans ce modèle (428).

Les quantités de HMGB1 sont augmentées dans le BAL de patients souffrant de IPF ou de pneumopathies d'hypersensibilité (429). Chez les patients IPF, HMGB1 est surtout détecté dans les

cellules inflammatoires et dans les cellules épithéliales hyperplasiques. Dans le modèle BLM de la fibrose, HMGB1 est principalement détecté dans les cellules épithéliales bronchiques lors de la phase précoce puis dans les cellules épithéliales alvéolaires et dans les cellules inflammatoires plus tardivement lors de la fibrose (429). L'injection d'anti-HMGB1 atténue significativement l'inflammation pulmonaire et la fibrose. Sur des fibroblastes *in vitro*, HMGB1 induit leur prolifération, mais ni apoptose ni synthèse de collagène (429).

Le récepteur RAGE fut isolé et caractérisé en premier chez le bovin en 1992 (416) et à la différence de la plupart des autres tissus, le poumon possède une expression très élevée de RAGE en condition physiologique (430). Une perte de l'expression de RAGE a été rapportée dans les poumons de patients IPF, ainsi que dans les modèles murins de fibrose induite par la BLM ou l'asbeste (431-433).

D'un côté, il fut établi que les souris déficientes en RAGE développent spontanément une fibrose pulmonaire avec l'âge. Après administration d'asbeste, elles développent une réponse fibrotique, soit faiblement (432), soit fortement (431). De l'autre il fut écrit que les mêmes souris sont presque complètement protégées dans le modèle BLM (434). Dans cet article les auteurs proposent que les effets bénéfiques passent par le défaut de signalisation de HMGB1.

Une étude plus récente s'est intéressée à cette apparente contradiction et a reproduit les phénotypes opposés dans les deux cas, après utilisation de BLM ou d'asbeste (435). Selon leurs résultats, l'absence de RAGE faciliterait la capacité de migration des cellules épithéliales alvéolaires afin de réparer le tissu endommagé dans le modèle BLM mais pas dans celui de l'asbeste.

Ceci dit, la fonction biologique de RAGE dans le poumon sain demeure peu connue. Elle semble importante pour l'adhérence et l'étalement des surfaces cellulaires sur la lame basale (436). Ceci est à mettre en parallèle avec l'expression forte et relativement sélective de RAGE sur les pneumocytes de type I (436). Il fut montré que RAGE peut constituer un marqueur de transdifférentiation vers des pneumocytes de types II (437), phénomène important dans l'évolution vers la fibrose et la perte de fonction respiratoire.

Si j'ai choisi de parler aussi longuement de HMGB1 c'est parce qu'elle semble pour moi avoir de très nombreux points communs avec l'ATP en tant que signal de danger. Le tableau ci dessous présente certaines caractéristiques communes qui feraient de HMGB1 et ATP de bons signaux de danger pour une modulation fine de leur action, tant dans la multiplicité des dérivés et des récepteurs associés.

	HMGB1	ATP
Expression	Ubiquitaire	Ubiquitaire
Localisation principale	Intracellulaire (nucléaire)	Intracellulaire
Sécrétion	Passive (nécrose) Active	Passive (mort cellulaire) Active
Diversité	acétylation, phosphorylation méthylation oxydation	ATP ADP Adenosine
Récepteur	TLR2 TLR4 RAGE CD24	P2X1-7 P2Y1,2,4,6,11,13,14 A1,2a,2b,3

D'autres chercheurs sont beaucoup plus prudents sur le rôle de HMGB1 (et de HSP70, voir paragraphe suivant) et rapportent que lorsque ces protéines sont utilisées très pures elles perdent leur effets pro-inflammatoires. Une revue récente leur discrédite le terme de DAMP, d'alarmine ou de signaux de dangers (438). Beaucoup d'études utiliseraient des protéines recombinantes venant d'un système d'expression développé chez E. Coli et la contamination par des agonistes TLR2 et TLR4 est hautement probable (439). Cependant son action apparemment claire dans l'inflammation induite par la nécrose cellulaire en condition stérile ne souffre pas de ces considérations (424, 440).

HMGB1 a été montré comme pouvant se lier au LPS et à des lipopeptides (438) mais peut aussi favoriser les actions du TNF- α et de l'IFN- γ (421)(415). J'aurais tendance à le laisser dans la catégorie des DAMPs même si comme dit Marco Bianchi « *HMGB1 loves company* » (441).

HSP70

Les protéines HSP (**H**eat **S**hock **P**roteins) constituent une famille de chaperons moléculaires essentielle à la prévention de la mauvaise conformation ou de l'agrégation des protéines en formation (442). Certaines HSP, notamment HSP70 et HSP90 sont également importantes pour la présentation antigénique, l'activation des lymphocytes et des macrophages, la maturation des DCs (443, 444). Les HSPs dans l'immunité innée et adaptative sont bien décrites (445). Leurs actions en tant que signal de dangers ont également été rapportée (446, 447).

HSP70 possède un effet protecteur dans le développement de la fibrose induite par la BLM (448). Les lésions tissulaires et l'inflammation sont diminuées chez des souris surexprimant HSP70. Toutefois, les auteurs appuient un rôle cytoprotecteur de la protéine mais pas directement son action en tant que signal de danger (448).

Une autre équipe montra que l'administration d'un inducteur de HSP70, le geranylgeranylacetone utilisé en clinique, est bénéfique contre les effets de la BLM. La prévention de l'inflammation et la fibrose serait en partie due à la diminution de l'apoptose des cellules pulmonaires (449).

2 Signaux de dangers et autres maladies

Le tableau suivant montre cependant, outre ATP et acide urique, que de nombreux liens ont été établis entre des molécules endogènes et des pathologies, qu'elles soient d'origines auto-immune, infectieuse ou tumorale.

Biglycan • Atherosclerosis [210, 211] • Diabetic nephropathy [212] • Rheumatoid arthritis [213, 214] • Tumors inc colorectal [215], liver [216], osteosarcoma [217], pancreatic [218]	Fibrinogen • Atherosclerosis [219, 220] • Multiple sclerosis [221] • Rheumatoid arthritis [106] • Sepsis [221] • Tumors inc breast [222], osteosarcoma [223]	FNEDA • Atherosclerosis [224] • Psoriasis [225, 226] • Rheumatoid arthritis [110] • Sepsis [227] • Tumors inc liver, lung, colon [228, 229]
Heparan sulfate • Atherosclerosis [230] • Inflammatory bowel disease [231] • Lupus [232] • Tumors inc lung [233], colon, bladder, breast [234]	HMGB1 • Atherosclerosis [235] • Diabetes [236] • Lupus [90, 115, 237] • Multiple sclerosis [119] • Rheumatoid arthritis [111] • Sepsis [114] • Sjogrens [238] • Systemic sclerosis [239] • Tumors inc breast, lung, colorectal, pancreatic, melanoma [9]	HSPs • Atherosclerosis [240, 241] • Diabetes [236] • Inflammatory bowel disease [242] • Lupus [243] • Multiple sclerosis [244–246] • Psoriasis [247] • Rheumatoid arthritis [109] • Sepsis [248] • Tumors inc breast, lung [249, 250]
Low MW HA • Rheumatoid arthritis [251] • Sarcoidosis [116, 117] • Systemic sclerosis [252] • Tumors inc pancreatic [253]	Tenascin-C • Atherosclerosis [272] • Asthma [273, 274] • Diabetes [275, 276] • Inflammatory bowel disease [277] • Infection [278, 279] • Multiple sclerosis [280] • Rheumatoid arthritis [108, 281, 282] • Sepsis [113] • Tumors inc brain, breast, lung, liver, skin, prostate, kidney, bladder, lymphoma, ovarian [283]	Neutrophil elastase • Atherosclerosis [254] • Diabetes [255] • Inflammatory bowel disease [256] • Lupus [257–259] • Sepsis [260] • Tumors inc breast [261], pancreatic [262], lung [263]
SA100A8/A9 • Atherosclerosis [264] • Inflammatory bowel disease [265, 266] • Lupus [267] • Psoriasis [268] • Rheumatoid arthritis [269–271] • Sepsis [140] • Systemic sclerosis [120] • Tumors inc breast, lung, pancreatic, colorectal, [120]		Versican • Atherosclerosis [284] • Multiple sclerosis [211] • Tumors inc bone, lung [285]

Tableau 3 | Signaux de dangers endogènes et pathologies associées
Pour les références mentionnées, consulter : (450)

Quelques autres signaux de dangers sont connus. A titre d'exemple, l'ADN libéré par les cellules mortes activent TLR9 et l'inflammasome (451). Citons encore le cas de SAP130, composant des ribonucléoprotéines (452).

3 Distinction apoptose/nécrose, une simple histoire de sémantique ?

La mort cellulaire par nécrose est pro-inflammatoire *in vivo* (453), ce qui se caractérise par une augmentation du débit sanguin local, une fuite vasculaire et une sortie des leucocytes du sang vers le site inflammé. Les neutrophiles constituent le premier type cellulaire recruté au site nécrotique, suivi

d'un afflux de monocytes. La nécrose n'est pas un phénomène physiologique, elle apparaît en situation de lésion cellulaire pathologique et constitue une menace potentielle pour l'hôte (454). Le système immunitaire inné est capable de mobiliser rapidement les acteurs de défense solubles et cellulaires au niveau du site lésé. Cet engagement aurait pour but de neutraliser ou de cloisonner tout agent nuisible qui serait présent. Il permet aussi d'éliminer cellules mortes et débris tout en stimulant les mécanismes de réparation tissulaire. Toutefois, la réponse inflammatoire a un prix (455, 456). Les mécanismes effecteurs de l'inflammation sont imprécis et touchent tout l'environnement, y compris les cellules saines. Des enzymes hydrolytiques et des composés chimiques fortement réactifs, incluant les radicaux oxygénés, sont émis par les leucocytes vivants et morts et attaquent les cellules avoisinantes. Dans les cas d'infections, cela se réalise généralement sur une échelle de temps brève et les dommages collatéraux sont abordables par rapport au risque de sa propagation. Dans les cas d'inflammation stérile et chronique, le ratio coût/bénéfice est nettement moins favorable et peut conduire à la maladie. C'est pourquoi il est si important de mieux comprendre les mécanismes par lesquelles la mort cellulaire conduit à l'inflammation (352, 457).

Comme déjà mentionnée, la mort cellulaire programmée et régulée par apoptose est non-inflammatoire. La libération de signaux comme l'ATP, commun avec la nécrose, permet le recrutement de phagocytes par une signalisation de type « *find me* », selon le terme employé par Kodi Ravichandran (348). Pour aller plus loin, on pourrait également qualifier le phénomène « *Find me, on time !* ».

En plus, la spécificité d'expression de certains récepteurs peut différencier l'immunogénicité de la réponse dans certains cas.

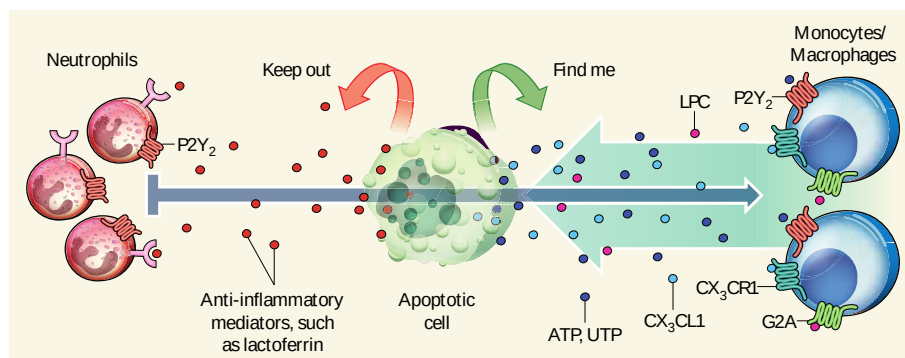


Figure 24 | Dualité de recrutement en réponse à l'apoptose

Des nucléotides comme l'ATP et l'UTP sont libérés par les cellules apoptotiques et fonctionnent comme « *find me* » sur P2Y₂ des macrophages. D'autres molécules, comme la fractalkine (CX₃CL₁) le LPC (lipid lysophosphatidylcholine) sont libérées et participent au recrutement. Les neutrophiles seraient eux inhibés par la signalisation issues d'autres facteurs libérés par les cellules apoptotiques, comme la lactoferrine (458).

La distinction entre apoptose et nécrose, même basée sur certains critères arbitraires et confus, peut aider à la meilleure compréhension des mécanismes immunitaires intervenant dans la mort cellulaire en condition stérile. La bléomycine, utilisée dans modèle IPF, est pour moi un bon exemple de raisonnement. Elle provoquerait en premier lieu une apoptose (387-389) or son administration *in vivo* est inflammatoire. Peut-être l'apoptose est-elle réellement non inflammatoire dans les

mécanismes physiologiques ou ontogéniques mais pas ailleurs et/ou se trouve ici suivi d'une nécrose secondaire.

Dans le cadre de la réponse nécrotique et le rôle critique de l'IL-1, quatre questions fondamentales, non exclusives, se posent :

- Quels sont les signaux de dangers / voies de signalisations permettant la production de IL-1
- Quels sont les rôles respectifs de l'IL-1 α et de l'IL-1 β
- Quelles sont les cellules productrices principales (myéloïdes ou non)
- Quelles sont les cellules répondeuses principales (myéloïdes ou non)

Plusieurs articles adressent ces questions, souvent partiellement, et apportent des réponses fréquemment contradictoires de prime abord. Il est possible d'injecter des cellules nécrotiques dans le péritoine, ce qui est pro-inflammatoire et conduit au recrutement de neutrophiles de manière dépendante de IL-1R1 (459). Un autre modèle d'étude créé par exemple une lésion nécrotique ponctuelle du foie sur l'hôte et examine le recrutement cellulaire induit (349).

Un article de Gabriel Nuñez annonce que les cellules (myéloïdes ou non) soumises à des cycles de congélation/décongélation meurent par nécrose et produisent de IL-1 α . En injectant ces cellules dans le péritoine, cette IL-1 α va agir principalement sur les cellules mésothéliales et pas sur les phagocytes (460). Les cellules mésothéliales forment une assise cellulaire pavimenteuse qui entoure les cavités séreuses et les organes internes. La cytokine se fixe sur l'IL-1R1 de ces cellules qui produisent en retour de forte quantité de IL-6 et CXCL1, cette dernière étant essentielle au recrutement des neutrophiles via CXCR2 (460). Dans ce modèle, ni l'IL-1 β ni les phagocytes ne semblent jouer un rôle important, ni dans la production de médiateurs inflammatoires, ni dans le recrutement de neutrophiles, à la différence des cellules non myéloïdes résidentes.

Cette étude est contredite par Kono et al. (461). Ils montrent que la production de IL-1 α et IL-1 β n'est pas réalisée par les cellules nécrotiques, sauf dans le cas d'injection de DC (461), ce qui paraît plus plausible. Le recrutement de neutrophiles est fortement diminué lorsque la souris qui reçoit les cellules nécrotiques est déficiente soit en IL-1 α soit en IL-1 β . La réponse est abrogée chez les doubles déficientes. En outre, IL-1 α et IL-1 β seraient principalement produites par les cellules myéloïdes et le recrutement des neutrophiles serait dû à l'activité des macrophages du péritoine (461).

D'autres travaux ont montré que l'inflammation est inhibée par des anticorps anti-IL-1 α mais pas anti-IL-1 β (459). En accord avec cela, la réponse inflammatoire aux cellules mortes n'est pas réduite en absence de Casp-1. *In vitro*, l'incubation de macrophages avec des cellules mortes conduit à la production d'IL-1 α . Ces observations montrent que la cytokine clé dans ce système serait IL-1 α et pas IL-1 β . La signalisation pro-inflammatoire de IL-1 α a lieu principalement sur les cellules radio-résistantes et pas sur les dérivés hématopoïétiques (459).

Pourtant la production d'IL-1 α est moins forte chez les souris déficiente en caspase-1 car cette cytokine se lie sur l'enzyme qui l'exporte à l'extérieur de la cellule. (191). Ainsi l'absence de rôle important d'IL-1 β , si elle était vérifiée, serait à considérer indépendamment du rôle de l'inflammasome Nlrp3. En accord avec cela il fut montré que la réponse inflammatoire à l'injection de cellules nécrotiques est dépendante de l'inflammasome Nlrp3 (350) et que les productions de IL-1 β et IL-1 α par des macrophages déficients en Nlrp3 sont fortement diminuées (350). Dans cette étude, un traitement des cellules nécrotiques par l'uricase ne modifie pas la quantité produite d'IL-1 β par les macrophages, excluant ici un rôle de l'acide urique ou du MSU en tant qu'activateur. En revanche les auteurs montrent que c'est principalement l'ATP issue des mitochondries des cellules nécrotiques qui constitue le principal signal de danger conduisant à l'activation de Nlrp3, la production de IL-1 β et le recrutement de neutrophiles (350). L'ATP signale en partie via P2X7 mais sa déficience ne modifie pas le recrutement de neutrophiles, excluant un rôle prépondérant de celui-ci dans le recrutement cellulaire (350).

Il est difficile de fournir un schéma clair des événements et des acteurs liant nécrose et acteurs de l'inflammation. Il apparaît néanmoins un rôle important des cytokines de la famille de l'IL1, IL-1 β et/ou IL-1 α . Trois autres cytokines de cette famille mériteraient d'être étudiées. Deux pro-inflammatoires, IL-18 et IL-33 signalant respectivement sur IL-18R et ST2. L'autre est un antagoniste de IL-1R1, l'IL-1Ra, empêchant l'action IL-1 α /IL-1 β .

C'est fort probable que les modalités de survenue de la nécrose soient importantes. Par exemple, si elle est induite trop rapidement ou brutalement, l'activation de l'inflammasome est fortement réduite comme observée *in vitro* avec les cellules THP1 (462). A l'opposé, un composé inducteur de la nécrose, 7BIO, permet la déstabilisation des lysosomes, active l'inflammasome et cela indépendamment de la signalisation purinergique ou de l'acide urique. D'autres inducteurs de nécrose caspases-indépendant, comme le peroxyde d'hydrogène ou le paclitaxel, n'active pas l'inflammasome (462). Egalement, lors d'une mort cellulaire par apoptose conventionnelle, HMGB1 établit une interaction forte et durable avec l'ADN, en contraste avec les cellules vivantes ou nécrotiques où elles sont nettement plus labiles (440).

La libération de IL-1 α produite lors de la nécrose peut être finement régulée comme montré sur cellules microgliales (463). Suivant la densité cellulaire *in vitro*, il se produit une rétention nucléaire d'IL-1 α qui va diminuer l'inflammation. Lorsque la densité cellulaire est faible, les cellules microgliales nécrotiques produisent de l'IL-1 α en même quantité que lors d'une densité élevée, mais vont activement la transporter et la fixer au sein du noyau au niveau de structures définies. Le transport et la rétention nucléaire de l'IL-1 α au sein des cellules microgliales nécrotiques seraient un moyen de diminuer son action pro-inflammatoire et réduire les dommages alentours (463).

La protéine HMGB1 est une protéine nucléaire régulatrice de la transcription et agissant également comme DAMP. Elle peut être libérée dans le milieu et agir comme une cytokine pro-inflammatoire (424). Il fut rapporté que HMGB1 pouvait être retenue dans le noyau de cellules apoptotiques pour éviter l'inflammation mais être également libérée par les cellules nécrotiques (424). Pourtant les signalisations TLR2 ou TLR4 ne semblent pas ou peu impliquées dans la détection de signaux de danger libérés par les cellules nécrotiques (460)(459). La contribution mineure de TLR2 et 4 est surprenante puisque HMGB1 se lie sur ces récepteurs et a été suggéré comme importante dans l'inflammation stérile (464). De même l'injection de cellules nécrotiques ne possédant pas HMGB1 conduit à une inflammation de même magnitude que des cellules contrôles (459). Encore une fois, les modalités de nécrose semblent importantes puisqu'une autre étude montre que son induction par *Klebsiella pneumonia* (465) provoque une inflammation dépendante d'une part de la libération de HMGB1 et de l'autre de l'activation de l'inflammasome Nrp3 (465).

Un article élégant montre que lors d'une nécrose hépatique localisée, l'ATP libéré par les cellules nécrotiques va signaler sur P2X7 exprimé sur les macrophages résidents, les cellules de Kupfer, qui activent alors leur inflammasome Nalp3 et produisent de l'IL-1 β (349). Cette cytokine augmente l'expression d'ICAM1 sur les cellules endothéliales proche du site lésé. Le chimiotactisme des neutrophiles se fait en partie grâce à l'établissement d'un gradient de la chimiokine MIP-2, produite de façon indépendante de l'IL-1 β par des cellules non myéloïdes, qui va signaler sur les neutrophiles via CXCR2. L'adhésion des neutrophiles sur la paroi de l'endothélium proche du site inflammé se réalise pour beaucoup via l'interaction entre l'intégrine CD11b du neutrophile et son ligand ICAM-1 sur la cellule endothéliale (349).

L'étape ultime du voyage des neutrophiles vers les cellules nécrotiques ou nécrotactisme n'est pas réalisée par des chimiokines mais par des signaux de dangers libérés par les cellules mortes. Il apparaît ici que les signaux de dangers principaux dans la migration terminale des neutrophiles sont des composés peptidiques plutôt que l'ATP. Ces peptides sont contenus initialement dans les mitochondries et signalent via le récepteur FPR1 (**F**ormyl-**p**eptide **r**eceptor **1**) (349).

En conclusion, si l'ATP est bien un signal de danger important dans l'établissement de l'inflammation neutrophilique en condition stérile, il est important de considérer que son action est assez spécifique, précoce et intégrée dans une cascade d'événements chronologique défini. Notons également le rôle prépondérant des cellules non myéloïdes dans la faisabilité de la réponse immunitaire et un rôle différentiel de signaux de dangers.

Rappelons que les cellules apoptotiques libèrent certaines molécules considérées comme des signaux de dangers dont de l'ATP (233) qui sont fondamentales pour leur l'élimination physiologique et cela sans provoquer d'inflammation. En plus de la libération passive de signaux de dangers, les

cellules nécrotiques mais pas apoptotiques génèrent activement des signaux pro-inflammatoires contribuant à la réponse inflammatoire stérile. L'activation de l'inflammasome NLRP3 permet la libération de IL-1 β mature et de IL18 sur cellules nécrotiques primées (462).

4 *Et l'autophagie dans les réponses inflammatoires ?* Existe-t-il un lien entre dérégulation de l'autophagie et inflammation stérile ?

L'autophagie est un mécanisme conservé dans l'évolution qui facilite le renouvellement de protéines endommagées, en excès ou d'organelles comme les mitochondries (466). L'autophagie participe à l'élimination de bactéries, notamment BCG (467-469), de virus et de protozoaires intracellulaires (470, 471). L'autophagie est nécessaire au fonctionnement du système immunitaire, que ce soit pour la présentation des antigènes, le développement des lymphocytes et la sécrétion de cytokines (471).

Pendant l'autophagie les composants cytoplasmiques sont internalisés, séquestrés dans des vésicules entourées d'une double membrane appelées autophagosomes, lesquels sont ensuite acheminés aux lysosomes pour dégradation (466). Un dysfonctionnement de l'autophagie est associé au vieillissement et à diverses pathologies humaines, incluant cancer et neuro-dégénération (470).

L'autophagie est contrôlée par les gènes Atg (**A**utophagy-related **g**enes). Elle survient en conditions physiologiques mais peut être favorisée par de nombreux facteurs, incluant le défaut de nutriments et les inhibiteurs de mTOR. Certaines cytokines favorisent l'autophagie (IFN- γ et TNF- α) (472, 473) d'autres l'inhibe (IL-4 et IL-13) (474). L'autophagie permet le contrôle des réponses inflammatoires dans les macrophages et les cellules dendritiques. L'inhibition de l'autophagie par diminution de l'expression de gènes Atg favorise la sécrétion de IL-1 β par un mécanisme dépendant des ROS (475).

L'autophagie n'est pas l'initiatrice de la mort dans le cas de mort cellulaire programmée du type apoptose mais elle est impliquée dans la création de signaux d'internalisation destinée aux autres cellules (476). Lorsque l'autophagie est compromise, l'élimination des cellules apoptotiques peut être ralentie et conduire à une mort par nécrose secondaire et à une inflammation locale (476), ce qui doit être pris en considération dans les cas d'inflammation stérile.

Tous les immunologistes intéressés par le sujet savent que l'activation de TLR permet la production de pro-IL-1 β . Peu savent que la protéine, encore inactive, est spécifiquement séquestrée dans les autophagosomes, que l'induction de l'autophagie se traduit par la perte de la pro-IL-1 β cytoplasmique et qu'elle inhibe la sécrétion de IL-1 β mature *in vitro* et *in vivo* (477). A l'inverse, un priming LPS, en inhibant l'autophagie conduit sans apport de second signal à l'activation de

l'inflammasome Nlrp3 et la formation de IL-1 β mature en forte quantité. Le rôle des ROS dans l'activation par le LPS seul en absence d'autophagie reste flou. Les auteurs n'ont pas trouvé d'augmentation de leur production suite au traitement par du LPS et un inhibiteur de l'autophagie. Cependant l'utilisation de détoxifiant de ROS (N-acétyl cystéine, Nac) permet dans les mêmes conditions d'inhiber la sécrétion d'IL-1 β . Les ROS ne proviendraient pas de la sous-unité NADPH oxydase NOX2 (gp91 phox) mais d'une autre source ou alors l'inhibition de IL-1 β par le Nac serait indépendante des ROS. Le potassium à forte concentration inhibe la production de IL-1 β mais également de IL-6, suggérant ainsi un effet toxique (477).

L'élimination de cellules mourant d'autophagie est pro-inflammatoire (478). Lorsque les macrophages phagocytent des cellules mortes par autophagie et pas par apoptose il y a activation concomitante de la casp-1 et sécrétion d'IL-1 β (479). Etonnement, il y aurait libération d'ATP par les phagocytes mais pas par les cellules mourantes. Cet ATP agirait en auto- ou para-crine via P2X7 qui est essentiel, tout comme un efflux de potassium. Un traitement par l'apyrase sur les phagocytes mais pas sur les cellules mourantes réduit fortement la production de IL-1 β par les premières (479).

La seule présence de cellules autophagiques permet la production par les macrophages de TNF- α , IL-6, IL-8 et IL-1 β (479). Le LPS seul ne conduit pas à la production de IL-1 β mais son addition à des cellules autophagiques permet une production synergique de IL-1 β , en quantité supérieure à celle de la seule présence de cellules autophagiques (479). Les auteurs rapportent que la phagocytose des cellules mortes par autophagie est essentielle à la production de IL-1 β par les macrophages, que l'incubation avec du surnageant seul ne suffit pas (479).

Non seulement de l'ATP sort des cellules autophagiques mais aussi une quantité significative est libérée par les phagocytes en cours d'internalisation des cellules autophagiques. L'hydrolyse de l'ATP ou le blocage de la signalisation du récepteur P2X7 conduit à la forte diminution de IL-1 β produite (479). Par contre dans cette étude, un traitement à l'apyrase des cellules autophagiques ne modifie pas l'inflammation générée par les phagocytes (479) ce qui peut paraître surprenant.

L'élimination des mitochondries endommagées ou vieillissantes se réalise par une forme d'autophagie qualifiée de mitophagie. Il existe un rôle important de la mitophagie dans la préservation de l'homéostasie mitochondriale (480). L'inhibition de l'autophagie favorise l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles et la translocation cytoplasmique d'ADN mitochondriale (ADNmt) en réponse au couple LPS/ATP. Etonnement, le transfert d'ADNmt dans le cytoplasme est dépendant de l'inflammasome Nlrp3 et de ROS. Pourtant cet ADNmt contribue également à l'activation de la caspase-1 et à la sécrétion de IL-1 β et IL-18 en partie seulement via AIM2 (480). *In vivo*, les souris incompetentes pour l'autophagie produisent plus de cytokines dans deux modèles de sepsis et cela

sous la dépendance de caspases (480). Ces souris sont également susceptibles à la létalité induite par injection de LPS (480).

Tous ces résultats sont à mettre en parallèle de la théorie d'activation de l'inflammasome Nlrp3 supportée par Jürg Tschopp où un défaut d'autophagie entraîne un défaut de l'homéostasie mitochondriale avec production augmentée de ROS et production de IL-1 β (481, 482).

B. Mécanismes d'activation de l'inflammasome Nlrp3

Depuis la découverte de l'inflammasome Nlrp3 et des pathologies auto-inflammatoires associées à sa mutation, un très grand nombre d'études se sont intéressées aux mécanismes moléculaires de son fonctionnement. La suite de la discussion se propose de parcourir les principales hypothèses mises en avant, leurs atouts comme leurs faiblesses.

1 Présentation des scenarii en hypothèse majeure

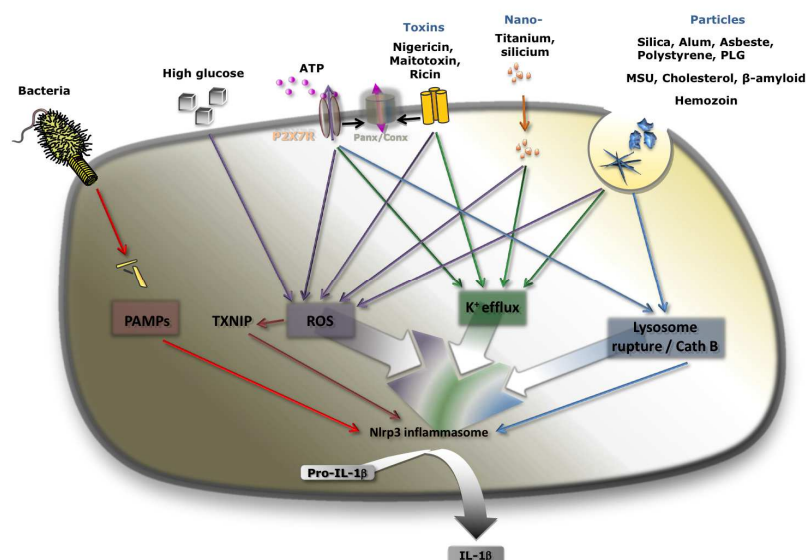


Figure 25 | Activation canonique de l'inflammasome Nlrp3

Ce schéma présente les quatre principales voies de signalisations qui peuvent conduire à la production d'IL-1 β suivant les types d'activateurs employés : liaisons directes de PAMPs, production de ROS, efflux de potassium ou déstabilisation des lysosomes.

Comme indiqué sur le schéma ci-dessus, quatre hypothèses principales sont actuellement à l'étude, aucune mutuellement exclusive.

2 Hypothèse « Entrée de PAMPs »

L'équipe de Gabriel Núñez a postulé en 2007 que dans les cas d'activation de l'inflammasome par des PAMPs (et en rajoutant de l'ATP) ceux-ci devaient accéder au cytoplasme par la Panx-1 puis possiblement se lier physiquement sur Nlrp3 (483).

Les premiers résultats sont basés sur des incubations avec des bactéries Gram⁺ et Gram⁻ tuées par la température ou directement avec toutes sortes de PAMPs puis l'ajout d'ATP. L'activation de la casp-1 nécessite la Panx-1, un hémicannal qui interagit avec le récepteur P2X7 pour faire rentrer les

PAMPs de l'intérieur des endosomes au cytoplasme (483). Un blocage de la maturation des endosomes via la chloroquine empêche l'activation de la casp-1.

Deux types de manipulations, permettant l'accès direct de molécules au cytoplasme, accréditent leur hypothèse : la streptolysine O et le DOTAP.

La streptolysine O (SLO) est une molécule dérivée de *Streptococcus* qui forme des pores membranaires. La SLO permet la pénétration de molécules exogènes dans le cytoplasme de cellules vivantes. L'ajout de SLO à des bactéries tuées permet l'activation de la casp-1 en absence de stimulation par l'ATP ou d'action de la panx-1. Remplacer les bactéries chauffées par du LPS donne les mêmes résultats. L'entrée de PAMPs dans le cytoplasme par des protéines générant des pores entraînent l'activation de l'inflammasome et de la casp-1 (483).

Le DOTAP est formé de lipides cationiques qui permettent l'entrée de molécules dans le cytoplasme de cellules vivantes sans générer de pore (Simberg et al., 2004). Une stimulation avec des bactéries chauffées ou des PAMPs en présence de DOTAP permet l'activation de la casp-1 sans ajouter d'ATP. A noter que le DOTAP seul n'a pas d'effet (483).

Les auteurs avancent l'idée que l'ATP ne serait nécessaire que pour faire rentrer les PAMPs via la Pannexin-1 et appuient cette hypothèse par un second article publié l'année suivante. Le muramyl dipeptide (MDP) est un composant retrouvé chez les bactéries Gram⁺ et Gram⁻. Le NLR Nod2 reconnaît les molécules assimilées aux peptidoglycanes qui contiennent du MDP et active les voies MAPK et NFκB conduisant notamment à la transcription de composés antibactériens et pro-inflammatoire comme la pro-IL-1β (484). Le MDP est internalisé par les macrophages et s'accumule dans les endosomes. L'ajout d'ATP exogène provoque une fuite rapide du MDP des vésicules acides vers le cytoplasme par un mécanisme dépendant de la pannexine-1 (485). Les auteurs avancent l'idée que la stimulation par l'ATP stimule P2X7 qui recrute la pannexine-1, laquelle forme un pore au sein des vésicules qui est essentiel pour l'acheminement du MDP dans le cytoplasme et l'activation de l'inflammasome (485).

L'infection de macrophages par des bactéries intracellulaires vivantes de types *Salmonella*, *Franciscella*, ou *Listeria* induit à l'activation de la casp-1 sans nécessiter d'ajout ATP et également en absence de Nlrp3 (483). Les mêmes souches modifiées pour devenir déficientes dans leurs systèmes de sécrétion, c'est-à-dire qu'elle ne possède plus la capacité de faire pénétrer directement des molécules dans le cytoplasme de l'hôte, n'activent plus la casp-1 sans ajout d'ATP. En l'ajoutant, on retrouve une l'activation de la casp-1, cette fois dépendante de Nlrp3 (483). Ces résultats montrent que des bactéries intracellulaires peuvent induire l'activation de la casp-1 grâce à deux mécanismes distincts. En l'absence de stimulation par l'ATP, un système de sécrétion de type III fonctionnel ou une protéine formant des pores est requise. Lorsque de l'ATP est ajouté, les macrophages infectés activent la casp-1 grâce à l'intervention de la panx-1 et de Nlrp3 et cela même en absence d'un

système de sécrétion fonctionnel ou de protéines formant des pores (483). Il existe donc une redondance des NLRs dans la détection de l'infection par des bactéries.

Les auteurs estiment que leur modèle constitue un parallèle avec les moyens d'activation de la casp-1 d'autres NLRs par les bactéries (485). Les bactéries intracellulaires activent la casp-1 via leurs systèmes de sécrétions de types III/IV et la délivrance de molécules bactériennes comme la flagelline dans le cytoplasme (180). L'activation de la casp-1 est réalisée par Nlrc4 indépendamment du couple P2X7/Panx-1 (180). Par exemple, *Listeria monocytogenes* produit des molécules qui forment des pores afin de permettre au pathogène d'accéder au cytoplasme de l'hôte et *Bacillus anthrax* établit un pore pour y acheminer des molécules bactériennes. Dans les deux cas cela mène à l'induction de la casp-1 (486, 487). Les auteurs concluent que le pore réalisé par le couple P2X7/panx1 après stimulation par l'ATP représenterait une alternative endogène afin de faire entrer dans le cytoplasme des particules bactériennes, comme le MDP, et activer la casp-1 grâce ici à Nlrp3.

En résumé Nuñez et al. postulent que le couple P2X7/panx1 permet le passage de molécules bactériennes à partir des compartiments endosomaux vers le cytoplasme, conduisant à l'activation de l'inflammasome Nlrp3.

Toutefois trois critiques majeures sont à opposer à cette théorie :

- Aucune preuve de liaison de PAMP n'a pour l'heure été établie malgré toutes les recherches sur Nlrp3
- La taille du pore formé par la Panx-1, restreinte aux molécules inférieure à 900 Da, soit bien inférieure à la taille de la majorité des PAMPs
- Il existe de très nombreux cas où l'absence de l'activation de Nlrp3 se réalise en l'absence totale d'implication de PAMPs, nécessitant au minimum plusieurs modes opératoires

En accord avec le troisième point il est à noter que presque toutes les expériences sur les cellules THP1 ne nécessitent pas l'ajout de LPS comme priming mais du PMA. Au sein de ces cellules la rupture physique des lysosomes permet une activation de l'inflammasome, écartant la possibilité d'une intervention des PAMPs (488).

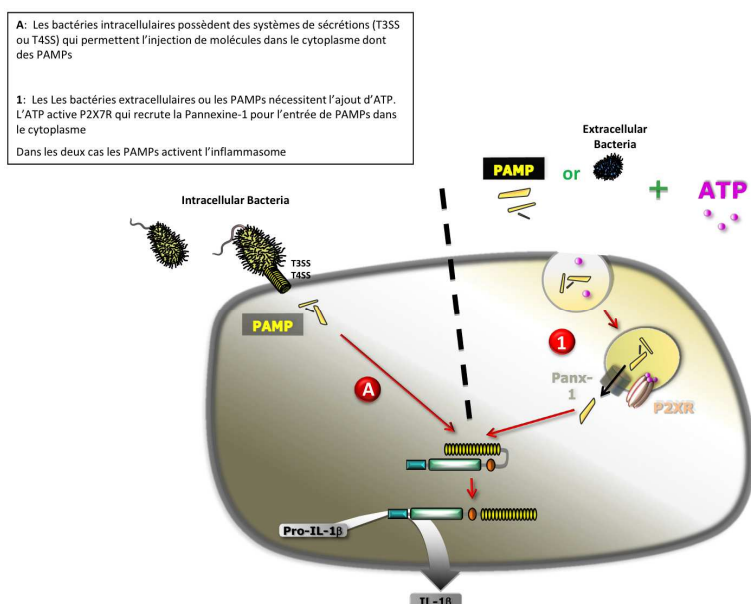


Figure 26 | Modèle d'activation de Nlrp3 par « entrée de PAMPs »

3 Hypothèse « Déstabilisation lysosomale »

Les personnes exposées aux poussières de silice ou d'amiante (asbeste) peuvent développer de graves maladies du poumon. Certaines pathologies comme la goutte ou Alzheimer se caractérisent par la présence d'une accumulation d'entités macroscopiques. La nécessité d'ajout d'adjuvant, comme des particules d'aluminium, en plus de l'antigène dans des préparations destinées à la vaccination était reconnue depuis longtemps mais son action restait inconnue.

Plusieurs études ont beaucoup éclaircies ces constatations *a priori* disparates, misent en lumière par l'activité de l'inflammasome Nlrp3.

Tout commença en 2006 lorsque l'équipe de Jürg Tschopp établit un rapprochement entre la découverte récente de la libération d'acide urique par les cellules mourantes (396) et la connaissance depuis des décennies que l'acide urique se dépose en cristaux dans les articulations de patients atteints de goutte. Ils identifient les cristaux de MSU mais aussi de CPPD (**C**alcium **p**yr**o**phosphate **d**ihydrate), responsable de la pseudo-goutte, comme agents inducteurs de l'inflammasome Nlrp3 à l'origine de l'inflammation observée chez les patients (393). Il s'agit là d'une avancée majeure avec de possibles implications cliniques directes. D'autres particules testées, le diamant, le zymosan et étonnamment l'hydroxyde d'aluminium n'activent pas Nlrp3. Les auteurs arguent que la production de IL-1 β par l'inflammasome Nlrp3 est restreinte aux particules pathogéniques (393).

La source d'Alum utilisée dans l'article précédent (393) n'est pas mentionnée et l'hétérogénéité des préparations peut expliquer en partie leur résultat. Cependant, l'année suivante une autre équipe montre que trois différents Alum commerciales activent la caspase-1 et induisent les

productions de IL-1 β et IL-18 matures (402). Par ailleurs, ils notent que l'Alum en poudre utilisé aux mêmes concentrations ne stimulent pas la production de IL-1 β . La manière dont la caspase-1 est activée n'est pas mentionnée et l'hypothèse de Nlrp3 est écartée. Les auteurs supposent que l'action de la caspase-1 oriente plutôt vers la voie Th1 comme dans cas du MSU et qu'elle ne serait pas impliqué dans la réponse Th2 à l'Alum (402).

Conservant l'hypothèse de pathogénicité des activateurs particuliers de Nlrp3, l'équipe de Tschopp identifie l'asbeste et la silice. D'autres pourtant comme les résidus des pots d'échappement diesels, les condensés d'extraits de cigarette et les billes inertes en polystyrène n'ont pas d'effet activateur de l'inflammasome (394). Cherchant à mieux comprendre les mécanismes par lesquels l'inflammasome Nlrp3 peut s'activer, ils montrent la nécessité de phagocytose des particules, comme celle d'un efflux de potassium ou de production de ROS (394). Les activateurs non particuliers ne nécessitent pas la présence d'un réseau d'actine fonctionnelle et la non-accumulation de IL-1 β mature dans le cytoplasme dans ces cas permet d'écarter le rôle de ce cytosquelette dans son excrétion (394).

Le rôle de l'inflammasome Nlrp3 dans les propriétés immuno-stimulatrices de l'Alum fut publié moins de trois semaines plus tard par l'équipe de Richard Flavell et leurs résultats indiquent également une nécessité de phagocytose (111). Dans un modèle d'asthme allergique en présence de l'alum comme adjuvant, les auteurs allouent un rôle majeur à l'inflammasome Nlrp3, indépendamment de la production endogène d'acide urique (111). Cette découverte sera totalement remise en question par les travaux de Bart Lambrecht. Son équipe a récemment publié *in vivo* un rôle de l'alum qui passait par une production d'acide urique endogène, agissant indépendamment de Nlrp3 (114).

Allant plus loin que la simple nécessité de phagocytose, l'hypothèse « déstabilisation des lysosomes » fut en premier émise par Eicke Latz en 2008 (488). Comme précédemment accepté son équipe montre que l'activation de l'inflammasome Nlrp3 en réponse aux particules MSU, Silice et alum nécessite leur internalisation par l'intermédiaire du cytosquelette. Plusieurs expériences cherchent à comprendre le devenir et les conséquences de l'internalisation de ces particules. Les vésicules d'endocytose contenant les particules fusionnent avec les lysosomes. Leur découverte principale est la mise en évidence que les lysosomes chargés en particules perdent leur intégrité et vident leur contenu dans le cytoplasme (488). L'internalisation des particules aboutit à une perte globale de quantité de lysosomes dans la cellule. Ces organites contiennent une pléthore d'enzymes protéolytiques, la plupart nécessitant l'environnement acide des lysosomes pour être active. Le blocage de l'acidification empêche la production de IL-1 β en réponse aux particules mais pas par l'activateur soluble ATP (488). Parmi les enzymes, la cathepsine B libérée est active et est une des plus importantes dans la réponse aux cristaux. Elle se retrouve également dans le surnageant des cellules ayant été en contact avec des cristaux (488). Il fut montré que la seule rupture physique ou

chimique des lysosomes conduisait à l'activation de l'inflammasome Nlrp3 et la production par la cellule de IL-1 β , sans ajout d'un quelconque cristal mais toujours en partie sous la dépendance de la cathepsine B (488). Au final, il apparaît que le phagocyte reconnaît la lésion de ses lysosomes comme un signal de danger endogène et permet en conséquence l'activation de l'inflammasome Nlrp3.

Depuis, outre le MSU, deux autres agents particuliers endogènes pathogéniques suivraient la même voie, les protéines β -amyloïde et les cristaux de cholestérol.

La maladie d'Alzheimer est un désordre neuro-dégénératif caractérisé par une mort neuronale intense et une démence progressive. Il est généralement accepté que l'accumulation extracellulaire de protéine fibrillaire β -amyloïde sous forme de plaques séniles constitue le principal inducteur de la maladie (489). Sa présence entraîne une activité fortement pro-inflammatoire des cellules microgliales. Les neurones sont très peu sensibles à ces agrégats, en revanche la co-incubation avec des cellules microgliales conduit à leur forte mortalité, signifiant le rôle prépondérant de la microglie dans ce processus.

Les cellules microgliales internalisent les fibres par un mécanisme de « phagocytose frustrée » avec déstabilisation et fuite du contenu lysosomal dont la cathepsine B (489). Cette enzyme serait en partie responsable de l'activation de Nlrp3, la maturation de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 β mature. L'inflammation, dont les productions de NO, de TNF et de chimiokines, est sensiblement amoindrie en absence de l'inflammasome ou de la voie de signalisation de IL1-R1 (489).

Une alimentation trop riche associée à une prédisposition génétique peut conduire à l'athérosclérose. Elle se caractérise notamment par le dépôt de cholestérol sous forme cristalline qui obstrue les vaisseaux sanguins en formant des plaques d'athérome. A l'inverse de ce qui est était supposé auparavant, dès les stades initiaux de la maladie il y a apparition concomitante de cellules inflammatoires et de petits cristaux de cholestérol (490). *In vitro*, ces cristaux sont capables d'activer l'inflammasome Nlrp3 par un mécanisme qui dépend de leur phagocytose, de la rupture des lysosomes et de leur translocation dans le cytoplasme. L'inhibition de l'acidification des lysosomes ou la déficience en cathepsines B ou L diminuent sensiblement la production de IL-1 β (490). *In vivo* les rôles de l'inflammasome Nlrp3 et des cathepsines dans le développement de l'athérosclérose sont démontrés. Il apparaît notamment que ce sont les cellules hématopoïétiques et non les cellules du parenchyme qui sont principalement à l'origine de l'athérosclérose (490).

A noter qu'un rôle de la libération des cathepsines dans des pathologies articulaires est proposé, et cela indépendamment de l'inflammasome (491). L'ajout d'ATP *in vitro* entraîne dans les 5 minutes l'activation de P2X7, un influx de calcium, un phénomène d'alcalinisation, une exocytose des lysosomes sécrétoires et une libération de cathepsines actives dont principalement la cathepsine B. L'incubation en forte concentration extracellulaire en potassium ne modifie pas l'excrétion des

cathepsines (491). L'alcalinisation serait responsable de la déstabilisation des lysosomes et de la fuite du contenu dans le cytoplasme puis son excrétion (491).

Un inhibiteur de la cathepsine B intracellulaire très souvent utilisé, le CA074Me, est également capable d'inhiber l'activation de Nlrp1 par la toxine létale de *B. anthracis* (492). Soit l'inhibiteur n'est pas très spécifique, soit la cathepsine B joue aussi un rôle dans l'activation de Nlrp1. Alors le modèle « déstabilisation des lysosomes » n'est pas réservé au seul Nlrp3 et donc explique difficilement la spécificité (même relative) d'activation.

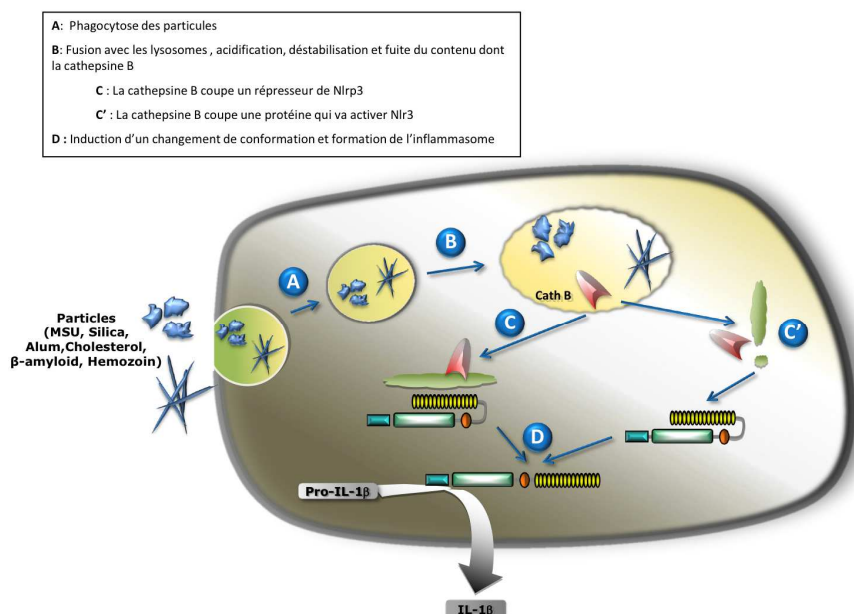


Figure 27 | Modèle d'activation de Nlrp3 par « déstabilisation des lysosomes »

4 Hypothèse « ROS »

L'hypothèse de l'intervention critique de substances oxygénées réactives (ROS) est menée par l'équipe de Jürg Tschopp, malheureusement décédé tragiquement début 2011. Ce chercheur atypique s'est très tôt intéressé au rôle des ROS dans l'activation de l'inflammasome. Depuis, il a été montré que presque tous les activateurs connus de l'inflammasome Nlrp3 génèrent des ROS et que leur inhibition bloque cette activation (Cf. **tableau 4**)

Les ROS sont des radicaux libres contenant un atome d'oxygène. Elles incluent le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyde ($OH^{\cdot}$). Ces molécules sont hautement réactives, dû à la présence d'un électron non apparié. Elles sont avides d'électrons qu'elles capturent sur d'autres molécules en les oxydant. Les ROS apparaissent principalement en tant que résidu du métabolisme de l'oxygène au sein de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie (493). Les ROS sont également générés par l'activité d'enzymes cellulaires telles que les NADPH oxydases, les xanthines oxydoréductases, les lipoxygénases et les cyclooxygénases.

La production cellulaire de ROS régule plusieurs réponses physiologiques importantes, tels que l'angiogenèse, le contrôle du tonus vasculaire, la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation et la migration. Alors que les ROS sont également important pour la signalisation cellulaire (phénomène connu sous le nom de signalisation redox), la production soutenue de ROS peut causer des dommages cellulaires. Pour empêcher ce stress plusieurs enzymes présentent des activités antioxydantes, incluant la thiorédoxine (TRX), les superoxydes dismutases, les peroxydases et catalases, qui toutes sont impliquées dans la neutralisation des ROS. Un équilibre rompu entre la formation des ROS et la capacité de détoxifier ces radicaux oxydants peut produire un état qualifié de stress oxydatif. Le stress oxydatif joue un rôle important dans des processus pathologiques comme le vieillissement, l'hypertension, l'athérosclérose, le cancer, l'ischémie, les maladies neuro-dégénératives et les diabètes (494).

Dès 2007, dans un article pourtant dévolu à la nécessité de l'efflux de potassium, Tschopp et al. montrent que l'activation de l'inflammasome Nlrp3 par différents types d'agonistes est dépendante de la production de ROS (495). Il dit s'intéresser à leur implication possible pour plusieurs raisons. Ils constituent dans l'évolution un des plus anciens signaux émis après phagocytose de micro-organismes ou de particules. La toxicité des fibres d'asbeste est corrélée à leur niveau de production de ROS. Enfin, il rapporte que l'activation de Nlrp3 par l'ATP est dépendante des ROS (496). En 2008 le modèle de Tschopp accrédite l'hypothèse de la production de ROS par la NADPH oxydase comme importante dans l'activation de l'inflammasome Nlrp3 en réponse aux particules de silice ou d'asbeste (394). Toutefois la NADPH oxydase est un complexe multienzymatique avec probablement certaines redondances. Une autre équipe montra que l'utilisation de cellules déficientes pour une sous-unité de NADPH oxydase ne modifie pas la réponse face au MSU et à la silice, ce qui leur permet d'éliminer le rôle des ROS produits par cette sous unité (488).

A la place de la détection de PAMPs/DAMPs *per se*, l'inflammasome Nlrp3 serait activé par des ROS générés par les cellules en réponse au stress cellulaire. Les ROS seraient nécessaires mais pas suffisants car il existe de nombreuses situations pour lesquelles il y a production de ROS mais pas d'activation de l'inflammasome. Cherchant à mieux comprendre leur implication, l'équipe de Tschopp s'intéressa à l'oxydoréductase TRX. A l'état basal la TRX est maintenue inactive par la TXNIP (**thioredoxin-interacting protein**). TXNIP interagit directement avec le domaine redox de TRX réduite et qui fonctionnerait comme régulateur négatif de l'activité réductase de TRX

La TRX se détache de son partenaire TXNIP lorsque la concentration en ROS intracellulaire augmente. La TRX libérée réalise son action de détoxification des ROS. Il fut montré que lorsque TRX est sous-exprimée, il s'ensuit une augmentation de la production de IL-1 β en réponse à des particules (394). En 2010, l'équipe dirigée par Tschopp met en évidence une liaison physique TXNIP/Nlrp3 et ceci en réponse à des agonistes particuliers (MSU) ou soluble (R-837) (197). La protéine TXNIP possède la capacité de se fixer sur les domaines NACHT et LRR de Nlrp3. Elle ne se

lie pas aux autres NLRs ni aux autres protéines contenant des LRRs testés, suggérant son interaction spécifique avec Nlrp3 (197).

L'utilisation de cellules déficientes en TXNIP ou la diminution de sa production conduits à la diminution de la quantité d'IL-1 β produite en réponse aux activateurs Nlrp3 ATP, MSU, silice, alum, R-837 (197). Il n'y a pas de différence avec des activateurs de Nlrc4 ou AIM2. *In vivo*, l'inflammation résultant de l'injection de cristaux de MSU est également fortement diminuée chez les souris TXNIP-/- (197). Toute une série d'expériences tend à montrer que le couple TXNIP/Inflammasome Nlrp3 joue un rôle crucial dans le diabète de type II et la production de IL-1 β par les cellules β -pancréatiques en réponse à la production de ROS consécutive à l'hyperglycémie (197). A noter l'association TXNIP et diabète de type II fut précédemment établi, sans faire le lien avec la production de IL-1 β (497).

En résumé cela suggère un modèle dans lequel TXNIP est libérée de TRX après oxydation de TRX par des ROS, ce qui permet à TXNIP de se lier à l'inflammasome et de l'activer.

Jürg Tschopp relie la production de ROS à un phénomène plus global qu'il qualifie de « stress métabolique » (498). En compagnie de deux de ses collaborateurs, il propose que l'inflammasome Nlrp3 ne soit pas seulement capable de détecter des PAMPs/DAMPs mais également des stress métaboliques. Il prend pour exemple deux pathologies : le diabète de type II (T2DM) et la goutte (498).

Le T2DM se manifeste lorsque les cellules β -pancréatiques échouent à compenser une trop forte glycémie. Chez les sujets sains, l'insuline est l'hormone qui permet d'internaliser le glucose dans les cellules, rendant l'hyperglycémie postprandiale physiologique et transitoire. Les patients atteints de diabète ont développé antérieurement une résistance à l'insuline de façon asymptomatique, avec maintien de l'hyperglycémie. Le glucose à trop forte concentration possède des effets néfastes. Les mécanismes qui initient la résistance à l'insuline puis le développement de la maladie ne sont pas complètement compris. L'inflammation locale au niveau des îlots pancréatiques est impliquée. Elle se caractérise par une infiltration de cellules et une production locale de cytokines qui accompagnent les étapes précoces de la maladie (499). L'inflammation locale, couplée aux effets toxiques du glucose, accélèrent la perte des cellules sécrétrices d'insuline et diminue la capacité des cellules- β pancréatiques restantes à sécréter de l'insuline (500).

L'expression de l'IL-1 β est élevée dans la circulation et au sein des îlots pancréatiques pendant la phase de progression allant de l'obésité au T2DM. IL-1 β fut montré comme un acteur important dans la pathologie (501). Les cellules β -pancréatiques humaines et murines, pourtant non myéloïdes, possèdent les trois composants de base de l'inflammasome (Nlrp3, ASC, et caspase-1) (197) et produisent de l'IL-1 β (502). Pour nouer la boucle, ces cellules expriment fortement le récepteur IL-1R1 (503). Bien que la quantité d'IL-1 β produite soit proportionnellement inférieure à

celle des macrophages, celle-ci suffit pour une signalisation autocrine claire sur la viabilité et sur la capacité sécrétrice de l'insuline, laquelle peut être bloquée par des antagonistes de l'IL-1 β . La production basale d'IL-1 β est physiologique notamment sur la prolifération des cellules β -pancréatiques. Cependant, l'exposition chronique à de fortes teneurs de glucose inhibe la production d'insuline et induit une mort cellulaire d'une façon dépendante de IL-1 β (502). L'IL-1 β , élevée au niveau des îlots, diminue la production d'insuline et induit une apoptose Fas dépendante (502).

L'idée que l'inflammasome NLRP3 puisse être activé par des voies de stress métaboliques est renforcée par les études réalisées sur la goutte. La goutte est liée à une dérégulation du métabolisme des purines, menant à une concentration élevée en acide urique dans le sang et à un dépôt de sa forme cristalline, le MSU, au sein des articulations. Ces cristaux sont responsables de l'inflammation et de la douleur articulaire des patients. Le lien MSU/Nlrp3/IL-1 β est connu depuis 2006 (393). De la même manière que l'activation de l'inflammasome par le glucose, la production d'IL-1 β par les cristaux de MSU est influencé par l'activité de la TRX (394).

Les derniers travaux de l'équipe de Tschopp semblent écarter le rôle de la NADPH oxydase dans la formation des ROS. La source principale de ROS cellulaire est d'origine mitochondriale, notamment favorisée par certaines sources métaboliques et l'hypoxie (504). Afin d'éviter les dommages cellulaires, les mitochondries qui produisent trop de ROS sont en permanence éliminées par mitophagie, une spécialisation de l'autophagie (505). L'inhibition de la mitophagie conduit à l'accumulation de mitochondries endommagées fortement génératrice de ROS et activatrice de l'inflammasome NLRP3 (481). Le blocage des enzymes clés des complexes I ou III de la chaîne respiratoire mitochondriale permet d'augmenter artificiellement la production de ROS. Un autre moyen consiste à bloquer la mitophagie par addition de 3-méthyladenine (3-MA). Dans les deux cas l'augmentation des ROS est à mettre en parallèle avec la quantité de IL-1 β produite via l'inflammasome NLRP3 (481). L'inhibition de l'autophagie augmente la quantité de IL-1 β produite en réponse au MSU ou à la nigéricine et n'est pas corrélée à une augmentation de la mort cellulaire (481).

Les ROS ont une durée de vie courte et signalent à courte distance (506). Sur les 22 NLRs, seul NOD5 (NLRX1) serait mitochondrial. Cependant il apparaît que NLRP3 et ASC activés iraient se localiser près des structures regroupant réticulum endoplasmique (RE) et mitochondries (481). A l'état latent, NLRP3 se localise au niveau du cytoplasme et en particulier proche du RE. Après stimuli activateurs, ici testés MSU, alum et nigéricine, NLRP3 et sa protéine adaptatrice ASC se redistribuent au niveau de l'espace périnucléaire. Ces protéines se colocalisent avec des structures regroupés sous le terme de MAM (Mitochondria-associated ER membranes) c'est à dire regroupant du RE et des mitochondries (481). En accord avec les données précédentes (197, 507), inflammasome activé et TXNIP se colocalisent au niveau des mêmes structures, MAMs/mitochondries (481).

La synthèse de ROS et l'activation de l'inflammasome en réponse à de multiples signaux sont supprimées lorsque les canaux anioniques voltage dépendant VDAC1 ou VDAC3 de la mitochondrie sont inhibés. Les VDACs sont les canaux échangeurs d'ions et de métabolites entre la mitochondrie et les autres compartiments dans le RE les plus importants (508). L'activité de VDAC est régulée par l'hexokinase et des membres de la famille Bcl-2 (508). La surexpression de Bcl-2 anti-apoptotique conduit à la fermeture partielle de VDAC, avec diminutions concomitantes des ROS et du calcium mitochondriale. Chez les souris surexprimant Bcl2, il s'opère une diminution de la production de IL-1 β en réponse à MSU, alum ou nigéricine mais pas de l'activateur Nlrc4 salmonelle (481)

Une autre équipe publia un article montrant que l'activation de la caspase-1 en réponse à LPS/ATP est dépendante de la production de ROS d'origine mitochondriale (480). L'activation de la casp-1 est diminuée chez les macrophages déplétés en ADN mitochondrial (ADNmt). L'ADNmt est transloqué dans le cytoplasme grâce à l'augmentation de la perméabilité mitochondriale (MPT) et ceci est favorisé par l'absence d'autophagie (480). L'augmentation de l'activité de la casp-1 au sein des cellules sans autophagie nécessite l'activation de l'inflammasome Nlrp3. Cet inflammasome est également nécessaire pour la MPT et ensuite la translocation du mtDNA dans le cytoplasme (480).

Le blocage des ROS produits par la mitochondrie en réponse à LPS/ATP bloque le transfert cytoplasmique de mtDNA et l'activation de la caspase-1. La production mitochondriale de ROS est certainement la conséquence de l'activation de P2X7 par l'ATP. L'ATP a été montré comme inducteur de dommages mitochondriaux (509).

En revanche, le blocage des ROS mitochondriaux ne bloque pas la sécrétion d'IL-1 β en réponse à LPS/MSU. Les auteurs rapportent que les particules cristallines comme l'asbeste, la silice et le MSU activent l'inflammasome en partie grâce à la production de ROS induite par les NADPH oxydase phagocytaire (197, 394) ce qui n'est approuvée par toutes les études (488).

Ainsi, bien qu'il apparaisse une certaine nécessité de ROS pour l'activation de l'inflammasome Nlrp3, les sources peuvent être multiples. En clinique, ses mutations engendrant des dommages mitochondriaux ou une dérégulation de la mitophagie sont associées à la maladie de Crohn (510) et à une forme récessive de la maladie de Parkinson (511).

A rebours de tout ce qui a été dit, Eicke Latz rapporte que les cellules de patients atteints de granulomatose chronique (CGD) portent des mutations dans les gènes codant pour les NADPH oxydases (512). Leurs phagocytes ne peuvent générer ni anion superoxyde ni dérivés métaboliques, ce qui les rend plus susceptibles à certaines infections bactériennes ou de champignons. Les patients présentent fréquemment des lésions inflammatoires, tels que des colites chroniques ou des symptômes de type lupus (513). Cette dernière caractéristique pourrait être liée à la découverte récente que les

phagocytes de ces patients possèdent un inflammasome hyperactif et une surproduction basale de IL-1 β (514). Cela impliquerait que les ROS provenant de NADPH oxydases bloqueraient plutôt que favoriseraient l'activation de la caspase-1. A l'inverse, le même groupe démontra que les macrophages SOD1 déficients, qui échouent à détoxifier les superoxydes et présentent donc des niveaux de ROS supérieurs, sécrètent beaucoup moins de IL-1 β en condition inflammatoire. *In vivo*, les souris déficientes en SOD1 comme celles déficientes en Casp-1 sont fortement résistantes au choc endotoxique (515). Ainsi les ROS peuvent avoir un effet inhibiteur de l'inflammasome.

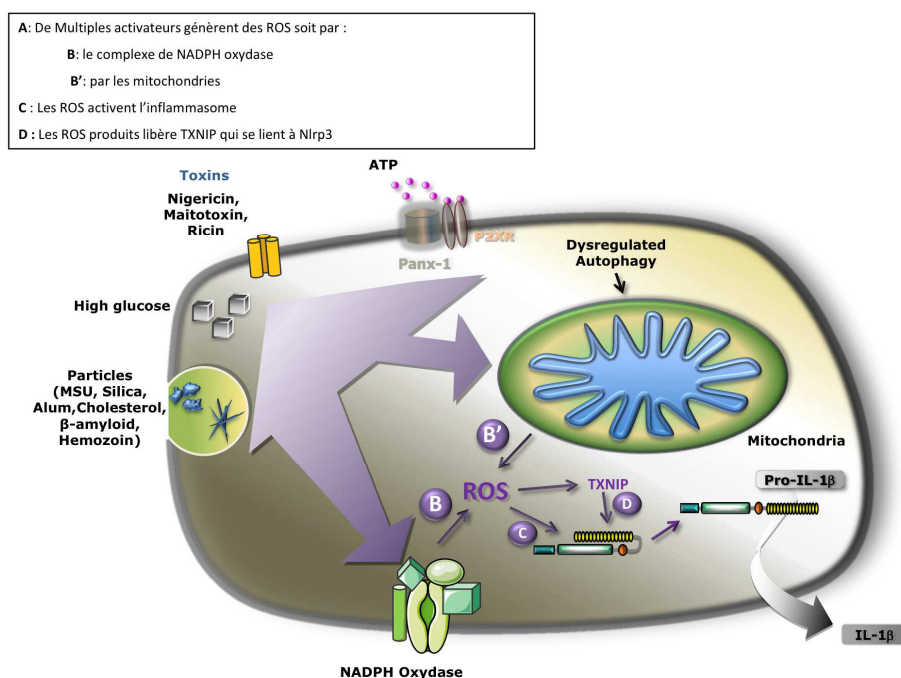


Figure 28 | Modèle d'activation de Nlrp3 « production de ROS »

5 Hypothèse « Potassium et Gonflement »

L'hypothèse de la nécessité d'un efflux de potassium préalable à l'activation de Nlrp3 a été également proposée par Jürg Tschopp. En 2007, deux modèles d'activations étaient pour l'heure sujets d'études. Soit une liaison directe des activateurs, soit un changement ionique intracellulaire qui induirait un changement de conformation d'un composant de l'inflammasome qui conduirait à l'activation de ce dernier (495). Selon lui, l'hypothèse ionique est supportée par des évidences expérimentales. Il y a plusieurs années, l'ATP et la nigéricine ont été montrés comme étant des activateurs de la casp-1 par un mécanisme dépendant du potassium (516, 517). Or, ces mêmes molécules ont tout récemment été montrées comme activatrices de l'inflammasome (518). Tschopp fait le lien entre le deux et expliquent « *we became interested in investigating the possibility that all known signals that activate the NALP3 inflammasome act by inducing intracellular K⁺ efflux, thus explaining why seemingly unrelated molecules can activate the same inflammasome* » (495).

Son équipe montre que l'activation des inflammasomes Nlrp1 et Nlrp3 mais pas Nlrc4 est inhibée lorsque l'efflux de potassium est empêché par l'addition d'un excès de potassium dans le

milieu de culture (495). En effet, l'ajout de KCl à 130mM dans le milieu de culture bloque la production de IL-1 β Nlpr3-dépendente par des macrophages primés au LPS puis stimulés par R837, MSU, nigéricine, ATP et la bactérie *Escherichia coli*. L'ajout de KCl bloque également la réponse de l'inflammasome Nlrp1 par la toxine létale de *Bacillus anthracis*. L'activation de Nlrc4 par *Salmonella typhimurium* n'est pas modifiée par l'addition du KCl même à plus forte concentration (495).

Il se produit une activation spontanée de la caspase-1 lorsque les lysats cellulaires sont incubés dans un milieu contenant moins de 70mM de K⁺. Cette auto-activation de la caspase se réalise d'une manière dépendante de la protéine ASC, protéine intervenant effectivement dans la formation des inflammasomes Nlrp1 et Nlrp3 mais pas Nlrc4 (495).

Pour étudier si la forte concentration en potassium affecte l'assemblage de l'inflammasome, ASC fut immunoprécipité en absence ou présence de 130mM K⁺. Aucune casp-1 n'est « pull-down » avec 130mM de potassium. Donc, une concentration intracellulaire physiologique en potassium bloque le recrutement de la casp-1 sur ASC, possiblement à cause d'une inhibition de l'oligomérisation de NLRP3 (495).

Contrairement à l'étude précédente (495) les macrophages utilisés par Franchi et al. infectés dans des conditions similaires par *Escherichia coli* ne permettent pas la production de IL-1 β sans ajout d'ATP exogène (486). Les auteurs expliquent que l'ajout d'agonistes TLRs ou l'infection par des bactéries extracellulaires (*Staphylococcus aureus* ou *Escherichia Coli*) doit s'accompagner de l'ajout d'ATP essentiel à l'activation de la caspase-1. A l'opposé, la détection cytosolique de la flagelline ou l'ajout de bactéries intracellulaires (*S. typhimurium* ou *L. monocytogenes*) entraînent une activation de la caspase-1 sans ajout d'ATP exogène et sans nécessité de déplétion de K⁺.

L'ajout d'un excès de potassium extracellulaire ne bloque pas l'activation de la caspase 1 en réponse aux bactéries intracellulaires *Salmonella typhimurium* (dépendant de Nlrc4) ou *Listeria monocytogenes* (dépendant de et Nlrp3 et AIM2 (519)). A l'inverse, l'infection par *Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus* suivie d'un milieu riche en K⁺ empêche l'activation de la caspase-1 (486). Une infection par la *Salmonelle* ne modifie pas la concentration intracellulaire en potassium. Une forte concentration en potassium extracellulaire ne modifie pas l'activation de la casp-1 ni la quantité de IL-1 β dans le surnageant. Par contre un mutant *salmonelle* déficient en flagelline n'est plus en capacité d'activer la casp-1 en absence d'ATP. Une stimulation par de l'ATP à 5mM induit une forte déplétion en potassium maximum et stable de 20min à une heure (486). Les auteurs montrent que P2X7, supposé essentiel à l'efflux de potassium suite à la stimulation par l'ATP, n'a aucun rôle dans l'activation de la caspase-1 en réponse aux bactéries intracellulaires mais n'apportent aucune indication précise sur la réponse aux bactéries extracellulaires, où ici cet apport d'ATP est pourtant indispensable (486).

L'absence de nécessité de P2X7 et d'une déplétion en potassium pour l'activation de la casp-1 en réponse à des bactéries intracellulaires suggère que la détection cytosolique des ces micro-organismes est suffisante pour l'activation de l'inflammasome. En ligne avec cela, l'internalisation de flagelline purifiée induit une activation de la casp-1 via Nlrc4, lequel est indépendant de la concentration intra-cytoplasmique en potassium et non affecté par une incubation des cellules dans un milieu contenant une forte concentration en potassium. A noter que la présentation de ce modèle possède de nombreux points communs avec le modèle « entrée de PAMPs », ce qui n'est pas très étonnant puisque provenant tout deux de l'équipe dirigée par G. Núñez.

Une étude plus récente s'est intéressée de nouveau au rôle du potassium dans l'activation de l'inflammasome par des bactéries (520). Les auteurs indiquent que la présence de bactéries intracellulaires est connue pour être détectée par le Nlrc4 grâce à la flagelline. Ces bactéries doivent être transloquées dans le cytoplasme de l'hôte, souvent grâce à l'intervention du système de sécrétion de type III (TTSS) (180, 521). Cependant, une forme mutante de cette bactérie ne possédant pas de flagelline est montrée comme encore capable d'activer Nlrc4 d'une manière dépendante du TTSS (27). S'intéressant au mécanisme permettant à *P. aeruginosa* d'activer Nlrc4 en absence de flagelline les auteurs montrent que celui-ci est dépendant de la concentration en potassium (520). Ils ont également découvert qu'il en allait de même pour les formes flagellés de *P. aeruginosa* et *S. typhimurium* (520). Toutefois, les concentrations nécessaires en potassium extracellulaires sont plus élevées que celle qui avaient été rapportées comme effective pour bloquer Nlrp3, pouvant expliquer pourquoi d'autres groupes avaient conclu l'indépendance de Nlrc4 par rapport à la concentration en potassium (486, 495).

A noter que les auteurs de cet article n'ont trouvé aucune évidence de la formation de pore membranaire suite à l'infection cellulaire de *P. aeruginosa*. Contrairement à l'activation de Nlrp3 par l'ATP, l'efflux de potassium suite à l'infection n'a été observé que dans une minorité de cellules isolées et dans ce cas la concentration dans le surnageant totale n'est pas modifiée. Il est également important de noter que la perte cellulaire en potassium seule n'est pas suffisante à l'activation de Nlrc4, car pour certaine souche comme *pseudomonas* PAO1 la présence de flagelline est absolument indispensable (522).

Au final l'efflux de potassium, comme la production de ROS, semble être nécessaire mais non suffisant. Cet efflux serait ubiquitaire, consécutif à l'activation de P2X7, à l'infection par des bactéries, par utilisation directe de toxines bactériennes ou par des cristaux. Il est non restreint à l'inflammasome Nlrp3. La première publication sur un inflammasome (Nlrp1) utilisait déjà des extraits cellulaires en conditions hypotonique et notait son activation spontanée (154).

Par ailleurs l'efflux de potassium a été montré comme essentiel à la formation de l'apoptosome (523), une plateforme moléculaire cytoplasmique qui présente de nombreuses homologues avec l'inflammasome. La diminution de la concentration intracellulaire en potassium est

une étape précoce essentielle à l'assemblage de l'apoptosome, après la libération de cytochrome C par les mitochondries. L'efflux de potassium contrôle l'activation de la casp-9 via Apaf-1 (524).

Une étude sur le mode d'action de MSU apporte une information intéressante. Les cristaux de MSU sont très riches en sodium. Après internalisation, l'acidification des lysosomes des phagocytes conduit à la libération de ce sodium et ainsi à une forte augmentation de l'osmolarité intracellulaire. Par compensation il se produit une entrée d'eau par des aquaporines, donnant un aspect gonflé caractéristique. Les auteurs estiment que c'est la dilution ainsi réalisée de la concentration intracellulaire en potassium, et pas un réel efflux de potassium, qui permet de descendre sous le seuil nécessaire pour l'activation de l'inflammasome (525).

Bien que le mécanisme semble spécifique aux cristaux riches en sodium, le gonflement (« *swelling* ») des cellules est une caractéristique précoce bien connue lors de l'apoptose et de la stimulation transitoire par une forte concentration en ATP. Pablo Pelegrin s'intéresse fortement au « *swelling* » des cellules et estime qu'il pourrait s'agir d'un mécanisme assez général permettant d'expliquer l'activation de Nlrp3 (conversation personnelle).

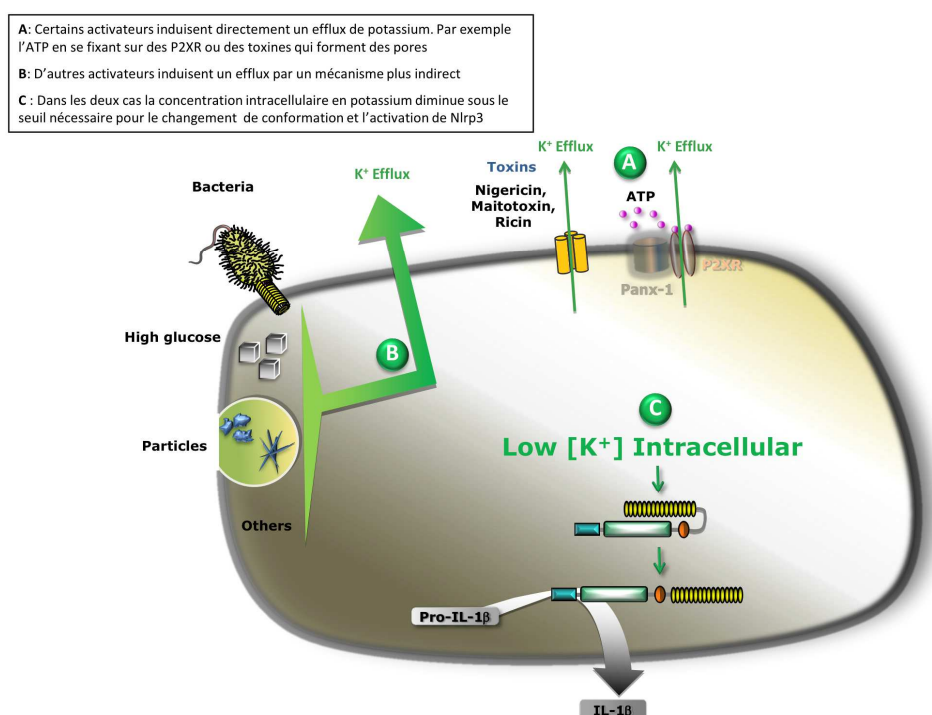


Figure 29 | Modèle d'activation de Nlrp3 « efflux de potassium »

6 QUID

Les paragraphes ci-dessus citent certains des chercheurs les plus impliqués selon moi dans telle ou telle hypothèse. Bien sûr je ne prétends pas parler en leur nom et il est fort probable que chacun d'eux s'intéresse aux hypothèses de travail des autres, parfois pour les contredire

La nomination permet une meilleure assimilation. Aucun postulat n'est sans doute vrai sans le recours des autres et les voies se recoupent sur bien des points. Les cristaux induisent un efflux de potassium et la forme inachevée de « phagocytose frustrée » est associée à la production de ROS (526). Il est possible que l'efflux de potassium régule la production de ROS (498).

A l'inverse on peut trouver de multiples exemples de travaux qui ne reproduisent pas les modèles précédemment publiés. Il fut montré que les cellules déficientes en cathepsine B répondaient parfaitement à MSU, silice et alum tout comme en présence d'une l'inhibition de l'acidification des lysosomes (527). Le rôle des ROS, en tout cas ceux produit par la NAPH oxydase, est aussi remis en question (488) et Veit Hornung a récemment relancé complètement le débat sur le rôle des ROS (528). Ses résultats montreraient que ces substances réactives seraient fondamentales et spécifiques pour le 1^{er} signal, l'induction de la synthèse de pro-IL-1 β et de Nlrp3. Son équipe rejette toute implication des ROS des l'étape d'activation de l'inflammasome Nlrp3 (528). Ceci me paraît difficile à comprendre au regard des articles précédents, lorsque par exemple les inhibiteurs de ROS sont ajoutés après l'étape d'induction et qu'ils bloquent pourtant l'activation de Nlrp3 ou encore sur les cellules THP1, souvent « primées » la veille avec du PMA.

Concernant la validité du modèle « entrée de PAMP », les expériences de surexpression de Nlrp3 au moyen d'un vecteur viral au sein d'une lignée préalablement immortalisée de macrophages apportent des informations précieuses. La stimulation de ces cellules par le LPS ne permet pas l'activation de la caspase-1, reposant la question d'une possible reconnaissance directe de PAMPs par Nlrp3. Cependant, les seules stimulations soit par l'ATP soit par la nigéricine sont maintenant suffisantes pour l'activation de la caspase-1, sans priming (529).

Selon moi, certains articles publiés mentionnant des rôles activateurs de l'inflammasome de divers composés ne sont pas sans reproche. Souvent les auteurs ont eu besoin de rajouter de l'ATP pour activer la caspase-1 et produire la forme mature d'IL-1 β . Il me semble alors que leurs activateurs n'ont principalement induit que le premier signal, synthèse de pro-IL-1 β et Nlrp3. Notamment plusieurs travaux de l'équipe de G. Núñez, qu'en aucun cas je réfute mais que je préfère prendre avec précautions quant au message, surtout aux vues de l'hypothèse qu'il défend. Ceci est vrai aussi pour le zymosan et le mannane, PAMPs de champignons (530) et pour le polyI:C, analogue des ARN viral double brin (531).

D'une manière générale, je suis assez prudent quant à l'action activatrice spécifique de bactéries sur l'inflammasome Nlrp3 (531) et je préfère ne pas trop en parler. Il faut notamment prendre en compte l'inflammasome AIM2, capable de reconnaître l'ADN cytoplasmique sans grande spécificité d'origine (171).

Le tableau ci-dessous tente une synthèse non exhaustive de la littérature sur l'inflammasome Nlrp3, en se basant sur le critère de la production d'IL-1 β .

Known Activators		Nature		Canonical triggering				Other		
Particules	PAMPs	DAMPs	Other	Phagocytosis	Lysosome Destab	ROS production	K ⁺ efflux	Uric Acid	ATP release	Panx-1
Abeste										
Alum Hydroxyde	micro		adjuvant	✓ (9,21)	✓ (3,24,25)	X (21)	✓ (9)	X (2,3), ✓ (5)		
Amphotericin B	micro		anti fungal drug	X (36)	X (36)	X (36)	✓ (2,4,24)			X (2,4)
ATP		metabo		X (3,7,13)	X (3,13, 35)	✓ (523)	X (3, 35) ✓ (8, 11,17,18)			X (36)
dying cells (Autophagic)		cell death		✓ (32)			✓ (8, 35)			✓ (16, 17, 35)
β -amyloid protein		patho		✓ (13)	✓ (13)		✓ (32)			✓ (32)
β -glucan	fungus						✓ (14)			✓ (1)
7-bromindirubin-3'-oxime (7BIO)		inh respiratory chain		X (34)	X (14)	✓ (14) X (518)	✓ (14)	X (34)		X (34)
Biglycan		extra cell mat		✓ (7)	✓ (34)	✓ (20)			X (520)	✓ (20)
calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD)		metabo		✓ (12)						
Cholesterol		metabo		X (25)	✓ (524) X (3)	X (3)	✓ (35)			
dA-dT			antibiotic	✓ (35)	X (35)		✓ (18)			X (35)
gramicidin							✓ (30)			X (18)
H ₂ O ₂		metabo					✓ (30)			
High glucose			disrupt lysosomes		✓ (3)		✓ (15)			X (16)
Hypthal fragment (A. Fumigatus)	fungus		bact toxin	✓ (21)		X (21)	✓ (21)	X (21)		X (21)
Maitotoxin	parasite						✓ (51)			
Malarial hemozoin			PI3K autophagy inh	✓ (22) X (27)		X (522) ✓ (27)	✓ (27)			
3-methyladenine	nano			✓ (22) X (27)		X (522) ✓ (27)	✓ (27)			
Nano SiO ₂	nano			✓ (36)	✓ (36)	✓ (36)	✓ (36)			X (36)
Nano TiO ₂			anti fungal drug	X (35)	✓ (35)	✓ (35)	✓ (35)			X (35)
natamycin			antibiotic	X (35)	✓ (35)	✓ (35)	✓ (35)			X (35)
neomycin			bact toxin	X (8,12)	X (4,4,21)	✓ (17, 521)	✓ (8,15)			X (5,18)
Nigericin			anti fungal drug	X (35)	X (36)	X (36)	✓ (36)			X (36)
Nystatin				X (25)	✓ (25)					
Poly I:C	micro		adjuv	✓ (24)	✓ (24)		✓ (24)			
Poly(lactide-co-glycolide) (PLG)			antibiotic	X (35)	X (35)	X (35)	✓ (35)			X (35)
polymyxin B	micro		adjuvant	✓ (24)	✓ (24)		✓ (24)			
Polystyrene				X (9)	X (21)	✓ (8,18)	✓ (8)			
R857	synthetic									
R848	synthetic		plant toxin	X (3)			✓ (26)			
Ricin			inh respiratory chain				✓ (33)			
Rotenone			inh respiratory chain				✓ (33)			
Thenoyltrifluoroacétone (TTFA)			antibiotic	✓ (35)	✓ (35)	✓ (35)	✓ (35)			X (35)
Tyrotrobricin			skin irritant							
2,4,6 Trinitrochlorobenzene (TNCB) (35)			acute phase protein							
Serum amyloid (SAA)				✓ (3, 10)	✓ (3, 44) X (21)	X (3, 523) ✓ (8, 10, 18)	✓ (10)	X (3)	✓ (536) *	✓ (536) *
Silica	micro	metabo		✓ (2,3,7,5,21)	✓ (3) X (21)	X (3, 521) ✓ (8, 5, 18)	✓ (6, 5, 21)	✓ (2,3,9)	✓ (6)	X (19)
Uric acid Crystals (MSU)	micro		physical							✓ (6) X (7,21)
UV-B			PI3K autophagy inh			✓ (31)				
Wortmannin										

Tableau 4 | Résumé non exhaustif des principaux activateurs de Nlrp3 étudiés et les voies associées

Chaque symbole vert (✓) indique que l'article a accordé la nécessité d'une des voies de signalisation dans l'activation en réponse à tel ou tel agoniste. Au contraire, une croix bleue (X) indique que des résultats excluent un rôle de cette voie. Le signe (§) indique soit que les données ne sont pas convaincantes, soit qu'elles ne sont pas claires. Les numéros renvoient aux articles : (1) (532); (2) (111); (3) (488); (4) (533); (5) (534); (6) (535); (7) (593); (8) (495); (9) (394); (10) (536); (11) (496); (12) (490); (13) (493); (15) (335); (16) (538); (17) (539); (18) (197); (19) (350); (20) (368); (21) (527); (22) (540); (23) (491); (24) (544); (25) (542); (26) (543); (27) (194); (28) (29); erreurs; (30) (544); (31) (477); (32) (479); (33) (481); (34) (462); (35) (545); (36) (546); (37) (547); (38) (548)

* P2X7 lierait directement la protéine SAA et le rôle de la cathepsine B serait de la couper

De nombreux articles ont exclus le rôle de P2X7, souvent amalgamé avec un rôle possible de l'ATP, voire la signalisation purinergique dans sa globalité pourtant réalisée par toute une famille de récepteurs.

Notre hypothèse se concentre sur le mécanisme d'activation de Nlrp3 par des particules. Nos résultats avec l'utilisation de souris déficientes en P2X7 montrent également une absence d'implication de ce récepteur, mais pas l'utilisation d'inhibiteurs jugés pourtant spécifiques. Plusieurs hypothèses peuvent tenter d'expliquer ces contradictions. Les inhibiteurs ne sont pas si spécifiques ou les doses utilisées ne garantissent pas la spécificité. Il se pourrait aussi que la déficience fonctionnelle en P2X7 depuis la fécondation soit en partie compensée par d'autres récepteurs. Aucune de ses hypothèses n'a de valeur décisive. Cependant, l'ensemble de nos résultats offre toutes les raisons de croire fermement en un rôle majeur de la signalisation dans l'activation de l'inflammasome Nlrp3.

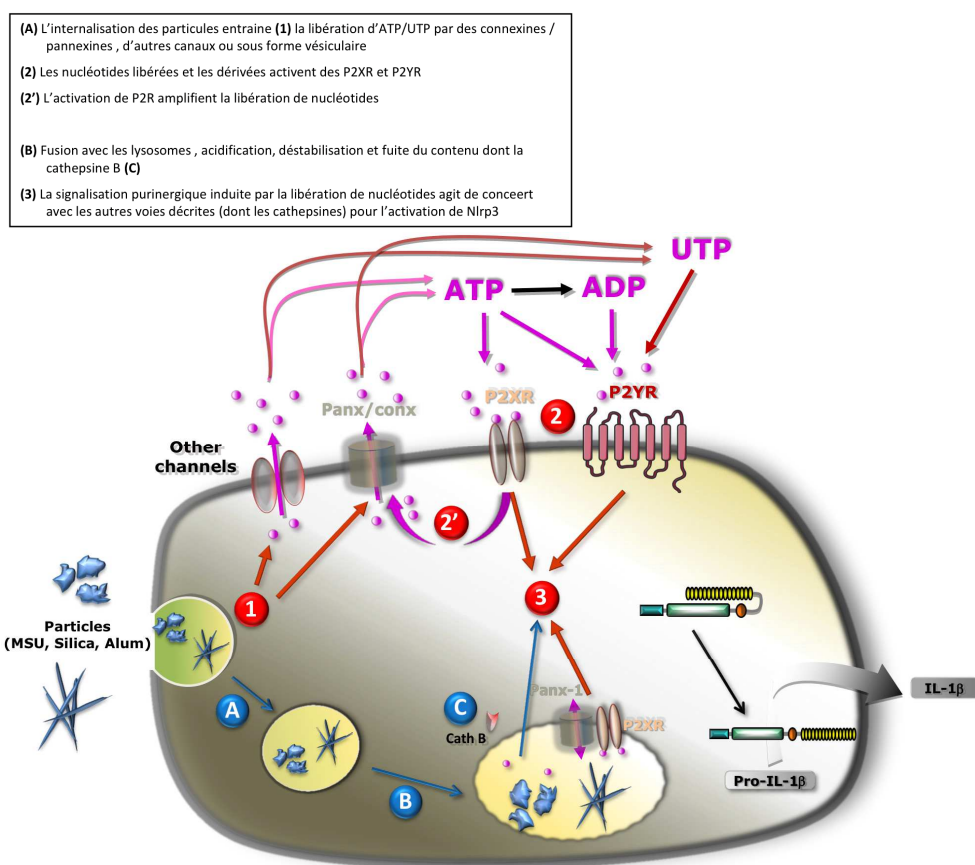


Figure 30 | Hypothèse de recherche développée par le laboratoire IEM

Au moins deux études encouragent l'approfondissement de notre hypothèse. La plus importante, réalisée sur monocytes humains, a montré que ces cellules stimulées par différents PAMPs mais aussi par le MSU, sécrètent de l'ATP et que celui-ci induit la maturation de la pro-IL-1 β (535).

Les monocytes humains fraîchement collectés et mis en culture n'ont pas de pro-IL-1 β . Au bout de quelques heures, cette synthèse n'est pas négligeable et les cellules sont alors capables de maturer la protéine (535).

Par ailleurs, les monocytes stimulés par du MSU ou différents agonistes TLR et NOD conduisent tous à la synthèse de pro-IL-1 β et à l'excrétion de la forme mature. Les auteurs montrent que toutes ces molécules induisent la libération d'ATP et que celui-ci agit en autocrine/paracrine principalement via le récepteur P2X7. La signalisation P2X7 induit un efflux de potassium et un influx de calcium, lequel conduit à l'activation de la phospholipase A2 importante pour la maturation ou l'excrétion de IL-1 β (535). Une perturbation de ces échanges d'ions par modifications de leurs concentrations extracellulaires se répercute directement sur la quantité d'IL-1 β produite. L'ionophore nigéricine induit un efflux de potassium et conduit à une production soutenue d'IL-1 β indépendante de P2X7. Cela montre que l'activité du P2X7R devient négligeable lorsque l'efflux de potassium est obtenue en dehors d'une activation de PRR. La stabilisation de l'ATP endogène libéré par l'ajout d'un inhibiteur de sa dégradation augmente la production de IL-1 β mature (535). Au final, les auteurs montrent que sur les monocytes humains primaires, différents PAMPs et DAMPs sont compétents pour l'induction de la maturation et de l'excrétion IL-1 β par un processus qui fait intervenir en premier lieu la libération d'ATP endogène.

La deuxième étude, cette fois-ci sur des cellules murines, concerne l'activation de l'inflammasome en réponse à la protéine β -amyloïde, agent particulaire dont l'agrégation serait la cause principale de la maladie d'Alzheimer (532). Les auteurs montrent que l'incubation de β -amyloïde avec des cellules microgliales induit la libération d'ATP. Il s'ensuit une boucle de stimulation auto- ou para-crine via P2X7 permettant notamment la production de IL-1 β (532).

C. Quelques mots sur la régulation de l'activité de l'inflammasome

Partout dans le manuscrit il est question d'activation de l'immunité innée et de promotion de l'inflammation, en particulier au moyen du complexe cytosolique formé par l'inflammasome Nlrp3. Il me paraît important de mettre en lumière les moyens de contrôle dont l'organisme dispose.

Le premier niveau de régulation s'établit au niveau transcriptionnel sur plusieurs types cellulaires, lors de l'étape dite de « priming ». La signalisation passe par différents TLRs ou par des cytokines comme le TNF- α qui engagent la voie NF κ B aboutissant à la synthèse non seulement de pro-IL-1 β mais aussi de Nlrp3 (529). Certains chercheurs qualifient l'induction de la transcription de Nlrp3 comme critique pour la future formation de l'inflammasome (549).

Il est connu que les monocytes sanguins humains libèrent de IL-1 β mature après une simple stimulation de la voie TLR (exemple LPS) à l'inverse des BMDM et des macrophages péritonéaux de

souris ou de la lignée de macrophages humains THP1. Cherchant à comprendre les disparités de résultats et d'hypothèses, l'étude de Netea and al. a montré que l'addition de LPS sur des monocytes humains induisait la libération d'ATP en extracellulaire et que l'activation de la caspase-1 y est constitutive (550). A l'opposé, les macrophages alvéolaires humains ne libèrent pas constitutivement de l'ATP et ont besoin d'un second signal pour activer leur inflammasome.

Cette étude très informative montre un contrôle de l'inflammasome et de la production d'IL-1 β suivant la localisation des acteurs immunitaires. (550). Les monocytes sanguins qui entrent en contact avec des PAMPs signalent à l'hôte une entrée d'un micro-organisme au sein de son milieu intérieur. Ces monocytes sont ainsi capables de déclencher directement une production d'IL-1 β . Les macrophages sont infiltrés dans les tissus de l'organisme et peuvent être directement en contact avec le milieu extérieur dans les alvéoles pulmonaires et dans l'intestin. Ici la présence de PAMPs n'est pas corrélée à une menace directe. La nécessité d'un second signal permet la discrimination où par exemple la mort des cellules avoisinantes et leur libération de signaux de dangers tel l'ATP fournira l'indication d'une situation « non neutre ». Dans ce sens, l'ajout d'INF- γ aux macrophages, signe d'une situation également « non neutre », lui permet de produire de l'IL-1 β par l'ajout de LPS sans ATP exogène (550).

Un autre niveau de contrôle permettrait à l'organisme d'opérer une distinction entre infection et traumatisme afin de moduler la nécessité ou l'intensité de la réponse à mettre en place. Il est important pour l'organisme de chercher à pondérer cette réponse qui peut se révéler préjudiciable avec une balance bénéfice/risque nettement défavorable notamment dans les cas d'inflammations stériles incontrôlées. Une signalisation TLR en réponse à des molécules dérivées de micro-organismes entraîne une signalisation majoritairement pro-inflammatoire. La stimulation TLR par le DAMP HMGB1 s'accompagne de sa fixation sur d'autres récepteurs à signalisation inhibitrice, afin de diminuer la réponse inflammatoire globale (426). Si on supprime ce verrou, les conséquences peuvent être létales chez la souris (426).

A la différence de l'INF- γ , Les interférons de type I (IFN- α et IFN- β) sont couramment utilisés contre les désordres auto-immuns et inflammatoires. Un travail récent montre clairement que les IFN de type I inhibent la production de IL-1 β *in vitro* et *in vivo*. Par l'induction d'IL-10, ces deux IFN bloquent la production de pro-IL1- α et pro-IL1- β . Ils inhibent également l'activation des inflammasomes NLRP1 et NLRP3 et la maturation des cytokines associées (551).

In vivo, l'augmentation d'interféron de type I par injection de poly(I:C) favorisent à la susceptibilité des souris face à l'infection par le champignon *C. albicans* par un mécanisme qui serait lié à la diminution de production de IL-1 β . Cela est à mettre en parallèle avec les observations de l'augmentation des risques d'infection après contamination virale (551). Les traitements par l'IFN ont été utilisés avec succès récemment pour traiter des patients souffrant de fièvre méditerranéenne familiale (552), maladie liée à la surproduction de IL-1 β .

Une autre étude a montré un rétrocontrôle négatif de l'immunité adaptative sur l'immunité innée dans la résolution de l'inflammation (553). La réponse inflammatoire doit se terminer activement sinon elle peut se révéler très dommageable comme dans des cas d'arthrite et de diabète de type 2. Les lymphocytes CD4 effecteurs et mémoires sont capables d'abolir l'activation de la caspase 1 et la libération de IL-1 β par les macrophages par un mécanisme nécessitant le contact cellulaire (553).

Enfin, la protéine Nlpr3 pourrait avoir des rôles complètement indépendant d'une forme d'inflammasome, ce qui ajoute un niveau de complexité à son fonctionnement. Dans un modèle de lésion ischémique, il fut montré au sein de cellules non hématopoïétiques un rôle protecteur de Nlrp3 mais pas de ASC ou de la caspase-1 ni d'un traitement par l'Anakinra ou l'absence de IL-1R1 (554).

Conclusion

I. Sur mon travail de thèse

L'ascendant psychologique de l'inflammasome Nlrp3 dans la littérature comme pilier de la détection de situations de dangers peut amener à des conclusions hâtives. Porté par un sujet, un étudiant chercheur aura facilement tendance à occulter volontairement ou non les informations qui s'alignent difficilement sur sa tendance naturelle à schématiser. Je me rappelle qu'abasourdi par une semaine de documentation bibliographique, je me suis vu interpellé par mon estimé professeur François Erard qui non sans ironie me lança « alors ça y est, tu connais tout ? ». Je ne su lui répondre que « non, je n'ai fais que clarifier mon incompréhension ».

II. Sur l'immunologie

L'immunologie a émergé de la microbiologie durant l'ère pastorienne en rationalisant la découverte de la vaccination de Jenner avant de devenir une discipline à part entière, auréolée seize fois du prix Nobel de médecine et de physiologie. Il ressort du XX^{ème} siècle trois paradigmes principaux, chronologiquement défensif (réponse anti-infectieuse), sélectif (sélection clonale) et cognitif (distinction soi/non-soi). Au cours de ma thèse, j'ai été amené à étudier et adhérer à la théorie du danger de Polly Matzinger qui me semble être en mesure de proposer élégamment des solutions aux interrogations actuelles. Comme attendu en science, la réponse à une question particulière ouvre la porte à de nombreuses autres non résolues. Les connaissances accumulées ont permis les succès incontestables sur la santé humaine de la vaccination et des greffes, sans pour autant avoir saisis tous les ressorts de l'immunité.

Dogmatique, nous pouvons nous demander la pertinence réelle des modèles que nous utilisons, sans cesse en évolution, toujours en équilibre tangent. Le modèle restera nécessaire pour fixer un terreau de réflexions et faire germer des idées nouvelles, par la suite vérifiées ou réfutées. La difficulté réside dans la nécessité parfois de débarrasser d'une partie du terreau, de rechercher de nouvelles terres ailleurs, d'accepter les engrais des autres et ne pas trop s'attacher à son parterre. L'essor de l'informatique, la puissance « Murphiesque » (obéissant à la loi de Murphy) de ses calculs et ses applications techniques permettent aujourd'hui d'étudier en profondeur les caractéristiques d'une cellule spécifique (FACS, transcriptomique) comme d'un organisme (séquençage génomique). La révolution nanotechnologique ouvre un champ futuriste mêlant l'organique dans la machine.

François Erard aime à parler de « science molle » pour qualifier l'immunologie. Il s'agit évidemment d'une l'opposition aux sciences dites dures comme les mathématiques et la physique qui obéissent à un nombre restreint de lois définies et immuables (vitesse de la lumière, masse de l'électron ou encore la force de gravitation). Plusieurs astrophysiciens de renom admettent que le changement d'une partie par million de la valeur d'une seule de ces constantes suffirait parfaitement

pour que la matière et donc le temps ne puissent exister. L'univers tel que nous le connaissons résulte d'une symphonie permettant à la matière de se former et de s'agglutiner en galaxies, constellations, étoiles, planètes, algues et doryphores. La biologie, dans sa division « molle » de l'immunologie, obéit aux mêmes constantes physiques sans pouvoir en déroger nullement. Il apparaît à l'expérimentateur la seule résultante d'une combinaison incroyablement étreinte dont l'apparente mollesse réside dans la relative faiblesse de notre capacité à décomposer en détail le système étudié. A défaut d'une *mollesse* au sens *léthargique* les systèmes immunitaires de nombreux organismes seraient *malléables*. Ils ont la capacité d'intégrer une multitude de signaux endogènes ou exogènes, de les compiler pour générer une réponse salutaire. Citons à nouveau Stephen J. Gould lorsqu'il écrit que « *les choses ne se passent pas telles qu'elles auraient dû se passer mais telles qu'elles ont pu se passer* ». La réponse globale de l'organisme est une solution évolutive. Elle ne découle pas d'un à propos agencé parfaitement où tous les paramètres unitaires agiraient dans le seul sens de la réponse globale. La ligne droite comme chemin le plus court n'a pas son équivalent en biologie et serait difficilement superposable à la théorie de la sélection naturelle. En ce sens, l'immunité est un système ayant pour objet l'établissement d'un état de protection de l'hôte suffisamment performant pour permettre la production de descendants. La performance se juge par la survie de l'individu ainsi que la quantité de moyens, notamment énergétique, déployées.

Il est selon moi pas impossible qu'un système immunitaire « trop performant » provoquerait un déséquilibre désavantageux pour la pérennité de l'espèce en limitant sa capacité d'adaptation et de coopération. La vie a beaucoup utilisée la symbiose pour se complexifier. Nier la relation à la « je t'aime moi non plus » de la relation macro/microorganismes biaise grandement notre jugement du rôle de l'immunité.

Références bibliographiques

1. A. Curry, Evolution. Creationist beliefs persist in Europe. *Science* 323, 1159 (Feb 27, 2009).
2. G. Ruvkun, O. Hobert, The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 282, 2033 (Dec 11, 1998).
3. M. Salzter, Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends Immunol* 22, 285 (Jun, 2001).
4. B. W. Wren, R. H. French-Constant, Invertebrates as a source of emerging human pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2, 833 (Oct, 2004).
5. D. H. Kim, F. M. Ausubel, Evolutionary perspectives on innate immunity from the study of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Immunol* 17, 4 (Feb, 2005).
6. C. L. Kurz, J. J. Ewbank, *Caenorhabditis elegans*: an emerging genetic model for the study of innate immunity. *Nat Rev Genet* 4, 380 (May, 2003).
7. A. C. Millet, J. J. Ewbank, Immunity in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Immunol* 16, 4 (Feb, 2004).
8. H. Schulenburg, C. L. Kurz, J. J. Ewbank, Evolution of the innate immune system: the worm perspective. *Immunol Rev* 198, 36 (Apr, 2004).
9. R. Medzhitov, Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity* 30, 766 (Jun 19, 2009).
10. L. Margulis, D. Sagan, L'Univers bactériel : les nouveaux rapports de l'homme et de la nature *Seuil; Collection : Points Sciences*, (2002).
11. F. M. Ausubel, Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* 6, 973 (Oct, 2005).
12. J. Travis, Origins. On the origin of the immune system. *Science* 324, 580 (May 1, 2009).
13. R. Langman, The Immune System. Evolutionary Principles Guide our Understanding of this Complex Biological Defense System. *San Diego, CA: Academic Press*, 1989, (1989).
14. Z. A. Nagy, Evolutionary origin of the immune system: a dialogue with Rod Langman. *Scand J Immunol* 67, 313 (Apr, 2008).
15. G. W. Litman, J. P. Rast, S. D. Fugmann, The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 10, 543 (Aug, 2010).
16. J. L. Dangel, J. D. Jones, Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826 (Jun 14, 2001).
17. S. T. Chisholm, G. Coaker, B. Day, B. J. Staskawicz, Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803 (Feb 24, 2006).
18. C. Zipfel, G. Felix, Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol* 8, 353 (Aug, 2005).
19. T. Nurnberger, F. Brunner, B. Kemmerling, L. Piater, Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* 198, 249 (Apr, 2004).
20. L. Gomez-Gomez, T. Boller, Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci* 7, 251 (Jun, 2002).
21. G. Felix, J. D. Duran, S. Volko, T. Boller, Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* 18, 265 (May, 1999).
22. C. Zipfel *et al.*, Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature* 428, 764 (Apr 15, 2004).
23. D. Chinchilla, Z. Bauer, M. Regenass, T. Boller, G. Felix, The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* 18, 465 (Feb, 2006).
24. L. Gomez-Gomez, T. Boller, FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol Cell* 5, 1003 (Jun, 2000).
25. J. D. Jones, J. L. Dangel, The plant immune system. *Nature* 444, 323 (Nov 16, 2006).
26. J. P. Ting, B. K. Davis, CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu Rev Immunol* 23, 387 (2005).
27. J. Glazebrook, Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43, 205 (2005).
28. P. Schulze-Lefert, Plant immunity: the origami of receptor activation. *Curr Biol* 14, R22 (Jan 6, 2004).
29. F. L. Takken, M. Albrecht, W. I. Tameling, Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Curr Opin Plant Biol* 9, 383 (Aug, 2006).
30. B. F. Holt, 3rd, D. A. Hubert, J. L. Dangel, Resistance gene signaling in plants--complex similarities to animal innate immunity. *Curr Opin Immunol* 15, 20 (Feb, 2003).
31. B. C. Meyers, A. Kozik, A. Griego, H. Kuang, R. W. Michelmore, Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 15, 809 (Apr, 2003).
32. T. Zhou *et al.*, Genome-wide identification of NBS genes in japonica rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes. *Mol Genet Genomics* 271, 402 (May, 2004).
33. P. Matzinger, The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301 (Apr 12, 2002).
34. M. G. Kim *et al.*, Two Pseudomonas syringae type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in Arabidopsis. *Cell* 121, 749 (Jun 3, 2005).
35. M. J. Axtell, B. J. Staskawicz, Initiation of RPS2-specified disease resistance in Arabidopsis is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* 112, 369 (Feb 7, 2003).
36. G. J. Lieschke, N. S. Trede, Fish immunology. *Curr Biol* 19, R678 (Aug 25, 2009).
37. B. e. a. Adams, Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. *Biol. Control* 37, 32 (2006).
38. S. Brenner, In the beginning was the worm. *Genetics* 182, 413 (Jun, 2009).
39. N. Pujol *et al.*, A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 11, 809 (Jun 5, 2001).
40. J. E. Irazoqui, J. M. Urbach, F. M. Ausubel, Evolution of host innate defence: insights from *Caenorhabditis elegans* and primitive invertebrates. *Nat Rev Immunol* 10, 47 (Jan, 2010).
41. D. Ferrandon, J. L. Imler, C. Hetru, J. A. Hoffmann, The Drosophila systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol* 7, 862 (Nov, 2007).
42. A. Aderem, R. J. Ulevitch, Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782 (Aug 17, 2000).
43. K. V. Anderson, Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 12, 13 (Feb, 2000).
44. K. V. Anderson, G. Jurgens, C. Nusslein-Volhard, Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 42, 779 (Oct, 1985).
45. N. J. Gay, F. J. Keith, Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351, 355 (May 30, 1991).
46. B. Lemaître, E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, J. A. Hoffmann, The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 86, 973 (Sep 20, 1996).
47. R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, C. A. Janeway, Jr., A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394 (Jul 24, 1997).
48. A. Poltorak *et al.*, Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085 (Dec 11, 1998).
49. S. Vallabhupuram, M. Karin, Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 27, 693 (2009).
50. J. A. Hoffmann, J. M. Reichhart, Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol* 3, 121 (Feb, 2002).
51. M. Gottar *et al.*, The Drosophila immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature* 416, 640 (Apr 11, 2002).
52. B. R. Herrin, M. D. Cooper, Alternative adaptive immunity in jawless vertebrates. *J Immunol* 185, 1367 (Aug 1, 2010).
53. G. W. Litman, L. J. Dishaw, J. P. Cannon, R. N. Haire, J. P. Rast, Alternative mechanisms of immune receptor diversity. *Curr Opin Immunol* 19, 526 (Oct, 2007).
54. J. Finstad, R. A. Good, The Evolution of the Immune Response. 3. Immunologic Responses in the Lamprey. *J Exp Med* 120, 1151 (Dec 1, 1964).
55. Z. Pancer *et al.*, Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature* 430, 174 (Jul 8, 2004).
56. M. F. Flajnik, M. Kasahara, Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet* 11, 47 (Jan, 2010).
57. B. Magnadottir, Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol* 20, 137 (Feb, 2006).
58. H. Sakano, K. Huppi, G. Heinrich, S. Tonegawa, Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature* 280, 288 (Jul 26, 1979).
59. T. Hibino *et al.*, The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Dev Biol* 300, 349 (Dec 1, 2006).
60. M. A. Donnelly, T. S. Steiner, Two nonadjacent regions in enteroaggregative Escherichia coli flagellin are required for activation of toll-like receptor 5. *J Biol Chem* 277, 40456 (Oct 25, 2002).
61. G. W. Litman, J. P. Cannon, L. J. Dishaw, Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat Rev Immunol* 5, 866 (Nov, 2005).
62. B. Beutler *et al.*, Genetic analysis of resistance to viral infection. *Nat Rev Immunol* 7, 753 (Oct, 2007).
63. S. M. Hedrick, The acquired immune system: a vantage from beneath. *Immunity* 21, 607 (Nov, 2004).
64. J. A. Long, K. Trinajstić, Z. Johanson, Devonian arthropod embryos and the origin of internal fertilization in vertebrates. *Nature* 457, 1124 (Feb 26, 2009).
65. R. Friedman, A. L. Hughes, Molecular evolution of the NF-kappaB signaling system. *Immunogenetics* 53, 964 (Feb, 2002).
66. C. Luo, L. Zheng, Independent evolution of Toll and related genes in insects and mammals. *Immunogenetics* 51, 92 (Feb, 2000).
67. M. Doherty, M. J. Robertson, Some early Trends in Immunology. *Trends Immunol* 25, 623 (Dec, 2004).
68. <1581 - nicolas de nancel - Discours_tres_ample_de_la_pest_ diuis - 1581.pdf>.
69. A. W. Boylston, Clinical investigation of smallpox in 1767. *N Engl J Med* 346, 1326 (Apr 25, 2002).
70. P. Ehrlich, *Roy. Soc. Proc.* 66, 424 (1900).
71. K. Landsteiner, M. W. Chase, Studies on the Sensitization of Animals with Simple Chemical Compounds : Ix. Skin Sensitization Induced by Injection of Conjugates. *J Exp Med* 73, 431 (Feb 28, 1941).
72. F. Breinl, F. Haurowitz, *Physiol. Chem.* xcii, , 45 (1930).
73. F. M. Burnet, M. Freeman, A. V. Jackson, D. Lush, The Production of Antibodies *Macmillan, Melbourne*, (1941).
74. F. M. Burnet, F. Fenner, Genetics and immunology. *Heredity* 2, 289 (Dec, 1948).
75. F. M. Burnet, F. Fenner, The Production of Antibodies. 2nd edition. *Macmillan. London*, (1949).
76. F. H. Crick, On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol* 12, 138 (1958).
77. F. M. Burnet, Enzyme, Antigen and Virus. *Cambridge University Press, Cambridge, UK* , (1956).
78. F. M. Burnet, A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin* 26, 119 (Mar-Apr, 1976).
79. N. K. Jerne, The Natural-Selection Theory of Antibody Formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 41, 849 (Nov 15, 1955).
80. D. W. Talmage, Allergy and immunology. *Annu Rev Med* 8, 239 (1957).
81. F. M. Burnet, The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity. *Vanderbilt Univ. Press, Nashville, TN*, (1959).
82. R. E. Billingham, L. Brent, P. B. Medawar, Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172, 603 (Oct 3, 1953).
83. J. Lederberg, Genes and antibodies. *Science* 129, 1649 (Jun 19, 1959).
84. H. P. Schwarz, F. Dörner, Karl Landsteiner and his major contributions to haematology. *Br J Haematol* 121, 556 (May, 2003).
85. D. E. Mosier, A requirement for two cell types for antibody formation in vitro. *Science* 158, 1573 (Dec 22, 1967).

86. D. R. Forsdyke, A theory of immunity. *J Theor Biol* 25, 173 (Oct, 1969).
87. P. Bretscher, M. Cohn, A theory of self-nonself discrimination. *Science* 169, 1042 (Sep 11, 1970).
88. M. G. Weigert, I. M. Cesari, S. J. Yonkovich, M. Cohn, Variability in the lambda light chain sequences of mouse antibody. *Nature* 228, 1045 (Dec 12, 1970).
89. K. J. Lafferty, A. J. Cunningham, A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci* 53, 27 (Feb, 1975).
90. R. M. Zinkernagel, P. C. Doherty, Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701 (Apr 19, 1974).
91. R. M. Zinkernagel, P. C. Doherty, Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 251, 547 (Oct 11, 1974).
92. P. C. Doherty, R. M. Zinkernagel, H-2 compatibility is required for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Exp Med* 141, 502 (Feb 1, 1975).
93. N. Hozumi, S. Tonegawa, Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 3628 (Oct, 1976).
94. O. Bernard, N. Hozumi, S. Tonegawa, Sequences of mouse immunoglobulin light chain genes before and after somatic changes. *Cell* 15, 1133 (Dec, 1978).
95. O. Valbuena, K. B. Marcu, M. Weigert, R. P. Perry, Multiplicity of germline genes specifying a group of related mouse kappa chains with implications for the generation of immunoglobulin diversity. *Nature* 276, 780 (Dec 21-28, 1978).
96. P. Early, H. Huang, M. Davis, K. Calame, L. Hood, An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* 19, 981 (Apr 19, 1980).
97. M. P. R. Kins, R. H. Schwartz, Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* 165, 302 (Feb 1, 1987).
98. P. Matzinger, Essay 1: the Danger model in its historical context. *Scand J Immunol* 54, 4 (Jul-Aug, 2001).
99. R. E. Langman, M. Cohn, A short history of time and space in immune discrimination. *Scand J Immunol* 44, 544 (Dec, 1996).
100. R. M. Zinkernagel, Immunology taught by viruses. *Science* 271, 173 (Jan 12, 1996).
101. N. A. Mitchison, Charles Janeway jr. *Current Biology* 13, R422 (2003).
102. C. A. Janeway, Jr., Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1, 1 (1989).
103. C. A. Janeway, Jr., The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 13, 11 (Jan, 1992).
104. R. Medzhitov, C. A. Janeway, Jr., Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298 (Apr 12, 2002).
105. C. A. Janeway, Jr., C. C. Goodnow, R. Medzhitov, Danger - pathogen on the premises! Immunological tolerance. *Curr Biol* 6, 519 (May 1, 1996).
106. D. E. Koshland, Jr., Recognizing self from nonself. *Science* 248, 1273 (Jun 15, 1990).
107. P. Matzinger, Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12, 991 (1994).
108. P. Matzinger, An innate sense of danger. *Semin Immunol* 10, 399 (Oct, 1998).
109. S. Gallucci, M. Lolkema, P. Matzinger, Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 5, 1249 (Nov, 1999).
110. R. Medzhitov, Innate immunity: quo vadis? *Nat Immunol* 11, 551 (Jul, 2010).
111. S. C. Eisenbarth, O. R. Colegio, W. O'Connor, F. S. Sutterwala, R. A. Flavell, Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453, 1122 (Jun 19, 2008).
112. E. De Gregorio, E. Trito, R. Rappuoli, Alum adjuvant: unraveling a century old mystery. *Eur J Immunol* 38, 2068 (Aug, 2008).
113. E. Kuroda *et al.*, Silica Crystals and Aluminum Salts Regulate the Production of Prostaglandin in Macrophages via NALP3 Inflammasome-Independent Mechanisms. *Immunity* 34, 514 (Apr 22, 2011).
114. M. Kool *et al.*, An unexpected role for uric Acid as an inducer of T helper 2 cell immunity to inhaled antigens and inflammatory mediator of allergic asthma. *Immunity* 34, 527 (Apr 22, 2011).
115. H. M. Hoffman, F. A. Wright, D. H. Broide, A. A. Wanderer, R. D. Kolodner, Identification of a locus on chromosome 1q44 for familial cold urticaria. *Am J Hum Genet* 66, 1693 (May, 2000).
116. F. G. Witherspoon, C. B. White, *et al.*, Familial urticaria due to cold. *Arch Derm Syphilol* 58, 52 (Jul, 1948).
117. M. e. a. Jung, A locus for familial cold urticaria maps to distal chromosome1q: familial cold urticaria and Muckle-Wells syndrome are probably allelic. *Am J Hum Genet* 59, (1996).
118. H. M. Hoffman, J. L. Mueller, D. H. Broide, A. A. Wanderer, R. D. Kolodner, Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet* 29, 301 (Nov, 2001).
119. L. Cuisset *et al.*, Genetic linkage of the Muckle-Wells syndrome to chromosome 1q44. *Am J Hum Genet* 65, 1054 (Oct, 1999).
120. C. Dode *et al.*, New mutations of CIA1 that are responsible for Muckle-Wells syndrome and familial cold urticaria: a novel mutation underlies both syndromes. *Am J Hum Genet* 70, 1498 (Jun, 2002).
121. J. Feldmann *et al.*, Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in CIA1, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes. *Am J Hum Genet* 71, 198 (Jul, 2002).
122. A. M. Prieur, C. Griscelli, Arthropathy with rash, chronic meningitis, eye lesions, and mental retardation. *J Pediatr* 99, 79 (Jul, 1981).
123. S. G. Hassink, D. P. Goldsmith, Neonatal onset multisystem inflammatory disease. *Arthritis Rheum* 26, 668 (May, 1983).
124. A. M. Prieur *et al.*, A chronic, infantile, neurological, cutaneous and articular (CINCA) syndrome. A specific entity analysed in 30 patients. *Scand J Rheumatol Suppl* 66, 57 (1987).
125. T. F. Consortium, A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nat Genet* 17, 25 (Sep, 1997).
126. T. I. F. Consortium, Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. The International FMF Consortium. *Cell* 90, 797 (Aug 22, 1997).
127. R. S. Hotchkiss, A. Strasser, J. E. McDunn, P. E. Swanson, Cell death. *N Engl J Med* 361, 1570 (Oct 15, 2009).
128. A. H. Wyllie, R. G. Morris, A. L. Smith, D. Dunlop, Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142, 67 (Jan, 1984).
129. L. M. Zheng, A. Zychlinsky, C. C. Liu, D. M. Ojcius, J. D. Young, Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J Cell Biol* 112, 279 (Jan, 1991).
130. A. Moeller, K. Ask, D. Warburton, J. Gaudie, M. Kolb, The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol* 40, 362 (2008).
131. J. Yuan, H. R. Horvitz, The Caenorhabditis elegans cell death gene ced-4 encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* 116, 309 (Oct, 1992).
132. J. Yuan, S. Shaham, S. Ledoux, H. M. Ellis, H. R. Horvitz, The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641 (Nov 19, 1993).
133. H. Zou, W. J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg, X. Wang, Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405 (Aug 8, 1997).
134. K. Hofmann, P. Bucher, J. Tschopp, The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* 22, 155 (May, 1997).
135. J. Bertin *et al.*, Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 274, 12955 (May 7, 1999).
136. N. Inohara *et al.*, Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 274, 14560 (May 21, 1999).
137. X. Yang, H. Y. Chang, D. Baltimore, Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* 281, 1355 (Aug 28, 1998).
138. L. Aravind, V. M. Dixit, E. V. Koonin, The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci* 24, 47 (Feb, 1999).
139. E. V. Koonin, L. Aravind, The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem Sci* 25, 223 (May, 2000).
140. J. Masumoto *et al.*, ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem* 274, 33835 (Nov 26, 1999).
141. J. Bertin, P. S. DiStefano, The PYRIN domain: a novel motif found in apoptosis and inflammation proteins. *Cell Death Differ* 7, 1273 (Dec, 2000).
142. E. Staub, E. Dahl, A. Rosenthal, The DAPIN family: a novel domain links apoptotic and interferon response proteins. *Trends Biochem Sci* 26, 83 (Feb, 2001).
143. F. Martinon, K. Hofmann, J. Tschopp, The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. *Curr Biol* 11, R118 (Feb 20, 2001).
144. W. J. Fairbrother *et al.*, The PYRIN domain: a member of the death domain-fold superfamily. *Protein Sci* 10, 1911 (Sep, 2001).
145. Z. L. Chu *et al.*, A novel enhancer of the Apaf1 apoptosome involved in cytochrome c-dependent caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem* 276, 9239 (Mar 23, 2001).
146. T. Hlaing *et al.*, Molecular cloning and characterization of DEFCAP-L and -S, two isoforms of a novel member of the mammalian Ced-4 family of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 276, 9230 (Mar 23, 2001).
147. K. Pawlowski, F. Pio, Z. Chu, J. C. Reed, A. Godzik, PAAD - a new protein domain associated with apoptosis, cancer and autoimmune diseases. *Trends Biochem Sci* 26, 85 (Feb, 2001).
148. B. Kobe, J. Deisenhofer, A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature* 374, 183 (Mar 9, 1995).
149. C. Miceli-Richard *et al.*, CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat Genet* 29, 19 (Sep, 2001).
150. Y. Ogura *et al.*, A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603 (May 31, 2001).
151. J. P. Hugot *et al.*, Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599 (May 31, 2001).
152. E. Aganna *et al.*, Association of mutations in the NALP3/CIA1/PYPAF1 gene with a broad phenotype including recurrent fever, cold sensitivity, sensorineural deafness, and AA amyloidosis. *Arthritis Rheum* 46, 2445 (Sep, 2002).
153. G. A. Manji *et al.*, PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF-kappa B. *J Biol Chem* 277, 11570 (Mar 29, 2002).
154. F. Martinon, K. Burns, J. Tschopp, The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 10, 417 (Aug, 2002).
155. C. A. Dinarello, Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci* 856, 1 (Sep 29, 1998).
156. A. Mantovani, M. Muzio, P. Ghezzi, C. Colotta, M. Introna, Regulation of inhibitory pathways of the interleukin-1 system. *Ann N Y Acad Sci* 840, 338 (May 1, 1998).
157. M. Thome *et al.*, Identification of CARDIAC, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr Biol* 8, 885 (Jul 16, 1998).
158. J. L. Poyet *et al.*, Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *J Biol Chem* 276, 28309 (Jul 27, 2001).
159. P. Li *et al.*, Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479 (Nov 14, 1997).
160. Y. Tsujimoto, Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* 3, 697 (Nov, 1998).
161. S. E. Girardin, P. J. Sansonetti, D. J. Philpott, Intracellular vs extracellular recognition of pathogens-common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol* 10, 193 (Apr, 2002).
162. N. Inohara, G. Nunez, The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* 20, 6473 (Oct 1, 2001).
163. C. A. Janeway, Jr., R. Medzhitov, Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197 (2002).
164. B. Sauter *et al.*, Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 191, 423 (Feb 7, 2000).

165. R. M. Vabulas *et al.*, HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 277, 15107 (Apr 26, 2002).
166. L. Agostini *et al.*, NALP3 forms an IL-1 β -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20, 319 (Mar, 2004).
167. K. Schroder, J. Tschopp, The inflammasomes. *Cell* 140, 821 (Mar 19, 2010).
168. V. Steimle, L. A. Otten, M. Zufferey, B. Mach, Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* 75, 135 (Oct 8, 1993).
169. F. Martinon, A. Mayor, J. Tschopp, The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 27, 229 (2009).
170. A. Mayor, F. Martinon, T. De Smedt, V. Petrilli, J. Tschopp, A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nat Immunol* 8, 497 (May, 2007).
171. B. K. Davis, H. Wen, J. P. Ting, The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol* 29, 707 (Apr 23, 2011).
172. M. Chamaillard *et al.*, An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 4, 702 (Jul, 2003).
173. S. E. Girardin *et al.*, Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 278, 8869 (Mar 14, 2003).
174. T. A. Kufer, D. J. Banks, D. J. Philpott, Innate immune sensing of microbes by Nod proteins. *Ann N Y Acad Sci* 1072, 19 (Aug, 2006).
175. D. Arnoult *et al.*, An N-terminal addressing sequence targets NLRX1 to the mitochondrial matrix. *J Cell Sci* 122, 3161 (Sep 1, 2009).
176. D. McGonagle, S. Savic, M. F. McDermott, The NLR network and the immunological disease continuum of adaptive and innate immune-mediated inflammation against self. *Semin Immunopathol* 29, 303 (Sep, 2007).
177. G. Chen, M. H. Shaw, Y. G. Kim, G. Nunez, NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol* 4, 365 (2009).
178. S. L. Masters, A. Simon, I. Aksentijevich, D. L. Kastner, Horror autoinflammatory: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease (*). *Annu Rev Immunol* 27, 621 (2009).
179. S. Mariathasan *et al.*, Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430, 213 (Jul 8, 2004).
180. E. A. Miao *et al.*, Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf. *Nat Immunol* 7, 569 (Jun, 2006).
181. E. A. Miao *et al.*, Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRP4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3076 (Feb 16, 2010).
182. J. A. Kummer *et al.*, Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J Histochem Cytochem* 55, 443 (May, 2007).
183. B. Faustin *et al.*, Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell* 25, 713 (Mar 9, 2007).
184. L. C. Hsu *et al.*, A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1 β secretion in response to Bacillus anthracis infection and muramyl dipeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7803 (Jun 3, 2008).
185. T. Burckstummer *et al.*, An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol* 10, 266 (Mar, 2009).
186. V. Hornung *et al.*, AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458, 514 (Mar 26, 2009).
187. D. A. Muruve *et al.*, The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 452, 103 (Mar 6, 2008).
188. E. Elinav *et al.*, NLRP6 Inflammasome Regulates Colonic Microbial Ecology and Risk for Colitis. *Cell* 145, 745 (May 27, 2011).
189. G. Y. Chen, M. Liu, F. Wang, J. Bertin, G. Nunez, A Functional Role for Nlrp6 in Intestinal Inflammation and Tumorigenesis. *J Immunol*, (May 4, 2011).
190. S. Normand *et al.*, Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (May 18, 2011).
191. M. Keller, A. Ruegg, S. Werner, H. D. Beer, Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 132, 818 (Mar 7, 2008).
192. G. Guarda *et al.*, Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *J Immunol* 186, 2529 (Feb 15, 2011).
193. A. Halle *et al.*, The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nat Immunol* 9, 857 (Aug, 2008).
194. A. S. Yazdi *et al.*, Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 19449 (Nov 9, 2010).
195. T. Csak *et al.*, Fatty acids and endotoxin activate inflammasomes in hepatocytes which release danger signals to activate immune cells in steatohepatitis. *Hepatology*, (Apr 12, 2011).
196. M. H. Zaki, M. Lamkanfi, T. D. Kanneganti, The Nlrp3 inflammasome: contributions to intestinal homeostasis. *Trends Immunol* 32, 171 (Apr, 2011).
197. R. Zhou, A. Tardivel, B. Thorens, I. Choi, J. Tschopp, Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 11, 136 (Feb, 2010).
198. S. E. Di Carlo, H. L. Collins, Submitting illuminations for review. *Advan. Physiol. Edu.* 25, 70 (June 1, 2001).
199. D. S. Miller, S. B. Horowitz, Intracellular compartmentalization of adenosine triphosphate. *J Biol Chem* 261, 13911 (Oct 25, 1986).
200. B. M. Paddle, G. Burnstock, Release of ATP from perfused heart during coronary vasodilatation. *Blood Vessels* 11, 110 (1974).
201. G. Burnstock, Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 7, 575 (Jul, 2008).
202. G. G. Yegutkin, Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783, 673 (May, 2008).
203. A. Fabbro, A. Skorinkin, M. Grandolfo, A. Nistri, R. Giniatullin, Quantal release of ATP from clusters of PC12 cells. *J Physiol* 560, 505 (Oct 15, 2004).
204. D. N. Bowser, B. S. Khakh, Vesicular ATP is the predominant cause of intercellular calcium waves in astrocytes. *J Gen Physiol* 129, 485 (Jun, 2007).
205. G. J. Liu, E. L. Werry, M. R. Bennett, Secretion of ATP from Schwann cells in response to uridine triphosphate. *Eur J Neurosci* 21, 151 (Jan, 2005).
206. R. Maroto, O. P. Hamill, Brefeldin A block of integrin-dependent mechanosensitive ATP release from *Xenopus* oocytes reveals a novel mechanism of mechanotransduction. *J Biol Chem* 276, 23867 (Jun 29, 2001).
207. H. A. Praetorius, J. Leipziger, ATP release from non-excitable cells. *Purinergic Signal* 5, 433 (Dec, 2009).
208. K. Hisadome *et al.*, Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells. *J Gen Physiol* 119, 511 (Jun, 2002).
209. F. Boudreaux, R. Grygorczyk, Cell swelling-induced ATP release is tightly dependent on intracellular calcium elevations. *J Physiol* 561, 499 (Dec 1, 2004).
210. Y. Wang, R. Roman, S. D. Lidofsky, J. G. Fitz, Autocrine signaling through ATP release represents a novel mechanism for cell volume regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12020 (Oct 15, 1996).
211. K. Strange, F. Emma, P. S. Jackson, Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am J Physiol* 270, C711 (Mar, 1996).
212. R. A. North, Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82, 1013 (Oct, 2002).
213. P. Pelegrin, A. Surprenant, Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *Embo J* 25, 5071 (Nov 1, 2006).
214. M. Tsukimoto *et al.*, P2X7 receptor-dependent cell death is modulated during murine T cell maturation and mediated by dual signaling pathways. *J Immunol* 177, 2842 (Sep 1, 2006).
215. P. Pelegrin, Many ways to dilate the P2X7 receptor pore. *Br J Pharmacol* 163, 908 (Jul, 2011).
216. K. E. Schreckenbach, S. Crespin, B. R. Kwak, M. Chanson, Connexin channel-dependent signaling pathways in inflammation. *J Vasc Res* 48, 91 (2011).
217. M. L. Cotrina *et al.*, Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15735 (Dec 22, 1998).
218. J. A. Orellana *et al.*, ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *J Neurochem*, (Feb 5, 2011).
219. H. K. Eltzschig *et al.*, ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ Res* 99, 1100 (Nov 10, 2006).
220. M. Z. Sarieddine *et al.*, Connexin43 modulates neutrophil recruitment to the lung. *J Cell Mol Med* 13, 4560 (Nov-Dec, 2009).
221. G. A. Ransford *et al.*, Pannexin 1 contributes to ATP release in airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41, 525 (Nov, 2009).
222. B. A. MacVicar, R. J. Thompson, Non-junction functions of pannexin-1 channels. *Trends Neurosci* 33, 93 (Feb, 2010).
223. C. D'Hondt, R. Ponsaerts, H. De Smedt, G. Bultynck, B. Himpens, Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions? *Bioessays* 31, 953 (Sep, 2009).
224. Y. Panchin *et al.*, A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol* 10, R473 (Jun 29, 2000).
225. R. Bruzzone, S. G. Hormuzdi, M. T. Barbe, A. Herb, H. Monyer, Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13644 (Nov 11, 2003).
226. V. I. Shestopalov, Y. Panchin, Pannexins and gap junction protein diversity. *Cell Mol Life Sci* 65, 376 (Feb, 2008).
227. G. E. Sosinsky *et al.*, Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels (Austin)* 5, (May 1, 2011).
228. M. T. Barbe, H. Monyer, R. Bruzzone, Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. *Physiology (Bethesda)* 21, 103 (Apr, 2006).
229. L. Bao, S. Locovei, G. Dahl, Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett* 572, 65 (Aug 13, 2004).
230. S. Locovei, J. Wang, G. Dahl, Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett* 580, 239 (Jan 9, 2006).
231. C. Virginio, A. MacKenzie, F. A. Rassendren, R. A. North, A. Surprenant, Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 2, 315 (Apr, 1999).
232. C. Marques-da-Silva, M. Chaves, N. Castro, R. Coutinho-Silva, M. Guimaraes, Colchicine inhibits cationic dye uptake induced by ATP in P2X2 and P2X7 receptor-expressing cells: implications for its therapeutic action. *Br J Pharmacol* 163, 912 (Jul, 2011).
233. Y. Qu *et al.*, Pannexin-1 Is Required for ATP Release during Apoptosis but Not for Inflammasome Activation. *J Immunol* 186, 6553 (Jun 1, 2011).
234. Y. Chen *et al.*, Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation. *Sci Signal* 3, ra45 (2010).
235. U. Schenk *et al.*, Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal* 1, ra6 (2008).
236. F. B. Chekeni *et al.*, Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 467, 863 (Oct 14, 2010).
237. S. F. Okada, R. A. Nicholas, S. M. Kreda, E. R. Lazarewski, R. C. Boucher, Physiological regulation of ATP release at the apical surface of human airway epithelia. *J Biol Chem* 281, 22992 (Aug 11, 2006).
238. G. G. Yegutkin, A. Mikhailov, S. S. Samburski, S. Jalkanen, The detection of micromolar pericellular ATP pool on lymphocyte surface by using lymphoid ecto-adenylate kinase as intrinsic ATP sensor. *Mol Biol Cell* 17, 3378 (Aug, 2006).
239. C. S. Geyti *et al.*, Slow spontaneous [Ca²⁺]_i oscillations reflect nucleotide release from renal epithelia. *Pflugers Arch* 455, 1105 (Mar, 2008).
240. T. K. Harden, E. R. Lazarewski, R. C. Boucher, Release, metabolism and interconversion of adenine and uridine nucleotides: implications for G protein-coupled P2 receptor agonist selectivity. *Trends Pharmacol Sci* 18, 43 (Feb, 1997).
241. R. Grygorczyk, J. W. Hanrahan, CFTR-independent ATP release from epithelial cells triggered by mechanical stimuli. *Am J Physiol* 272, C1058 (Mar, 1997).
242. G. Arcuino *et al.*, Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9840 (Jul 23, 2002).

243. P. Bodin, D. Bailey, G. Burnstock, Increased flow-induced ATP release from isolated vascular endothelial cells but not smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 103, 1203 (May, 1991).
244. W. Liu *et al.*, Effect of flow and stretch on the $[Ca^{2+}]_i$ response of principal and intercalated cells in cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 285, F998 (Nov, 2003).
245. J. A. Gruenhagen, E. S. Yeung, Investigation of G protein-initiated, Ca^{2+} -dependent release of ATP from endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1693, 135 (Aug 23, 2004).
246. G. J. Liu, A. Kalous, E. L. Werry, M. R. Bennett, Purine release from spinal cord microglia after elevation of calcium by glutamate. *Mol Pharmacol* 70, 851 (Sep, 2006).
247. H. Zimmermann, Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug. dev. res.* Volume 52, 44 (January - February 2001, 2001).
248. C. R. Maliszewski *et al.*, The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J Immunol* 153, 3574 (Oct 15, 1994).
249. M. Handa, G. Guidotti, Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (Solanum tuberosum). *Biochem Biophys Res Commun* 218, 916 (Jan 26, 1996).
250. E. Kaczmarek *et al.*, Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem* 271, 33116 (Dec 20, 1996).
251. N. Mizumoto *et al.*, CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat Med* 8, 358 (Apr, 2002).
252. S. Deaglio *et al.*, Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204, 1257 (Jun 11, 2007).
253. S. A. Levesque, F. Kukulski, K. Enyoji, S. C. Robson, J. Sevigny, NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages. *Eur J Immunol* 40, 1473 (May, 2010).
254. F. Kukulski *et al.*, Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal* 1, 193 (Jun, 2005).
255. G. G. Yegutkin, T. Henttinen, S. Jalkanen, Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via phosphotransfer reactions. *FASEB J* 15, 251 (Jan, 2001).
256. G. G. Yegutkin, T. Henttinen, S. S. Samburski, J. Sychala, S. Jalkanen, The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. *Biochem J* 367, 121 (Oct 1, 2002).
257. J. W. Goding, B. Grobbs, H. Slegers, Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta* 1638, 1 (May 20, 2003).
258. C. Stefan, S. Jansen, M. Bollen, Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic Signal* 2, 361 (Jun, 2006).
259. L. A. van Meeteren *et al.*, Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol* 26, 5015 (Jul, 2006).
260. H. Zimmermann, 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J* 285 (Pt 2), 345 (Jul 15, 1992).
261. A. Martinez-Martinez *et al.*, The ecto-5'-nucleotidase subunits in dimers are not linked by disulfide bridges but by non-covalent bonds. *Biochim Biophys Acta* 1478, 300 (May 23, 2000).
262. Y. Moriwaki, T. Yamamoto, K. Higashino, Enzymes involved in purine metabolism--a review of histochemical localization and functional implications. *Histol Histopathol* 14, 1321 (Oct, 1999).
263. G. R. Strohmeier *et al.*, Surface expression, polarization, and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia. *J Clin Invest* 99, 2588 (Jun 1, 1997).
264. L. Airas, M. Salmi, S. Jalkanen, Lymphocyte-vascular adhesion protein-2 is a novel 70-kDa molecule involved in lymphocyte adhesion to vascular endothelium. *J Immunol* 151, 4228 (Oct 15, 1993).
265. R. Resta, Y. Yamashita, L. F. Thompson, Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev* 161, 95 (Feb, 1998).
266. J. Sychala, A. G. Zimmermann, B. S. Mitchell, Tissue-specific regulation of the ecto-5'-nucleotidase promoter. Role of the camp response element site in mediating repression by the upstream regulatory region. *J Biol Chem* 274, 22705 (Aug 6, 1999).
267. A. Algars *et al.*, Different role of CD73 in leukocyte trafficking via blood and lymph vessels. *Blood* 117, 4387 (Apr 21, 2011).
268. A. Zernecke *et al.*, CD73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. *Circulation* 113, 2120 (May 2, 2006).
269. L. Wang *et al.*, CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice. *J Clin Invest* (May 2, 2011).
270. T. Eckle *et al.*, Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury. *J Immunol* 178, 8127 (Jun 15, 2007).
271. J. B. Volmer, L. F. Thompson, M. R. Blackburn, Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated adenosine production is tissue protective in a model of bleomycin-induced lung injury. *J Immunol* 176, 4449 (Apr 1, 2006).
272. L. Airas *et al.*, Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. *J Cell Biol* 136, 421 (Jan 27, 1997).
273. J. J. Kobbie *et al.*, T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol* 177, 6780 (Nov 15, 2006).
274. J. Reutershan *et al.*, Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs. *FASEB J* 23, 473 (Feb, 2009).
275. S. Deaglio, S. C. Robson, Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. *Adv Pharmacol* 61, 301 (2011).
276. L. Morabito *et al.*, Methotrexate and sulfasalazine promote adenosine release by a mechanism that requires ecto-5'-nucleotidase-mediated conversion of adenosine nucleotides. *J Clin Invest* 101, 295 (Jan 15, 1998).
277. B. N. Cronstein, Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev* 57, 163 (Jun, 2005).
278. D. M. Ireland, D. C. Mills, Detection and determination of adenosine diphosphate and related substances in plasma. *Biochem J* 99, 283 (May, 1966).
279. R. Franco, A. Valenzuela, C. Lluís, J. Blanco, Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol Rev* 161, 27 (Feb, 1998).
280. M. D. Desrosiers *et al.*, Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. *J Immunol* 179, 1884 (Aug 1, 2007).
281. A. V. Zavialov, A. Engstrom, Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochem J* 391, 51 (Oct 1, 2005).
282. A. Migchielsen *et al.*, Adenosine-deaminase-deficient mice die perinatally and exhibit liver-cell degeneration, atelectasis and small intestinal cell death. *Nat Genet* 10, 279 (Jul, 1995).
283. A. Toro, M. Paiva, C. Ackerley, E. Grunebaum, Intracellular delivery of purine nucleoside phosphorylase (PNP) fused to protein transduction domain corrects PNP deficiency in vitro. *Cell Immunol* 240, 107 (Apr, 2006).
284. X. W. Wu, D. M. Muzny, C. C. Lee, C. T. Caskey, Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *J Mol Evol* 34, 78 (Jan, 1992).
285. R. P. Pillinger MH, Abeles AM., Hyperuricemia and gout: new insights into pathogenesis and treatment. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 65, 215 (2000).
286. M. Zacher, L. H. Burch, A. J. Hirsh, J. Sychala, R. C. Boucher, Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J Biol Chem* 278, 13468 (Apr 11, 2003).
287. T. Henttinen, S. Jalkanen, G. G. Yegutkin, Adherent leukocytes prevent adenosine formation and impair endothelial barrier function by Ecto-5'-nucleotidase/CD73-dependent mechanism. *J Biol Chem* 278, 24888 (Jul 4, 2003).
288. M. L. Markert, Purine nucleoside phosphorylase deficiency. *Immunodef Rev* 3, 45 (1991).
289. H. Yan, M. D. Tsai, Nucleoside monophosphate kinases: structure, mechanism, and substrate specificity. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 73, 103 (1999).
290. S. H. Donaldson, M. Picher, R. C. Boucher, Secreted and cell-associated adenylate kinase and nucleoside diphosphokinase contribute to extracellular nucleotide metabolism on human airway surfaces. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26, 209 (Feb, 2002).
291. M. Picher, R. C. Boucher, Human airway ecto-adenylate kinase. A mechanism to propagate ATP signaling on airway surfaces. *J Biol Chem* 278, 11256 (Mar 28, 2003).
292. R. Parks, R. Agarwal, Nucleoside diphosphokinases. Boyer (Ed.), *Enzymes* vol. 8, 307 (1973).
293. A. S. Otero, NM23/nucleoside diphosphate kinase and signal transduction. *J Bioenerg Biomembr* 32, 269 (Jun, 2000).
294. A. C. Fabre *et al.*, Cell surface adenylate kinase activity regulates the F(1)-ATPase/P2Y (13)-mediated HDL endocytosis pathway on human hepatocytes. *Cell Mol Life Sci* 63, 2829 (Dec, 2006).
295. P. D. Boyer, The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* 66, 717 (1997).
296. T. L. Moser *et al.*, Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiotensin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6656 (Jun 5, 2001).
297. S. L. Chi, S. V. Pizzo, Angiotensin is directly cytotoxic to tumor cells at low extracellular pH: a mechanism dependent on cell surface-associated ATP synthase. *Cancer Res* 66, 875 (Jan 15, 2006).
298. A. J. Marcus *et al.*, Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *J Thromb Haemost* 1, 2497 (Dec, 2003).
299. S. C. Robson, J. Sevigny, H. Zimmermann, The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2, 409 (Jun, 2006).
300. P. F. Lennon, C. T. Taylor, G. L. Stahl, S. P. Colgan, Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J Exp Med* 188, 1433 (Oct 19, 1998).
301. H. K. Eltzschig *et al.*, Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J Exp Med* 198, 783 (Sep 1, 2003).
302. A. Van Linden, H. K. Eltzschig, Role of pulmonary adenosine during hypoxia: extracellular generation, signaling and metabolism by surface adenosine deaminase/CD26. *Expert Opin Biol Ther* 7, 1437 (Sep, 2007).
303. R. W. Li *et al.*, Physiological and Pharmacological Roles of Vascular Nucleoside Transporters. *J Cardiovasc Pharmacol* (Jan 22, 2011).
304. L. F. Thompson *et al.*, Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med* 200, 1395 (Dec 6, 2004).
305. M. J. Bours, E. L. Swennen, F. Di Virgilio, B. N. Cronstein, P. C. Dagnelie, Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 112, 358 (Nov, 2006).
306. J. Sychala, Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther* 87, 161 (Aug-Sep, 2000).
307. R. Corriden, P. A. Insel, W. G. Junger, A novel method using fluorescence microscopy for real-time assessment of ATP release from individual cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C1420 (Oct, 2007).
308. M. Salmi, S. Jalkanen, Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat Rev Immunol* 5, 760 (Oct, 2005).
309. J. L. Madara *et al.*, 5'-adenosine monophosphate is the neutrophil-derived paracrine factor that elicits chloride secretion from T84 intestinal epithelial cell monolayers. *J Clin Invest* 91, 2320 (May, 1993).
310. N. Dale, T. Pearson, B. G. Frenguelli, Direct measurement of adenosine release during hypoxia in the CA1 region of the rat hippocampal slice. *J Physiol* 526 Pt 1, 143 (Jul 1, 2000).
311. E. D. Martin *et al.*, Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission. *Glia* 55, 36 (Jan 1, 2007).
312. E. R. Lazarewicz, R. C. Boucher, T. K. Harden, Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol* 64, 785 (Oct, 2003).

313. E. R. Lazarowski, L. Homolya, R. C. Boucher, T. K. Harden, Direct demonstration of mechanically induced release of cellular UTP and its implication for uridine nucleotide receptor activation. *J Biol Chem* 272, 24348 (Sep 26, 1997).
314. E. R. Lazarowski, R. C. Boucher, UTP as an extracellular signaling molecule. *News Physiol Sci* 16, 1 (Feb, 2001).
315. A. K. Wihlborg *et al.*, Positive inotropic effects by uridine triphosphate (UTP) and uridine diphosphate (UDP) via P2Y2 and P2Y6 receptors on cardiomyocytes and release of UTP in man during myocardial infarction. *Circ Res* 98, 970 (Apr 14, 2006).
316. A. J. Hirsh *et al.*, Adenosine deaminase 1 and concentrative nucleoside transporters 2 and 3 regulate adenosine on the apical surface of human airway epithelia: implications for inflammatory lung diseases. *Biochemistry* 46, 10373 (Sep 11, 2007).
317. A. N. Drury, A. Szent-Gyorgyi, The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68, 213 (Nov 25, 1929).
318. G. Burnstock, Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24, 509 (Sep, 1972).
319. G. Burnstock, Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S172 (Jan, 2006).
320. G. Burnstock, Purinergic receptors. *J Theor Biol* 62, 491 (Oct 21, 1976).
321. G. Burnstock, A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*, 107 (1978).
322. S. J. Reshkin *et al.*, Activation of A(3) adenosine receptor induces calcium entry and chloride secretion in A(6) cells. *J Membr Biol* 178, 103 (Nov 15, 2000).
323. W. G. Junger, Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol* 11, 201 (Mar, 2011).
324. A. E. King, M. A. Ackley, C. E. Cass, J. D. Young, S. A. Baldwin, Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* 27, 416 (Aug, 2006).
325. J. C. Shryock, L. Belardinelli, Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol* 79, 2 (Jun 19, 1997).
326. G. Burnstock, Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87, 659 (Apr, 2007).
327. T. Eckle, A. Grenz, S. Laucher, H. K. Eltzschig, A2B adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice. *J Clin Invest* 118, 3301 (Oct, 2008).
328. S. Valera *et al.*, A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371, 516 (Oct 6, 1994).
329. G. Burnstock, Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64, 1471 (Jun, 2007).
330. M. F. Jarvis, B. S. Khakh, ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* 56, 208 (Jan, 2009).
331. J. R. Gever, D. A. Cockayne, M. P. Dillon, G. Burnstock, A. P. Ford, Pharmacology of P2X channels. *Pflügers Arch* 452, 513 (Aug, 2006).
332. A. Nicke *et al.*, P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *Embo J* 17, 3016 (Jun 1, 1998).
333. J. A. Roberts *et al.*, Molecular properties of P2X receptors. *Pflügers Arch* 452, 486 (Aug, 2006).
334. F. Di Virgilio, Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci* 28, 465 (Sep, 2007).
335. P. Pelegrin, A. Surprenant, Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1 β release through a dye uptake-independent pathway. *J Biol Chem* 282, 2386 (Jan 26, 2007).
336. M. Seman *et al.*, NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* 19, 571 (Oct, 2003).
337. S. Hubert *et al.*, Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. *J Exp Med* 207, 2561 (Nov 22, 2010).
338. K. D. Lustig, A. K. Shiau, A. J. Brake, D. Julius, Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5113 (Jun 1, 1993).
339. M. P. Abbracchio *et al.*, International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 58, 281 (Sep, 2006).
340. T. Yokomizo, T. Izumi, K. Chang, Y. Takuwa, T. Shimizu, A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature* 387, 620 (Jun 5, 1997).
341. M. Kronlage *et al.*, Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis. *Sci Signal* 3, ra55 (2010).
342. Y. Chen *et al.*, ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 314, 1792 (Dec 15, 2006).
343. A. Filippini, R. E. Taffs, M. V. Sitkovsky, Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8267 (Nov, 1990).
344. T. Woehrle *et al.*, Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. *Blood* 116, 3475 (Nov 4, 2010).
345. L. Yip *et al.*, Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *Faseb J* 23, 1685 (Jun, 2009).
346. K. Atarashi *et al.*, ATP drives lamina propria (T)H17 cell differentiation. *Nature* 455, 808 (Oct 9, 2008).
347. S. Padeh, A. Cohen, C. M. Roifman, ATP-induced activation of human B lymphocytes via P2-purinoreceptors. *J Immunol* 146, 1626 (Mar 1, 1991).
348. M. R. Elliott *et al.*, Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461, 282 (Sep 10, 2009).
349. B. McDonald *et al.*, Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 330, 362 (Oct 15, 2010).
350. S. S. Iyer *et al.*, Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20388 (Dec 1, 2009).
351. K. Wilhelm *et al.*, Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med* 16, 1434 (Dec, 2010).
352. H. Kono, K. L. Rock, How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 8, 279 (Apr, 2008).
353. A. la Sala *et al.*, Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J Leukoc Biol* 73, 339 (Mar, 2003).
354. R. G. Crystal, S. H. Randell, J. F. Engelhardt, J. Voynow, M. E. Sunday, Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proc Am Thorac Soc* 5, 772 (Sep 15, 2008).
355. M. J. Evans, L. J. Cabral, R. J. Stephens, G. Freeman, Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO₂. *Exp Mol Pathol* 22, 142 (Feb, 1975).
356. S. Gordon, P. R. Taylor, Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953 (Dec, 2005).
357. B. N. Lambrecht, H. Hammad, The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation. *Lancet* 376, 835 (Sep 4, 2010).
358. G. Raghu, D. Weycker, J. Edelsberg, W. Z. Bradford, G. Oster, Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 174, 810 (Oct 1, 2006).
359. <http://www.pq.poumon.ca/diseases-maladies/pulmonary-fibrose-pulmonaire/>.
360. T. J. Gross, G. W. Hunninghake, Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 345, 517 (Aug 16, 2001).
361. S. K. Jindal, R. Agarwal, Autoimmunity and interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 11, 438 (Sep, 2005).
362. E. A. Kim *et al.*, Interstitial lung diseases associated with collagen vascular diseases: radiologic and histopathologic findings. *Radiographics* 22 Spec No, S151 (Oct, 2002).
363. D. S. Kim, H. R. Collard, T. E. King, Jr., Classification and natural history of the idiopathic interstitial pneumonias. *Proc Am Thorac Soc* 3, 285 (Jun, 2006).
364. Y. Kondoh *et al.*, Acute exacerbation in idiopathic pulmonary fibrosis. Analysis of clinical and pathologic findings in three cases. *Chest* 103, 1808 (Jun, 1993).
365. C. Termeer, J. P. Sleeman, J. C. Simon, Hyaluronan-magic glue for the regulation of the immune response? *Trends Immunol* 24, 112 (Mar, 2003).
366. K. R. Taylor *et al.*, Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem* 279, 17079 (Apr 23, 2004).
367. K. A. Scheibner *et al.*, Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol* 177, 1272 (Jul 15, 2006).
368. A. Babelova *et al.*, Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *J Biol Chem* 284, 24035 (Sep 4, 2009).
369. J. Wiggins, B. Strickland, M. Turner-Warwick, Combined cryptogenic fibrosing alveolitis and emphysema: the value of high resolution computed tomography in assessment. *Respir Med* 84, 365 (Sep, 1990).
370. V. Lagente *et al.*, Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. *Braz J Med Biol Res* 38, 1521 (Oct, 2005).
371. H. Birkedal-Hansen, Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 7, 728 (Oct, 1995).
372. G. Murphy, A. J. Docherty, The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7, 120 (Aug, 1992).
373. J. E. Gadek *et al.*, Collagenase in the lower respiratory tract of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 301, 737 (Oct 4, 1979).
374. M. Selman, T. E. King, A. Pardo, Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 134, 136 (Jan 16, 2001).
375. H. Umezawa, Bleomycin and other antitumor antibiotics of high molecular weight. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* 5, 1079 (1965).
376. H. Umezawa, M. Ishizuka, K. Maeda, T. Takeuchi, Studies on bleomycin. *Cancer* 20, 891 (May, 1967).
377. I. Y. Adamson, Pulmonary toxicity of bleomycin. *Environmental Health Perspectives* 16, 119 (Aug, 1976).
378. Y. Daskal, F. Gyorkey, P. Gyorkey, H. Busch, Ultrastructural study of pulmonary bleomycin toxicity. *Cancer Res* 36, 1267 (Apr, 1976).
379. S. M. Hecht, In Cancer Chemotherapeutic Agents. Foye, W. O., Ed.; American Chemical Society: Washington, DC 369 (1995).
380. C. o. p. a. Specialties, Bleonexane®. Canadian Pharmacists Association, (2006).
381. S. M. Hecht, Bleomycin: new perspectives on the mechanism of action. *J Nat Prod* 63, 158 (Jan, 2000).
382. C. A. Claussen, E. C. Long, Nucleic Acid recognition by metal complexes of bleomycin. *Chem Rev* 99, 2797 (Sep 8, 1999).
383. N. I. Chaudhary, A. Schnapp, J. E. Park, Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 769 (Apr 1, 2006).
384. S. M. Sebt, J. E. Mignano, J. P. Jani, S. Srimatandada, J. S. Lazo, Bleomycin hydrolase: molecular cloning, sequencing, and biochemical studies reveal membership in the cysteine proteinase family. *Biochemistry* 28, 6544 (Aug 8, 1989).
385. I. Y. Adamson, D. H. Bowden, The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol* 77, 185 (Nov, 1974).
386. F. Chua, J. Gaudie, G. J. Laurent, Pulmonary fibrosis: searching for model answers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33, 9 (Jul, 2005).
387. S. B. Wallach-Dayana *et al.*, Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L790 (Apr, 2006).
388. V. Y. Lee *et al.*, Bleomycin induces alveolar epithelial cell death through JNK-dependent activation of the mitochondrial death pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289, L521 (Oct, 2005).
389. O. Mungunsukh, A. J. Griffin, Y. H. Lee, R. M. Day, Bleomycin induces the extrinsic apoptotic pathway in pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298, L696 (May, 2010).
390. X. Li, H. Rayford, R. Shu, J. Zhuang, B. D. Uhal, Essential role for cathepsin D in bleomycin-induced apoptosis of alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287, L46 (Jul, 2004).
391. X. Li, H. Rayford, B. D. Uhal, Essential roles for angiotensin receptor AT1a in bleomycin-induced apoptosis and lung fibrosis in mice. *Am J Pathol* 163, 2523 (Dec, 2003).
392. J. Zhao *et al.*, Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282, L585 (Mar, 2002).
393. F. Martinon, V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel, J. Tschopp, Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440, 237 (Mar 9, 2006).
394. C. Dostert *et al.*, Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320, 674 (May 2, 2008).
395. P. Gasse *et al.*, IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary

- inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest* 117, 3786 (Dec, 2007).
396. Y. Shi, J. E. Evans, K. L. Rock, Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425, 516 (Oct 2, 2003).
 397. R. C. Landis *et al.*, Safe disposal of inflammatory monosodium urate monohydrate crystals by differentiated macrophages. *Arthritis Rheum* 46, 3026 (Nov, 2002).
 398. M. Idzko *et al.*, Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med* 13, 913 (Aug, 2007).
 399. Y. Shi, W. Zheng, K. L. Rock, Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14590 (Dec 19, 2000).
 400. Y. Shi, K. L. Rock, Cell death releases endogenous adjuvants that selectively enhance immune surveillance of particulate antigens. *Eur J Immunol* 32, 155 (Jan, 2002).
 401. P. Gasse *et al.*, Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 179, 903 (May 15, 2009).
 402. H. Li, S. Nookala, F. Re, Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1 β and IL-18 release. *J Immunol* 178, 5271 (Apr 15, 2007).
 403. T. Kobayashi, H. Kouzaki, H. Kita, Human eosinophils recognize endogenous danger signal crystalline uric acid and produce proinflammatory cytokines mediated by autocrine ATP. *J Immunol* 184, 6350 (Jun 1, 2010).
 404. K. Bosmansky, K. Trnavsky, [Serum uric acid levels in disorders of the rheumatic type]. *Z Rheumatol* 43, 59 (Mar-Apr, 1984).
 405. H. Kono, C. J. Chen, F. Ontiveros, K. L. Rock, Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. *J Clin Invest* 120, 1939 (Jun 1, 2010).
 406. T. Muller *et al.*, The purinergic receptor P2Y₂ receptor mediates chemotaxis of dendritic cells and eosinophils in allergic lung inflammation. *Allergy* 65, 1545 (Dec, 2010).
 407. R. Paula Vieira *et al.*, P2Y₆ Receptor Contributes to Airway Inflammation and Remodeling in Experimental Allergic Airway Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*, (Apr 21, 2011).
 408. L. M. Fabbri, F. Luppi, B. Beghe, K. F. Rabe, Update in chronic obstructive pulmonary disease 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 1056 (May 15, 2006).
 409. E. Mortaz *et al.*, ATP in the pathogenesis of lung emphysema. *European Journal of Pharmacology* 619, 92 (Oct 1, 2009).
 410. M. Lommatzsch *et al.*, Extracellular adenosine triphosphate and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 181, 928 (May 1, 2010).
 411. M. Lucattelli *et al.*, P2X₇ receptor signaling in the pathogenesis of smoke-induced lung inflammation and emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44, 423 (Mar, 2011).
 412. S. Cicko *et al.*, Purinergic receptor inhibition prevents the development of smoke-induced lung injury and emphysema. *J Immunol* 185, 688 (Jul 1, 2010).
 413. M. C. Hyman *et al.*, Self-regulation of inflammatory cell trafficking in mice by the leukocyte surface apyrase CD39. *J Clin Invest* 119, 1136 (May, 2009).
 414. N. Riteau *et al.*, Extracellular ATP is a danger signal activating P2X₇ receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182, 774 (Sep 15, 2010).
 415. A. Castiglioni, V. Canti, P. Rovere-Querini, A. A. Manfredi, High-mobility group box 1 (HMGB1) as a master regulator of innate immunity. *Cell Tissue Res* 343, 189 (Jan, 2011).
 416. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med* 161, 646 (Feb, 2000).
 417. M. E. Bianchi, A. A. Manfredi, High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 220, 35 (Dec, 2007).
 418. I. Ito, J. Fukazawa, M. Yoshida, Post-translational methylation of high mobility group box 1 (HMGB1) causes its cytoplasmic localization in neutrophils. *J Biol Chem* 282, 16336 (Jun 1, 2007).
 419. A. Rouhiainen, S. Tumova, L. Valmu, N. Kalkkinen, H. Rauvala, Pivotal advance: analysis of proinflammatory activity of highly purified eukaryotic recombinant HMGB1 (amphoterin). *J Leukoc Biol* 81, 49 (Jan, 2007).
 420. J. H. Youn, Y. J. Oh, E. S. Kim, J. E. Choi, J. S. Shin, High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF- α production in human monocytes. *J Immunol* 180, 5067 (Apr 1, 2008).
 421. H. S. Hreggvidsdottir *et al.*, The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signals to promote inflammation. *J Leukoc Biol* 86, 655 (Sep, 2009).
 422. Y. Sha, J. Zmijewski, Z. Xu, E. Abraham, HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines. *J Immunol* 180, 2531 (Feb 15, 2008).
 423. I. E. Dumitriu, P. Baruah, M. E. Bianchi, A. A. Manfredi, P. Rovere-Querini, Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 35, 2184 (Jul, 2005).
 424. M. T. Lotze, K. J. Tracey, High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 5, 331 (Apr, 2005).
 425. H. Wang *et al.*, HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285, 248 (Jul 9, 1999).
 426. G. Y. Chen, J. Tang, P. Zheng, Y. Liu, CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science* 323, 1722 (Mar 27, 2009).
 427. E. Abraham, J. Arcaroli, A. Carmody, H. Wang, K. J. Tracey, HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol* 165, 2950 (Sep 15, 2000).
 428. H. Zhang *et al.*, Role of soluble receptor for advanced glycation end products on endotoxin-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 178, 356 (Aug 15, 2008).
 429. N. Hamada *et al.*, The role of high mobility group box1 in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39, 440 (Oct, 2008).
 430. J. Brett *et al.*, Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* 143, 1699 (Dec, 1993).
 431. J. M. Englert *et al.*, A role for the receptor for advanced glycation end products in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 172, 583 (Mar, 2008).
 432. L. Ramsgaard *et al.*, The role of the receptor for advanced glycation end-products in a murine model of silicosis. *PLoS One* 5, e9604 (2010).
 433. M. A. Queisser *et al.*, Loss of RAGE in pulmonary fibrosis: molecular relations to functional changes in pulmonary cell types. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39, 337 (Sep, 2008).
 434. M. He *et al.*, The role of the receptor for advanced glycation end-products in lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, L1427 (Dec, 2007).
 435. J. M. Englert *et al.*, Paradoxical function for the receptor for advanced glycation end products in mouse models of pulmonary fibrosis. *Int J Clin Exp Pathol* 4, 241 (Mar, 2011).
 436. N. Demling *et al.*, Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. *Cell Tissue Res* 323, 475 (Mar, 2006).
 437. M. Shirasawa *et al.*, Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells. *Genes Cells* 9, 165 (Feb, 2004).
 438. M. F. Tsan, Heat shock proteins and high mobility group box 1 protein lack cytokine function. *J Leukoc Biol*, (Jan 7, 2011).
 439. O. Takeuchi, S. Akira, Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805 (Mar 19, 2010).
 440. P. Scaffidi, T. Misteli, M. E. Bianchi, Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191 (Jul 11, 2002).
 441. M. E. Bianchi, HMGB1 loves company. *J Leukoc Biol* 86, 573 (Sep, 2009).
 442. A. L. Fink, Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* 79, 425 (Apr, 1999).
 443. Z. Li, A. Menoret, P. Srivastava, Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol* 14, 45 (Feb, 2002).
 444. R. P. Wallin *et al.*, Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol* 23, 130 (Mar, 2002).
 445. P. Srivastava, Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2, 185 (Mar, 2002).
 446. W. Chen, U. Syldath, K. Bellmann, V. Burkart, H. Kolb, Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol* 162, 3212 (Mar 15, 1999).
 447. J. H. Williams, H. E. Ireland, Sensing danger--Hsp72 and HMGB1 as candidate signals. *J Leukoc Biol* 83, 489 (Mar, 2008).
 448. K. Tanaka, Y. Tanaka, T. Namba, A. Azuma, T. Mizushima, Heat shock protein 70 protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Biochem Pharmacol* 80, 920 (Sep 15, 2010).
 449. T. Fujibayashi *et al.*, Protective effect of geranylgeranylacetone, an inducer of heat shock protein 70, against drug-induced lung injury/fibrosis in an animal model. *BMC Pulm Med* 9, 45 (2009).
 450. A. M. Piccinini, K. S. Midwood, DAMPENing inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm* 2010, (2010).
 451. A. B. Imaeda *et al.*, Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J Clin Invest* 119, 305 (Feb, 2009).
 452. S. Yamasaki *et al.*, Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat Immunol* 9, 1179 (Oct, 2008).
 453. G. Majno, M. La Gattuta, T. E. Thompson, Cellular death and necrosis: chemical, physical and morphologic changes in rat liver. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 333, 421 (1960).
 454. G. Majno, I. Joris, Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146, 3 (Jan, 1995).
 455. J. L. Romson *et al.*, Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 67, 1016 (May, 1983).
 456. H. Jaeschke, T. Hasegawa, Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int* 26, 912 (Oct, 2006).
 457. K. L. Rock, H. Kono, The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol* 3, 99 (2008).
 458. C. Gregory, Cell biology: Sent by the scent of death. *Nature* 461, 181 (Sep 10, 2009).
 459. C. J. Chen *et al.*, Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med* 13, 851 (Jul, 2007).
 460. T. Eigenbrod, J. H. Park, J. Harder, Y. Iwakura, G. Nunez, Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 α released from dying cells. *J Immunol* 181, 8194 (Dec 15, 2008).
 461. H. Kono, D. Karmarkar, Y. Iwakura, K. L. Rock, Identification of the cellular sensor that stimulates the inflammatory response to sterile cell death. *J Immunol* 184, 4470 (Apr 15, 2010).
 462. H. Li, A. Ambade, F. Re, Cutting edge: Necrosis activates the NLRP3 inflammasome. *J Immunol* 183, 1528 (Aug 1, 2009).
 463. N. M. Luheshi, B. W. McColl, D. Brough, Nuclear retention of IL-1 α by necrotic cells: a mechanism to dampen sterile inflammation. *Eur J Immunol* 39, 2973 (Nov, 2009).
 464. M. F. Tsan, B. Gao, Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 76, 514 (Sep, 2004).
 465. S. B. Willingham *et al.*, NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 183, 2008 (Aug 1, 2009).
 466. C. He, D. J. Klionsky, Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43, 67 (2009).
 467. V. Deretic, Autophagy in infection. *Curr Opin Cell Biol* 22, 252 (Apr, 2010).
 468. I. Monastyrsky, D. J. Klionsky, Autophagy in organelle homeostasis: peroxisome turnover. *Mol Aspects Med* 27, 483 (Oct-Dec, 2006).
 469. K. Moreau, S. Luo, D. C. Rubinsztein, Cytoprotective roles for autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 22, 206 (Apr, 2010).
 470. B. Levine, G. Kroemer, Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27 (Jan 11, 2008).
 471. H. W. Virgin, B. Levine, Autophagy genes in immunity. *Nat Immunol* 10, 461 (May, 2009).
 472. M. G. Gutierrez *et al.*, Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* 119, 753 (Dec 17, 2004).
 473. J. Harris, J. Keane, How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity. *Clin Exp Immunol* 161, 1 (Jul 1, 2010).
 474. J. Harris *et al.*, T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular Mycobacterium tuberculosis. *Immunity* 27, 505 (Sep, 2007).

475. T. Saitoh *et al.*, Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* 456, 264 (Nov 13, 2008).
476. X. Qu *et al.*, Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* 128, 931 (Mar 9, 2007).
477. J. Harris *et al.*, Autophagy controls IL-1 β secretion by targeting pro-IL-1 β for degradation. *J Biol Chem* 286, 9587 (Mar 18, 2011).
478. G. Petrovski, G. Zahuczky, G. Majai, L. Fesus, Phagocytosis of cells dying through autophagy evokes a pro-inflammatory response in macrophages. *Autophagy* 3, 509 (Sep-Oct, 2007).
479. G. Petrovski, al., Phagocytosis of cells dying through autophagy induces inflammasome activation and IL-1 β release in human macrophages. *Autophagy* 7:3, 37 (2011).
480. K. Nakahira *et al.*, Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 12, 222 (Mar, 2011).
481. R. Zhou, A. S. Yazdi, P. Menu, J. Tschopp, A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221 (Jan 13, 2011).
482. J. Tschopp, Mitochondria: Sovereign of inflammation? *Eur J Immunol* 41, 1196 (May, 2011).
483. T. D. Kanneganti *et al.*, Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* 26, 433 (Apr, 2007).
484. N. Inohara *et al.*, Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 278, 5509 (Feb 21, 2003).
485. N. Marina-Garcia *et al.*, Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2. *J Immunol* 180, 4050 (Mar 15, 2008).
486. L. Franchi, T. D. Kanneganti, G. R. Dubyak, G. Nunez, Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K⁺ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *J Biol Chem* 282, 18810 (Jun 29, 2007).
487. E. D. Boyden, W. F. Dietrich, Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet* 38, 240 (Feb, 2006).
488. V. Hornung *et al.*, Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9, 847 (Aug, 2008).
489. H. L. Weiner, D. Frenkel, Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat Rev Immunol* 6, 404 (May, 2006).
490. P. Duewell *et al.*, NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464, 1357 (Apr 29, 2010).
491. G. Lopez-Castejon *et al.*, P2X(7) receptor-mediated release of cathepsins from macrophages is a cytokine-independent mechanism potentially involved in joint diseases. *J Immunol* 185, 2611 (Aug 15, 2010).
492. Z. L. Newman, S. H. Leppla, M. Moayeri, CA-074Me protection against anthrax lethal toxin. *Infect Immun* 77, 4327 (Oct, 2009).
493. F. Martinon, Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur J Immunol* 40, 616 (Mar, 2010).
494. M. Valko *et al.*, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44 (2007).
495. V. Petrilli *et al.*, Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 14, 1583 (Sep, 2007).
496. C. M. Cruz *et al.*, ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem* 282, 2871 (Feb 2, 2007).
497. S. T. Hui *et al.*, Txnip balances metabolic and growth signaling via PTEN disulfide reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3921 (Mar 11, 2008).
498. K. Schroder, R. Zhou, J. Tschopp, The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science* 327, 296 (Jan 15, 2010).
499. J. A. Ehses *et al.*, Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* 56, 2356 (Sep, 2007).
500. A. E. Butler *et al.*, Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102 (Jan, 2003).
501. K. Maedler, G. Dharmadikari, D. M. Schumann, J. Stirling, Interleukin-1 beta targeted therapy for type 2 diabetes. *Expert Opin Biol Ther* 9, 1177 (Sep, 2009).
502. K. Maedler *et al.*, Glucose-induced beta cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 110, 851 (Sep, 2002).
503. M. Boni-Schnetzler *et al.*, Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor 1. *Endocrinology* 150, 5218 (Dec, 2009).
504. P. S. Brookes, Y. Yoon, J. L. Robotham, M. W. Anders, S. S. Sheu, Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C817 (Oct, 2004).
505. S. J. Goldman, R. Taylor, Y. Zhang, S. Jin, Autophagy and the degradation of mitochondria. *Mitochondrion* 10, 309 (Jun, 2010).
506. E. A. Veal, A. M. Day, B. A. Morgan, Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* 26, 1 (Apr 13, 2007).
507. G. Saxena, J. Chen, A. Shalev, Intracellular shuttling and mitochondrial function of thioredoxin-interacting protein. *J Biol Chem* 285, 3997 (Feb 5, 2010).
508. M. Colombini, VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem* 256-257, 107 (Jan-Feb, 2004).
509. E. Adinolfi *et al.*, Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. *Mol Biol Cell* 16, 3260 (Jul, 2005).
510. N. L. Restivo, M. D. Srivastava, I. A. Schafer, C. L. Hoppel, Mitochondrial dysfunction in a patient with crohn disease: possible role in pathogenesis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 38, 534 (May, 2004).
511. J. M. Oliveira, Nature and cause of mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: focusing on huntingtin and the striatum. *J Neurochem* 114, 1 (Jul, 2010).
512. E. Latz, NOX-free inflammasome activation. *Blood* 116, 1393 (Sep 2, 2010).
513. M. G. Schappi, V. Jaquet, D. C. Belli, K. H. Krause, Hyperinflammation in chronic granulomatous disease and anti-inflammatory role of the phagocyte NADPH oxidase. *Semin Immunopathol* 30, 255 (Jul, 2008).
514. F. Meissner *et al.*, Inflammasome activation in NADPH oxidase defective mononuclear phagocytes from patients with chronic granulomatous disease. *Blood* 116, 1570 (Sep 2, 2010).
515. F. Meissner, K. Molawi, A. Zychlinsky, Superoxide dismutase 1 regulates caspase-1 and endotoxic shock. *Nat Immunol* 9, 866 (Aug, 2008).
516. D. Perregaux, C. A. Gabel, Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem* 269, 15195 (May 27, 1994).
517. I. Walev, K. Reske, M. Palmer, A. Valeva, S. Bhakdi, Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes. *Embo J* 14, 1607 (Apr 18, 1995).
518. S. Mariathasan *et al.*, Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440, 228 (Mar 9, 2006).
519. S. Kim *et al.*, Listeria monocytogenes is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome. *Eur J Immunol* 40, 1545 (Jun, 2010).
520. C. S. Arlehamn, V. Petrilli, O. Gross, J. Tschopp, T. J. Evans, The role of potassium in inflammasome activation by bacteria. *J Biol Chem* 285, 10508 (Apr 2, 2010).
521. L. Franchi *et al.*, Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol* 7, 576 (Jun, 2006).
522. E. A. Miao, R. K. Ernst, M. Dors, D. P. Mao, A. Aderem, *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through Ipaf. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2562 (Feb 19, 2008).
523. P. Karki *et al.*, Intracellular K(+) inhibits apoptosis by suppressing the Apaf-1 apoptosome formation and subsequent downstream pathways but not cytochrome c release. *Cell Death Differ* 14, 2068 (Dec, 2007).
524. K. Cain, C. Langlais, X. M. Sun, D. G. Brown, G. M. Cohen, Physiological concentrations of K⁺ inhibit cytochrome c-dependent formation of the apoptosome. *J Biol Chem* 276, 41985 (Nov 9, 2001).
525. C. Schorn *et al.*, Sodium overload and water influx activate the NALP3 inflammasome. *J Biol Chem* 286, 35 (Jan 7, 2011).
526. L. A. O'Neill, Immunology. How frustration leads to inflammation. *Science* 320, 619 (May 2, 2008).
527. C. Dostert *et al.*, Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS One* 4, e6510 (2009).
528. F. Bauernfeind *et al.*, Cutting Edge: Reactive Oxygen Species Inhibitors Block Priming, but Not Activation, of the NLRP3 Inflammasome. *J Immunol*, (Jun 15, 2011).
529. F. G. Bauernfeind *et al.*, Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 183, 787 (Jul 15, 2009).
530. M. Lamkanfi, R. K. Malleddi, T. D. Kanneganti, Fungal zymosan and mannan activate the cryopyrin inflammasome. *J Biol Chem* 284, 20574 (Jul 31, 2009).
531. T. D. Kanneganti *et al.*, Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem* 281, 36560 (Dec 1, 2006).
532. J. M. Sanz *et al.*, Activation of microglia by amyloid [beta] requires P2X7 receptor expression. *J Immunol* 182, 4378 (Apr 1, 2009).
533. M. Lamkanfi *et al.*, Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol* 181, 3755 (Sep 15, 2008).
534. M. Kool *et al.*, Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 205, 869 (Apr 14, 2008).
535. A. Piccini *et al.*, ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8067 (Jun 10, 2008).
536. S. L. Cassel *et al.*, The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9035 (Jul 1, 2008).
537. H. Kumar *et al.*, Involvement of the NLRP3 inflammasome in innate and humoral adaptive immune responses to fungal beta-glucan. *J Immunol* 183, 8061 (Dec 15, 2009).
538. P. Pelegrin, A. Surprenant, Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1 β release through pyrophosphates. *Embo J* 28, 2114 (Jul 22, 2009).
539. J. Hewinson, S. F. Moore, C. Glover, A. G. Watts, A. B. MacKenzie, A key role for redox signaling in rapid P2X7 receptor-induced IL-1 beta processing in human monocytes. *J Immunol* 180, 8410 (Jun 15, 2008).
540. M. Winter *et al.*, Activation of the inflammasome by amorphous silica and TiO(2) nanoparticles in murine dendritic cells. *Nanotoxicology*, (Sep 16, 2010).
541. F. A. Sharp *et al.*, Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 870 (Jan 20, 2009).
542. J. V. Rajan, S. E. Warren, E. A. Miao, A. Aderem, Activation of the NLRP3 inflammasome by intracellular poly I:C. *FEBS Lett* 584, 4627 (Nov 19, 2010).
543. M. Lindauer, J. Wong, B. Magun, Ricin Toxin Activates the NALP3 Inflammasome. *Toxins (Basel)* 2, 1500 (Jun 1, 2010).
544. N. Said-Sadier, E. Padilla, G. Langsley, D. M. Ojcius, *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. *PLoS One* 5, e10008 (2010).
545. R. Allam *et al.*, Cutting edge: cyclic polypeptide and aminoglycoside antibiotics trigger IL-1 β secretion by activating the NLRP3 inflammasome. *J Immunol* 186, 2714 (Mar 1, 2011).
546. K. Niemi *et al.*, Serum Amyloid A Activates the NLRP3 Inflammasome via P2X7 Receptor and a Cathepsin B-Sensitive Pathway. *J Immunol* 186, 6119 (Jun 1, 2011).
547. M. N. Darisipudi, R. Allam, K. V. Rupanagudi, H. J. Anders, Polyene Macrolide Antifungal Drugs Trigger Interleukin-1 β Secretion by Activating the NLRP3 Inflammasome. *PLoS One* 6, e19588 (2011).
548. H. Watanabe *et al.*, Activation of the IL-1 β -processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 127, 1956 (Aug, 2007).
549. V. Hornung, E. Latz, Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation. *Eur J Immunol* 40, 620 (Mar, 2010).
550. M. G. Netea *et al.*, Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in

- monocytes and macrophages. *Blood* 113, 2324 (Mar 5, 2009).
551. G. Guarda *et al.*, Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity* 34, 213 (Feb 25, 2011).
552. N. Tweezer-Zaks, E. Rabinovich, M. Lidar, A. Livneh, Interferon-alpha as a treatment modality for colchicine-resistant familial Mediterranean fever. *J Rheumatol* 35, 1362 (2008).
553. G. Guarda *et al.*, T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes. *Nature* 460, 269 (Jul 9, 2009).
554. A. A. Shigeoka *et al.*, An inflammasome-independent role for epithelial-expressed Nlrp3 in renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* 185, 6277 (Nov 15, 2010).

Annexe

Annexe 1 : Article 4 : Nanoparticules et Inflammation pulmonaire

Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β

Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, Tschopp J. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Nov 9;107(45):19449-54

J'ai eu la chance de faire partie d'une collaboration entre ma directrice de thèse, Isabelle Couillin, et Jürg Tschopp, ancien chef d'un l'institut basé à Lausanne. Les expériences ont été principalement réalisées en Suisse par Amir Yazdi et les autres membres de l'équipe. Au laboratoire IEM d'Orléans, nous avons mis au point et réalisé les expériences pulmonaires.

L'utilisation de la matière à l'échelle nanométrique présente de très nombreux avantages, largement exploité par l'industrie pour toutes sortes d'applications (Cf. Introduction). Les nanotechnologies sont en pleine explosion et les prévisions économiques tablent sur un marché de centaines de milliards d'euros par an dans les années à venir. Cependant la majorité de la recherche s'est penchée sur les applications des nanoproducts mais pas sur leurs implications sur la santé et l'environnement. C'est l'objet du travail publié lors de cette collaboration.

Nos collaborateurs suisse ont montré que les nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂) ou de dioxyde de silice (SiO₂) sont capables d'activer l'inflammasome Nlrp3 et conduire à la production de IL-1 β . *A contrario*, des nanoparticules d'oxyde de Zinc (ZnO) d'une taille similaire ne produisent pas cet effet pro-inflammatoire. En accord avec la taille restreinte de ces particules, TiO₂ et SiO₂ pénètrent dans les cellules sans nécessité de phagocytose.

In vivo, l'injection de nanoparticules de TiO₂ dans le péritoine conduit au recrutement de neutrophiles, lequel s'accompagne d'une augmentation de la production de IL-1 β et IL-6 mais ni TNF- α , ni IL-1 α . Etonnement, le recrutement de neutrophiles apparaît peu dépendant de ASC et indépendant de Nlrp3. Cependant, le phénotype clair de la déficience en IL-1R1 laissait présager un rôle conjugué de IL-1 α et IL-1 β et en effet les résultats montrent que les souris déficientes en IL-1 α ne présentent pas de recrutement de cellules inflammatoires dans le péritoine. Enfin, le recrutement de neutrophiles ne dépend de l'inflammasome Nlrp3 qu'après la déplétion de IL1- α . Ainsi, les effets de IL1- α apparaissent prédominer sur ceux Nlrp3/IL-1 β dans ce modèle de péritonite.

Chez l'Homme, les deux voies principales de pénétration de nanoparticules comme le TiO₂ sont la peau et les poumons.

Les kératinocytes humains en culture sont capables de détecter la présence de TiO₂ d'une taille nanométrique, mais pas micrométrique, et conduire à la production de IL-1 β mature. Cette observation est importante car elle présente une activité de l'inflammasome Nlrp3 non négligeable au sein de cellules non myéloïdes. A noter que les kératinocytes murins n'expriment pas l'inflammasome et ne produisent pas de IL-1 β

et que l'exposition cutanée en TiO₂ sur plusieurs jours ne conduit pas chez ces animaux au développement d'une inflammation visible.

Afin d'étude les potentielles implications de l'inhalation de nanoparticules, nous avons instillé des nanoparticules de TiO₂ et observé la réponse inflammatoire 6h après. Nos résultats montrent le rôle également prédominant de IL1- α dans le recrutement de neutrophiles dans l'espace aérien. La protéine Nlrp3 apparaît facultative alors que Casp-1 et ASC semblent jouer un rôle un peu plus important. Cependant, les productions de IL1- α et IL-1 β sont fortement augmentées, ce qui montrerait l'implication de ces deux cytokines dans l'inflammation en réponse aux nanoparticules.

En conclusion, notre étude fournit des données qui devraient inciter à la plus grande prudence quant à l'utilisation massive de nanoproducts. Il est important d'étudier plus en profondeur leurs impacts sur la santé humaine. Notre étude montre qu'elles ne sont pas inertes pour l'organisme et conduisent au développement d'une réponse inflammatoire fortement dépendante de IL1- α . L'implication de l'inflammasome Nlrp3, notamment aux vues des différences entre les expériences *in vitro* et *in vivo*, mérite d'être clarifié.

Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β

Amir S. Yazdi^a, Greta Guarda^a, Nicolas Riteau^b, Stefan K. Drexler^a, Aubry Tardivel^a, Isabelle Couillin^b, and Jürg Tschopp^{a,1}

^aDepartment of Biochemistry, University of Lausanne, CH-1066 Epalinges, Switzerland; and ^bLaboratory of Molecular Immunology and Embryology, University of Orleans and Centre National de la Recherche Scientifique, F-45071 Orleans, France

Edited by Marc Feldmann, Imperial College London, London, United Kingdom, and approved October 1, 2010 (received for review June 13, 2010)

Nanoparticles are increasingly used in various fields, including biomedicine and electronics. One application utilizes the opacifying effect of nano-TiO₂, which is frequently used as pigment in cosmetics. Although TiO₂ is believed to be biologically inert, an emerging literature reports increased incidence of respiratory diseases in people exposed to TiO₂. Here, we show that nano-TiO₂ and nano-SiO₂, but not nano-ZnO, activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome, leading to IL-1 β release and in addition, induce the regulated release of IL-1 α . Unlike other particulate Nlrp3 agonists, nano-TiO₂-dependent-Nlrp3 activity does not require cytoskeleton-dependent phagocytosis and induces IL-1 α / β secretion in nonphagocytic keratinocytes. Inhalation of nano-TiO₂ provokes lung inflammation which is strongly suppressed in IL-1R- and IL-1 α -deficient mice. Thus, the inflammation caused by nano-TiO₂ in vivo is largely caused by the biological effect of IL-1 α . The current use of nano-TiO₂ may present a health hazard due to its capacity to induce IL-1R signaling, a situation reminiscent of inflammation provoked by asbestos exposure.

caspase-1 | titanium dioxide | silica dioxide

Nanoparticles are single particles with a diameter less than 100 nm (1). Nanomaterials are increasingly used for manufacturing industrial items, such as antibacterial surface coatings and semiconductors. The most frequently used nanoparticles are inorganic metal oxides such as silica dioxide (SiO₂) and titanium dioxide (TiO₂), due to their large surface-to-volume ratio (2). In particular, nano-TiO₂ is frequently used as white pigment in many everyday products such as white paint, paper, and plastics, and their use is especially prevalent in cosmetics (3).

Although μ m-sized and larger TiO₂ particles are believed to be biologically inert (4), an augmented frequency of respiratory diseases in workers exposed to TiO₂ was reported in the late 1980s (5). Supporting this observation, several recent studies demonstrated that pulmonary uptake of TiO₂ nanoparticles worsened respiratory diseases such as pulmonary fibrosis or lipopolysaccharide (LPS)-induced lung inflammation in vivo (6, 7). The particle size of TiO₂ was a critical factor in triggering this pulmonary inflammatory response (8, 9).

Cytokines of the interleukin-1 family, such as interleukin-1 α (IL-1 α), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-18 (IL-18) are potent mediators of innate immunity. They are produced as proforms, which are further processed upon activation. Pathways leading to IL-1 α processing, which is active both as pro-IL-1 α and as cleaved fragment, are yet to be characterized in detail, but were reported to involve the Ca²⁺-dependent protease calpain (10). Besides its function as an autocrine growth factor, IL-1 α is known to drive sterile inflammation, in particular in response to dying cells (11). Compared with IL-1 α processing and activation, the mechanisms mediating pro-IL-1 β and pro-IL-18 maturation are better characterized. Pro-IL-1 β and pro-IL-18 are cleaved by the protease caspase-1, that itself is autoactivated through caspase-1 clustering within large multiprotein complexes called inflama-

somes (12). To date four inflammasomes are functionally characterized: the Nlrp1 (NLR pyrin domain containing 1, Nalp1), Nlrp3 (NLR pyrin domain containing 3, Nalp3), Nlrp4 (NLR containing a caspase recruitment domain 4, Ipaf), and AIM2 (absent in melanoma) inflammasomes. The best-characterized inflammasome consists of three main components, the Nod-like receptor (NLR)-family protein, Nlrp3, procaspase-1, and the ASC (apoptosis speck-like protein containing a CARD) adapter, which bridges interactions between the former proteins (12). Following autoactivation via inflammasome assembly, caspase-1 cleaves IL-1 β , whose biologically active form is then secreted.

The potent actions of mature IL-1 β dictate that its synthesis and secretion are tightly regulated. A first signal, such as Toll-like receptor activation, triggers synthesis of pro-IL-1 β by transcriptional induction, whereas a second stimulus leads to inflammasome oligomerization, caspase-1 autoactivation, and caspase-1-dependent cleavage and release of the biologically active, mature IL-1 β . This second signal, by which an active inflammasome complex is formed, is triggered by an ever-expanding group of chemically and biologically unrelated danger-associated molecular patterns (DAMPs) or pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (13). Whereas Nlrp3 inflammasome-dependent inflammation promotes pathogen clearance in a number of infection models, such as *Candida albicans* (14) and *Klebsiella pneumoniae* (15), the Nlrp3 inflammasome can also initiate pathological inflammatory reactions in response to endogenous or exogenous danger signals such as ATP (16), monosodium urate crystals (MSU) (17), UVB irradiation (18), and the environmental pollutants, silica and asbestos (19, 20). Although data suggest that potassium efflux (13), cathepsin B (19), and/or the generation of reactive oxygen species (ROS) (20) may modulate inflammasome activation, the exact molecular mechanisms mediating inflammasome activation remain elusive (21).

Results

Nanoparticles Activate the Nlrp3 Inflammasome in Myeloid Cells and Lead to IL-1 β Secretion in Primary Human Keratinocytes. To determine the possible IL-1-stimulatory effect of metallic nanoparticles, the human macrophage cell line THP1, was stimulated with various nanoparticles for 6 h. In contrast to ZnO (15 nm), both TiO₂ (anatase, 20 nm or rutile, 80 nm) and SiO₂ (15 nm) induced caspase-1 cleavage and IL-1 β secretion (Fig. 1A). Because the organ primarily exposed to everyday metallic nanoparticles is the skin, we also stimulated primary human keratinocytes with nanoparticles (Fig. 1B).

Author contributions: A.S.Y., I.C., and J.T. designed research; A.S.Y., G.G., N.R., S.K.D., A.T., and I.C. performed research; A.S.Y., G.G., N.R., S.K.D., A.T., and I.C. analyzed data; and A.S.Y. and J.T. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: Jurg.Tschopp@unil.ch.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1008155107/-DCSupplemental.

Similar to macrophages, human keratinocytes secreted mature IL-1 β in a dose-dependent manner following exposure to nano-TiO $_2$ and nano-SiO $_2$ but not carbon nanotubes, another nanoparticle, which is used primarily in electronic and material science.

To examine whether mouse and human cells behaved similarly, mouse bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) (Fig. 1C) and bone marrow-derived macrophages (BMDM) (Fig. S1) were treated with nano-TiO $_2$ and nano-SiO $_2$. Nano-TiO $_2$ and nano-SiO $_2$ were potent stimuli for IL-1 β secretion in both murine myeloid cell types, whereas release of inflammasome-independent cytokines such as TNF were minimally affected by nano-TiO $_2$ stimulation as compared with the TLR9 agonist CpG DNA, which induced TNF secretion without activating inflammasome-dependent IL-1 β secretion (Fig. S2).

As particulate danger signals (e.g., asbestos, MSU, and alum) trigger secretion of mature IL-1 β via the Nlrp3 inflammasome, we hypothesized that the Nlrp3 inflammasome may also mediate responses to nano-TiO $_2$ and nano-SiO $_2$. To test this hypothesis, we treated human and mouse macrophages in which Nlrp3 inflammasome components were knocked down or knocked out, respectively, with nano-TiO $_2$ or nano-SiO $_2$. THP1 cells stably infected with shRNA directed against caspase-1 or Nlrp3 (Fig. 1A) or BMDCs from ASC $^{-/-}$ or Nlrp3 $^{-/-}$ mice (Fig. 1C) did not secrete IL-1 β in response to nano-TiO $_2$ or nano-SiO $_2$, indicating that the Nlrp3 inflammasome mediated responses to these agonists. In contrast, knockdown or knockout of the related NLR family member, IPAF (Nlrp4) which can also mediate inflammasome assembly, did not impair IL-1 β secretion (Fig. 1A, Fig. S1).

Phagocytosis Is Not Required for Inflammasome Activation by Nano-TiO $_2$. The precise mechanism of inflammasome activation remains poorly characterized at present; however, potassium efflux and

intracellular ROS have been proposed to be critical for Nlrp3 inflammasome activation in response to "classic" Nlrp3 agonists. To further characterize the activating capacity of nanoparticles in this context, we examined whether Nlrp3 inflammasome activity was suppressed by the ATP-sensitive potassium channel inhibitor, glibenclamide or the chemical ROS scavenger (2R,4R)-4-aminopyrrolidine-2, 4-dicarboxylate (APDC). As for "classic" Nlrp3 agonists such as MSU, cellular pretreatment with glibenclamide or APDC diminished inflammasome-dependent IL-1 β secretion triggered by nanoparticles (Fig. S3A).

Although the above results suggested the current inflammasome activation scheme proposed for other particles, we found an important difference between nano-TiO $_2$ and known particulate activators such as MSU, alum, hemozoin, and μ m-sized SiO $_2$ (20). Whereas these above-mentioned particulates can activate the Nlrp3 inflammasome in myeloid cells, they do not trigger activation in keratinocytes (Fig. 2A and B). This is likely to reflect the low capacity of keratinocytes to phagocytose particles. In contrast, small diameter (15 nm) but not large diameter (1.5 μ m) SiO $_2$ could activate the inflammasome in keratinocytes (Fig. 2B), whereas both nano-sized and μ m-sized SiO $_2$ activated the Nlrp3 inflammasome in myeloid cells (Fig. 2A), suggesting that the inflammasome-activating signal was triggered without the need for particle phagocytosis. In support of this, disruption of actin-mediated phagocytosis by cytochalasin D was unable to suppress nanoparticle-induced IL-1 β secretion in macrophages (Fig. 2C). Electron microscopy studies further revealed that mainly clustered TiO $_2$ was located free in the cytoplasm of THP1 cells and not located in phagosomes or lysosomes, as would be expected if they were internalized by phagocytosis (Fig. 2D). To further elucidate other possible mechanisms of nanoparticle uptake, THP1 cells were either treated with methyl- β -cyclodextrin to disrupt lipid raft-mediated endocytosis

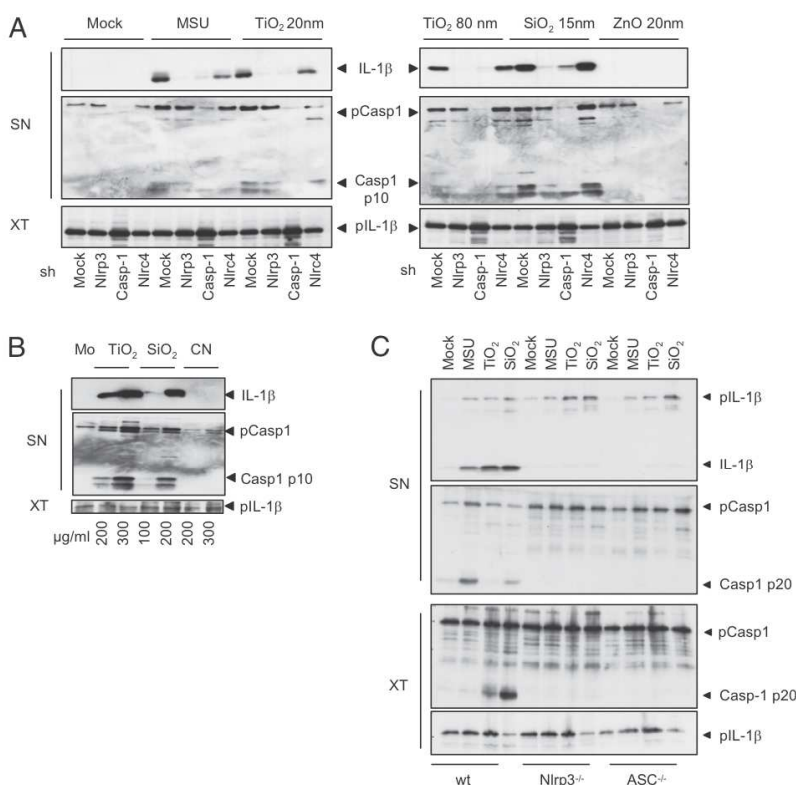


Fig. 1. Titanium and silica nanoparticles activate the Nlrp3 inflammasome in murine and human macrophages and human keratinocytes. (A) THP1 cells stimulated with MSU (300 μ g/mL), TiO $_2$ 20 nm (200 μ g/mL), TiO $_2$ 80 nm (200 μ g/mL), SiO $_2$ 15 nm (200 μ g/mL), and ZnO 15 nm (200 μ g/mL) for 6 h and analyzed by Western blot. (B) Human primary keratinocytes stimulated with the indicated concentrations of TiO $_2$, 20 nm, SiO $_2$, 15 nm secreted IL-1 β and cleaved caspase-1, whereas carbon nanotube exposure did not trigger caspase-1 cleavage. (C) Murine macrophages treated with MSU (300 μ g/mL), nano-TiO $_2$ (200 μ g/mL), or nano-SiO $_2$ (200 μ g/mL) released IL-1 β in an Nlrp3- and ASC-dependent manner. SN, supernatants; XT, cell extracts. Results are representative of three independent experiments.

filipin or nystatin to block the caveolae-dependent endocytic pathway or chlorpromazine hydrochloride to inhibit clathrin-mediated endocytosis but nano-TiO₂-mediated inflammasome activation could not be blocked. (Fig. S3 B–D)

Recruitment of Neutrophils upon I.P. Injection of Nano-TiO₂ Is Completely IL-1R-, ASC-, and IL-1 α -Dependent. Taken together, the above results suggested a proinflammatory activity of nano-TiO₂ and nano-SiO₂ in vitro. We used an established inflammatory peritonitis model (17) to confirm such a role in vivo. In this model, i.p. injection of inflammasome activators drives the influx of neutrophilic granulocytes to the peritoneal cavity. Compared with the solvent control, TiO₂ evoked significant neutrophil recruitment 6 h postinjection (Fig. 3A). The influx of neutrophils was accompanied by significant secretion of IL-1 β and IL-6 into the peritoneal cavity, while cytokine levels for IL-1 α and TNF remained unchanged (Fig. S4A). When signaling by both IL-1 α and IL-1 β was blocked through deficiency in their common receptor, IL-1 receptor (IL-1R), mice exhibited strongly reduced neutrophil influx (Fig. 3B). In strict accordance with impaired neutrophil recruitment, a drastic decrease in IL-6 secretion was detected in IL-1R^{-/-} mice, suggesting the dependence of IL-6 secretion on IL-1R signaling (Fig. S4B). As the ex vivo findings indicated a critical function for the inflammasome components ASC and Nlrp3 in the response to specific nanoparticles, we also examined TiO₂-dependent neutrophil influx in mice deficient in ASC and Nlrp3. Whereas TiO₂-induced peritonitis appreciably depended on the ASC adapter, surprisingly, Nlrp3 deficiency did not significantly affect TiO₂-induced peritonitis (Fig. 3C and D).

Due to our observation that IL-1R deficiency more strongly suppressed TiO₂-dependent neutrophil influx compared with ASC or Nlrp3 deficiency, we hypothesized that IL-1 α and IL-1 β may act in concert to mediate neutrophil influx via their common receptor. Indeed, IL-1 α deficiency protected mice from inflammatory cell recruitment (Fig. 3E).

Recruitment of Neutrophils upon I.P. Injection of Nano-TiO₂ only Depends on NLRP3 After Depletion of IL-1 α . As the effects of IL-1 α appeared to dominate over Nlrp3/IL-1 β in this in vivo setting,

we reexamined the effect of Nlrp3 deficiency following IL-1 α depletion. Following injection of a neutralizing anti-IL-1 α antibody, Nlrp3 deficiency significantly suppressed neutrophil influx compared with WT, indicating that both IL-1 α and IL-1 β can mediate TiO₂-induced peritonitis, although the effect of IL-1 α predominates (Fig. 3F).

Nano-TiO₂ Induces the Release of IL-1 α in a Partially Nlrp3- and ASC-Dependent Manner in Myeloid Cells and Keratinocytes in Vitro. As the peritonitis model suggested a major role for IL-1 α in TiO₂-dependent inflammation in vivo, we next investigated whether nanoparticles regulated the secretion of IL-1 α by murine dendritic cells (DCs) in vitro. Whereas release of IL-1 β by MSU or nano-TiO₂ was completely dependent on ASC and Nlrp3 as expected (Fig. 3G), IL-1 α release displayed only a partial dependency on ASC and Nlrp3 (Fig. 3H). The partial ASC dependency of IL-1 α release was also apparent in murine keratinocytes (Fig. 3I).

Cutaneous Exposure to TiO₂ Does Not Lead to a Clinically or Histologically Visible Inflammation. Data from the peritonitis model and the in vitro data provided proof of principle that TiO₂ can induce IL-1-dependent inflammatory responses. However, the two most common routes of nano-TiO₂ exposure to humans are via the skin (e.g., application of nano-TiO₂-containing cosmetics) and the lungs (e.g., dust inhalation). To more closely mimic a physiological route of cutaneous exposure, we treated shaved back skin of mice with either a single application of TiO₂ or PBS dissolved in olive oil or for chronic exposure once daily over a period of 5–10 consecutive days. In agreement with previous reports suggesting that TiO₂ nanoparticles do not penetrate into living skin (22, 23), we found that application of the nanoparticle emulsion or its vehicle control did not lead to clinically visible inflammation. Histologically, 8/11 (72%) mice treated with one single application of TiO₂ displayed acanthosis (epidermal thickening) without any inflammatory infiltrate, whereas the PBS-treated mice displayed epidermal alterations in 2/11 (18%) cases. Acanthosis without inflammatory infiltrate might be due to mechanical irritation and could be caused by the mice scratching or licking away the TiO₂. Upon chronic exposure, the incidence of epidermal

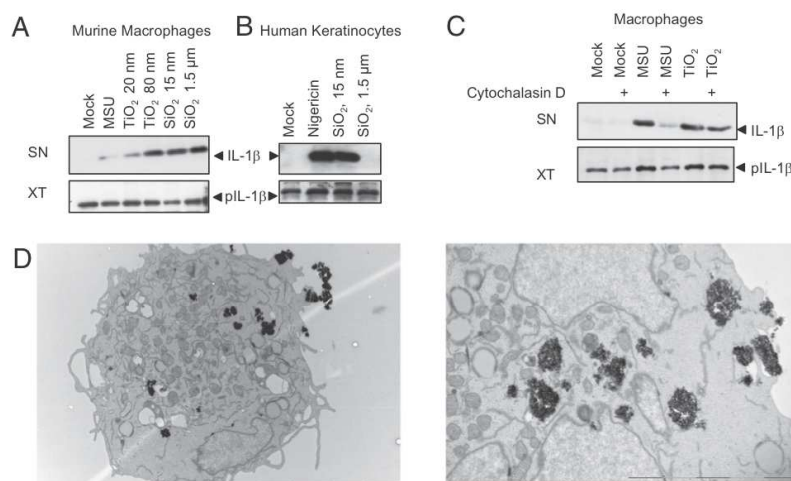


Fig. 2. Phagocytosis is not essential for nanoparticle-induced inflammasome activation. (A) Bone marrow-derived macrophages released IL-1 β upon stimulation with MSU (300 μ g/mL), TiO₂ 20 nm (200 μ g/mL), TiO₂ 80 nm (200 μ g/mL), SiO₂ 15 nm (200 μ g/mL), and SiO₂ 1.5 μ m (200 μ g/mL). (B) In contrast, human keratinocytes released mature, cleaved IL-1 β only upon exposure to nano-SiO₂ (200 μ g/mL) and not to μ m-sized SiO₂ (200 μ g/mL). (C) Actin polymerization blockade by Cytochalasin D (1 μ M) impaired MSU-induced inflammasome activation without affecting TiO₂-dependent IL-1 β secretion. Results are representative of three independent experiments. (D) TEM images of THP1 cells stimulated with nano-TiO₂. TiO₂ aggregates were free in the cytoplasm and not located in phagosomes.

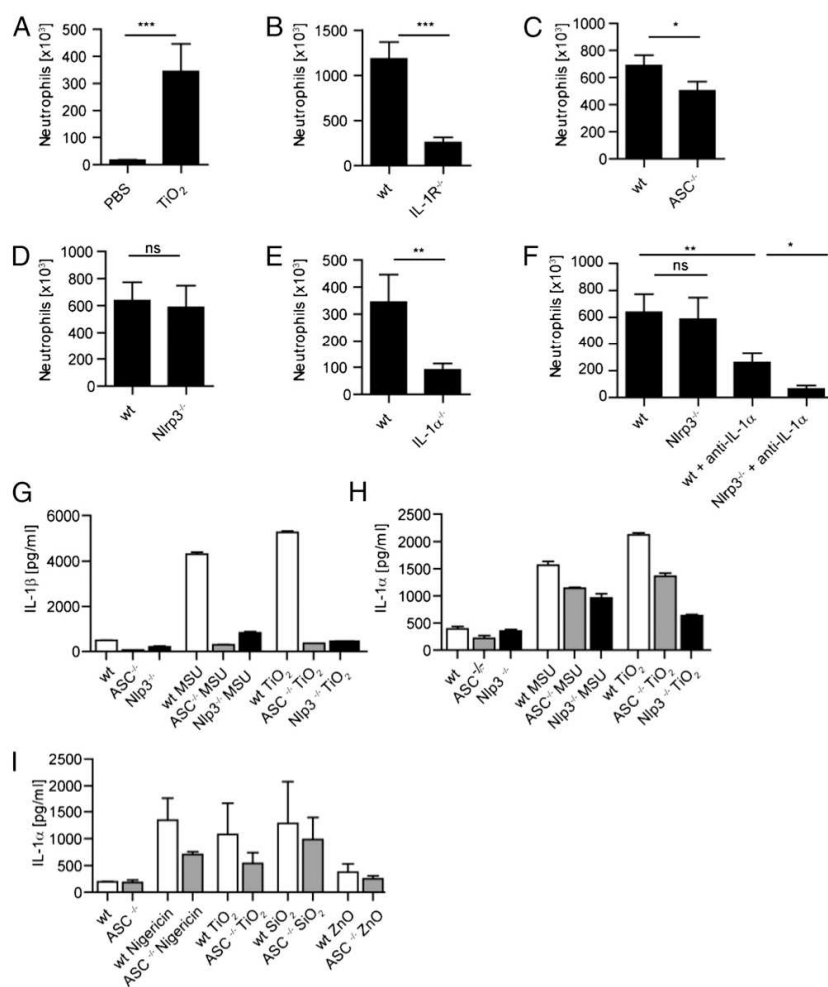


Fig. 3. Role of the inflammasome and IL-1α in murine models of TiO₂-induced peritonitis and in murine BMDCs and primary murine keratinocytes. (A) I.p. injection of nano-TiO₂ induced the recruitment of neutrophils to the peritoneal cavity. (B–F) The recruitment of inflammatory cells depended upon the presence of (B) IL-1R, (C) ASC, and (E) IL-1α, whereas the inflammatory response was only clearly dependent on Nlrp3 following IL-1α depletion (D and F). (**P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; NS, nonsignificant, *n* = 7–10 mice per group). (G) Upon stimulation with MSU (300 μg/mL) or nano-TiO₂ (200 μg/mL) release of IL-1β was completely abolished in Nlrp3- or ASC-deficient murine BMDCs, whereas the release of (H) IL-1α only partially depended on Nlrp3 and ASC. (I) Murine keratinocytes secreted IL-1α in a partially ASC-dependent manner upon stimulation with Nigericin (5 μM), nano-TiO₂ (200 μg/mL), and nano-SiO₂ (200 μg/mL), whereas exposure to nano-ZnO (200 μg/mL) did not trigger IL-1α secretion. Results are representative of three independent experiments.

thickening did not further increase and still no inflammatory infiltrates were detectable.

Pulmonary Inflammation upon Intranasal Exposure of Nano-TiO₂ Requires IL-1R, ASC, Caspase-1, and IL-1α. We next investigated the effect of pulmonary exposure to nano-TiO₂. A single dose of intranasally administered TiO₂ induced an inflammatory response leading to neutrophil recruitment in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and IL-1R or caspase-1 deficiency significantly blocked neutrophil influx (Fig. 4A). Similar to the observations in the peritonitis model, neutrophil influx depended significantly on the presence of the adapter protein ASC, but exhibited only a partial dependence on Nlrp3, which did not reach significance (Fig. 4B and C). As for the peritonitis model, neutrophil recruitment was highly dependent on IL-1α (Fig. 4C), and so the effects of IL-1α in this model may mask the potential contribution of IL-1β/Nlrp3. In accordance with our observation in the peritonitis model, only a minor secretion of IL-1α and TNF into the BALF could be observed, whereas TiO₂ caused a prominent increase of IL-1β and IL-6 (Fig. 4D). Regarding total lung tissue, an induction of both IL-1α and IL-1β could be observed after the administration of TiO₂, reflecting an increased synthesis of the two cytokines.

Discussion

As the use of nanotechnology in our daily consumption products is expanding at a rapid pace, we investigated the inflammatory capacity of one of the most commonly used nanoparticles, TiO₂. Previous in vitro and in vivo experiments (24) and postexpositional analysis (5) suggested TiO₂ was able to induce inflammation; however, the mechanisms underlying such inflammation were unclear. We present here that, like other environmental irritants such as asbestos or silica, TiO₂ and SiO₂ nanoparticles are sensed by the Nlrp3 inflammasome (20).

Despite the identification and characterization of numerous sterile or microbial activators of the Nlrp3 inflammasome, the precise mechanism mediating inflammasome activation by these diverse stimuli remains to be determined. Interestingly, nano-TiO₂ only partly followed the current scheme for particulate-mediated activation. Like asbestos and silica, nano-TiO₂ induces the production of ROS (3) and ROS scavengers block TiO₂-dependent IL-1β secretion; nanoparticle-dependent inflammasome activation also appears to depend upon intracellular potassium levels. In contrast to large-diameter, classic particulate Nlrp3 agonists that require phagocytosis, uptake of nanoparticles appeared to occur independently of a functional actin cytoskeleton. Such a mechanistic divergence from the classic particulate activation scheme is

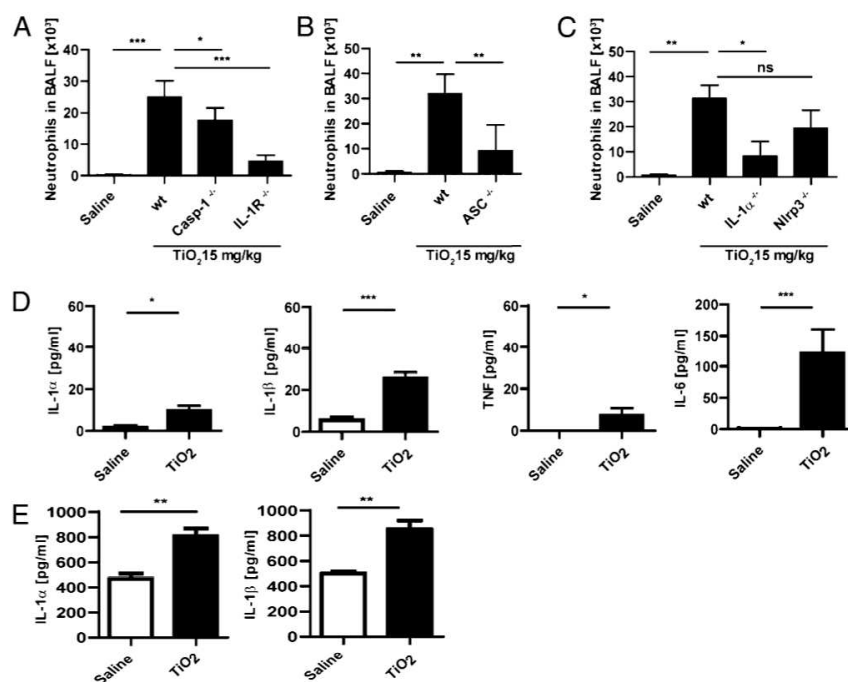


Fig. 4. Pulmonary exposure to TiO₂. Intranasal application of nano-TiO₂ triggered the recruitment of neutrophils to the bronchoalveolar fluid (BALF). Neutrophil recruitment was clearly dependent on (A) IL-1R, caspase-1, (B) ASC, and (C) IL-1α, whereas the recruitment did not significantly depend on Nlrp3. (D) Intranasal application of nano-TiO₂ induced the secretion of IL-6 and IL-1β into the BALF, whereas TNF- and IL-1α production was only slightly increased. (E) In total lung tissue, significantly increased levels of IL-1α and IL-1β could be observed (**P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; NS, nonsignificant; *n* = 6–8 mice per group).

further supported by the ability of nanoparticles to activate primary keratinocytes, which unlike professional phagocytic cells such as macrophages, only ingest small organelles such as melanosomes. However, the exact mechanism of nano-TiO₂ uptake remains elusive, as blocking lipid raft-mediated, caveolin-dependent, or clathrin-dependent endocytosis did not efficiently block IL-1β secretion.

In addition to ASC-, Nlrp3-, and caspase-1-dependent secretion of mature IL-1β, we found that nano-TiO₂ triggers secretion of another IL-1 family member, IL-1α, in both myeloid and epithelial cells. Interestingly, IL-1α secretion also depends, albeit partly, on the Nlrp3 inflammasome, in accordance with previous results in caspase-1-deficient mice (25).

The *in vivo* results presented here clearly demonstrate an IL-1R-dependent proinflammatory activity of nano-TiO₂ in the lung and peritoneum, which exhibits similar potency to MSU and asbestos, which cause gout and asbestosis, respectively. Moreover, the extreme potency of nano-TiO₂ is reflected by its capability to release both IL-1α and IL-1β and is further highlighted by the fact that it can induce the secretion of IL-1 by keratinocytes, a feature not shared with typical particulates. Our results obtained in lung and peritoneal inflammation models indicate the dominance of IL-1α over the biological contribution of IL-1β/Nlrp3.

Our data suggest that nano-TiO₂ should be used with greater caution than is currently used. The manufacture of TiO₂ nanoparticles is a huge industry; about 2 million tons per year are produced worldwide. In addition to paint, cosmetics, sunscreen, and vitamins, nanoparticles can be found in toothpaste, food colorants, nutritional supplements, and hundreds of other personal care products. When this widespread usage is considered in light of the data presented above, the potential risk of inflammation-driven cancer is a particular concern, especially for people occupationally exposed to high concentrations of TiO₂ nanoparticles. Better precautions must be taken to limit the ingestion of these particles, both in manufacturing and in everyday contact with nanoparticle-containing substances.

Similar words of caution were expressed in the last century following the first evidence for association between lung inflam-

mation and asbestos inhalation. Yet it took almost 100 y, and countless fatalities, until asbestos was banned from use. Given that asbestos and TiO₂ exert similar proinflammatory activities via IL-1R signaling through the activation of either IL-1α and IL-1β, we hope that future decisions will be made to prevent possible morbidity and perhaps mortality.

Materials and Methods

Mice. C57BL/6J, Nlrp3^{-/-} (17), Asc^{-/-}, Ipaf^{-/-} (26), IL-1α (27), IL-1R^{-/-}, and caspase-1^{-/-} (25) mice (on C57BL/6J background) and BALB/c and IL-1R^{-/-} (28) mice (on BALB/c background) were housed at the animal facility at the University of Lausanne or the Transgenos Institute (Centre National de la Recherche Scientifique, Orleans, France). All animal experiments followed the French government's ethical and animal experiment regulations and the Swiss Federal Veterinary Office guidelines. Six- to 10-wk-old C57BL/6J and BALB/c mice were purchased from The Jackson Laboratory.

Reagents. Nano-sized particles (TiO₂, anatase, 20 nm; TiO₂, rutile, 80 nm; ZnO, 15 nm; SiO₂, 15 nm, carbon nanotubes) were obtained from Iolitec. Before each use, the particles were sonicated 15 min and vigorously vortexed for 1 min. Nigericin, MSU, cytochalasin D, nystatin, methyl-β-cyclodextrin, and chlorpromazine hydrochloride were purchased from Sigma; phorbol 12-myristate 13-acetate and APDC from Alexis.

Anti-human cleaved IL-1β (2021L) was purchased from Cell Signaling and anti-human caspase-1 (sc-622) was obtained from Santa Cruz; anti-IL-1β p35 is a sheep antibody made in our laboratory. Antibodies against mouse IL-1β and mouse caspase-1 (p20) were generous gifts from Roberto Solari, Glaxo, and Peter Vandenabeele (Ghent University, Belgium).

For cytokine detection, ELISA kits for murine IL-1α (R&D System), IL-1β, and TNF-α (eBioscience) were used according to the manufacturers' instructions.

Cell Preparation. Bone marrow-derived dendritic cells and bone marrow-derived macrophages were differentiated from tibial and femoral bone marrow progenitors as described elsewhere (29, 30). Cells were primed with 10 ng/mL ultra-pureLPS (Invivogen) for 3 h. Cell culture medium was replaced by OPTIMEM (Invitrogen) for the duration of the stimulation. Supernatants (SN) were precipitated by methanol-chloroform precipitation and cell extracts (XT) and SN of ~200,000 cells were loaded for Western blot.

Primary adult murine tail epidermal keratinocytes were isolated from adult mice according to standard procedure (31). Tail skin was digested overnight in

10 mg/mL Dispase II (Roche). After removal of the epidermal sheets and trypsin digestion (0.05% Trypsin/EDTA), the epidermal suspension was filtered through a 100- μ m mesh. The cells were cultured in Cnt-57 basal keratinocytes medium (CellnTec) on collagen-coated dishes (Puracol, Nutacon).

Primary human keratinocytes were isolated from neonatal foreskin (32). Briefly, the s.c. fatty tissue was trimmed and the biopsies were placed in 10 mg/mL Dispase II (Roche). The epidermal sheets were removed, chopped, and incubated in 0.05% Trypsin/EDTA. After filtration through a 100- μ m mesh, the cells were cultured in Cnt-57 basal keratinocytes medium (CellnTec).

Generation of THP1 Cells Stably Expressing shRNA. THP1 cells stably expressing shRNA against Nalp3 and Caspase-1 were obtained as previously described (13).

For experiments, THP1 cells were differentiated 3 h with 0.5 μ M phorbol 12-myristate 13-acetate (Enzo Lifesciences). Cell extracts and precipitated supernatants were analyzed by Western blot.

Electron Microscopy. Samples were fixed in 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, and postfixed in 1% osmium tetroxide, 1.5% potassium ferrocyanide, and stained with 1% uranyl acetate. After dehydration, the samples were embedded in Durcupan. Ultrathin sections were contrasted with lead citrate and then examined with a Philips CM12 electron microscope.

Fluorescence Microscopy. Cholera toxin B staining (Invitrogen) was performed according to the manufacturer's instructions. Slides were examined with a Leica SP5 tandem upright confocal microscope and the LAS AF lite software.

In Vivo Peritonitis Model. Peritonitis was induced in 6- to 10-wk-old age- and sex-matched mice by injection of 1–1.5 mg of sonicated and thoroughly vortexed TiO₂ particles in 400 μ L sterile PBS. After 5–6 h, the mice were killed by CO₂ exposure and the peritoneal cavity was flushed with 5.5 mL of sterile PBS. The lavage fluid was centrifuged and the cell pellets analyzed for neutrophil influx by flow cytometry (CD11b⁺, Ly-6C⁺, Ly-6G^{high}, F4/80⁺) using the following monoclonal antibodies: anti-CD11b (M1/70), anti-F4/80 (BM8) (eBioscience), anti-Ly-6C (AL-21), and anti-Ly-6G (1A8) (BD Biosciences). Data were collected using a FACSCanto (BD Biosciences) and analyzed using FLOWJO software (Tree Star).

The supernatants were concentrated using Amicon Ultra centrifugal filters (Millipore) and analyzed using ELISA kits for murine IL-1 α (R&D System), IL-1 β , IL-6, and TNF (eBioscience) according to the manufacturers' instructions.

For experiments in which IL-1 α was blocked with a neutralizing antibody, mice were injected with anti-IL-1 α (clone ALF-161, eBioscience) 80 μ g i.p., 30 min before TiO₂ stimulation.

In Vivo Cutaneous Exposure. Intact murine back skin was challenged with nano-TiO₂ in PBS/olive oil or the PBS/olive oil carrier control by cutaneous exposure on the back skin. The back skin of the mice was shaved 24 h before exposure. Besides a single application, we applied the topical treatment daily for 5–10 consecutive days. Twenty-four hours after the last exposure, mice were killed by CO₂ exposure, skin biopsies were taken, fixed in formalin, and stained with hematoxylin and eosin (H&E) using standard procedures.

In Vivo Intranasal Application and Bronchoalveolar Lavage (BAL). TiO₂ (7.5–30 mg/kg) in saline or the vehicle alone was administered by nasal instillation in a volume of 40 μ L under light ketamine-xylazine anesthesia. Six hours post-application, BAL was performed. Briefly, the trachea was incised and a homemade small plastic canula was inserted to flush both lungs three times with 1 mL PBS, going back and forth twice each time. The recovery of the total lavage exceeded 95%. The samples collected were centrifuged (600 g for 10 min) and cell pellets were resuspended in 0.4 mL PBS and maintained at 4 °C until cell determination. Differential cell counts were performed on cytopsin preparations (Cytospin 3, Thermo Shandon) after May-Grünwald staining (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Differential cell counts were made on 200 cells using standard morphological criteria. For cytokine determination, the supernatants of the BALF were analyzed by ELISA.

After BAL, the lungs were perfused with Isoton (Coulter) to flush the vascular content. Lungs were homogenized by a rotor-stator (Ultra Turrax), the extract was centrifuged, and IL-1 α and IL-1 β levels in the supernatants of the lung homogenates were determined using ELISA.

Statistical Analysis. The significance of the differences between groups was calculated using the unpaired *t* test and the Bonferroni posttest (GraphPad Prism version 5.0). Differences were considered significant when *P* < 0.05.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Rosa Castillo for excellent technical support, Graham W. Knott for precious help with the electron microscopy, Mark Masin for establishing the cholera toxin staining, and Kate Schroder for helpful discussions and the critical reading of the manuscript. A.S.Y. is supported by Grant YA-182/1-1, Deutsche Forschungsgemeinschaft.

- Auffan M, et al. (2009) Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nanotechnol* 4:634–641.
- Klein J (2007) Probing the interactions of proteins and nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:2029–2030.
- Onuma K, et al. (2009) Nano-scaled particles of titanium dioxide convert benign mouse fibrosarcoma cells into aggressive tumor cells. *Am J Pathol* 175:2171–2183.
- ILSI Risk Science Institute Workshop Participants (2000) The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: A workshop consensus report. *Inhal Toxicol* 12:1–17.
- Garabrant DH, Fine LJ, Oliver C, Bernstein L, Peters JM (1987) Abnormalities of pulmonary function and pleural disease among titanium metal production workers. *Scand J Work Environ Health* 13:47–51.
- Bermudez E, et al. (2002) Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* 70:86–97.
- Inoue K, et al. (2008) Size effects of nanomaterials on lung inflammation and coagulatory disturbance. *Int J Immunopathol Pharmacol* 21:197–206.
- Ferin J, Oberdorster G, Penney DP (1992) Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6:535–542.
- Sager TM, Kommineni C, Castranova V (2008) Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: Role of particle surface area. *Part Fibre Toxicol* 5:17.
- Kavita U, Mizel SB (1995) Differential sensitivity of interleukin-1 alpha and -beta precursor proteins to cleavage by calpain, a calcium-dependent protease. *J Biol Chem* 270:27758–27765.
- Chen CJ, et al. (2007) Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med* 13:851–856.
- Martinon F, Burns K, Tschopp J (2002) The inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 10:417–426.
- Pétrilli V, et al. (2007) Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 14:1583–1589.
- Gross O, et al. (2009) Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 459:433–436.
- Willingham SB, et al. (2009) NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 183:2008–2015.
- Mariathasan S, et al. (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440:228–232.
- Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440:237–241.
- Feldmeyer L, et al. (2007) The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Curr Biol* 17:1140–1145.
- Hornung V, et al. (2008) Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9:847–856.
- Dostert C, et al. (2008) Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320:674–677.
- Schroder K, Tschopp J (2010) The inflammasomes. *Cell* 140:821–832.
- Sadrieh N, et al. (2010) Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO₂ particles. *Toxicol Sci* 115:156–166.
- Filipe P, et al. (2009) Stratum corneum is an effective barrier to TiO₂ and ZnO nanoparticle percutaneous absorption. *Skin Pharmacol Physiol* 22:266–275.
- Johnston HJ, et al. (2009) Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO₂ (2) particles: The contribution of physicochemical characteristics. *Part Fibre Toxicol* 6:33.
- Kuida K, et al. (1995) Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267:2000–2003.
- Mariathasan S, et al. (2004) Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430:213–218.
- Horai R, et al. (1998) Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med* 187:1463–1475.
- Adachi O, et al. (1998) Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1 and IL-18-mediated function. *Immunity* 9:143–150.
- Gross O, et al. (2006) Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* 442:651–656.
- Didierlaurent A, et al. (2006) Tollip regulates proinflammatory responses to interleukin-1 and lipopolysaccharide. *Mol Cell Biol* 26:735–742.
- Redvers RP, Li A, Kaur P (2006) Side population in adult murine epidermis exhibits phenotypic and functional characteristics of keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:13168–13173.
- Calkins CC, et al. (2006) Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. *J Biol Chem* 281:7623–7634.



PNAS



PNAS

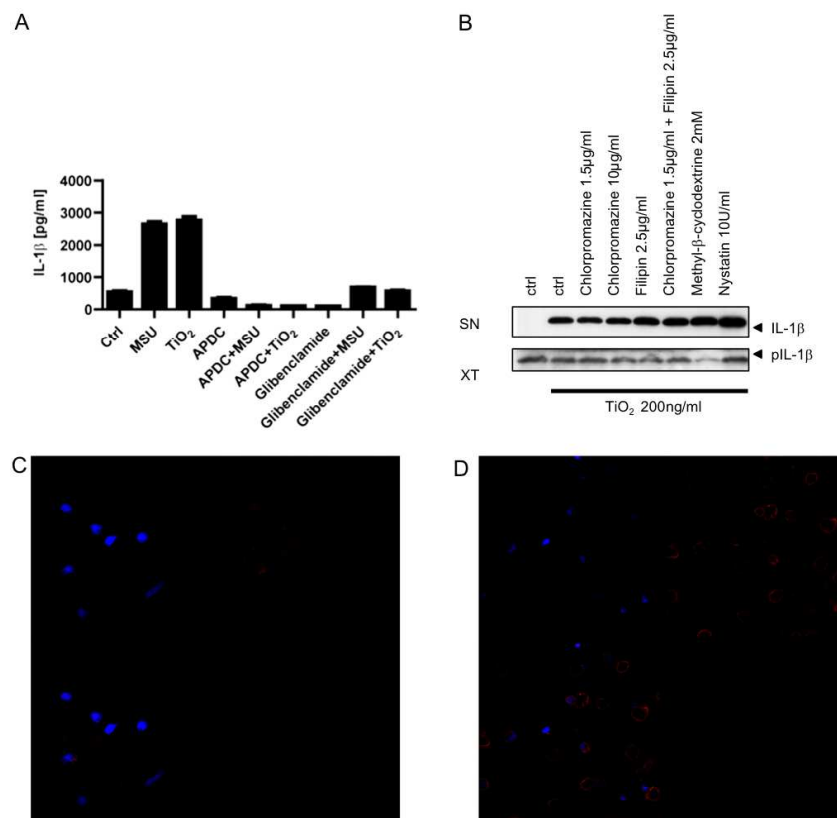


Fig. S3. ROS scavengers and glibenclamide, but not endocytosis-inhibitors block nano-TiO₂-induced IL-1 β secretion. (A) Pretreatment with the ROS scavenger APDC (100 μ M) and the ATP-sensitive potassium inhibitor glibenclamide (50 μ M) impairs nano-TiO₂ (200 μ g/mL)-induced IL-1 β release from bone marrow-derived DCs, whereas (B) lipid-raft extraction by methyl- β -cyclodextrin (MBCD; 2 $\times$ 10 mM wash, 2 mM during treatment), blocking clathrin-mediated endocytosis by chlorpromazine-hydrochloride (1.5 μ g/mL or 10 μ g/mL) and blocking caveolin-dependent endocytosis by either filipin (2.5 μ g/mL or 2.5 μ g/mL in combination with chlorpromazine-hydrochloride, 1.5 μ g/mL) or nystatin (10 U/mL) did not alter TiO₂-induced IL-1 β secretion in THP1 cells. The effective lipid-raft depletion was demonstrated by the lack of membranous cholera toxin B staining (C) after treatment with MBCD, (D) compared with the untreated control.

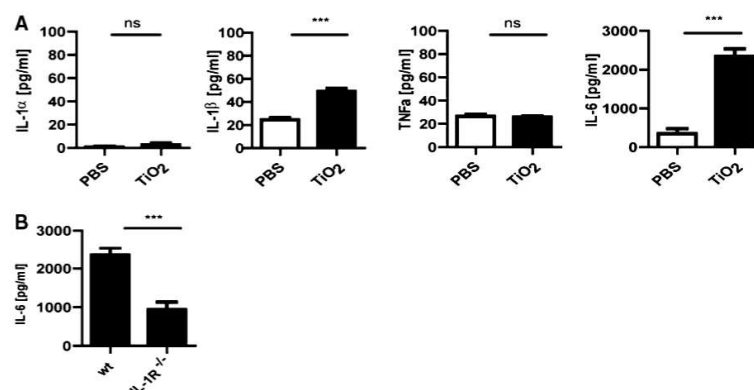


Fig. S4. TiO₂ i.p. injection induces IL-1 β and TNF receptor-dependent IL-6 secretion. (A) I.p. injection of 1.5 mg TiO₂ into the peritoneal cavity led to significant IL-1 β and IL-6 secretion, whereas IL-1 α and TNF remained unchanged. (B) IL-6 release into the peritoneal cavity was drastically diminished in IL-1R^{-/-} mice compared with wild-type controls, indicating the dependence of IL-6 secretion on IL-1 signaling (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; NS, nonsignificant, n = 6–7 mice per group).

Annexe 2 : Article 5 : IL-17 et fibrose pulmonaire

IL-1 and IL-23 mediate early IL-17A production by $\gamma\delta$ T cell in pulmonary inflammation and fibrosis

P Gasse, N Riteau, R Vacher, M-L Michel, A Fautrel, F di Padova, L Fick, S Charron, V Lagente, G Eberl, M Le Bert, V F J Quesniaux, F Huaux, M Leite-de-Moraes, B Ryffel and I Couillin ; *PlosOne*, July 2011 (*In press*)

L'étude réalisée dans cet article est acceptée pour publication dans le journal PlosOne. Les expériences ont été principalement réalisées par Pamela Gasse. Elles s'inscrivent dans la continuité de nos publications sur le rôle de l'inflammasome Nlrp3 dans le développement de l'inflammation et de la fibrose induite chez la souris par la Bléomycine.

Ici, nous avons examiné l'implication de l'IL-1 β et de l'IL-23 dans la production précoce de l'IL-17 par des cellules de l'immunité innée. L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire très importante impliquée notamment dans le recrutement de neutrophiles. Nous montrons que lors d'une lésion pulmonaire induite par la BLM, il se produit une régulation positive des gènes codants pour l'IL-23, IL-17A et IL-17F. L'augmentation de la production de ces ARNm est dépendante de la signalisation IL-1R1.

L'utilisation de souris déficientes, soit en IL-23p19, soit en IL17RA, montre l'importance de l'IL-23 et de l'IL-17A dans l'établissement de la réponse inflammatoire à la BLM. L'utilisation d'anticorps bloquant l'IL17A, mais pas ceux bloquant l'IL-17F, permet de confirmer dans ce modèle le rôle de IL-17A.

Nous montrons que les deux formes, IL-17A et IL-17F, sont produits très précocement après l'administration de BLM. Les cellules productrices de l'IL-17 varient selon les modèles, de nombreux sous types de cellules pourraient être impliqués, aussi il est important de chercher à clarifier les débats. Dans notre modèle d'inflammation, cette production est réalisée préférentiellement par les lymphocytes T $\gamma\delta$ (ROR γ t⁺), dans une moindre mesure par les lymphocytes T CD4⁺, mais pas par les iNKT.

Au final, notre étude fournit des données attestant l'existence d'un axe IL-1 β /IL-23/IL-17 dans l'inflammation induite par la lésion pulmonaire et la réparation tissulaire. Celle se réalise notamment par la production de IL-17A et IL-17F par les lymphocytes T $\gamma\delta$. La meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de la fibrose pulmonaire idiopathique pourrait permettre le développement de thérapie pour l'heure indisponible.

IL-1 and IL-23 mediate early IL-17A production by $\gamma\delta$ T cell in pulmonary inflammation and fibrosis

P Gasse¹, N Riteau¹, R Vacher¹, M-L Michel², A Fautrel^{3,4}, F di Padova⁵, L Fick⁶, S Charron¹, V Lagente³, G Eberl⁷, M Le Bert¹, V F J Quesniaux¹, F Huaux⁸, M Leite-de-Moraes², B Ryffel^{1,6} and I Couillin^{1,9¶}

¹University of Orleans and CNRS, UMR6218, Orleans, France and ²University of Paris V and CNRS, UMR8147, Paris, France and ³INSERM U991, Université de Rennes 1, France and ⁴H2P2 Histopathological platform IFR140 INSERM U991, Université de Rennes 1, France and ⁵Novartis Pharma, Basel, Switzerland, and ⁶Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, University of Cape Town, South Africa, and Institute Pasteur, ⁷Laboratory of Lymphoid Tissue Development, CNRS URA 1961, Paris, France and ⁸University Catholic of Louvain, Brussels, Belgium, and ⁹Key-Obs S. A S., Orleans France

Grant support by the French «Conseil Général du Loiret», «Fondation de la Recherche Médicale» and «Agence Nationale de la Recherche 2007 MIME-003-02».

Key words: IL-17, IL-23, Lung, Inflammation, Fibrosis, Bleomycin

Running title: Lung injury depends on IL-17 and IL-23

Address of correspondence to Isabelle Couillin[¶], Molecular Immunology and Embryology, CNRS UMR6218, Transgenose Institute, CNRS, 3B rue de la Férollerie 45071 Orleans, France. Phone: 0033 238 25 54 39 Fax: 0033 238 25 79 79.

E-mail: couillin@cnrs-orleans.fr

Abbreviations used in this paper: BLM, Bleomycin; IL-1R1, Interleukin-1 Receptor 1; TLR, Toll-Like Receptor; BALF, BronchoAlveolar Lavage Fluid; KC, Keratinocyte derived-Chemokine; KO, Knock Out; MMP, Matrix MetalloProteinase; TIMP, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase.

Abstract

Background: Idiopathic pulmonary fibrosis is a devastating as yet untreatable disease. We demonstrated recently the predominant role of the NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β expression in the establishment of pulmonary inflammation and fibrosis in mice.

Methods : The contribution of IL-23 or IL-17 in pulmonary inflammation and fibrosis eATP was assessed using the bleomycin model in deficient mice. FACS analysis were performed to identify IL-17 producing cells.

Results : We show that bleomycin or IL-1 β -induced lung injury lead in increased expression of early IL-23p19, and IL-17A or IL-17F expression. Early IL-23p19 and IL-17A, but not IL-17F, and IL-17RA signaling are required for inflammatory response to BLM as shown with gene deficient mice or mice treated with neutralizing antibodies. Using FACS analysis, we show that IL-17A and IL-17F are produced very early and preferentially by ROR γ t⁺ γ δ T cells and to a lesser extent by CD4 α β ⁺ T cells, but not by iNKT cells in this model. Moreover, IL-23p19 and IL-17A expressions or IL-17RA signaling are necessary to pulmonary TGF- β 1 production, collagen deposition and evolution to fibrosis.

Conclusions : Our findings demonstrate the existence of an early IL-1 β -IL-23-IL-17A axis leading to pulmonary inflammation and fibrosis and identify innate IL-23 and IL-17A as interesting drug targets for IL-1 β driven lung pathology.

Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) represents a growing health issue, occurring from repeated lung injury of ill-defined origins. It is associated with epithelial cell damage, recurrent inflammation and dysregulation of repair processes, evolving towards irreversible lung fibrosis. Patients suffering from this progressive form of interstitial lung disease present collagen accumulation and localised fibrotic foci in the absence of overt inflammation. Although chronic in nature, one complication is an accelerated phase of IPF. These exacerbations are characterized by acute inflammation reactivation which is frequently fatal within few weeks to a few months and underlining the important role of inflammation in IPF evolution [1]. In the murine model of bleomycin (BLM)-induced lung fibrosis, neutrophil influx in the airways is a feature of the acute inflammation phase while lymphocytes recruitment appears later. We previously showed that inflammation, remodeling and fibrosis were mediated through the pro-inflammatory and pro-fibrotic cytokine IL-1 β (IL-1 β) and IL-1R1/MyD88 signaling in resident cells [2] and that IL-1 β production, inflammation and fibrosis were dependent on the NLRP3 inflammasome (also called cryopyrin and NALP3). Moreover we demonstrated that recombinant murine IL-1 β recapitulates the effects of BLM, triggering pulmonary inflammation and fibrosis. Since interleukin-17 (IL-17) is a major pro-inflammatory cytokine involved in neutrophil recruitment [3,4] and chronic lung pathologies[5,6], we hypothesized that IL-1 β secreted upon lung injury may induce innate “proTh17” IL-23 and IL-17 expression in lung resulting in pulmonary inflammation and evolution to fibrosis. Interestingly, a crucial role for IL-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune arthritis or EAE was reported, suggesting a link between IL-1 and IL-17 in establishment of some autoimmune diseases [7,8]. In particular, IL-1 signaling was shown to be critical for IL-17 production, Th17 cell differentiation and EAE development [9,10]. Moreover IL-1 α or IL-1 β synergizes with IL-23 to promote IL-17 production by

murine T cells in the absence of T cell receptor engagement [8]. Studies on IL-23-driven innate IL-17 production suggest that the function of IL-23 may not be confined to expansion of memory Th17 cells [11]. Recently, IL-1 β and IL-23 were shown to induce innate IL-17 production from $\gamma\delta$ T cells amplifying Th17 responses and autoimmunity [12]. Since the development of Th17 cells may take 4 to 7 days, requiring an antigen-specific priming, with costimulation provided by APCs, and a particular cytokine environment [13], they are unlikely the only source of IL-17 in the early neutrophilic inflammation phase. Here, we addressed both the cell source and upstream events leading to IL-17 response in BLM-induced lung fibrosis.

IL-17 was first described to be produced by a CD4⁺ $\alpha\beta$ T cell subset characterized by IL-17 (or IL-17A), but also IL-17F, IL-21, IL-22, IL-6 and TNF- α production and termed Th17 [14,15]. The generation of CD4⁺ Th17 subset is under the control of specific cytokines and transcription factors [16]. In mice, TGF- β is necessary and the switch to the Th17 pathway is induced by IL-6 and/or IL-21 [17] and requires IL-23 for full *in vivo* differentiation, expansion and migration into the circulation and peripheral tissues [13,18]. A whole family of new cytokines has been grouped around IL-17A, the closest associated to IL-17A being IL-17F which shares about 50% sequence homology and a strikingly similar pattern of expression with IL-17A. IL-17A or IL-17F can be secreted as homodimers or IL-17A/IL-17F heterodimers. Similar to IL-17A, IL-17F signals via a receptor complex composed with IL-17RA and IL-17RC. The relative contribution of IL-17A and F in lung fibrosis was still unknown. IL-17A was also shown to be produced very early by $\gamma\delta$ T cells triggering protective immunity against infection [19] exacerbating chronic inflammation [20]. The non-classical $\gamma\delta$ T cells in the thymus develop either to IL-17 or IFN- γ producing cells in the absence or presence of antigen encounter, respectively [21]. During an immune response, $\gamma\delta$ T cells rapidly produce IL-17 in response to IL-23 and/or other dendritic cell products while

antigen-specific CD4⁺αβ⁺ Th17 cells develop later [22,23]. Recently NKT cells that lack the NK1.1 marker were also identified as early IL-17-producing cells that can contribute to neutrophil recruitment through IL-17 secretion [24]. IL-17 synthesis depends on the RORγt transcription factor in both IL-██████████αβ Th17 cells, and γδT cells but also iNKT17 cells [25,26,27]. γδ T cells produce IL-17 in response to IL-23 alone or after infection [19,28,29] whereas iNKT cells express IL-17 through IL-23-dependent and independent pathways.

Here, we show that lung injury triggers the expression of early IL-23, IL-17A and IL-17F in an IL-1 dependent manner, that early IL-23 and IL-17A, but not IL-17F are necessary for the establishment of the innate response to BLM and that γδ T cells are the major source of early IL-17A and IL-17F. Moreover, we show that IL-23p19 is required for the late evolution to pulmonary fibrosis. Importantly, IL-23p19 and IL-17A are upstream of the expression of TGF-β1, the central mediator of lung fibrosis suggesting that innate IL-17A from γδ T cells [30] might promote the commitment towards an inflammatory Th17 phenotype through induction of TGF-β1 in an IL-6 rich environment.

Methods

Mice

IL-1R1^{-/-} [31], IL-23/p19^{-/-} [32] and IL-17RA^{-/-} [33] backcrossed 10 times on the wild-type C57BL/6 genetic background were bred in our animal facility at the Transgenose Institute (CNRS, Orleans). *Rorc*(*γt*)-*Gfp*^{TG} were used for IL-17 producing cells investigation [34]. All animal experiments complied with the French Government's ethical and animal experiment regulations. This protocole was analysed and approved under the number CL2007-033 by the Ethic committee for animal experimentation of CNRS and University in Orleans.

Treatments

Bleomycin sulfate (5, 7.5 or 10mg/kg) from Bellon Laboratories (Montrouge, France), rmIL-1 β (50 μ g/kg) from R&D Systems (Minneapolis, USA) were given intranasally in 40 μ L under light ketamine-xylasine anesthesia. IL-17A (100 μ g, Novartis Pharma, Basel, Switzerland), IL-17F (100-150 μ g, Dr C. Uyttenhove, Bruxelles, Bergium) neutralizing antibodies or control Ig were administered intranasally or intraperitonally. A dose-response study was performed to find the effective dose for both antibodies.

Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF)

BALF was performed as previously described [35].

Lung homogenization and analysis

Lungs were homogenized and lung tissue myeloperoxidase activity (MPO) was evaluated as described [35].

Cell count and determination

Total cell and differential cell counts were determined in BALF as previously described [35].

Mediator measurements by ELISA

IL-1 β , KC, IL-6 and TIMP-1 levels in BALF or lung homogenate were determined by ELISA (R&D system, Minneapolis, USA). Latent or active TGF- β 1 levels were assayed in BALF and lung homogenates by ELISA (R&D, Minneapolis, USA). Latent or active TGF β -1 was not detected in lung homogenates using this method.

Semi-quantitative PCR

IL-17A, IL-17F, IL-23/p19 or IL-1 β mRNA levels in lung were assessed (Online supplemented material). The electrophoresis gels were analyzed using a densitometric analyzer (ImageJ). Band densities were measured and compared to housekeeping gene HPRT1.

Zymographic analysis of MMPs

MMP-2 activity was determined by gelatin zymography as described [2].

Histology

After BAL and lung perfusion, the large lobe was fixed and 3- μ m sections were stained with Hematoxylin and Eosine (H&E) or sirius red. For collagen determination the slides were stained with 0.1% picosirius solution (0.1% sirius red in saturated aqueous picric acid, pH2) for 1h, counterstained with Mayer's hematoxylin for 2 min. All the slides were numerised with Nikon i80 – X10 plan APO objective and QICAM color cooling camera (Qimaging).

The lung sections were analyzed by imageJ - NIH software. The percentage of collagen was determined.

Total lung collagen assay

Aliquots of lung homogenate (50µl) were assayed for total lung collagen levels using the Sircol collagen dye binding assay according to the manufacturer's instructions (Biocolor Ltd, Northern Ireland).

Flow cytometry analysis

Lung mononuclear cells were isolated and stimulated in the Online supplemented material. Cells were incubated with CD1d-tetramer-APC (NHI tetramer), anti-NK1.1-PerCP-Cy5.5, anti-CD4-APCalex750, anti-CD8-PB, anti-TCRγδ-APC, anti-TCRαβ-APC, anti-CD11bPerCp Cy5.5 (BD PharMingen) or isotype control antibodies. For intracellular staining, cells were fixed with 4% PFA, washed, and permeabilized with 0.5% saponin (Sigma-Aldrich) in PBS, then incubated with anti-IL-17A-PE, anti-IL-17F-PE, anti-GFP alexa488, anti-IL12p40-FITC anti-IL-23p19-alexa647 or isotype controls. The cells were analyzed in a FACSCanto II (Becton Dickinson) by using FlowJo software.

Statistical Analysis

Statistical evaluation of differences between the experimental groups was determined by non parametric one way analyse of variance test and Bonferroni post test using Prism software. *P* values of <0.05 were considered statistically significant.

Results

IL-23p19, IL-17A and IL-17F expression after airway bleomycin or IL-1 β administration

We previously showed that inflammation, remodeling and fibrosis after bleomycin (BLM) exposure were mediated through IL-1 β release with recombinant murine IL-1 β (rmIL-1 β) recapitulating the effects of BLM [2]. We speculated that IL-1 β secreted upon lung injury may induce innate IL-23 and IL-17 expression in lung resulting in pulmonary inflammation and evolution to fibrosis. Here we analyzed the expression of IL-23/p19 in the lung upon local BLM or rmIL-1 β . Using semi-quantitative PCR analysis, we showed that IL-23/p19 mRNA expression is increased in lung of wild-type mice, 24h after a single intranasal administration of BLM (Fig. 1A). Since IL-1 β is induced following BLM, we asked whether rmIL-1 β could also cause IL-23p19 expression. Indeed, instillation of rmIL-1 β induced a significant increase of IL-23p19 pulmonary mRNA expression (Fig. 1A, B). Moreover BLM-induced pro-IL-1 β expression in the lung was not affected in absence of IL-23p19 indicating that IL-1 β is upstream of IL-23p19 (Fig. 1A, B). These results suggest that IL-1 β produced locally upon lung injury induce IL-23p19 expression in the lung. Intracellular staining of IL-23p19⁺ cells by flow cytometry confirmed that IL-23p19 is produced by lung infiltrating CD11b⁺ monocytes (not shown). We then analyzed the respective expression of IL-17A and IL-17F in the lung after local BLM or rmIL-1 β administration. We showed that IL-17A but not IL-17F mRNA expression is induced in the lung 24h after BLM in these experimental conditions (Fig. 1C, D). Instillation of rmIL-1 β induced a dramatic increase of IL-17A and IL-17F

pulmonary mRNA expression (Fig. 1C, D). IL-17A and F expression after local BLM in IL-1R1 deficient mice was reduced in absence of IL-1R1 signaling suggesting that IL-1 β produced locally upon lung injury may in turn induce IL-17A and IL-17F expression in the lung (Fig. 1C, D). These data show the existence of an IL-1 β -IL-23-IL-17A axis following lung injury

Early pulmonary inflammation is dependent on IL-23p19 and IL-17RA signaling

To investigate whether IL-23p19 plays a role in lung inflammation upon lung injury, we evaluated early airway inflammatory cell response after airway BLM administration in lung of IL-23p19 deficient mice. Within 24h, BLM elicited an acute neutrophil recruitment into the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and into the lung in C57BL/6 wild-type mice (Fig. 2A, B). In the absence of IL-23p19, neutrophil recruitment in the BALF (Fig. 2A) and neutrophil activity in the lung as assessed by MPO activity measurement (Fig. 2B) were dramatically reduced. Saline administration did not cause neutrophil influx in either group. IL-6 and KC production in lung 24h after BLM were also diminished in the absence of IL-23p19 but IL-1 β release was unaffected (not shown). To evaluate the role of IL-23p19 in the possible protease/antiprotease imbalance, we measured tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) levels into the lung after BLM administration. Production of TIMP-1 is the hallmark of evolution towards fibrosis. Twenty four hours after BLM administration, lung TIMP-1 was significantly increased in wild-type mice but not in IL-23p19 deficient mice (Fig. 2C). Thus, BLM induced airway neutrophil recruitment, KC, IL-6 and TIMP-1 expression in an IL-23p19 dependent way, while IL-1 β release was likely upstream of IL-23. To assess whether innate IL-17A and/or IL-17F play a role in early lung inflammation, we evaluated the inflammatory cell response in the lung of mice deficient for IL-17 receptor (IL-17RA). In the absence of IL-17RA, neutrophil recruitment in the BALF (Fig. 3A) and

neutrophil activity in lung (Fig. 3B) were dramatically reduced 24h post BLM. Production of both KC (Fig. 3D) and IL-6 (Fig. 3E) in the lung were reduced in IL-17RA deficient mice but IL-1 β levels were not significantly modified, indicating that IL-1 β is upstream of IL-17 (Fig. 3C). Moreover 24 hours after BLM administration, lung TIMP-1 expression was induced in wild-type mice but not in IL-17RA deficient mice (Fig. 3F). Thus, BLM induced airway neutrophil recruitment, KC, IL-6 and TIMP-1 expression in an IL-17RA dependent way, while IL-1 β release was likely upstream of IL-17.

IL-17A, but not IL-17F, is essential for bleomycin-induced acute lung inflammation and remodeling

To determine the relative contribution of IL-17A and IL-17F in BLM-induced acute lung inflammation, we investigated the inflammatory response to BLM using neutralizing antibodies against IL-17A or IL-17F. Neutralization of IL-17A led to a significant reduction of neutrophil recruitment into the BALF (Fig. 4A) and reduction of neutrophil MPO activity in the lung (Fig. 4B) 24h after BLM administration. IL-1 β (Fig. 4C), KC (Fig. 4D), IL-6 (Fig. 4E) or TIMP-1 (Fig. 4F) lung levels were also reduced after IL-17A neutralization. Lower IL-1 β in mice treated with anti-IL17A could be explained by the existence of an autocrine or paracrine loop with IL-17 inducing IL-1 β production and amplifying the response. In contrast, we could exclude a role of IL-17F in these responses by analyzing the effect of IL-17F neutralizing antibodies. Blocking IL-17F had no significant effect on neutrophil recruitment into the BALF (Fig. 5A) or into the lung parenchyma as shown by MPO analysis (Fig. 5B). Pro-inflammatory cytokines and chemokine levels were also not reduced by IL-17F neutralizing antibodies (Fig. 5C-E). Moreover, anti-IL-17F antibodies had no effect on lung TIMP-1 levels (Fig. 5F). Anti-IL-17A and anti-IL-17F antibodies were used at doses efficient in blocking lung neutrophilic inflammation induced by intranasal administration of rmIL-17A

or rmIL-17F, respectively, to C57BL/6 wild-type mice (data not shown). Therefore, locally BLM-induced inflammation, but also repair processes depend on functional IL-17A, but not on IL-17

Cellular source of early IL-17A and F: $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T cells but not iNKT cells

In order to investigate the IL-17 producing cells in the lung in response to bleomycin administration, we used transgenic *Rorc*(γt)-*Gfp*^{TG} mice expressing EGFP under control of the *Rorc*(γt) promoter on a bacterial artificial chromosome (BAC) which allows visualization of the ROR γ t⁺ cells [26]. ROR γ t was shown to be a marker for IL-17-producing cells in both $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell populations [26]. Lymphocytes from the lung of *Rorc*(γt)-*Gfp*^{TG} mice were collected 24h after BLM or saline administration, stimulated *in vitro* with PMA/ionomycin, and cell surface markers and intracellular staining for IL-17 were performed. FACS analysis showed that BLM administration enhanced the total number of IL-17A^{pos}ROR γ t^{pos} and IL-17F^{pos}ROR γ t^{pos} lung mononuclear cells (Fig. 6A). These IL-17-producing cells positive for ROR γ t were essentially $\gamma\delta$ T cells and CD4^{pos} $\alpha\beta$ T cells but few iNKT cells (Fig. 6B). Up to 70% of IL-17A^{pos}ROR γ t^{pos} cells and 60% of IL-17F^{pos}ROR γ t^{pos} were $\gamma\delta$ T cells. Among $\gamma\delta$ T cells recruited after BLM administration, more than 30% produce IL-17A and 5% produce IL-17F (Fig. 6C). These data demonstrate that early IL-17A and F producing cells in response to BLM-induced lung injury are essentially $\gamma\delta$ T cells and to a lesser extent CD4^{pos} $\alpha\beta$ T cells, while almost no iNKT cells produced IL-17A or F in these conditions.

Lung remodeling and fibrosis are dependent on IL-23

To further assess the role of IL-23 in lung fibrosis we analyzed remodeling and fibrosis in lungs of IL-23p19 deficient mice 14 days after BLM administration. MMP-2 (or gelatinase A, 72 kDa) is well described in pulmonary fibrosis, preferentially secreted by fibroblasts and

epithelial cells [36]. Assessing gelatinase activity by zymography, we showed that BLM dramatically induced MMP-2 activity in wild-type mice and this activity was significantly reduced in IL-23p19 deficient mice (Fig.7A). Moreover, BLM-induced TIMP-1 expression was also reduced in IL-23p19 deficient mice (Fig. 7B). Since TGF- β 1 is essential in the development of lung fibrosis and also in the development of IL-17 producing cells in particular Th17 cells, we asked whether the production of TGF- β 1 upon bleomycin is dependent on IL-23. Indeed, latent TGF- β 1 was detected after activation in BALF from wild-type mice, 14 days after bleomycin administration but was reduced in BALF from IL-23p19 deficient (Fig.7C). Active TGF- β 1 was undetectable in BALF from wild-type and deficient mice probably due to lower production (data not shown). Microscopic analysis of lung sections showed extensive fibrotic areas with abundant collagen deposition as compared to normal alveolar structure of the saline controls 14 days post BLM. Cellular infiltrates, alveolar wall destruction and collagen deposition were significantly reduced in IL-17RA deficient mice (Fig. 7E) in comparison to BLM-treated wild-type mice. Collagen quantification in lung homogenates showed that total collagen content, enhanced 14 days after bleomycin instillation was significantly reduced in lung of IL-17RA deficient mice (Fig. 7D). These data demonstrate that lung remodeling and fibrosis require IL-23 for full responses *in vivo* and that IL-23 is involved in TGF- β 1 production in response to epithelial lung injury induced by bleomycin.

Bleomycin-induced remodeling, lung fibrosis and TGF- β 1 are reduced in the absence of IL-17RA signaling and can be prevented by IL-17A neutralization

Furthermore, the analysis of remodeling in lung of IL-17RA deficient mice 14 days after BLM administration showed that MMP-2 activity and TIMP-1 level were reduced (Fig. 8A, B). As latent TGF- β 1 was reduced in BALF from IL-23-p19 deficient mice, we asked

whether it required functional IL-17A. Latent TGF- β 1 expression was also reduced in IL-17RA deficient mice (Fig. 8C) whereas active TGF- β 1 remained undetectable (data not shown). Total collagen content in lung was significantly reduced in IL-17RA deficient mice in comparison to wild-type mice (Fig. 8D). Moreover, we observed that cellular infiltrates, alveolar wall destruction and collagen deposition were significantly reduced in IL-17RA deficient (Fig. 8E) in comparison to BLM-treated wild-type mice.

We further confirmed the implication of IL-17A in lung remodeling, and demonstrate that these developments can be prevented by anti-IL-17A neutralizing antibodies. Antibodies to IL-17A administered after BLM reduced MMP-2 activity in BALF (Fig. 9A), TIMP-1 level in lung (Fig. 9B) and latent TGF- β 1 level in BALF (Fig. 9C) in wild-type mice. Moreover, anti-IL-17A antibody treatment attenuated pulmonary fibrosis observed at day 14 (Fig. 9E). Remodeling response, analyzed by collagen specific sirius red staining of microscopic lung sections showed that lung collagen content, enhanced after BLM, was significantly reduced by anti-IL-17A antibody treatment (Fig. 9D). Therefore, IL-17A and IL-17RA signaling are required for the development of pulmonary inflammation, fibrosis, and collagen deposition in response to bleomycin and IL-17A neutralization can prevent evolution towards fibrosis.

Discussion

In this study, we report the involvement of IL-23p19 and innate IL-17A in the occurrence of pulmonary inflammation and fibrosis and demonstrate the critical role of IL-1 β in these processes. We show the existence of an IL-1 β /IL-23/IL-17 axis which is essential for bleomycin-induced pulmonary inflammation, remodeling and fibrosis.

IL-23p19 and IL-17A were expressed early in tissue following local bleomycin suggesting that these cytokines play a role in lung injury-induced inflammation and subsequent evolution to fibrosis. Since we previously outlined that exogenous IL-1 β can mimic the pathology, we analyzed the effect of airway rmIL-1 β on pulmonary IL-23p19 and IL-17 expression. IL-23p19, IL-17A and IL-17F mRNA were strongly increased after airway rmIL-1 β administration and bleomycin-induced IL-17A and IL-17F expression were dependent on IL-1R1 signaling, demonstrating that IL-1 β is upstream of IL-17. Further, IL-17 may promote IL-1 β production by an amplification loop. Therefore the data suggest that lung injury promotes IL-1 β production which increases IL-23 expression and in turn can stimulate innate IL-17 expression. An IL-1 β /IL-17 axis has been reported in experimental autoimmune encephalomyelitis and arthritis for which a crucial role for IL-1 β in the induction of IL-17-producing T cells was demonstrated [8,12,37]. Moreover IL-1 β drives pathogenic Th17 cells during spontaneous arthritis in interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra)-deficient [38]. Chronic destructive arthritis was reduced in IL-17RA deficient mice whereas abolished in IL-1R1 deficient mice [39]. In multiple sclerosis, IL-17 was produced by microglia in response to IL-23 or IL-1 β [40]. In mice, IL-1 β and IL-23 are produced by dendritic cells upon infection-induced Th-17 cells [41]. After lung injury, IL-1 β may be produced very early by

dendritic cells and alveolar macrophages acting on IL-17 producing cells to promote IL-17 expression. We showed for that early IL-23p19, IL-17RA signaling and IL-17A were necessary to trigger pulmonary inflammation and remodeling responses in response to lung injury. The relative role of IL-17A versus IL-17F in lung inflammation leading to fibrosis was not known [42]. We showed that IL-17A promotes pulmonary inflammation and remodeling upon airway BLM whereas IL-17F has no effect. IL-17A and IL-17F which are highly homologous members of the IL-17 protein family and bind the same receptor complex consisting of IL-17RA and IL-17RC were often described as pro-inflammatory cytokines with redundant role in inflammation and autoimmunity. IL-17F apparently plays a marginal role in the development of delayed-type and contact hypersensitivities, autoimmune encephalomyelitis, collagen-induced arthritis, and arthritis in IL-1Ra deficient mice. In asthma, IL-17F may play an important regulatory role and seems to function differently than IL-17A [42,43]. Our results suggest that unlike IL-17A, IL-17F has no essential role in acute inflammation in our model. Overlapping or distinct roles of these cytokines may depend on IL-17A and/or IL-17F production by different cell types or on the role of functional homodimers or heterodimers. In an attempt to identify the IL-17 producing cells, we found $\gamma\delta$ T cells but neither iNKT cells nor $\alpha\beta$ T cells as the major source of early IL-17A and IL-17F. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cell were present in naïve mice and enhanced after bleomycin. Indeed, IL-17- producing $\gamma\delta$ T cells may be differentiated in the periphery and poised ready to produce IL-17 in a rapid manner [29]. This is the first demonstration of early IL-17A and F production by $\gamma\delta$ T cell after pulmonary injury. IL-17A producing $\gamma\delta$ T cells are more present than IL-17F producing $\gamma\delta$ T cells in agreement with the predominant role of IL-17A in pulmonary inflammation after injury. Late pulmonary induction of IL-17 expression by $\gamma\delta$ T cells 7 and 14 days after local BLM was reported but the direct role of the IL-17 on late inflammation and fibrosis was not studied [5]. Moreover, in this study deletion of all $\gamma\delta$ T cell

was associated with reduced inflammation in the bronchoalveolar space but severe interstitial inflammation with complete loss of alveolar structure and delayed epithelium repair 7 and 14 days after bleomycin. By contrast, using mice deficient for IL-17 signaling or treated with anti-IL-17 antibodies, we show reduced inflammation in the bronchoalveolar space and in interstitium inflammation and confirmed two studies reporting that IL-17 has a detrimental role in lung fibrosis [5,44]. Dendritic epidermal $\gamma\delta$ T cells involved in skin epithelium wound repair [45] may also contribute to lung epithelium repair as suggested in the lung of tobacco smokers without COPD [46]. Depletion of these cells might be responsible for the disease aggravation described in $\gamma\delta$ deficient mice [5]. Dendritic epidermal $\gamma\delta$ T cells with lung wound repair activity and IL-17 producing $\gamma\delta$ T cells with detrimental effect may coexist in the airways after lung injury. This could explain the different phenotypes observed between our study with mice deficient for IL-17 signaling and Braun and colleagues's study with mice deficient for $\gamma\delta$ T cells. As we show that early IL-17 producing cells are essentially $\gamma\delta$ T cells, this suggests that IL-17 producing $\gamma\delta$ T cells have a detrimental effect probably in inducing the expansion of Th17 which are auto-reactive and pathogenic T cells. $\gamma\delta$ T cells were described as non-conventional T-cell implicated in early innate immunity whereas conventional CD4 $\alpha\beta$ Th17 cells were often involved in adaptive immunity suggesting that late IL-17 producing cells in response to bleomycin-induced lung damages would be CD4 $\alpha\beta$ Th17 cells [23]. In support of this, it was shown that IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells activated by IL-1 β and IL-23 can promote IL-17 production by CD4⁺ T cells suggesting that $\gamma\delta$ T cells act in an amplification loop for IL-17 production by Th17 cells [12]. Even if IL-17 production by $\gamma\delta$ T cells has a protective role in inducing adaptive immune response against infection, IL-17 producing $\gamma\delta$ T cells were implicated in inflammatory diseases associated with tissue damage [47,48] and in the generation and activation of IL-17-producing auto-reactive T cells. IL-17-

producing $\gamma\delta$ T cells exacerbate collagen-induced arthritis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [12].

Interestingly we report that airway TGF- β 1, the main critical mediator of remodeling and fibrotic responses in the lung, was induced after lung injury in wild-type mice but strongly reduced in IL-23p19 and IL-17RA deficient mice or wild-type mice treated with anti-IL-17A antibodies indicating that IL-23p19 and IL-17A are upstream of the expression of TGF- β 1 and suggesting that innate IL-17A produced by $\gamma\delta$ T lymphocytes may influence the production of TGF- β 1. In case of repeated injury, the emergence of TGF- β 1 as a component associated with cellular injury and inflammation with IL-6 and IL-1 β would provide the conditions for differentiation of CD4 $\alpha\beta$ Th17 cells as a second wave of immune response. Moreover, we reported for the first time that IL-23 is required for full establishment of pulmonary inflammation, remodeling and fibrosis in mice. IL-12p40 subunit, which associates with IL-23p19 subunit to form IL-23 cytokine, but neither IL-12p35 nor IL-12p70, was shown to play a key role in silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis [49]. Increased serum IL-23 was observed in patients with systemic sclerosis [50]. Our results strongly support the notion that IL-23 is required for IL-17 production by $\gamma\delta$ T cells in response to epithelial cell damage. Naïve $\gamma\delta$ T cells have been shown to produce IL-17 in response to IL-23 alone [19,29] and to constitutively express IL-23 receptor [12,28]. These cells have a pathogenic role in severe disease such as collagen-induced arthritis [20]. In this case they appear to be driven by self molecules that arise during inflammation. Such a break of self tolerance with induction of pathogenic IL-17 producing $\gamma\delta$ should be possible in the case of repeated lung injury and inflammation leading to pulmonary fibrosis. A first study showed that bleomycin and IL-1 β -mediated pulmonary fibrosis was IL-17A dependent [51]. Nevertheless, the authors used bleomycin which is only 90% drug (and lacks the bleomycin A2 but not the B2 peak), the other 10% consisting of streptococcal contaminants including

TLR2 ligands. These authors may have studied a TLR2 response and hypersensitivity pneumonitis. We used the bleomycin pharmaceutical grade material that have both bleomycin A2 and B2 and lacks TLR2 ligands and from which patient died from bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Another study described how IL-17A may regulate the expression and/or proinflammatory properties of IL-22 in pulmonary fibrosis but did not analysed the link between IL-1 β , IL-23 and IL-17 [52].

In conclusion, we highlighted the existence of an innate IL-1 β -IL-23-IL-17A axis in the establishment of early pulmonary inflammation with direct consequences on late evolution to fibrosis after lung injury. We demonstrate that IL-23p19, IL-17A and IL-17RA signaling are essential to pulmonary inflammation whereas IL-17F seems dispensable. Moreover we identified $\gamma\delta$ T cells as the major source of early IL-17A, providing a new mechanism whereby IL-1 and IL-23 may mediate pulmonary fibrosis. IL-23p19 was identified for the first time as an essential mediator of pulmonary fibrosis. Importantly, IL-23p19 and IL-17A are upstream of TGF- β 1, the central mediator of lung fibrosis. Our findings point on the potential role of IL-17-producing TCR $\gamma\delta$ T cells in lung injury as a first line of defense that can orchestrate an inflammatory response leading to pulmonary fibrosis. Our study provides new information on the pathogenic role of IL-23 and IL-17 underlining the importance of targeting these cytokines in the development of new therapeutic approaches against lung fibrosis.

Acknowledgments

We acknowledge the skilled technical assistance of Louis Fauconnier (UMR6218 IEM, Orleans), and Isabelle Guenon (INSERM U620, Université de Rennes 1). We thank Marc Lebert for RT-PCR assistance (UMR6218 IEM, Orleans). We acknowledge Dr C. Uyttenhove for the kind gift of IL-17A and IL-17F neutralizing antibodies and Dr J. Van Snick for the gift of IL-23 antibodies (Ludwig Institute for Cancer Research, Bruxelles). The authors are grateful to François Erard for scientific discussion and correction of the manuscript.

References

1. Kondoh Y, Taniguchi H, Kawabata Y, Yokoi T, Suzuki K, et al. (1993) Acute exacerbation in idiopathic pulmonary fibrosis. Analysis of clinical and pathologic findings in three cases. *Chest* 103: 1808-1812.
2. Gasse P, Mary C, Guenon I, Noulin N, Charron S, et al. (2007) IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest* 117: 3786-3799.
3. Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A (2003) IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol* 170: 2106-2112.
4. Miyamoto M, Prause O, Sjostrand M, Laan M, Lotvall J, et al. (2003) Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *J Immunol* 170: 4665-4672.
5. Braun RK, Ferrick C, Neubauer P, Sjoding M, Sterner-Kock A, et al. (2008) IL-17 producing gammadelta T cells are required for a controlled inflammatory response after bleomycin-induced lung injury. *Inflammation* 31: 167-179.
6. Simonian PL, Roark CL, Wehrmann F, Lanham AK, Diaz del Valle F, et al. (2009) Th17-polarized immune response in a murine model of hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis. *J Immunol* 182: 657-665.
7. Nakae S, Saijo S, Horai R, Sudo K, Mori S, et al. (2003) IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5986-5990.

8. Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KH, Lavelle EC (2006) A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 203: 1685-1691.
9. Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, et al. (2009) Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* 30: 576-587.
10. van Beelen AJ, Teunissen MB, Kapsenberg ML, de Jong EC (2007) Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7: 374-381.
11. Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, et al. (2006) Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 203: 2473-2483.
12. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, et al. (2009) Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 31: 331-341.
13. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM (2006) Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24: 677-688.
14. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, et al. (2005) Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6: 1123-1132.
15. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, et al. (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6: 1133-1141.
16. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE (2007) IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25: 821-852.
17. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B (2006) TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24: 179-189.

18. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, et al. (2009) The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol* 10: 314-324.
19. Lockhart E, Green AM, Flynn JL (2006) IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 177: 4662-4669.
20. Roark CL, French JD, Taylor MA, Bendele AM, Born WK, et al. (2007) Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing gamma delta T cells. *J Immunol* 179: 5576-5583.
21. Jensen KD, Su X, Shin S, Li L, Youssef S, et al. (2008) Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naïve cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma. *Immunity* 29: 90-100.
22. Stockinger B, Veldhoen M, Martin B (2007) Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 19: 353-361.
23. Roark CL, Simonian PL, Fontenot AP, Born WK, O'Brien RL (2008) gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol* 20: 353-357.
24. Michel ML, Keller AC, Paget C, Fujio M, Trottein F, et al. (2007) Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med* 204: 995-1001.
25. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, et al. (2006) The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126: 1121-1133.
26. Crossgrove K, Maina CV, Robinson-Rechavi M, Lochner MC (2008) Orthologues of the *Drosophila melanogaster* E75 molting control gene in the filarial parasites *Brugia malayi* and *Dirofilaria immitis*. *Mol Biochem Parasitol* 157: 92-97.

27. Michel ML, Mendes-da-Cruz D, Keller AC, Lochner M, Schneider E, et al. (2008) Critical role of ROR-gammat in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19845-19850.
28. Martin B, Hirota K, Cua DJ, Stockinger B, Veldhoen M (2009) Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* 31: 321-330.
29. Shibata K, Yamada H, Hara H, Kishihara K, Yoshikai Y (2007) Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after *Escherichia coli* infection via IL-17 production. *J Immunol* 178: 4466-4472.
30. Bonniaud P, Margetts PJ, Ask K, Flanders K, Gauldie J, et al. (2005) TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *J Immunol* 175: 5390-5395.
31. Glaccum MB, Stocking KL, Charrier K, Smith JL, Willis CR, et al. (1997) Phenotypic and functional characterization of mice that lack the type I receptor for IL-1. *J Immunol* 159: 3364-3371.
32. Ghilardi N, Kljavin N, Chen Q, Lucas S, Gurney AL, et al. (2004) Compromised humoral and delayed-type hypersensitivity responses in IL-23-deficient mice. *J Immunol* 172: 2827-2833.
33. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, et al. (2001) Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 194: 519-527.
34. Sparwasser T, Gong S, Li JY, Eberl G (2004) General method for the modification of different BAC types and the rapid generation of BAC transgenic mice. *Genesis* 38: 39-50.

35. Gasse P, Riteau N, Charron S, Girre S, Fick L, et al. (2009) Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 179: 903-913.
36. Suga M, Iyonaga K, Okamoto T, Gushima Y, Miyakawa H, et al. (2000) Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 1949-1956.
37. Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y (2003) Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171: 6173-6177.
38. Koenders MI, Devesa I, Marijnissen RJ, Abdollahi-Roodsaz S, Boots AM, et al. (2008) Interleukin-1 drives pathogenic Th17 cells during spontaneous arthritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Arthritis Rheum* 58: 3461-3470.
39. Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Heuvelmans-Jacobs M, Helsen MM, van den Bersselaar LA, et al. (2008) T cell dependence of chronic destructive murine arthritis induced by repeated local activation of Toll-like receptor-driven pathways: crucial role of both interleukin-1beta and interleukin-17. *Arthritis Rheum* 58: 98-108.
40. Kawanokuchi J, Shimizu K, Nitta A, Yamada K, Mizuno T, et al. (2008) Production and functions of IL-17 in microglia. *J Neuroimmunol* 194: 54-61.
41. Shainheit MG, Smith PM, Bazzone LE, Wang AC, Rutitzky LI, et al. (2008) Dendritic cell IL-23 and IL-1 production in response to schistosome eggs induces Th17 cells in a mouse strain prone to severe immunopathology. *J Immunol* 181: 8559-8567.
42. Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, et al. (2009) Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucocutaneous bacterial infection and allergic responses. *Immunity* 30: 108-119.
43. Yang XO, Chang SH, Park H, Nurieva R, Shah B, et al. (2008) Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med* 205: 1063-1075.

44. Wilson MS, Feng CG, Barber DL, Yarovinsky F, Cheever AW, et al. (2010) Redundant and pathogenic roles for IL-22 in mycobacterial, protozoan, and helminth infections. *J Immunol* 184: 4378-4390.
45. Jameson J, Havran WL (2007) Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol Rev* 215: 114-122.
46. Pons J, Sauleda J, Ferrer JM, Barcelo B, Fuster A, et al. (2005) Blunted gamma delta T-lymphocyte response in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 25: 441-446.
47. Ito Y, Usui T, Kobayashi S, Iguchi-Hashimoto M, Ito H, et al. (2009) Gamma/delta T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 60: 2294-2303.
48. Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, Sugimori H, Nakagawa R, et al. (2009) Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med* 15: 946-950.
49. Huaux F, Arras M, Tomasi D, Barbarin V, Delos M, et al. (2002) A profibrotic function of IL-12p40 in experimental pulmonary fibrosis. *J Immunol* 169: 2653-2661.
50. Komura K, Fujimoto M, Hasegawa M, Ogawa F, Hara T, et al. (2008) Increased serum interleukin 23 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 35: 120-125.
51. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, Gochuico BR, Rosas IO, et al. (2010) Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J Exp Med* 207: 535-552.
52. Sonnenberg GF, Nair MG, Kim TJ, Zaph C, Fouser LA, et al. (2010) Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J Exp Med* 207: 1293-1305.

Figures Legends

Figure 1 IL-23p19, IL-17A or IL-17F expression upon BLM or rmIL-1 β .

mRNA expression levels for IL-23p19 in lung of BLM (10mg/kg) or rmIL-1 β (50 μ g/kg) or saline treated were assessed using semi-quantitative PCR at 24h in wild-type mice (A). Semi-quantitative IL-1 β expression in the lung, evaluated with IL-1 β /HPRT1 PCR ratio, was reduced in absence of IL-23p19 signaling (B). mRNA expression levels for IL-17A, IL-17F and HPRT1 in lung of BLM (10mg/kg) or rmIL-1 β (50 μ g/kg) or saline treated wild-type mice or IL-1R1 $^{-/-}$ mice were assessed using semi-quantitative PCR at 24h (C). IL-17A and IL-17F mRNA levels were compared to the housekeeping gene HPRT1 mRNA levels and expressed as IL-17/HPRT ratio by measuring band densities using a densitometric analyzer (ImageJ) (D). Data represent mean values $\pm$ SD from 3 ratio independent experiments (n=5 or 6 mice per group; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Figure 2 Acute inflammation and remodeling upon BLM are dependent on IL-23p19

Analysis of acute inflammation and remodeling was performed 24h after BLM instillation (7.5mg/kg). IL-23p19 deficient mice showed reduced neutrophil recruitment in BALF (A) and lung tissue (B) and reduced TIMP-1 production in lung (c) in comparison to wild-type mice. Data represent mean values $\pm$ SD from 2 independent experiments (n=5 mice per group; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Figure 3 Impaired acute lung inflammation upon BLM in IL-17RA deficient mice

IL-17RA deficient mice showed reduced neutrophil recruitment in BALF (A) and lung tissue (B) in comparison to wild-type mice. BALs and myeloperoxidase (MPO) activity were performed 24h after BLM instillation (7.5mg/kg). KC (D), IL-6 (E) and TIMP-1 (F) levels in

the lung were also reduced in IL-17RA deficient mice at 24h but not IL-1 β levels (C). Cytokines, chemokine and TIMP-1 quantification in lung homogenates were performed by ELISA. Data represent mean values $\pm$ SD from 4 independent experiments (n=5 mice per group; ns, not significant, *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

Figure 4 Acute lung inflammation and remodeling upon BLM depends on IL-17A

Inflammatory and remodeling responses of wild-type mice treated with neutralizing antibody against IL-17A (150 μ g/mouse, i.p. just after BLM or saline i.n. instillation). Neutrophil recruitment in BALF (A) and myeloperoxidase (MPO) activity in lung tissue (B) induced by BLM (7.5mg/kg) were reduced after mice treatment with anti-IL-17A. IL-1 β (C), KC (D), IL-6 (E) and TIMP-1 (F) levels in lung homogenates assessed by ELISA were also reduced 24h after mice treatment neutralizing antibody against IL-17A. Data represent mean values $\pm$ SD from 3 independent experiments (n=4 mice per group; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

Figure 5 Acute lung inflammation and remodeling upon BLM are independent of IL-17F

Inflammatory and remodeling responses upon BLM (7.5mg/kg) of wild-type mice treated with neutralizing antibody against IL-17F (100-150 μ g/mouse, i.p. just after BLM or saline i.n. instillation). Neutrophil recruitment in BALF (A) and myeloperoxidase (MPO) activity (B) upon BLM (7.5mg/kg) were not reduced 24h after treatment with high doses of neutralizing antibody against IL-17F. IL-1 β (C), KC (D), IL-6 (E) and TIMP-1 (F) in lung homogenates assessed by ELISA were also reduced in BLM mice 24h after treatment with neutralizing antibody against IL-17F. Treatments with anti-IL-17F had not significant effect on all these parameters. Data represent mean values $\pm$ SD from 2 independent experiments (n=6 mice per group).

Figure 6 Early IL-17A and F are produced mainly by $\gamma\delta$ T cells

Lymphocytes from the lung of *Rorc(γt)-Gfp^{TG}* mice were prepared 24h after BLM or saline administration, and stimulated in vitro with PMA/ionomycin for 4h. Specific staining of cell markers (CD1d-tetramer-APC, anti-NK1.1-PerCP-Cy5.5, anti-CD4-APCalexa750, anti-CD8-PB, anti-TCR $\gamma\delta$ -APC, anti-TCR $\alpha\beta$ -APC), or isotype control and intracellular staining for IL-17 (anti-IL-17A-PE, anti-IL-17F-PE, anti-GFP alexa488 or isotype controls) were performed. FACS analysis showed that BLM administration enhanced the total number of IL-17A^{pos}ROR γt ^{pos} and IL-17F^{pos}ROR γt ^{pos} lung mononuclear cells (A). IL-17-producing cells positive for ROR γt were essentially $\gamma\delta$ T cells and CD4^{pos} $\alpha\beta$ T cells but few iNKT cells (B). Among $\gamma\delta$ T cells after bleomycin administration, at least 30% produce IL-17A and 5% produce IL-17F (C). Results are mean values $\pm$ SD from 4 independent experiments, with pools of 5 mice/group for each experiment, * $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

Figure 7 Remodeling and fibrosis are dependent on IL-23p19

Analysis of late pulmonary remodeling and fibrosis was performed 14 days after BLM administration (5mg/kg). MMP-2 activity (A) and TIMP-1 production (B) were reduced in IL-23p19 deficient mice. Active MMP-2 was expressed as relative intensity (RI). Latent TGF- β 1 detected in BALF from wild-type mice was reduced in BALF from IL-23p19 deficient mice (C). Total collagen content in lung was significantly reduced in IL-23p19 deficient mice in comparison to wild-type mice (D). Collagen was measured using the Sircol collagen dye binding assay. Lung microscopic sections showed extensive fibrotic areas with collagen deposition in wild-type mice treated with BLM which was attenuated in IL-23p19^{-/-} mice (e). Sirius red (SR) staining, scale bars 1mm and 200 μ m, n=5 mice. Data represent mean values $\pm$ SD from 2 independent experiments (n=5 mice per group; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Figure 8 Attenuation of bleomycin-induced lung fibrosis in IL-17RA^{-/-} mice

Pulmonary remodeling and fibrotic response of wild-type mice or IL-17RA deficient mice 14 days after BLM or saline i.n. instillation. MMP-2 (72Kd) activity in BALF was analyzed by zymography 14 days after administration of BLM (5mg/kg i.n.). Active MMP-2 was upregulated at day 14 after BLM in the BALF of wild-type mice but only partially in IL-17RA^{-/-} mice (A). TIMP-1 as indicator of a fibrotic process was upregulated in the lungs of B6, but to a lesser extent in IL-17RA^{-/-} mice on day 14 (B). The latent form of TGF- β 1 was present in BALF from B6 mice, 14 days after BLM, but was reduced in BALF from IL-17RA deficient mice as determined by ELISA assay (C). Active MMP-2 was expressed as relative intensity (RI). TIMP-1 and TGF- β 1 levels were assessed by ELISA. Total collagen content enhanced 14 days after bleomycin instillation was significantly reduced in lung of IL-17RA deficient mice (D). Collagen was measured using the Sircol collagen dye binding assay. Data represent mean values $\pm$ SD from 2 independent experiments (n=4 mice per group; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Lung microscopic sections showed extensive fibrotic areas at day 14 with collagen deposition in wild-type mice treated with BLM (5 mg/kg i.n.) which was attenuated in IL-17RA^{-/-} mice (E). Sirius red (SR) staining, scale bars 1mm and 200 μ m, n=5 mice).

Figure 9 Attenuation of bleomycin-induced lung fibrosis upon anti-IL-17A treatment

Pulmonary remodeling and fibrotic responses of wild-type mice treated with neutralizing antibody against IL-17A (150 μ g/mouse, i.p. just after BLM and 3 times per week) 14 days after BLM (5mg/kg i.n.) or saline. MMP-2 (72Kd) activity in BALF was analyzed by zymography 14 days after administration of BLM. Active MMP-2 upregulated upon BLM in the BALF of wild-type mice was greatly reduced after 6 treatments with neutralizing antibody against IL-17A (A). TIMP-1 in lung was also significantly decreased after treatment with

neutralizing antibody against IL-17A in comparison to untreated BLM mice (B). Latent TGF- β 1 detected in BALF from wild-type mice was reduced in BALF from wild-type mice treated with anti-IL-17A antibodies (C). Active MMP-2 was expressed as relative intensity (RI). TIMP-1 and TGF- β 1 levels were assessed by ELISA. In order to quantify lung collagen deposition, all the slides were numerised by Qimaging and analyzed by imageJ - NIH software. % of SR by lung were shown. Collagen content enhanced after BLM was significantly reduced when the mice were treated with anti-IL-17A antibody (D). Data represent mean values $\pm$ SD from 2 independent experiments (n=5 mice per group; *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$). Lung microscopic sections showed extensive fibrotic areas at day 14 with collagen deposition in wild-type mice administrated with BLM which was attenuated in mice treated with neutralizing antibodies against IL-17A (E). Sirius red (SR) staining, scale bars 1mm and 200 μ m, n=5 mice

Figure 1

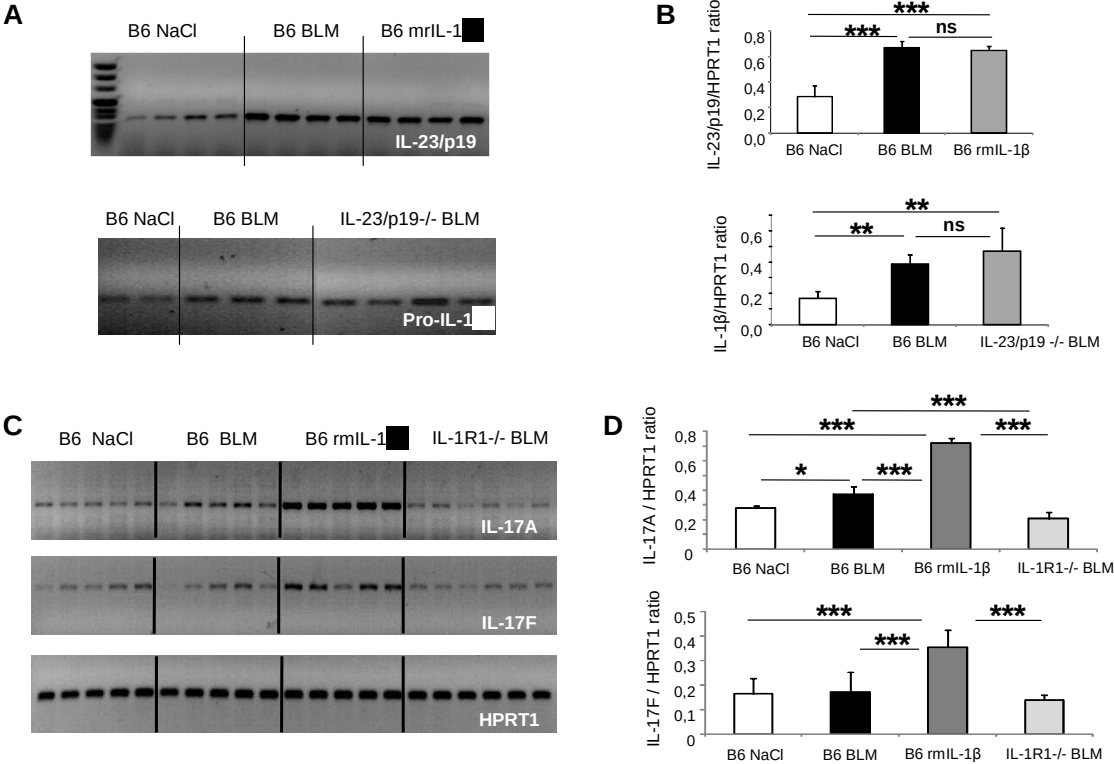


Figure 2

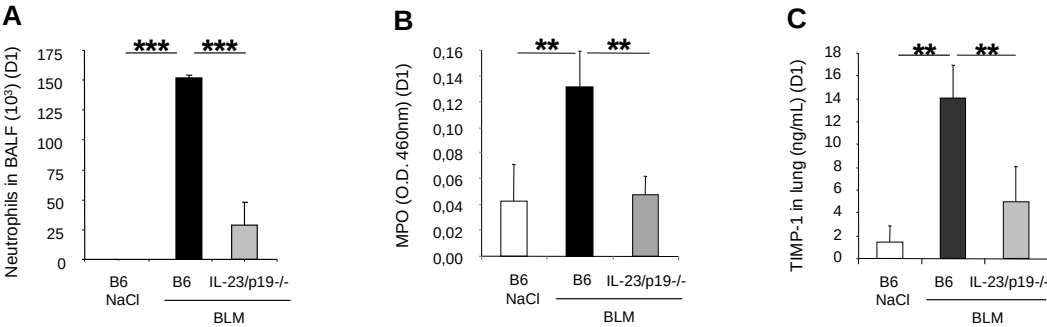


Figure 3

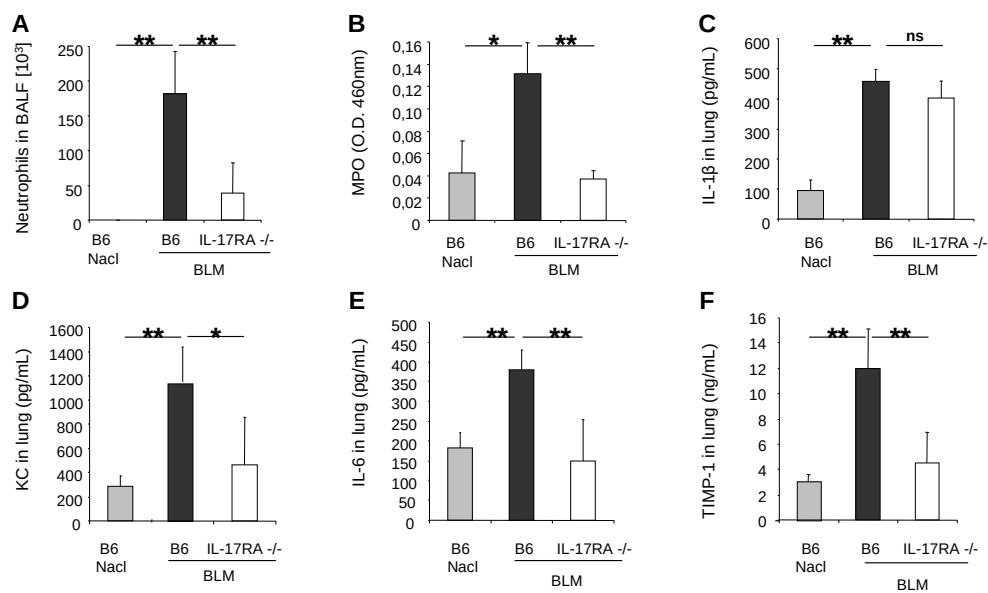


Figure 4

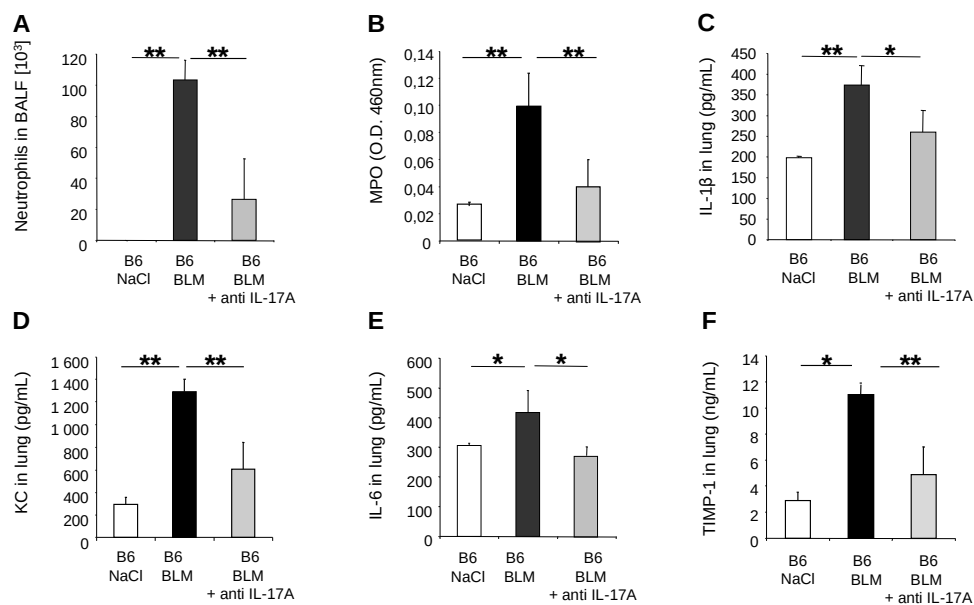


Figure 5

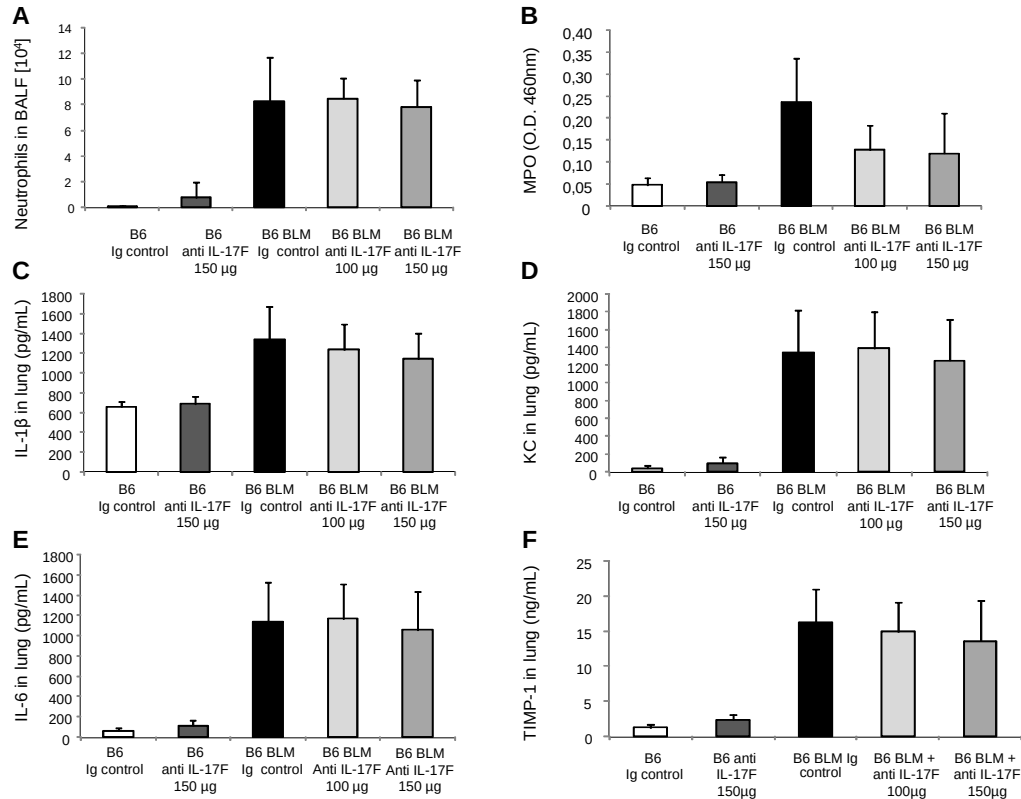


Figure 6

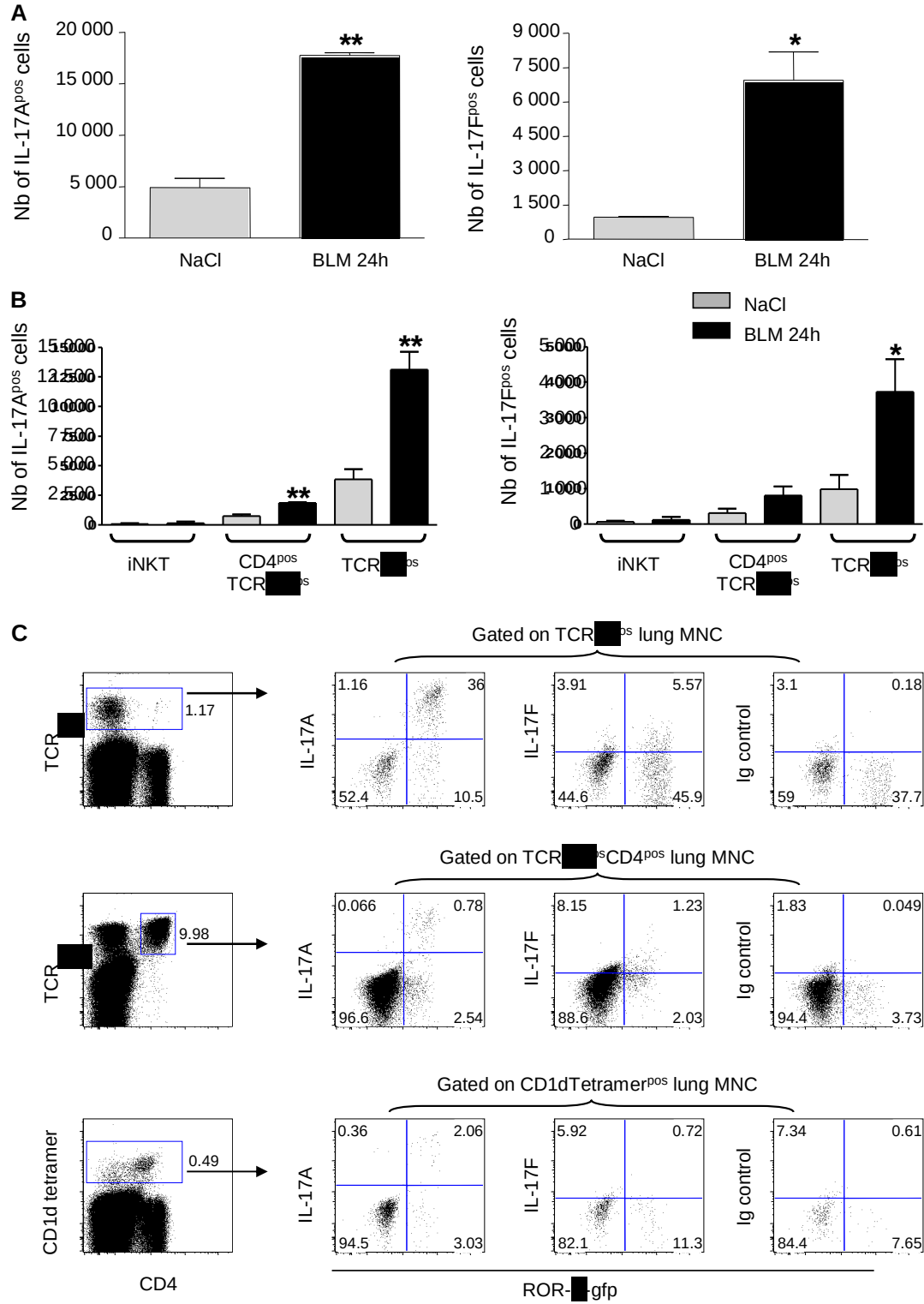


Figure 7

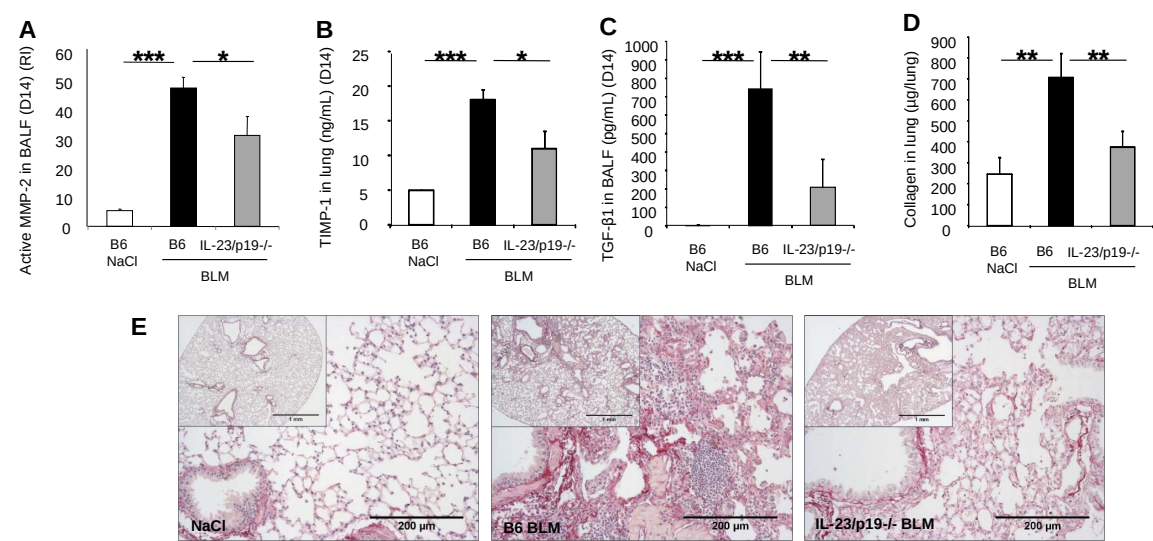


Figure 8

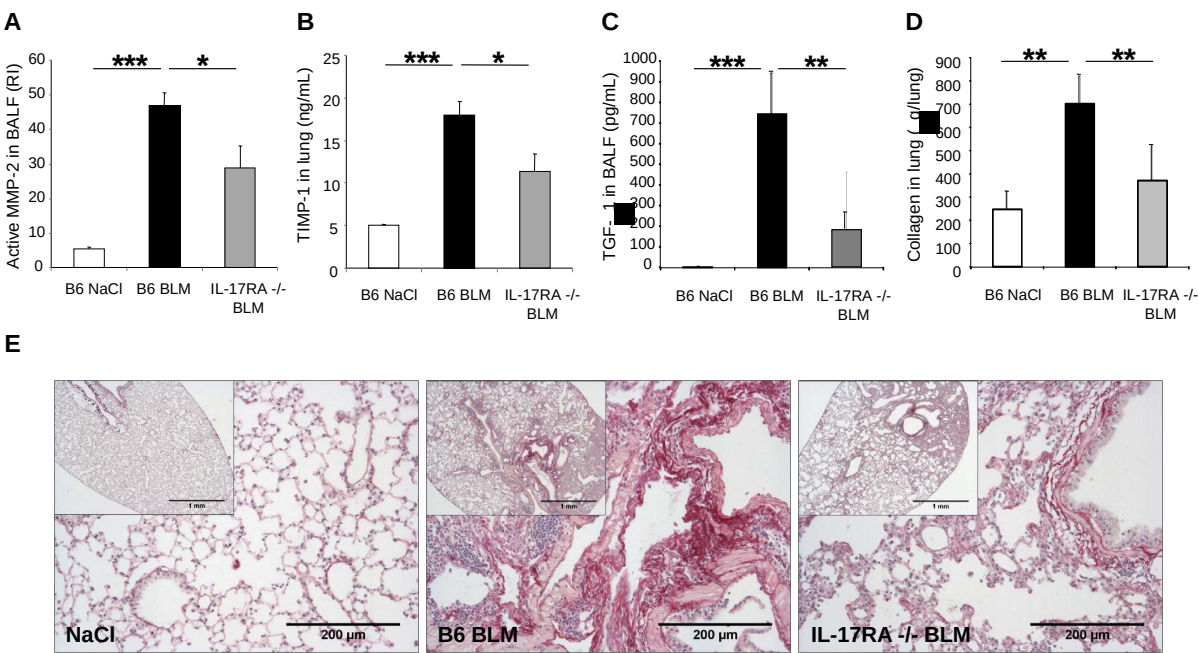
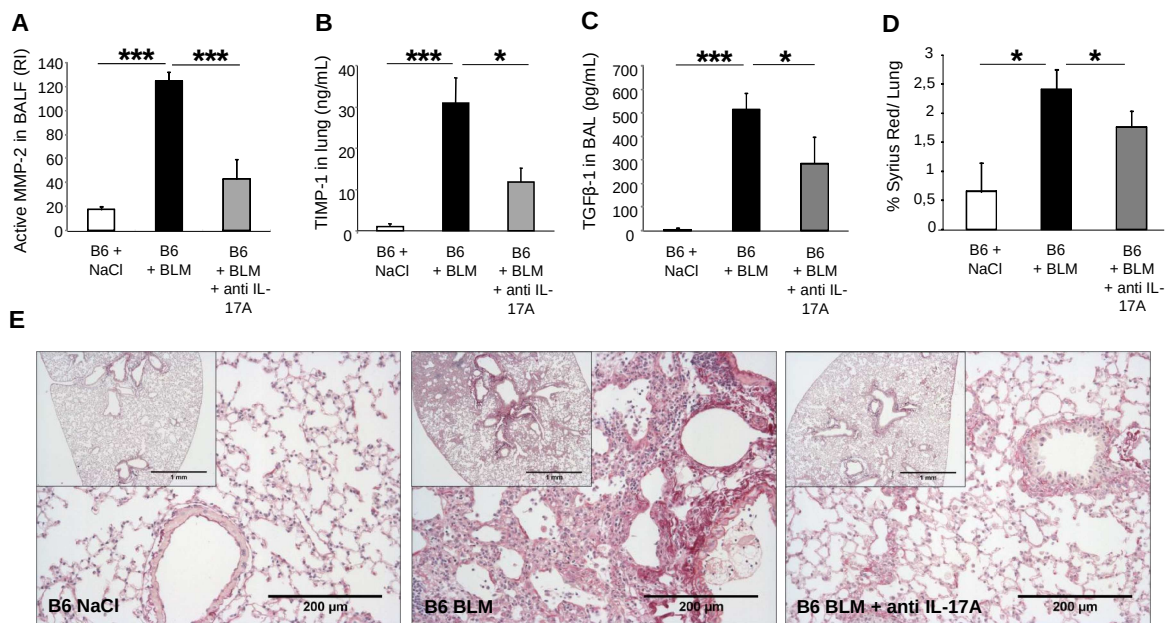


Figure 9



Online supplemented material

Semi-quantitative PCR

IL-17A, IL-17F, IL-23/p19 or IL-1 β mRNA transcript levels from lung of treated or control mice were assessed. Total RNA was isolated from less than 100mg of lung tissue previously snap-frozen in liquid nitrogen. RNAs were first extracted with RNA TRIzol reagent (Sigma) and further purified using a commercial kit (RNeasy, Qiagen,) following manufacturer's instructions. 1 μ g of purified total RNA was used to generate first-strand cDNA synthesis by reverse transcription. These cDNA were subject to semi-quantitative PCR. An initial denaturation for 9 min at 95°C was followed by 30 (for IL-1 β), 35 (for IL-23/p19, IL-17A and HPRT1) or 40 (for IL-17F) cycles of amplification. Amplification conditions were as follows: 30s of denaturation (94°C), 30s of annealing, and 30s of amplification (72°C). PCR products were resolved by electrophoresis on a 1.5% agarose gel. The electrophoresis gels were analyzed using a densitometric analyzer (ImageJ). Images were taken and band densities were measured and compared to housekeeping gene HPRT1.

Flow cytometry analysis

Lung mononuclear cells were isolated and stimulated for 4h with 10⁻⁸ M Phorbol Myristate Acetate (PMA, Sigma-Aldrich), 5.10⁻⁶ M ionomycin, and 20 μ g/ml brefeldin A. Cells were incubated with CD1d-tetramer-APC (provided by NHI tetramer facilities), anti-NK1.1-PerCP-Cy5.5, anti-CD4-APCalex750, anti-CD8-PB, anti-TCR $\gamma\delta$ -APC, anti-TCR $\alpha\beta$ -APC, anti-CD11bPerCp Cy5.5 (BD PharMingen) or isotype control antibodies. For intracellular staining, cells were fixed with 4% PFA, washed, and permeabilized with 0.5% saponin (Sigma-Aldrich) in PBS, then incubated with anti-IL-17A-PE, anti-IL-17F-PE, anti-GFP alexa488, anti-IL12p40-FITC anti-IL-23p19-alexa647 or isotype controls. The cells were washed, fixed and analyzed in a FACSCanto II (Becton Dickinson) by using FlowJo software.

Nicolas RITEAU

Immunité Innée et Inflammasome : Rôle des Signaux de Dangers Endogènes

La théorie du danger développée par Polly Matzinger stipule que l'attrait principal du système immunitaire ne réside pas dans la distinction entre le soi « à protéger » et le non-soi « à combattre ». Toute situation potentiellement délétère pour l'hôte, avec émission de signaux de dangers endogènes, est à ce titre capable de générer une réponse immunitaire afin de mobiliser les acteurs capables de permettre un retour à une situation basale.

L'exposition des poumons de façon répétée à des agents toxiques environnementaux se traduit par une inflammation et une fibrose pulmonaire en condition stérile, c'est-à-dire sans intervention de micro-organisme. L'administration de Bléomycine dans les poumons de souris est un bon modèle pour étudier les molécules endogènes ou signaux de dangers engagés et les voies de signalisations associées. Nous avons identifié l'ATP extracellulaire et l'acide urique, provenant des cellules stressées ou endommagées, comme capables d'induire l'activation d'un complexe protéique cytoplasmique appelé inflammasome Nlrp3. Celui-ci conduit à la maturation de l'interleukine-1 β , cytokine pro-inflammatoire.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires d'activation de l'inflammasome Nlrp3 en réponse à des agents particulaires, responsables notamment de pathologies pulmonaires après inhalation. Nos résultats montrent que de l'ATP endogène est libéré activement par les cellules mises en contact avec des particules. Par un mécanisme autocrine/paracrine l'ATP va ensuite signaler sur plusieurs récepteurs purinergiques membranaires. Cette signalisation purinergique est importante dans la capacité des cellules à produire de l'interleukine-1 β mature.

Au final, les travaux présentés dans ce manuscrit attestent du rôle critique de molécules endogènes dans la mise en place d'une réponse immunitaire innée basée sur l'activité de l'inflammasome Nlrp3.

Mots clés : Acide urique, ATP, inflammasome, Bléomycine, Fibrose pulmonaire

Innate Immunity and Inflammasome: Role of Endogenous Danger Signals

The Danger Theory developed by Polly Matzinger specifies that what really matters for the immune system is not to distinguish between self « to protect » and non-self « to fight ». Any potentially detrimental situation for the host would be able to generate endogenous danger signal that are able to mount an immune response to eventually return to baseline.

Lung repeated expositions to toxic environmental pollutants lead to inflammation and then fibrosis in sterile condition, meaning without a role of micro-organism. Lung administration of Bleomycin in mice is a good model to define what are the endogenous molecules or danger signals and associated pathways. We have identified extracellular ATP and uric acid as danger signals released by stressed or damaged cells and able to produce pro-inflammatory interleukin-1 β through activation of a cytoplasmic complex called the Nlrp3 inflammasome.

We then became interested in the molecular mechanism of particle-induced Nlrp3 inflammasome activation *in vitro*. We demonstrate that particles such as silica or alum hydroxide lead to endogenous ATP release and further purinergic signaling via an autocrine/paracrine manner. We identified purinergic signaling as an essential triggering of interleukin-1 β maturation in response to particles.

As a whole, the work presented here highlights the critical role of two endogenous molecules, ATP and uric acid, in the Nlrp3-mediated immune response.

Keywords: Uric Acid, ATP, Inflammasome, Bleomycin, Pulmonary Fibrosis



**Immunologie et Embryologie Moléculaire,
IEM, UMR6218
3B rue de la Férollerie, 45071 Orléans cedex 2**

