HAL
open science

Mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 par les micro- et les nano- particules dans un modèle d'inflammation pulmonaire chez la souris

Ludivine Baron

To cite this version:

Ludivine Baron. Mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 par les micro- et les nano-particules dans un modèle d'inflammation pulmonaire chez la souris. Sciences agricoles. Université d'Orléans, 2013. Français. NNT : 2013ORLE2037 . tel-01124250

HAL Id: tel-01124250

https://theses.hal.science/tel-01124250v1

Submitted on 6 Mar 2015

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.

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE
ENERGIE, MATERIAUX, SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

Laboratoire d'Immunologie et de Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires – INEM – UMR7355 – CNRS – Université d'Orléans

THÈSE présentée par :

Ludivine BARON

Soutenue le : **19 novembre 2013**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Sciences du Vivant / Immunologie

Mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 par les micro- et les nano- particules dans un modèle d'inflammation pulmonaire chez la souris

THÈSE dirigée par :

Isabelle COUILLIN	Chargée de recherche, HDR, UMR7355, Orléans

RAPPORTEURS :

François HUAUX	Professeur de l'Université Catholique de Louvain, Belgique
Jean-Michel SALLENAVE	Professeur de l'Université Paris Diderot, INSERM U874

JURY :

Sahil ADRIOUCH	Maître de conférences, Université de Rouen, INSERM U905
Isabelle COUILLIN	Chargée de recherche, HDR, UMR7355, Orléans
François ERARD	Professeur de l'Université d'Orléans (Président du jury)
François HUAUX	Professeur de l'Univ. Catholique de Louvain, LTAP Belgique
Vincent LAGENTE	Professeur de l'Université de Rennes 1, INSERM UMR 991
Jean-Michel SALLENAVE	Professeur de l'Université Paris Diderot, INSERM U874

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier toutes les personnes qui ont participé de près comme de loin à mon doctorat.

Un Merci chaleureux à Valérie et à Bernhard pour m'avoir acceptée au sein de ce laboratoire ce qui a donné le point de départ d'une aventure de presque 4 ans. Sans vous, rien de tout cela n'aura été possible.

J'aimerais remercier ma directrice de thèse, Isabelle Couillin, pour m'avoir donné ma chance en m'acceptant comme stagiaire M2 puis en se battant pour l'obtention de cette bourse de thèse. Merci de m'avoir encadrée et de m'avoir permis d'avancer scientifiquement. Un merci sincère d'avoir pris à coeur la relecture méticuleuse de chacune des parties de ce manuscript. Je vous suis reconnaissante du temps que vous n'avez jamais hésité à m'accorder.

Merci à François Huaux et à Jean-Michel Sallenave d'avoir accepté le travail de rapporteurs pour cette thèse et de l'intérêt que vous avez porté à mon travail. Je remercie également les autres membres du jury, Sahil Adriouch, Vincent Lagente et François Erard, mon président de jury, pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Un gros Merci à tous les membres de l'INEM (autrefois IEM) et à ceux d'Artimmune, sans oublier tous ceux et celles qui ont croisé ma route. En particulier, l'ensemble de l'équipe d'Isabelle: Nono, Auré, Beb, Corinne, Florence, Marc (Merci d'avoir relu l'intro !) et tous les petits stagiaires (une petite pensée pour Anthony que j'ai encadré pendant son stage M2). Sans oublier Nico bien sûr, parti aux States. Certains sont restés et beaucoup sont partis. Bonne chance à tous!

Un paragraphe rien que pour toi, binôme! A nos tranches de rigolades, nos prises de têtes (elles auront été rares d'ailleurs), nos réflexions scientifiques et à toutes nos manips challenges de malades qu'on a pu lancer ensemble… Bonne continuation à toi Nono et à ta petite famille (n'oublies pas nos délires sur les groupes n=1).

Je souhaite remercier ma famille qui, depuis toujours, me soutient inconditionnellement et supporte encore mes ronchonnements. Merci à mes parents de m'avoir permis d'aller aussi loin, à toi Fred qui, même enceinte jusqu'aux yeux, me laisse toujours la porte grande ouverte et à toi, Angel, bonne chance dans le sud. Un grand merci à tous mes amis, surtout toi Laura, ma meilleure amie, on en aura fait du chemin depuis les caisses de Super U !

Et comme on a le droit à un paragraphe de remerciements spéciaux, merci à toi, le Débile, espèce de boule de poils puante. J'espère que tu empuantis bien le paradis. Un gros câlin à Ilya qui est arrivée depuis peu.

Et sans oublier : Merci à toutes les souris (C57BL/6, bandes de teigneuses). On vous oublie trop souvent.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS 2
TABLE DES MATIERES 3
ABBREVIATIONS 1
TABLE DES FIGURES 4
INTRODUCTION 5
I. L'Immunité 5
A. L'Immunité innée 5
1. Les différents modèles de l'Immunité innée 6
a) Les modèles du « non-soi » et du « non-soi infectieux » 6
b) Le modèle du « Danger » 6
2. Les senseurs de l'Immunité innée, les PRR 7
a) Les TLR (Toll-Like Receptors) 7
b) Les NLR (Nod-Like Receptors) 10
c) Les NAIP (NLR family, Apoptosis Inhibitory Proteins) 11
d) Les RLR (RIG-1-Like Receptors) ou RLH (RIG-Like Helicases) 11
e) Les CLR (C-type Lectin Receptors) 11
3. Les inflammasomes NLRP 11
a) L'inflammasome AIM2 13
b) L'inflammasome NLRC4 14
c) L'inflammasome NLRP1 15
d) Les inflammasomes NLRP6 et NLRP12 17
e) L'inflammasome NLRP3 17
4. Les caspases, les inflammasomes et « la » mort cellulaire 19
a) L'apoptose 19
b) La pyroptose 21
c) L'autophagie 22
d) La nécrose 22
5. Les médiateurs de l'Immunité innée 23
a) Les cytokines 23
(1) IL-1β (IL-1F2) et IL-18 (IL-1F4) 24
(2) IL-1α (IL-1F1) 25
(3) IL-1Ra (IL-1F3) 25
(4) IL-33 (IL-F11) 26
(5) IL-36 28

(6) IL-37 (IL-1F7) 28
b) Les chimiokines 28
c) Les enzymes protéolytiques 29
d) La cascade du complément 29
B. L'Immunité adaptative 30
II. Les mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 34
A. Les signaux de danger endogènes et exogènes 34
B. Activation de l'inflammasome NLRP3 36
1. Le modèle d'efflux de potassium 36
2. Le modèle de la destabilisation lysosomale 38
3. Le modèle des mitochondries endommagées 40
4. Le point sur l'activation de l'inflammasome NLRP3 43
III. La signalisation purinergique 44
1. Les purines 45
2. Sécrétion des purines 45
3. Voie de signalisation des récepteurs P1 et P2 47
4. Rôles des récepteurs purinergiques et des purines dans les voies respiratoires 49
IV. Le système respiratoire 51
A. L'architecture pulmonaire 52
1. Mise en place de la structure pulmonaire 52
2. Structure pulmonaire 52
B. Les mécanismes de défense pulmonaire 53
1. Les défenses spécifiques de l'épithélium pulmonaire 53
a) L'épithélium, une barrière 53
b) Le mucus, la clairance ciliaire et les composés antimicrobiens 53
c) Le surfactant 55
d) Les interactions entre les cellules épithéliales et les cellules inflammatoires 56
2. Les cellules pulmonaires de l'Immunité innée 57
a) Les macrophages 57
b) Les cellules épithéliales 59
c) Les neutrophiles 59
d) Les NK, NKT et iNKT 60
e) Les ILC (Innate Lymphoid Cells) 61
f) Les cellules dendritiques (DC) 62
C. L'inflammation pulmonaire 64

1. L'inflammation 64
2. L'inflammation aiguë 65
3. L'inflammation chronique 66
4. Le microbiote pulmonaire 67
5. L'exposition des voies respiratoires aux nanoparticules 67
OBJECTIFS 70
RESULTATS 73
1ère partie : Mécanisme commun d'activation de l'inflammasome NLRP3 par les microparticules : libération d'ATP et signalisation purinergique (Article 1) 74
Supplementary data 86
2ème partie: L'adénosine, métabolite de l'ATP, et son rôle essentiel dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Article 2) 90
3ème partie: L'IL-33 et son récepteur ST2 modulent l'inflammation pulmonaire induite par les nanoparticules (Article 3) 126
DISCUSSION 146
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 160
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 162
ANNEXES 186
ANNEXE 1: Libération d'ATP et activation de l'inflammasome NLRP3 (Revue 1) 187

ABBREVIATIONS

AAM	**Alternatively Activated Macrophage**
AC	**Adénylate Cyclase**
ADA	**Adénosine DéAminase**
ADK	**Adénylate Kinase**
ADN	**Acide DésoxyriboNucléique**
ADN_{mt}	**Acide DésoxyriboNucléique mitochondrial**
Ado	**Adénosine**
ADP	**Adénosine DiPhosphatase**
AEC	**Alveolar Epithelial Cell/pneumocyte**
α-Gal-Cer	**α-Galactosyl-Céramide**
AIM2	**Absent In Melanoma 2**
AK	**Adénosine Kinase**
Alum	**Hydroxyde d'Aluminium**
AMP	**Adénosine MonoPhosphatase**
AMP_C	**Adénosine MonoPhosphatase Cyclique**
AR	**Adenosine Receptor**
ARN	**Acide RiboNucléique**
ARN_m	**Acide RiboNucléique Messager**
ASC	**Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD domain**
ATP	**Adénosine TriPhosphatase**
ATPe	**Adénosine TriPhosphatase Extracellulaire**
BCR	**B Cell Receptor**
BIR	**Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat**
BMDM	**Bone Marrow-Derived Macrophage**
Ca^{2+}	**Calcium**
CAM	**Complexe d'Attaque Membranaire**
CARD	**Caspase Activation and Recruitment Domain**
CASR	**Calcium Sensor Receptor**
CCL	**CC Chemokine Ligand**
$Clara^{var}$	**Cellule de Clara variante**
CLR	**C-type Lectin Receptor**
CMH	**Complexe Majeur d'Histocompatibilité**
CNT	**Concentrative Nucleoside Transporter/SLC28**
COPD	**Chronic Obstructive Pulmonary Disease**
COX	**CycloOXygenase**
CPA	**Cellule Présentatrice d'Antigènes**
CpG	**Cytidine-phosphate-Guanosine**
CTL	**C-Type Lectin**
DAMP	**Damage-Associated Molecular Pattern**
DC	**Dendritic Cell**
Δψ	**Potentiel membranaire mitochondrial**
DSS	**Dextran Sodium Sulfate**
E-NPP	**Ecto-Nucléotides PyroPhosphatase/PhosPhodiestérase**
ENT	**Equilibrative Nucleoside Transporter/SLC29**
E-NTPDase	**Ecto-Nucléosides TriPhosphate Diphosphohydrolase**
FcR	**Fc Receptor**
FIIND	**Function-to-find Domain**
FL	**Full-Length**
FPI	**Fibrose Pulmonaire Idiopathique**
GM-CSF	**Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor**
GPCR	**G Protein-Coupled Receptor**
H_2O_2	**Péroxyde d'hydroxyde**
HMGB1	**High Mobility Group Box 1**
HRV	**Human RhinoVirus**
HSV	**Herpes Simplex Virus**
IAPP	**Islet Amyloid PolyPeptide ou amyline**

ICE	**IL-1 beta Converting Enzyme**
IDSC	**ImmunoDéficience Sévère Combinée**
IFN	**Interféron**
Ig	**Immunoglobuline**
IKDC	**Interferon-producing Killer DC**
IL	**Interleukine**
IL-18BP	**IL-18-Binding Protein**
IL-1F	**Famille de l'IL-1**
ILC	**Innate Lymphoid Cell**
IL-1Ra	**IL-1 Receptor Antagonist**
IL-IRAcP	**IL-1 Receptor Accessory Protein**
iNKT	**Invariant NKT**
IP_3R	**Inositol Tri-Phosphate Receptor**
IPAF	**Ice Protease-Activating Factor**
IRAK	**IL-1 Receptor-Activating Kinase**
K^+	**Potassium**
KC	**Keratinocyte-derived Chemokine**
kDa	**Kilo Dalton**
LBA	**Lavage Broncho-Alvéolaire**
LF	**Lethal Factor**
LPS	**LipoPolySaccharide**
LRR	**Leucine-Rich Repeat**
LT/LeTX	**Lethal Toxin**
MAPK	**Mitogen-Activated Protein Kinase**
MASP	**MBL-Associated Serine Protease**
MBL	**Mannan-Binding Lectin**
MBP	**Mannose-Binding Protein**
MDA	**Melanoma Differentiation-Associated protein**
mDC/cDC	**DC myéloïde/conventionnelle**
MDSC	**Myeloid-Derived Suppressor cell**
MEC	**Matrice ExtraCellulaire**
MRP	**Multidrug Resistant Protein**
MMR	**Macrophage Mannose Receptor**
MSU	**MonoSodium d'Urate**
Na^+	**Sodium**
NACHT	**Nucleotide-binding and oligomerization**
NAD^+	**Nicotinamide Adénine Dinucléotide**
NAFLD	**Non-Alcoholic Fatty Liver Disease**
NAIP	**NLR family, Apoptosis Inhibitory Protein**
NBD	**Nucleotide-Binding Domain**
NBS	**Nucleotide-Binding Site**
NET	**Neutrophil Extracellular Trap**
NF-κB	**Nuclear Factor Kappa B**
NK	**Natural Killer**
NKT	**Natural Killer T**
NLR	**Nod-Like Receptor**
NLS	**Nuclear Localization Sequence**
NOD	**Nucleotide-binding and Oligomerization Domain**
NTP	**Nucléoside TriPhosphate**
O_2	**Dioxygène**
P2X7R	**Récepteur P2X7**
PA	**Protector Antigen**
PAMP	**Pathogen-Associated Molecular Pattern**
PARP	**Poly-ADP-Ribose Polymerase**
pb	**Paires de bases**
PBMC	**Peripheral Blood Mononuclear Cell**
pDC	**DC plasmacytoïde**
PDE	**PhosphoDiEstérase**
PGN	**PeptidoGlycaNe**

PLC	**PhosphoLipase C**
PMA	**Phorbol-1 2 –Myristate 13-Acétate**
Poly IC	**Polyinosinic acide-polycytidylic acide**
PRR	**Patterns Recognition Receptor**
PUF	**Particule Ultra Fine**
PYD	**Pyrin Domain**
RA	**Retinoic Acid**
RIG	**RA-Inducible Gene**
RLH	**RIG-1-Like Helicase**
RLR	**RIG-1-Like Receptor**
RORγt	**RA receptor-related Orphan Receptor γt**
ROS	**Reactive Oxygen Species**
SIGIRR/TIR8	**Single Ig IL-1R-Related molecule/Toll IL-1R 8**
SiO_2	**Dioxyde de silice**
SLPI	**Secretory Leukocyte Protease Inhibitor**
SP	**Protéine du Surfactant**
sST2	**soluble ST2**
ST2L	**ST2 transmembranaire**
T3SS	**Bacterial Type III Secretion**
TAK1	**TGF-β-Activated Kinase 1**
TAM	**Tumor-Associated Macrophage**
TCR	**T Cell Receptor**
T_{FH}	**T Follicular Helper cell**
TGF-β	**Transforming Growth Factor-β**
Th	**Lymphocyte T helper**
THP1	**Human acute monocytic leukemia cell line**
TiO_2	**Dioxyde de titane**
TIR	**Toll/IL-1 Receptor**
TIRAP	**TIR-domain containing Adaptator Protein**
TLR	**Toll-Like Receptors**
TNF	**Tumor Necrosis Factor**
TRAIL	**TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand**
TRAM	**TRIF-related Adaptator Molecule**
T_{reg}	**thymus-derived regulatory T cells**
TRIF	**TIR-domain-containing adaptator protein inducing IFN-β**
TRP	**Transient Receptor Potential**
TRPV	**Transient Receptor Potential Vanilloid**
TRX	**ThioRédoXine**
TXNIP	**ThioRedoXiN-Interacting Protein**
UDP	**Uridine Di-Phosphate**
UTP	**Uridine Tri-Phosphate**
VIH	**Virus de l'Immunodéficience Humaine**
ZnO	**Oxyde de zinc**

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Spécificité et voies de signalisation des TLR 9
Figure 2 : Structure des inflammasomes 10
Figure 3 : Spécificité de chaque inflammasome 13
Figure 4 : Activation de l'inflammasome AIM2 par l'ADN bactérien 14
Figure 5 : Activation de l'inflammasome NLRC4 par les bactéries 15
Figure 6 : Modèle d'activation de l'inflammasome NLRP1b par *Bacillus anthracis* 16
Figure 7 : Assemblage de l'inflammasome NLRP3 18
Figure 8 : Apoptose et pyroptose 20
Figure 9 : La famille de l'IL-1 24
Figure 10 : Les ligands et récepteurs de l'IL-33 26
Figure 11 : Les différents modes de sécrétion et de maturation de l'IL-33 27
Figure 12 : Les trois voies d'activation du complément 30
Figure 13 : Développement et fonctions des cellules T hleper 32
Figure 14 : Mécanismes d'action des anticorps dans la défense de l'hôte 33
Figure 15 : Les différents inducteurs de l'inflammasome NLRP3 34
Figure 16 : Implication de l'inflammasome NLRP3 dans des maladies inflammatoires stériles 35
Figure 17 : Modèle d'activation de l'inflammasome NLRP3 par l'efflux de K^+ 37
Figure 18 : Modèle d'activation de l'inflammasome NLRP3 par la production de ROS 39
Figure 19 : Modèle d'activation de l'inflammasome NLRP3 par la déstabilisation lysosomale 40
Figure 20 : Modèle d'activation de l'inflammasome NLRP3 via l'ADN mitochondrial oxydé 41
Figure 21 : Modèle d'activation de l'inflammasome NLRP3 par le calcium 42
Figure 22 : Récapitulatif de tous les mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 actuellement répertoriés 43
Figure 23 : La signalisation purinergique 45
Figure 24 : Voies de sécrétion et d'action de l'ATP et de l'ADP extracellulaires 46
Figure 25 : Voies de signalisation simplifiées des récepteurs P1 48
Figure 26 : Voies de signalisation des récepteurs P1 et P2 49
Figure 27 : Types cellulaires du système respiratoire 53
Figure 28 : Défenses antibactériennes et antimicrobiennes des cellules épithéliales alvéolaires 55
Figure 29 : Mécanismes de défense pulmonaire 56
Figure 30 : Classification des macrophages selon leur phénotype fonctionnel 58
Figure 31 : Classification des ILC suivant leur phénotype 62
Figure 32 : Les différentes populations de DC pulmonaires 63
Figure 33 : Modèle d'inflammation / réparation de l'épithélium pulmonaire 65
Figure 34 : Maladies associées à l'exposition aux nanoparticules 69
Figure 35 : Activation de l'inflammasome NLRP3 par l'ATPe et la signalisation purinergique 152
Figure 36 : Modèle hypothétique de l'activation de l'inflammasome NLRP3 par l'adénosine via l'adénylate cyclase (AC) 156
Figure 37 : Boucle autocrine ATP-adénosine 157

INTRODUCTION

I. L'Immunité

En réponse à la variété et à la complexité des microorganismes, les mécanismes permettant la reconnaissance des pathogènes sont très divers. Chez les mammifères, l'Immunité est classiquement divisée en Immunité innée et en Immunité adaptative. On considère que l'Immunité innée est la première réponse de l'organisme contre des agents pathogènes invasifs tandis que l'Immunité adaptative intervient plus tardivement et permet de protéger l'hôte d'expositions ultérieures aux mêmes pathogènes. Ces deux types de réponses sont interconnectées, la détection des pathogènes par l'Immunité innée permettant notamment d'initier l'Immunité adaptative (Janeway and Medzhitov, 2002). Lors de la mise en place de l'Immunité innée, la reconnaissance s'effectue principalement grâce à des récepteurs sélectionnés par l'évolution pour reconnaître des molécules dites du « non-soi » ou des molécules du « soi » qui ne sont pas physiologiquement présentes dans le milieu extracellulaire. La réponse adaptative va, quant à elle, permettre la mise en place d'un large répertoire de récepteurs qui reconnaissent collectivement les antigènes du « non-soi ».

A. L'Immunité innée

L'Immunité innée est un système universel et ancien de la défense de l'hôte contre les infections. Les senseurs de l'Immunité innée sont constitués d'un nombre limité de récepteurs « fixés » dans le génome et qui ne sont pas réarrangés : les PRR (Patterns Recognition Receptors). Ces récepteurs ont évolué pour reconnaître des motifs hautement conservés spécifiques des pathogènes et non pas de l'hôte, les PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) (Janeway, 1989). La reconnaissance de ces structures moléculaires permet au système immunitaire de faire la différence entre le « non-soi infectieux » et le « soi non-infectieux ». Les PAMP les plus connus sont le LPS (LipoPolySaccharide), le PGN (PeptidoGlycaNe), la flagelline et les acides nucléiques microbiens. La reconnaissance de ces PAMP par les PRR active des voies de signalisation pour aboutir à une réponse antimicrobienne inflammatoire. Cependant, il a été montré récemment que ces récepteurs ne détectent pas seulement des pathogènes invasifs mais également des signaux de « danger » endogènes, non microbiens, les DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns).

1. Les différents modèles de l'Immunité innée

a) Les modèles du « non-soi » et du « non-soi infectieux »

Pendant près de 60 ans, l'immunologie a reposé sur la théorie d'un système immunitaire qui fait la distinction entre le « soi », qu'il tolère et le « non-soi », qu'il attaque. Le modèle originellement établi par Burnet (Burnet, 1959) suggère que les lymphocytes sont activés par la reconnaissance d'entités étrangères par des récepteurs spécifiques exprimés à leur surface. Suite aux découvertes et aux incohérences relevées, ce modèle a été progressivement complexifié. Ainsi, un nouveau type cellulaire est ajouté : des cellules dites « helper » (ou auxiliaires, décrites plus tard comme étant des lympocytes Th) empêchent les cellules B de mourir suite à la reconnaissance d'un antigène (Bretscher and Cohn, 1970). De même, la notion de « co-stimulation » est introduite afin d'expliquer pourquoi les cellules T répondent plus fortement contre des cellules étrangères de leur propre espèce que contre celles d'espèces différentes. Un nouveau type cellulaire est encore ajouté : des cellules « stimulatrices » (désormais appelées Cellules Présentatrices d'Antigènes, ou CPA) initient la réponse immunitaire et co-stimulent les cellules T. Ce second signal serait spécifique à l'espèce (Lafferty and Cunningham, 1975). Comme la capture d'antigènes par les CPA n'est pas limitée aux substances étrangères, ce signal a été plus ou moins mis de côté jusqu'à Janeway en 1989. Il propose que les CPA restent quiescentes jusqu'à ce que des PAMP soient reconnus par des micro-récepteurs appelés PRR (Janeway, 1989). Ces PRR vont permettre aux CPA de faire la différence du « non-soi infectieux » et du « soi non-infectieux » (Janeway Jr., 1992). Le modèle du « non-soi infectieux » a été conforté par la découverte de récepteurs membranaires fortement conservés dans l'évolution, les Toll-Like Receptors (TLR), qui appartiennent aux PRR et reconnaissent effectivement des PAMP (Lemaitre et al., 1996). Malgré des modifications ultérieures, ce modèle ne peut, à lui tout seul, expliquer toutes les complexités du système immunitaire et son activation, par exemple lors du rejet des greffes ou les maladies auto-immunes.

b) Le modèle du « Danger »

En complément de ces modèles, Polly Matzinger élabore la théorie du « Danger » (Matzinger, 1994, 2002). Elle propose que les CPA soient activées, en plus des PAMP, par des signaux de danger appelés DAMP ou « alarmines » issus de cellules endommagées par des pathogènes, des toxines ou mécaniquement. Les alarmines sont des molécules intracellulaires comme le HMGB1 (High Mobility Group Box 1) ou des Interleukines (IL) comme l'IL-1α et l'IL-33 libérées lors de toute mort cellulaire autre que l'apoptose. Ces DAMP, qui sont des molécules normalement contenues dans les cellules, sont reconnus par des PRR lors d'infections et / ou d'endommagements cellulaires.

Bien que les modèles du « non-soi infectieux » et du « Danger » diffèrent sur un certain nombre de points, ils s'accordent toutefois sur le postulat de l'activation des CPA par des signaux issus de leur environnement immédiat.

2. Les senseurs de l'Immunité innée, les PRR

Les récepteurs de l'Immunité innée, conservés dans l'évolution, permettent la détection des situations potentiellement délétères pour l'organisme. Ces PRR, qui ne nécessitent pas de réarrangements, peuvent être exprimés à la surface cellulaire (en particulier les cellules épithéliales et les CPA), dans les compartiments intracellulaires ou être sécrétés dans la circulation sanguine et les fluides tissulaires (Medzhitov and Janeway Jr, 1997).

L'activation, par des DAMP ou des PAMP, des PRR peut induire divers mécanismes: opsonisation (le phagocyte se fixe sur un anticorps qui s'est lui-même fixé sur un antigène), activation du complément, phagocytose (aucun anticorps n'est impliqué dans ce phénomène non spécifique), activation de voies pro-inflammatoires (production de cytokines pro-inflammatoires et d'Interférons de type I (IFN-I)), augmentation de l'expression en surface cellulaire de molécules de co-stimulation et induction de l'apoptose. Les IFN-I jouent un rôle central dans l'induction de la synthèse de protéines et l'apoptose. Ils augmentent également la maturation des DC (Dendritic Cells), la cytotoxicité des NK (Natural Killers) et la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques aux virus ce qui permet d'interconnecter les réponses de l'Immunité innée et adaptative (Honda et al., 2006).

Plusieurs familles de PRR ont été identifiées, chaque membre se distinguant par ses ligands spécifiques, sa localisation cellulaire et la voie de signalisation qu'il active. Ces familles offrent une forte redondance fonctionnelle permettant une réponse optimale à une grande variété de PAMP et de DAMP.

a) Les TLR (Toll-Like Receptors)

Peu après la découverte du rôle dans la défense fongique du récepteur Toll chez la drosophile, un homologue, désormais identifié comme le TLR1 (Toll-Like Receptor 1), était découvert chez les mammifères (Taguchi et al., 1996). Chaque espèce de mammifère possède entre 10 et 15 TLR (avec une numérotation incrémentée). L'Homme en possède 10 et la souris 13, certains étant propres à une espèce (Lee et al., 2012a).

Les TLR jouent un rôle majeur dans la détection des pathogènes et l'induction de réponses inflammatoires et immunitaires. La stimulation des TLR par des PAMP active diverses voies de signalisation qui induisent des gènes antimicrobiens et des cytokines inflammatoires (voir

figure 1). La stimulation des TLR permet également la maturation des DC en induisant des molécules de co-stimulation et en augmentant la capacité de présentation des antigènes de ces cellules. Pour finir, la reconnaissance d'antigènes par les TLR va aider à la mise en place des réponses de l'Immunité adaptative.

Lorsque des TLR se lient à leur ligand (endogène ou exogène), ils recrutent une protéine adaptatrice TIR (Toll/IL-1 Receptor) (Akira and Takeda, 2004). A l'exception de TLR3, tous les TLR s'associent également à MyD88 ce qui induit une cascade de kinases s'achevant par l'activation du facteur de transcription NF-κB (Nuclear Factor Kappa B). NF-κB contrôle l'expression d'un grand nombre de molécules impliquées dans l'inflammation aiguë comme les cytokines pro-inflammatoires (l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et le TNFα (Tumor Necrosis Factor α), les chimiokines (comme le MIP-α (Macrophage Inflammatory Protein 1 α) ou CCL3 (CC Chemokine Ligand 3) et l'éotaxine) et les molécules d'adhésion vasculaire (par exemple la sélectine E) nécessaires pour le recrutement des leukocytes (Baeuerle and Henkel, 1994). Les TLR 3 et 4 s'associent avec une autre protéine adaptatrice TIR, le TRIF (TIR-domain-containing adaptator protein inducing IFN-β), activant ainsi la production d'IFN-I (Akira and Takeda, 2004) (voir figure 1). Ces mécanismes permettent de détecter les PAMP et d'induire rapidement une réponse inflammatoire.

Suivant qu'ils reconnaissent des composants de membranes bactériennes ou des acides nucléiques, les TLR sont divisés en deux groupes qui ne partagent pas la même localisation cellulaire (voir figure 1). Les TLR2, TLR4 et TLR5 sont intégrés dans la membrane plasmique et reconnaissent respectivement des lipopeptides, des LPS et des protéines de flagelles (Gangloff, 2012). Le TLR3 et le TLR4 forment des homodimères tandis que le TLR2 forme des hétérodimères avec le TLR1 ou le TLR6 ce qui lui permet de reconnaître une grande variété de PAMP issus de virus, de champignons, de bactéries et de parasites (Oliveira-Nascimento et al., 2012). Le TLR10, propre à l'Homme et absent chez la souris, peut s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec les TLR 1 et 2 mais ses fonctions sont peu connues (Hasan et al., 2005). Les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 constituent une sous-famille de TLR insérés dans la membrane des endosomes et reconnaissent les ARN (Acides RiboNucléiques) simples et doubles brins et les motifs CpG non méthylés (2'-deoxyribo (Cytidine-phosphate-Guanosine)) dérivés de composants microbiens. Ils induisent la production d'IFN-I (Kawai and Akira, 2006). Les ARN doubles brins sont synthétisés lors de la réplication d'un grand nombre de virus (à ARN ou à ADN (Acide DésoxyriboNucléiques)). Ils peuvent être mimés par le Poly IC (Polyinosinic acide-polycytidylic acide) reconnu par le TLR3 (Alexopoulou et al., 2001). Le TLR7 a pour ligands naturels des ARN simples brins riches en guanosine ou uridine, comme ceux dérivés des virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) (Heil et al., 2004) ou de l'influenza (Lund et al., 2004). Le TLR8 est phylogénétiquement très proche du TLR7 et forme un hétérodimère avec TLR7. Chez l'Homme, le TLR7/8 reconnait particulièrement les ARN simples brins dérivés du VIH alors qu'il pourrait être non

fonctionnel chez la souris (Heil et al., 2004). Le TLR9 détecte les ADN riches en CpG non methylés fréquemment présents chez les pathogènes, par exemple le HSV-2 (Herpes Simplex Virus-2) mais plutôt rares chez les vertébrés (Hemmi et al., 2000).

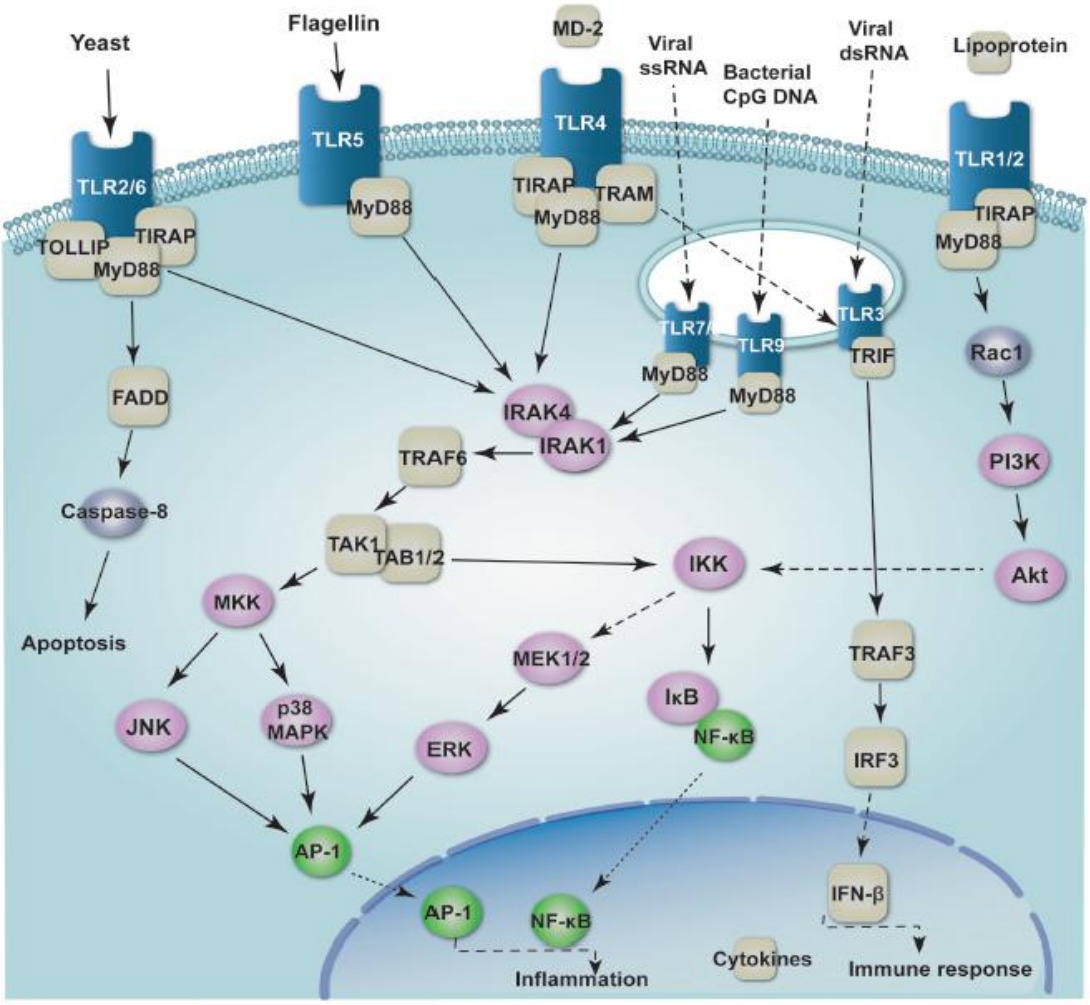


Figure 1 : Spécificité et voies de signalisation des TLR

Modifié d'après http://www.tocris.com/pathways/tlrPathway.php#.UhHO8KyeZn4

Les TLR sont des récepteurs clés de l'Immunité innée spécialisés dans la détection de PAMP. Ils existent sous forme d'homodimères (TLR 3, 4, 5 et 9) ou d'hétérodimères (TLR 1/2, 2/6, 7/8). Les TLR 1/2, 4, 5 et 2/6 sont insérés dans la membrane plasmique tandis que les TLR 3, 7/8 et 9 sont dans la membrane des endosomes. L'activation de ces TLR induit les cascades de signalisation PI3K et NF-κB grâce à des molécules adaptatrices comme MyD88, TIRAP (TIR-domain containing Adaptator Protein), TRIF et TRAM (TRIF-related Adaptator Molecule). Des kinases intracellulaires et l'expression de gènes, codants notamment pour des cytokines et des chimiokines, sont régulées pour stimuler une réponse immune inflammatoire et / ou spécifique à l'antigène.

IL est apparu que les TLR peuvent aussi détecter des signaux de danger indépendamment d'une infection. Des alarmines ont été identifiées comme des ligands de TLR2, par exemple des fragments d'acide hyaluronique (Scheibner et al., 2006), des oxydants comme le péroxyde d'hydroxyde (H_2O_2) (Paul-Clark et al., 2009) et le HMGB1 (Curtin et al., 2009). Les cristaux de MonoSodium d'Urate (MSU) peuvent se lier aux TLR 2 et 4 pour activer la voie NF-κB puis induire la production de cytokines comme l'IL-1β. Cependant, il est apparu que les PRR essentiels pour la transduction de ce signal ne soient finalement pas les TLR mais les NLR (Tao et al., 2013).

b) Les NLR (Nod-Like Receptors)

Les NLR (Nod-Like Receptors) sont une classe majeure des PRR et sont intégrés à la défense de l'hôte (Martinon et al., 2002), en complément des TLR. Leur conservation dans l'évolution démontre leur rôle primordial dans la défense de l'hôte. A l'inverse des TLR, ces récepteurs sont des senseurs intracellulaires présents dans le cytosol. L'activation, par des DAMP ou des PAMP, des NLR induit des cascades de signalisation qui aboutissent à l'expression de médiateurs pro-inflammatoires. Ils jouent un rôle clé dans l'élimination de pathogènes et la régulation de l'inflammation, en particulier dans les voies suivantes : la voie NF-κB/MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), les IFN-I et la caspase-1.

Les NLR sont des PRR cytosoliques composés de :

- un domaine central invariant, NACHT (Nucleotide-binding and oligomerization), NOD (Nucleotide-binding and Oligomerization Domain) ou NBS (Nucleotide-Binding Site)
- un domaine C-terminal LRR (Leucine-Rich Repeat) probablement responsable de la détection des molécules microbiennes (PAMP) ou des facteurs de stress endogènes (DAMP)
- un domaine effecteur N-terminal nécessaire à la transduction du signal. Cette région peut être composée d'un PYD (Pyrin Domain), d'un CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain) ou d'un BIR (Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat) (Martinon and Tschopp, 2005; Ting et al., 2008) (voir figure 2).

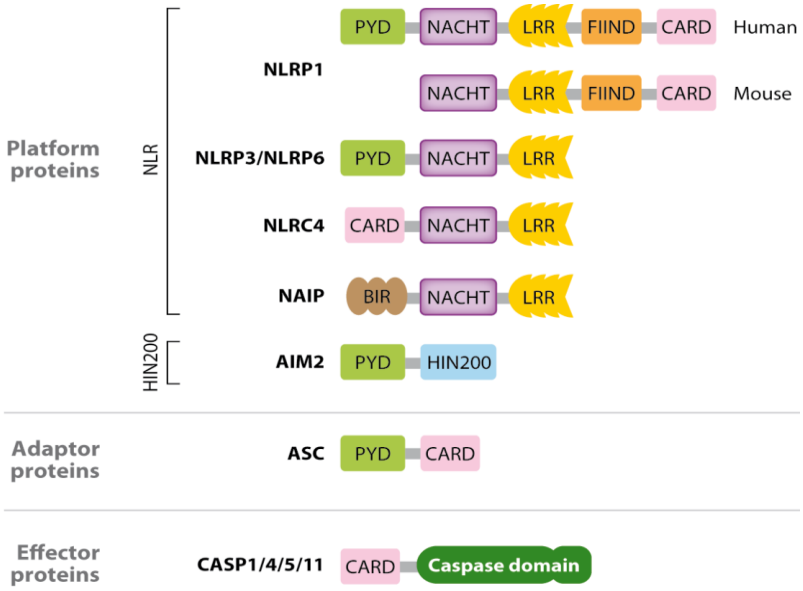


Figure 2 : Structure des inflammasomes (Lamkanfi and Dixit, 2012)
Les inflammasomes sont des plateformes multiprotéiques cytoplasmiques. Ils sont classiquement composés d'un récepteur NLR (NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRC4 ou NAIP), d'une protéine adaptatrice ASC et d'une protéine effectrice de la famille des caspases. Chaque interaction se fait entre domaines homologues. L'inflammasome NLRC4 ne nécessite pas forcément ASC mais est essentiel aux NAIP. L'inflammasome AIM2 est particulier et présente un récepteur aux domaines différents. NB : l'inflammasome NLRP12 n'est pas inclus.

Certains NLR sont impliqués dans l'activation de la caspase-1 (aussi nommée ICE pour IL-1 beta Converting Enzyme (Alnemri et al., 1996)) via la formation d'un complexe multi-protéique décrit pour la première fois en 2002 par Jürg Tschopp et ses collègues, l'inflammasome (Martinon et al., 2002).

c) *Les NAIP (NLR family, Apoptosis Inhibitory Proteins)*

Les NAIP (NLR family, Apoptosis Inhibitory Proteins) ont été récemment classés comme sous-famille des NLR (voir figure 2). Certains membres des NAIP sont nécessaires pour l'activation de l'inflammasome NLRC4. Les NAIP contiennent un domaine central NBD (Nucleotide-Binding Domain) et un domaine C-terminal LRR, mais à la différence des autres NLR, ils possèdent également trois domaines répétés N-terminaux BIR. Ce sont ces domaines BIR qui permettent l'activation de l'inflammasome NLRC4 (Kofoed and Vance, 2011).

d) *Les RLR (RIG-1-Like Receptors) ou RLH (RIG-Like Helicases)*

Les RLR (Retinoid Acid (RA)-Inducible Gene-1 (RIG-1) -Like Receptors) sont des hélicases cytosoliques qui permettent la détection de virus. En particulier, RIG-1 et MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5) peuvent détecter les ARN viraux. Leurs fonctions sont redondantes avec celles des TLR mais leur localisation cellulaire, leurs ligands et leurs voies de signalisation diffèrent ce qui offre aux cellules de l'hôte plusieurs mécanismes de défenses contre les infections virales.

e) *Les CLR (C-type Lectin Receptors)*

Les CLR (C-type Lectin Receptors) incluent les collectines et les récepteurs exprimés par les NK et les macrophages. Les collectines sont caractérisées par la présence d'une partie de type collagène et d'un domaine lectine ou CTL (C-Type Lectin). La famille des collectines inclut le MBL (Mannan-Binding Lectin) ou le MBP (Mannose-Binding Protein), les protéines du surfactant pulmonaire A et D (SP-A et SP-D) et le MMR (Macrophage Mannose Receptor).

Le MBL se lie de façon spécifique aux résidus de mannose terminaux, qui sont des sucres fréquents à la surface des micro-organismes, et active des protéases MASP (MBL-Associated Serine Proteases). Les MASP 1 et 2 activent la cascade du complément (la voie des lectines) en clivant les protéines C2 et C4 (Matsushita and Fujita, 1992) (voir La cascade du complément, p29). Le MMR détecte un grand nombre de bactéries gram positives et gram négatives ainsi que des champignons. La principale fonction du MMR serait d'initier la phagocytose de pathogènes et leur destruction dans le compartiment lysosomal (Fraser et al., 1998).

3. Les inflammasomes NLRP

Les inflammasomes sont généralement des complexes tripartites composés d'un récepteur NLR, d'une protéine adaptatrice ASC (Apoptosis-associated Speck-like containing a CARD domain) et d'une protéine effectrice de la famille des caspases. Comme ils sont impliqués dans la réponse immune aux pathogènes et aux signaux de danger, ils ne sont pas assemblés à l'état basal et les caspases sont inactives. L'assemblage ne s'effectue que si le récepteur détecte un activateur ce qui permet le

recrutement de la protéine adaptatrice puis de la protéine effectrice, en particulier la caspase-1 reponsable du clivage de l'Interleukine-1 beta (IL-1β). Le rôle de l'IL-1β dans l'inflammation chronique et aiguë a été montré par Dinarello en 1998 (Dinarello, 1998a). L'IL-1β, cytokine pro-inflammatoire produite par les macrophages et les monocytes activés, est initialement synthétisée en une molécule précurseur inactive, la pro-IL-1β, séquestrée dans le cytosol. La caspase-1 clive la pro-IL-1β (après l'acide aspartique 116) en une molécule de 17-kDa hautement inflammatoire sécrétée par la cellule (Meylan et al., 2006). Un autre membre de cette famille de l'IL-1, l'IL-18, est également produite sous forme de précurseur potentiellement clivable par la caspase-1 (Dinarello, 1998a). L'IL-18, une fois maturée, est un inducteur de la production de TNF, de chimiokines et d'IFN-γ (Dinarello, 2009). L'IL-1β et l'IL-18 vont initier une réponse pro-inflammatoire. La maturation de l'IL-1β et de l'IL-18 par la caspase-1 nécessite généralement le recrutement de la protéine ASC (Bauernfeind et al., 2011a) par le récepteur NLR. Les recrutements entre les différents partenaires se font via des interactions domaine-domaine. La protéine adaptatrice ASC est composée d'un domaine CARD et d'un domaine PYD (Bauernfeind et al., 2011a) et permet le recrutement de la pro-caspase-1 via l'interaction homotypique de leurs domaines CARD (voir figure 2). Les pro-caspases-1 se dimérisent et s'auto-clivent en sous-unités p10 et p20 qui forment alors des tétramères. Ces caspases-1 matures peuvent ensuite cliver à leur tour la pro-IL-1β et la pro-IL-18. L'activation de la caspase-1 dans les cellules myéloïdes conduit également à la mise en place d'une mort cellulaire spécifique, la pyroptose.

Même si les réponses immunes engagées convergent vers la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et /ou l'apoptose, chaque inflammasome est spécialisé dans la détection de DAMP et / ou PAMP bien précis et présente ses propres mécanismes d'activation (voir figure 3). Nous allons maintenant détailler ces inflammasomes.

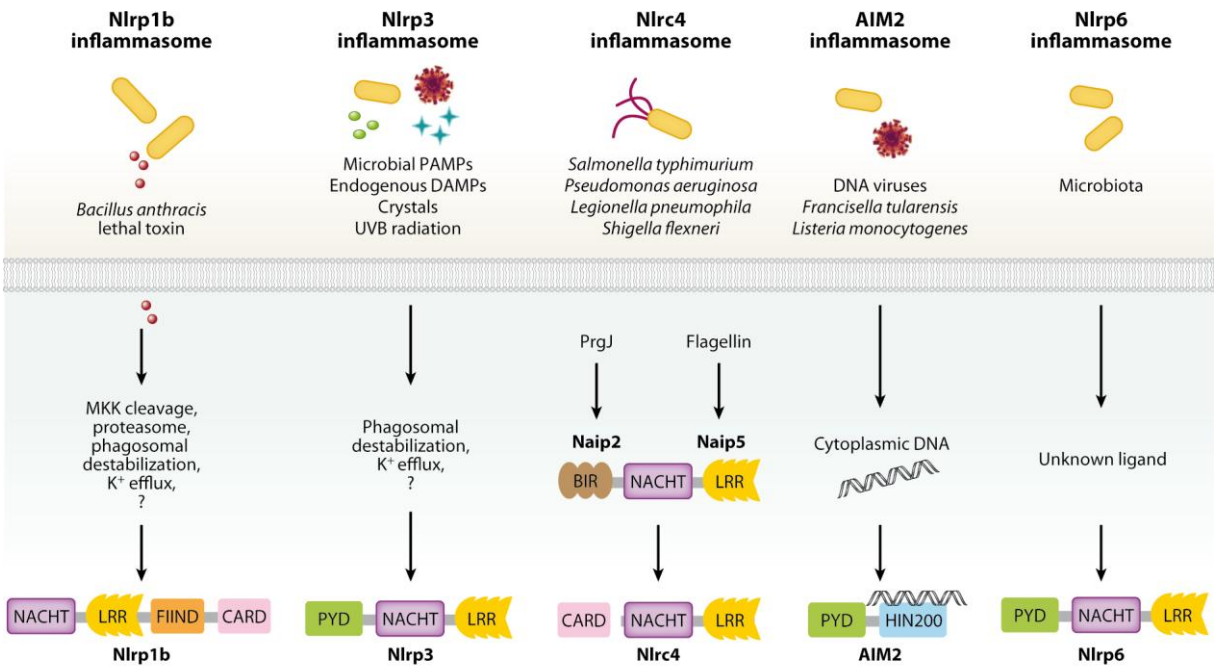


Figure 3 : Spécificité de chaque inflammasome (Lamkanfi and Dixit, 2012)

Chaque inflammasome a ses propres activateurs. Ils peuvent être bactériens (NLRP1, ici NLRP1b bien étudié pour son activation par la toxine létale de *Bacillus anthracis*, NLRC4 qui détecte les flagelles et le composé PrgJ, AIM2 qui détecte l'ADN cytoplasmique et NLRP6 qui est spécialisé dans la flore intestinale et dont le ligand reste inconnu) ou viraux (AIM2). L'inflammasome NLRP3 se caractérise par une une très grande hétérogénéité d'activateurs (PAMP, DAMP, cristaux, irradiations, …) et par des mécanismes d'activation complexes.
NB : l'inflammasome NLRP12 n'est pas inclus.

a) L'inflammasome AIM2

Le récepteur AIM2 (Absent In Melanoma 2) appartient à la famille des protéines PYHIN induites par l'IFN et qui contiennent les domaines PYRIN et HIN-200. Il est caractérisé par un domaine PYRIN (ou PYD) qui permet le recrutement de la caspase-1 via ASC, et un ou deux domaines C-terminaux de liaison à l'ADN, HIN-200, qui remplaçent le domaine LRR, mais ce récepteur ne possède pas de domaine NACHT ou NBD. Ces différences n'empêchent pas le récepteur AIM2 de former un inflammasome pouvant maturer des cytokines et induire une mort par pyroptose. Le récepteur AIM2 se lie directement à l'ADN double brin d'origine virale ou bactérienne, dans le cytosol, via des interactions électrostatiques entre le domaine HIN de cet inflammasome, chargé positivement, et le squelette de l'ADN chargé négativement (Jin et al., 2012). De l'ADN double brin , libre dans le cytosol, d'une taille de 80pb (paires de bases), est suffisant et nécessaire pour induire l'activation de l'inflammasome AIM2 et le clivage de la caspase-1 (Jin et al., 2012). Lorsque des bactéries comme *Listeria monocytogenes* ou *Francisella tularensis* sont lysées à l'intérieur de la cellule, l'inflammasome AIM2 est activé (Fernandes-Alnemri et al., 2010; Sauer et al., 2010) (voir figure 4).

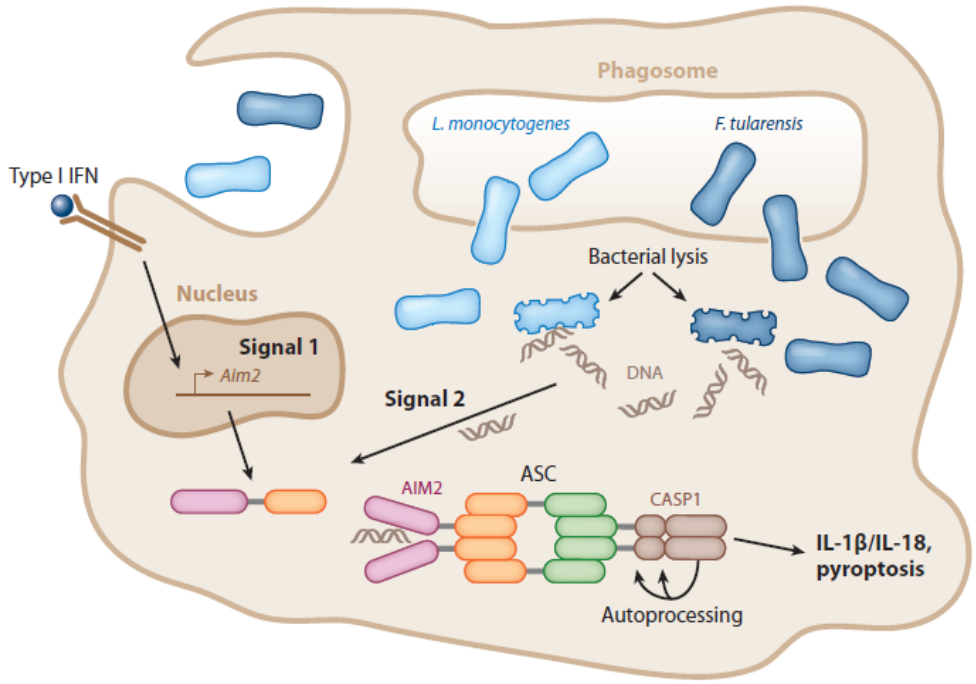


Figure 4 : Activation de l'inflammasome AIM2 par l'ADN bactérien (von Moltke et al., 2013)
Bien que dépourvu de NLR, l'inflammasome AIM2 est spécialisé dans la reconnaissance de l'ADN double-brin cytosolique. La transcription du récepteur AIM2 fait suite à une signalisation par les IFN de type 1.

b) L'inflammasome NLRC4

Anciennement connu sous le nom d'IPAF (Ice Protease Activating Factor) ou Card12, cet inflammasome peut activer la caspase-1 lors d'infection des macrophages par *Salmonella typhimurium* (Franchi et al., 2006). NLRC4 est composé d'un domaine N-terminal CARD, d'un domaine central NACHT et d'un domaine C-terminal LRR. Le clivage de la caspase-1 nécessite le recrutement d'ASC, ce qui ne semble pas être le cas lors de l'induction de la mort cellulaire via NLRC4 (Aachoui et al., 2013a; Broz et al., 2010). NLRC4 est capable de reconnaître deux composants des bactéries gram négatives : la flagelline (Miao et al., 2006), composant principal du flagelle, ou le PrgJ, un élément du système T3SS (bacterial Type III Secretion) dans le cas du recrutement de la caspase-1 directement par NLRC4 (Miao et al., 2010a). La distinction, par NLRC4, des bactéries commensales ou pathogéniques pourrait se baser sur les différences de flagelle entre les espèces bactériennes. De plus, l'injection des facteurs de virulence par le système T3SS est structurellement corrélée au flagelle (Miao et al., 2006). La défense de l'organisme contre des pathogènes via l'inflammasome NLRC4 peut passer par la maturation puis la sécrétion d'IL-1β et d'IL-18 et par la mort par pyroptose. C'est le cas, par exemple, lors de l'infection par le bacille dépourvu de gène de la flagelline et responsable de la dysenterie, *Shigella flexneri* (Sansonetti et al., 2000; Suzuki et al., 2007). L'IL-1β et l'IL-18 peuvent n'être que partiellement requises pour la défense contre certains pathogènes tels que *S. typhimurium* (Mariathasan et al., 2004). L'activation de l'inflammasome NLRC4 et le recrutement de la caspase-1 vont induire des lipides inflammatoires, les éicosonaïdes, responsables

de l'inflammation (Moltke et al., 2012). L'élimination des pathogènes se fait par deux voies principalement:

- la dégradation des pathogènes à l'intérieur des macrophages dans des lysosomes (Amer et al., 2006)
- la pyroptose caspase-1 dépendante des macrophages infectés qui exposent alors les bactéries à la phagocytose par les neutrophiles où elles sont détruites par leur ROS (Reactive Oxygen Species) (Miao et al., 2010b).

Il a été découvert récemment que la reconnaissance des divers ligands de NLRC4 nécessite une sous-famille des NLR, les NAIP (Zhao et al., 2011). Les NAIP 5 et 6 peuvent reconnaître directement la flagelline, tandis que la reconnaissance des protéines de T3SS nécessite le NAIP2 (Kofoed and Vance, 2011). Une fois activés par ces composants, les NAIP induisent une oligomérisation et une activation de NLRC4 (Kofoed and Vance, 2011) ce qui permet par la suite le recrutement de la caspase-1. L'activation de la caspase-1 nécessite également la phosphorylation de NLRC4, les kinases activées restent encore inconnues (voir figure 5).

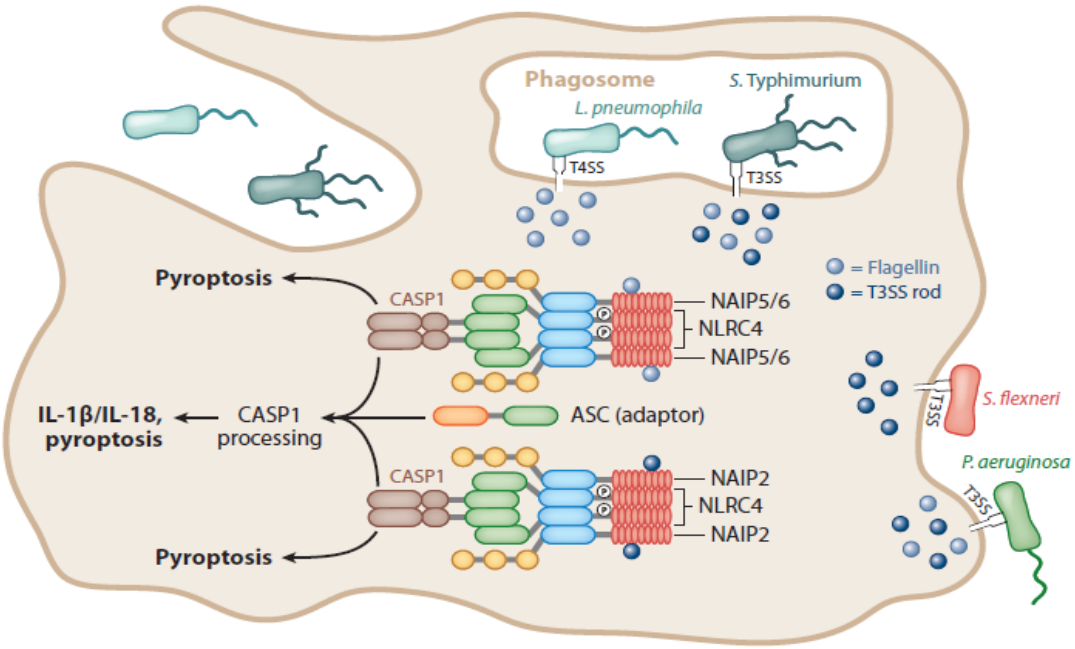


Figure 5 : Activation de l'inflammasome NLRC4 par les bactéries (von Moltke et al., 2013)
L'inflammasome NLRC4 est activé suite à la détection dans le cytosol de composants bactériens comme la flagelline ou le T3SS. L'élimination des pathogènes nécessite le recrutement de protéines NAIP et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18 (si la caspase-1 est recrutée) et / ou la pyroptose des cellules infectées.

c) L'inflammasome NLRP1

Il s'agit du premier inflammasome décrit (Martinon et al., 2002). Son côté C-terminal comprend, en plus de la région LRR classique, un autre domaine CARD et un domaine à la fonction encore inconnue, FIIND (Function-to-find Domain), retrouvé uniquement chez NLRP1 (Tschopp et al., 2003).

NLRP1 diffère entre l'Homme et la souris : chez l'Homme, il nécessite ASC alors que chez la souris l'activation de la caspase-1 peut se passer d'ASC (Hsu et al., 2008). Il est polymorphique chez la souris où les trois paralogues connus sont : NLRP1a, NLRP1b et NLRP1c. Cet inflammasome est principalement activé par le facteur de virulence majeur, la toxine létale (LT ou LeTx) de *Bacillus anthracis* (Boyden and Dietrich, 2006). Cette toxine est composée d'un antigène protecteur (PA) et d'un facteur létal (LF). Le PA est responsable de la formation de pores permettant au LF d'entrer dans les cellules ce qui aboutit au clivage protéolytique de substrats des cellules infectées puis à leur mort par lyse et nécrose (Thoren and Krantz, 2011). La sensibilité ou la résistance face à l'anthrax est modulée par les variants de NLRP1b (Boyden and Dietrich, 2006). La production de LT active l'inflammasome NLRP1b et la mort par pyroptose via la caspase-1 des macrophages infectés (Welkos et al., 1989) (voir figure 6). Les mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP1 humain restent encore à élucider.

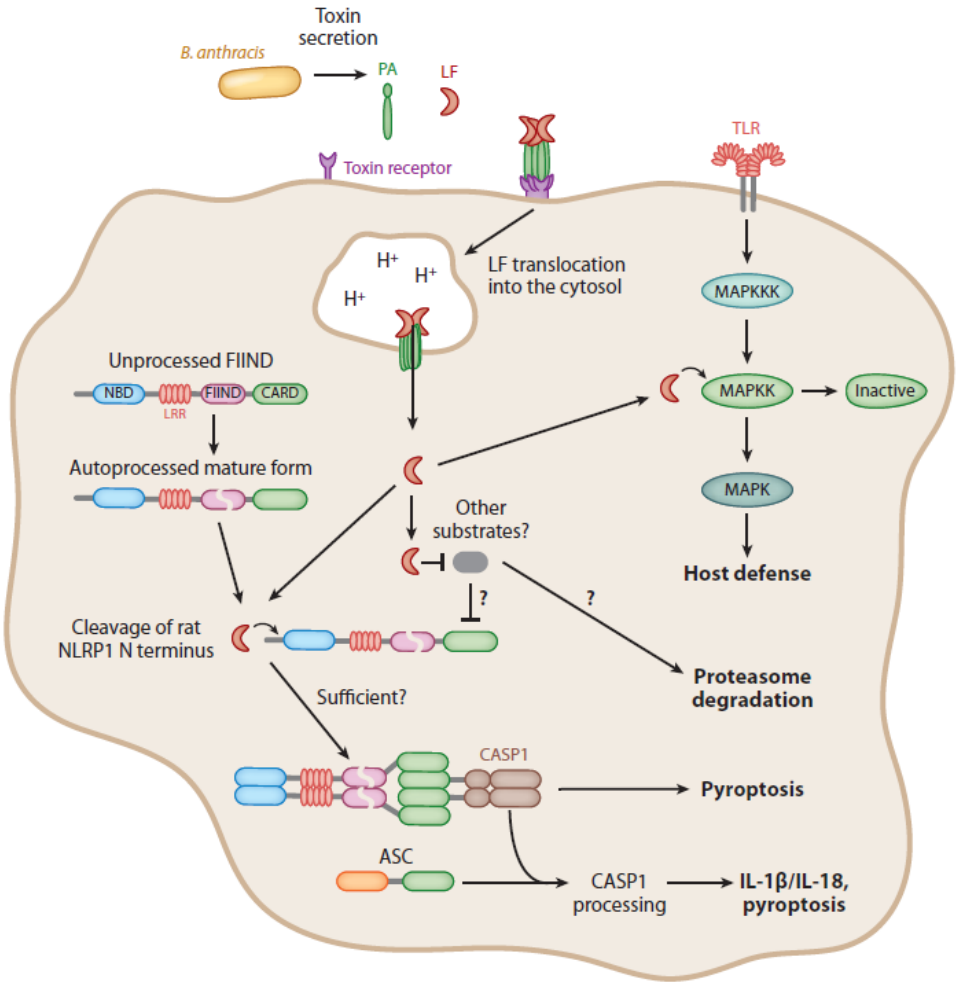


Figure 6 : Modèle d'activation de l'inflammasome NLRP1b par *Bacillus anthracis* (von Moltke et al., 2013)
Le facteur létal (LF) sécrété par le bacille se fixe sur le récepteur à toxine de la cellule hôte. L'antigène protecteur (PA) de *B. anthracis* se lie alors au LF ce qui forme la toxine létale (LT) qui est internalisée par la cellule dans un endosome. L'acidification de l'endosome permet au LF de s'échapper dans le cytosol où il inactive les kinases de la voie MAPK impliquées dans la défense de l'hôte. Après maturation du domaine FIIND de NLRP1b, le LF clive ce récepteur dans sa partie N-terminale (ce qui pourrait suffire pour induire une activation). Si l'inflammasome NLRP1b ne recrute pas la caspase-1, la cellule s'engage vers une mort par pyroptose, mais s'il y a recrutement de la caspase-1, les cytokines IL-1β et IL-18 sont également maturées.

d) Les inflammasomes NLRP6 et NLRP12

Ces deux membres de la famille des protéines NBD-LRR sont assez peu caractérisés. Egalement appelé Pypaf5, le récepteur NLRP6 s'associe avec ASC et la caspase-1 et peut activer la voie NF-κB. Les souris déficientes en NLRP6 sont plus résistantes aux infections de bactéries comme *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* et *Escherichia coli* (Anand et al., 2012). Il a été suggéré que l'inflammasome NLRP6 régule négativement la signalisation inflammatoire et en particulier NF-κB et la signalisation des MAPK suite à l'activation des TLR (Anand et al., 2012). Dans la même étude, il a également été proposé que NLRP6 régule la réponse inflammatoire au DSS (Dextran Sodium Sulfate) en modulant la composition du microbiote. Les souris déficientes en NLRP6 présentent une hyperplasie intestinale spontanée, un recrutement de cellules inflammatoires et une exacerbation de la colite induite par l'exposition au DSS. L'inflammasome NLRP6 régule la flore intestinale (Elinav et al., 2011) ce qui impacte la progression de syndromes métaboliques comme les NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases) et l'obésité (Henao-Mejia et al., 2012).

L'inflammasome NLRP12 joue aussi un rôle dans la défense contre les pathogènes, en particulier contre *Yersinia pestis* où il permet d'induire de l'IFN-γ via l'IL-18 (Vladimer et al., 2012). Ce bacille responsable de la peste peut neutraliser les défenses de l'hôte via son système T3SS qui évite la phagocytose et induit l'apoptose (Cornelis, 2002). De plus, le lipide tétra-acétylé A-LPS produit par *Y. pestis* n'est que faiblement reconnu par le TLR4 (Montminy et al., 2006). Il reste à déterminer si NLRP12 détecte le pathogène directement ou par une dérégulation de l'homéostasie de l'hôte.

e) L'inflammasome NLRP3

Le récepteur NLRP3 peut être activé par une très grande variété d'agonistes, comme des composants issus d'infections, de dommages tissulaires ou de désordres métaboliques. L'activation de l'inflammasome NLRP3, qui permet l'assemblage de récepteurs NLRP3 et des protéines adaptatrices ASC et effectrices caspase-1, nécessite deux signaux :

(a) une induction de la transcription, dépendante de la voie NF-κB, qui requiert la fixation de ligands de TLR ou de NLR ou des cytokines inflammatoires

(b) un activateur qui permet l'oligomérisation des récepteurs NLRP3.

Contrairement à NLRP1b, NLRC4 et aux NAIP, l'inflammasome NLRP3 n'est pas, ou peu, exprimé de façon constitutive dans la plupart des cellules résidentes comme les macrophages et les cellules dendritiques. Un premier signal fourni par les activateurs de la voie NF-κB, comme l'activation du TLR4 par le LPS est nécessaire mais pas suffisant pour l'activation de NLRP3 (Bauernfeind et al., 2009). Le NF-κB permet la synthèse et l'accumulation de pro-IL-1β, de pro-IL-18 et de NLRP3. Un deuxième signal, comme l'amiante (Dostert et al., 2008), la silice (Dostert et al., 2008), les adjuvants

d'aluminium (« Alum ») (Eisenbarth et al., 2008), l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) via la signalisation par le récepteur purinergique P2X7 (Mariathasan et al., 2006), des infections virales (Ichinohe et al., 2009), des produits de champignons (Gross et al., 2009), des ARN ou ADN bactériens (Kanneganti et al., 2006; Muruve et al., 2008), des toxines bactériennes (Mariathasan et al., 2006), … permet l'oligomérisation de l'inflammasome NLRP3. Lorsqu'il est activé, le récepteur NLRP3 recrute la protéine adaptatrice ASC qui recrute à son tour la caspase-1. La caspase-1 active peut induire une mort cellulaire ou maturer les cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18 (voir figure 7). Des molécules endogènes en excès constituent aussi des signaux de danger et peuvent déclencher une inflammation dite stérile car il y a absence de pathogènes. L'inflammasome NLRP3 est ainsi impliqué dans la pathogénèse de maladies inflammatoires stériles comme la goutte, l'athérosclérose, les diabètes de type 2 et la maladie d'Alzheimer. Ces maladies sont causées respectivement par des cristaux d'acide urique (MSU) dans les articulations (Martinon et al., 2006), du cholestérol (Duewell et al., 2010), des agrégats d'IAPP (Islet Amyloid PolyPeptide ou amyline) dans le pancréas (Masters et al., 2010) et des agrégats de fibres de peptides d'amyloïde-β dans le cerveau (Halle et al., 2008). L'acide urique est le produit final du catabolisme des bases puriques chez les mammifères. Lorsque des cellules sont endommagées, l'ADN et les ARN contenus sont dégradés puis finalement libérés. Les bases puriques (adénine et guanine) libérées dans le milieu extracellulaire sont converties en xanthine puis en acide urique par la xanthine oxydase. La synthèse d'acide urique peut être supprimée par l'allopurinol qui inhibe la xanthine oxydase.

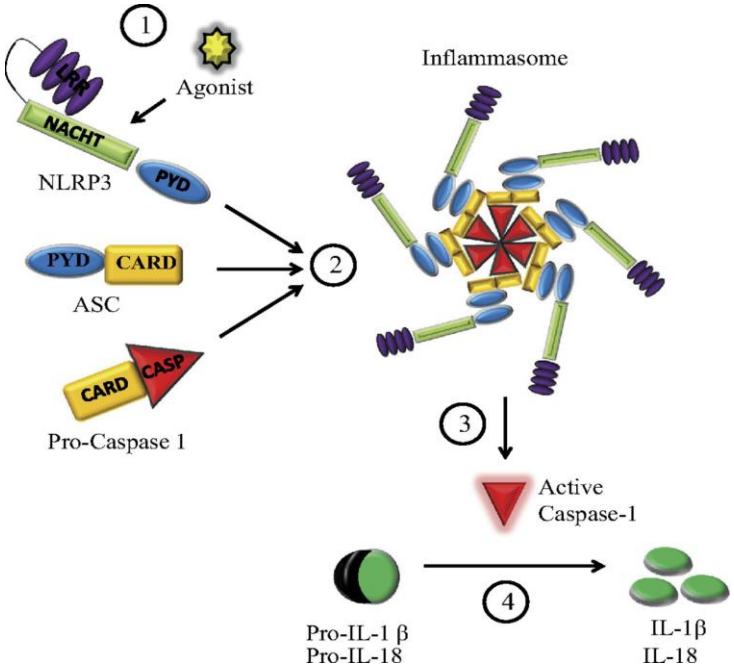


Figure 7 : Assemblage de l'inflammasome NLRP3 (Santos et al., 2012)

(1) La fixation d'un activateur sur la région LRR du récepteur NLRP3 induit un changement conformationnel de celui-ci. (2) Les récepteurs NLRP3 s'oligomérisent et recrutent des protéines adaptatrices ASC via leurs domaines PYD. Par leurs domaines CARD les protéines ASC recrutent des protéines effectrices pro-caspase-1. (3) Les pro-caspase-1 s'autoclivent ce qui les maturent. (4) Elles peuvent ensuite cliver les pro-IL-1β et pro-IL-18 en des molécules actives hautement inflammatoires.

Les activateurs et les mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 sont détaillés dans la partie Les mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3, p34.

4. Les caspases, les inflammasomes et « la » mort cellulaire

Les inflammasomes ont été beaucoup étudiés pour ce qui est de la résolution d'infections via l'activation de la caspase-1 et la maturation des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18. Cependant, leur rôle dans l'induction de la mort cellulaire pour lutter contre les infections est nettement moins connu. Pourtant ce rôle est loin d'être négligeable, surtout qu'une étude récente chez le poisson suggère que l'implication des inflammasomes dans la mort cellulaire serait antérieure dans l'évolution à leur rôle dans la maturation des cytokines (Angosto et al., 2012).

Il existe plusieurs types de morts cellulaires, certaines étant « accidentelles », d'autres dites programmées. Suivant le cas, elles peuvent être inflammatoires ou non. Les cellules apoptotiques ont un effet immunosuppresseur tandis que les cellules nécrotiques augmentent l'inflammation, en particulier par la reconnaissance de marqueurs de nécrose via le récepteur à lectine de type C, DNGR-1, par les cellules dendritiques (Sancho et al., 2009).

Pendant un grand nombre d'années, la mort cellulaire programmée était qualifiée d'apoptose. L'apoptose, indispensable au développement ainsi qu'à l'homéostasie, est décrite comme non inflammatoire, avec une intégrité de la membrane plasmique maintenue lorsque la cellule est phagocytée. La nécrose, autre forme de mort cellulaire, était quant à elle souvent considérée comme une conséquence passive suite à des stress environnementaux ou des dommages cellulaires et qui ne nécessitait aucune voie de signalisation.

Les facteurs qui permettent de déterminer quelle voie de mort cellulaire est engagée sont variés. L'étape du cycle cellulaire, la nature et l'intensité du ou des stimuli et, pour les cellules immunitaires en particulier, l'étape d'activation cellulaire, interviennent dans le « choix » de la mort cellulaire (Danial and Korsmeyer, 2004; Green, 2005; Strasser, 2005).

a) L'apoptose

Lors de cette mort cellulaire non inflammatoire, l'intégrité de la membrane plasmique est maintenue tardivement. Les protéines du cytosquelette sont clivées par des protéases ce qui permet d'accélérer la dégradation des composants de la cellule. La chromatine est condensée, le noyau fragmenté et la membrane forme des « cloques ». L'activation de l'apoptose par les caspases passe par deux voies différentes :

- les récepteurs de la mort : des membres de la famille du TNF (FAS, TNF ou TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)) se fixent sur des récepteurs dits de « mort cellulaire » sur la surface des membranes (Salmena et al., 2003). Cette liaison entraîne la formation d'un complexe multi-protéique, l'apoptosome, qui agrégé, active la caspase-8
- la voie mitochondriale : l'augmentation des ROS, de l'ADN oxydé et des protéines mal formées accroît la perméabilité mitochondriale. Cela a pour conséquence la libération dans le cytosol de protéines pro-apoptotiques (par exemple, le cytochrome c) et de protéines (comme SMAC et DIABLO) qui empêchent l'action des inhibiteurs cytosoliques sur les protéines pro-apoptotiques (Li et al., 1997). Cette voie est régulée par la balance des protéines pro- et anti- apoptotiques de la famille Bcl-2 et par la caspase-9.

Les caspases- 8 et 9 ainsi activées mobilisent à leur tour d'autres caspases comme les caspases- 3, 6 et 7, ce qui est à l'origine de l'activation d'un grand nombre de protéines, dont des DNases, qui vont dégrader la cellule (Strasser, 2005) (voir figure 8). Une comparaison peut être établie entre la caspase-1 qui active l'inflammasome et la caspase-9 qui active l'apoptosome.

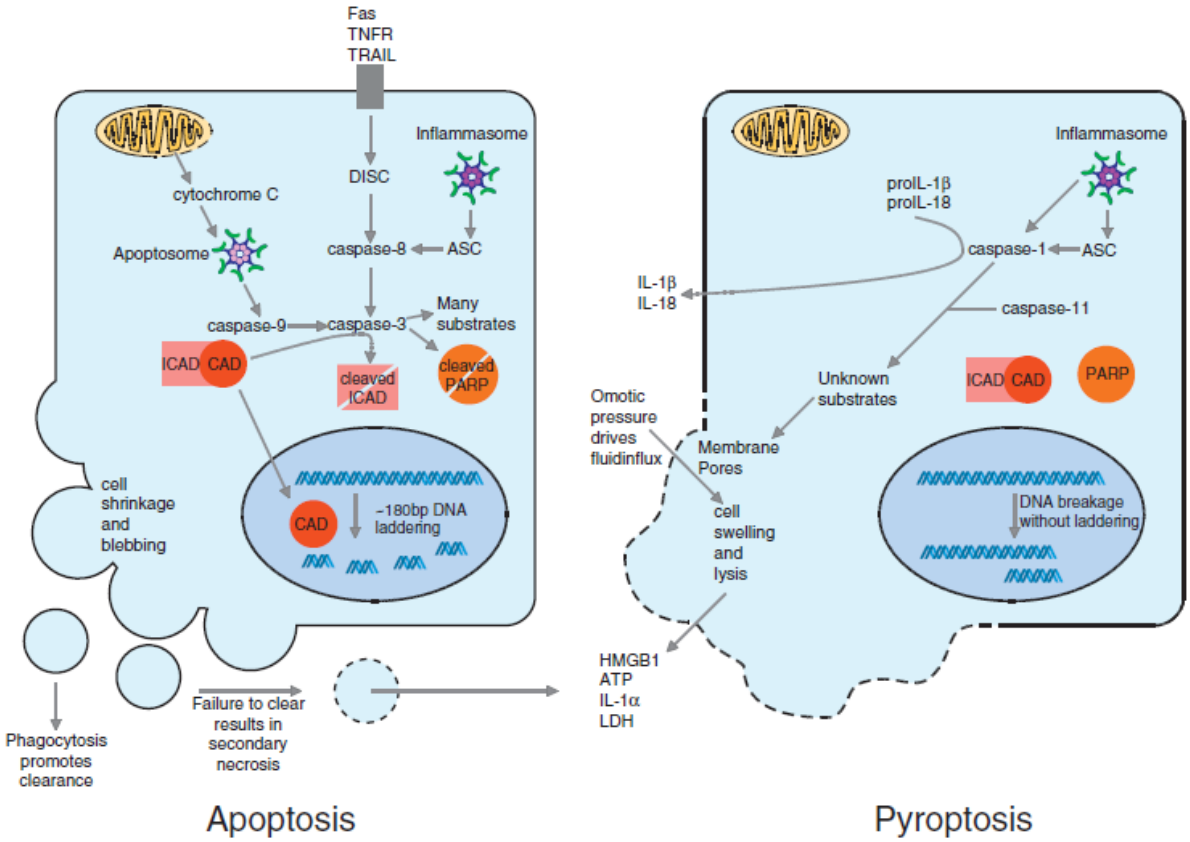


Figure 8 : Apoptose et pyroptose (Aachoui et al., 2013b)

Représentation schématique des morts cellulaires classiquement induites par les caspases. Une cellule en apoptose est caractérisée par une dégradation du contenu cytosolique et un bourgeonnement de la membrane plasmique. Elle est dite immunologiquement « silencieuse » car n'induit pas d'inflammation. A l'inverse, la pyroptose, avec une libération brutale de son contenu intracellulaire (dont certains composants deviennent des DAMP), est fortement inflammatoire. Une apoptose non résolue rapidement peut induire une nécrose, processus de mort cellulaire inflammatoire. L'engagement des caspases diffère suivant les voies : l'apoptose est caspases- 3 et 9 ou caspases- 3 et 8 dépendante alors que la pyroptose nécessite les caspases- 1 et 11.

b) La pyroptose

La pyroptose est une mort cellulaire qui nécessite l'activation d'un inflammasome pour le recrutement des caspases -1 ou -11 ce qui induit la maturation d'IL-1β et d'IL-18. La perte d'intégrité de la membrane résulte de la formation de pores membranaires qui nécessitent l'activation de la caspase-1 (Fink and Cookson, 2006). La perméabilité membranaire permet la libération dans le milieu extracellulaire de composants endogènes tels que l'ATP, le HMGB1 et l'IL-1α. En plus de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires, ces molécules vont participer à l'induction d'une inflammation. La pyroptose a été décrite pour les macrophages et les cellules dendritiques ce qui n'exclut pas qu'elle pourrait avoir lieu dans d'autres types cellulaires.

La pyroptose peut être dépendante des inflammasomes NLRP1 et NLRC4. L'auto-protéolyse de la caspase-1 a longtemps été considérée comme essentielle à son activation. En l'absence d'ASC, la caspase-1, non clivée et localisée de façon plus « diffuse » dans le cytoplasme, ne suffit pas à maturer les cytokines pro-inflammatoires (Mariathasan et al., 2004; Suzuki et al., 2007) mais peut néanmoins induire la pyroptose (Broz et al., 2010). ASC n'est donc nécessaire que pour l'auto-protéolyse de la caspase-1 et la maturation de l'IL-1β et de l'IL-18. L'induction de cette pyroptose caspase-1 dépendante et ASC-indépendante peut avoir lieu en réponse à l'activation des inflammasomes NLRP1 et NLRC4 mais, à priori, n'a pas lieu pour les inflammasomes NLRP3 et AIM2 dépourvus de domaine CARD. Pour NLRP3 et AIM2, ASC semble indispensable à la fois pour la pyroptose et la maturation des cytokines (Mariathasan et al., 2006; Roberts et al., 2009). L'élimination de pathogènes, comme *S. typhimurium* et *Legionella pneumophila* (Miao et al., 2010b), peut être complètement indépendante de l'IL-1β et de l'IL-18. L'hypothèse la plus simple est que la pyroptose permet d'éliminer les cellules que les pathogènes utilisent pour se multiplier (Zamboni et al., 2006) mais le recrutement de neutrophiles (aux propriétés antimicrobiennes performantes), indépendant de l'IL-1β et de l'IL-18, reste nécessaire pour l'élimination des pathogènes libérés dans le milieu extracellulaire (Broz et al., 2012). La pyroptose est également impliquée dans les réponses inflammatoires stériles comme dans le cas des lésions avancées de l'athérosclérose (Chang et al., 2013). Les lipoprotéines oxydées et les cristaux de cholestérol spécifiques de ces lésions avancées sont suggérés comme activateurs de l'inflammasome NLRP3 et de la caspase-1 et, par la suite, de la pyroptose de macrophages.

Suivant les stimuli, la pyroptose peut nécessiter l'activation de la caspase-11, mais le recrutement et l'activation de cette caspase restent méconnus. La caspase-11 murine induit la pyroptose, de façon indépendante de la caspase-1, mais elle peut aussi induire la maturation de l'IL-1β via l'inflammasome NLRP3. Nos connaissances actuelles ne nous permettent pas de savoir si les caspases humaines -4 ou -5 ont un fonctionnement cellulaire similaire à celui de la caspase-11 chez la souris.

Une hypothèse a été émise selon laquelle la caspase-11 serait recrutée par un inflammasome similaire à ceux recrutant la caspase-1 (les inflammasomes conventionnels), cet inflammasome hypothétique étant qualifié de « non conventionnel ».

Si trop de cellules de l'hôte entrent en pyroptose, les dégâts occasionnés à l'hôte peuvent être, soit une déplétion excessive d'une population cellulaire particulière, soit une trop forte libération de médiateurs pro-inflammatoires. De même, un excès dans le recrutement de neutrophiles via l'IL-1β peut se révéler préjudiciable à l'hôte. Lors d'une inflammation, les cytokines et la pyroptose pourraient former un équilibre dépendant de la quantité des pathogènes et / ou des signaux de danger.

c) L'autophagie

L'autophagie est le processus principal qui permet aux cellules de recycler leurs propres composants de macromolécules ou d'organelles non essentiels, redondants et endommagés (Kroemer and Jäättelä, 2005). C'est une réponse à un stress élevé mais encore insuffisant pour induire la mort, comme une privation en nutriments des cellules. L'autophagie peut moduler l'inflammation en éliminant des médiateurs immunologiques (Harris et al., 2011; Nakahira et al., 2010; Shi et al., 2012).

Suivant l'acheminement des composés à éliminer aux lysosomes, trois types majeurs d'autophagie ont été définis (Yorimitsu and Klionsky, 2005):

- macroautophagie : l'autophagosome, grâce à une double-membrane, enveloppe les composés et se fusionne aux autolysosomes
- microautophagie : le lysosome s'invagine pour « phagocyter » directement les composés
- autophagie médiée par les protéines chaperons : des protéines de choc thermique se fixent aux composés.

Cependant, dans le cas de stress extrêmes prolongés, la cellule franchit un « point de non-retour » et la macroautophagie provoque une mort cellulaire par autophagie. Cette mort se caractérise par l'absence d'une condensation de chromatine et la présence de nombreux autophagosomes. La mort par autophagie peut également jouer un rôle dans la suppression de tumeurs, l'élimination de microorganismes intracellulaires et la présentation d'antigènes (Kroemer and Jäättelä, 2005; Levine and Deretic, 2007).

d) La nécrose

La nécrose se caractérise par un gonflement de la cellule et de ses organelles ou par une rupture de la membrane cellulaire, accompagnés d'une brusque libération de composés intracellulaires dans le milieu. La nécrose est médiée par les ROS, les ions calcium (Ca^{2+}), la PARP (Poly-ADP-Ribose

Polymerase) et les protéases calpaïnes et cathepsines (Conus et al., 2008). La PARP est une enzyme de réparation de l'ADN qui peut épuiser les stocks d'ATP cellulaire lorsque trop de brins d'ADN sont endommagés. L'ATP étant nécessaire dans la mise en place de nombreux mécanismes de l'apoptose, une diminution drastique de la quantité d'ATP disponible induit un shift de l'apoptose vers la nécrose (Los et al., 2002). Par ailleurs, une augmentation forte de la concentration en calcium intracellulaire active des protéases inductrices de la nécrose.

La nécrose a originellement été pensée comme spécifiquement « accidentelle » mais des études montrent qu'elle peut également être programmée. Lors de la nécrose, des DAMP sont libérés dans le milieu extracellulaire. Ils entrent ensuite dans la circulation et peuvent activer des cellules immunes, comme c'est le cas pour le NAD^+ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) et le HMGB1 (Adriouch et al., 2012; Lotze and Tracey, 2005). Les premières cellules qui meurent, suite à un endommagement ou une infection, fonctionnent comme des sentinelles et permettent d'alerter le système immunitaire du danger et de la nécessité de défendre ou de réparer l'organisme. L'activation de l'inflammasome NLRP3 peut également aboutir à une nécrose programmée ce qui conduit à une inflammation médiée par les neutrophiles (Satoh et al., 2013).

Des interconnections entre les différentes morts cellulaires existent. Par exemple, si un signal, classiquement suffisant pour induire l'apoptose ou l'autophagie, persiste alors la nécrose peut être engagée.

5. Les médiateurs de l'Immunité innée

L'inflammation qui résulte des dommages tissulaires ou de l'intrusion de particules ou d'organismes étrangers est un processus dynamique faisant intervenir des médiateurs pro-inflammatoires. Ces médiateurs sont d'origine cellulaire ou dérivés de protéines plasmatiques. Ils sont actifs dans des granules de mastocytes, de basophiles ou de plaquettes, ils peuvent aussi être sous forme de précurseurs inactifs. Les médiateurs auxquels nous nous intéresserons sont les cytokines, les chimiokines et la cascade du complément.

a) Les cytokines

Les cytokines inflammatoires, comme le TNF-α, l'IL-1 et l'IL-6, sont produites par un grand nombre de cellules mais surtout par les macrophages et les mastocytes. Elles sont essentielles à la réponse inflammatoire par l'activation de leukocytes et l'induction de la phase aiguë de l'inflammation. Quasiment toutes les cellules sont capables de répondre à ces médiateurs inflammatoires mais la réponse est dépendante des types cellulaires et des tissus.

Pour notre étude, nous nous focaliserons sur les cytokines de la famille de l'IL-1, l'IL-1F, qui sont essentielles pour la défense de l'hôte et le contrôle de l'Immunité et de l'inflammation (Dinarello, 2009) (voir figure 9). Ces cytokines sont hautement régulées et toute dérégulation de leur expression ou de leur maturation peut avoir de graves répercussions pathologiques. L'IL-1 est impliquée dans des maladies pulmonaires inflammatoires et immunes comme l'asthme, l'hypertension pulmonaire, la fibrose pulmonaire et la formation de granulomes (Arend et al., 2008).

Table 1 | IL-1 family members.

Family name	Name	Receptor/coreceptor	Property	Synthesized as precursor	Processing required for activity
IL-1F1	IL-1α	IL-1RI/IL-1RacP	Proinflammatory	Yes	No
IL-1F2	IL-1β	IL-1RI/IL-1RacP	Proinflammatory	Yes	Yes
IL-1F3	IL-1Ra	IL-1RI	Antagonist for IL-1α,β	No	No
IL-1F4	IL-18	IL-18Rα/IL-18Rβ	Proinflammatory	Yes	Yes
IL-1F5	IL-36Ra	IL-1Rrp2	Antagonist for IL-36	Yes	Yes
IL-1F6	IL-36α	IL-1Rrp2/IL-1RAcP	Proinflammatory	Yes	Yes
IL-1F7	IL-37	IL-18Rα, IL18BP	Anti-inflammatory	Yes	Yes
IL-1F8	IL-36β	IL-1Rrp2/IL-1RAcP	Proinflammatory	Yes	Yes
IL1-F9	IL-36γ	IL-1Rrp2/IL-1RAcP	Proinflammatory	Yes	Yes
IL-1F10	IL-38	IL-1Rrp2	? Antagonist	Yes	? No
IL-1F11	IL-33	ST2/IL-1RAcP	Proinflammatory	Yes	No

Figure 9 : La famille de l'IL-1 (Carta et al., 2013)
Table récapitulative des différents membres de la famille de l'IL-1 avec l'ancienne et la nouvelle nomenclature, les récepteurs et corécepteurs impliqués. Il est également indiqué le rôle de la cytokine et si elle est synthétisée sous forme de précurseur qui doit être maturé ou non pour avoir une activité biologique.

Excepté l'IL-18 et l'IL-33, les gènes codants les IL-1F sont situés sur le chromosome 2 entre les loci de l'IL-1α et de l'IL-1Ra (IL-1 Receptor Antagonist) ce qui suggère que ces cytokines dérivent d'un même gène par duplication (chez l'Homme) (Nicklin et al., 2002). Les IL-1F possèdent des caractéristiques qui les différencient des autres cytokines : elles sont synthétisées sous forme de précurseurs et, l'IL-1Ra exceptée, elles sont dépourvues de peptide signal leur permettant de sortir de la cellule (Dinarello, 2009). Pour l'IL-1β, l'IL-18 (Dinarello, 1998a) et l'IL-37 (Boraschi et al., 2011), une maturation protéolytique est indispensable à leur activation. Ces cytokines sont maturées principalement par la caspase-1. Dans le cas de l'IL-1α (Dinarello, 1998b) et l'IL-33 (Moussion et al., 2008), le précurseur est actif.

(1) IL-1β (IL-1F2) et IL-18 (IL-1F4)

L'IL-1β et l'IL-18 partagent une structure tridimensionnelle relativement similaire (un repliement en feuillet β) (Kato et al., 2003). La transcription de la pro-IL-1β est induite par le facteur de transcription nucléaire NF-κB en réponse à des agonistes de TLR et à des cytokines endogènes, tandis que la pro-IL-18 est constitutivement exprimée par les monocytes sanguins, les macrophages tissulaires, les cellules épithéliales et les kératinocytes. Ces deux cytokines pro-inflammatoires sont contrôlées au moment de leur transcription mais également lors de leur maturation et de leur libération dans le milieu extracellulaire (Dinarello, 2009). Produites sous forme de précurseurs inactifs, sans peptide

signal, elles sont principalement maturées par la caspase-1 (Black et al., 1988; Ghayur et al., 1997). La maturation par la caspase-1 conduit au recrutement et à l'activation de cellules immunitaires comme les neutrophiles sur les sites d'infections et / ou de dommages tissulaires.

L'IL-18 est le principal inducteur d'IFN-γ et joue un rôle essentiel dans la réponse Th1 et l'activation de cellules NK (Akira, 2000). L'IL-18 se lie à son récepteur IL-18Rα avec une faible affinité et ce complexe est stabilisé par le recrutement de la protéine accessoire IL-18Rβ, nécessaire à l'activation cellulaire. De la même façon, la fixation de l'IL-1β sur l'IL-1R1 induit le recrutement de l'IL-1RAcP (IL-1 Receptor Accessory Protein) pour former un récepteur de haute affinité (Meng et al., 2007; Torigoe et al., 1997). Un grand nombre de poxvirus peuvent produire un homologue de l'IL-18BP (IL-18-Binding Protein) qui est une protéine soluble avec une haute affinité pour l'IL-18 et agit donc comme un inhibiteur.

La liaison de l'IL-18 avec l'IL-18R induit une cascade de signalisation qui implique la kinase IRAK (IL-1 Receptor Activating Kinase), le TRAF6 et le facteur de transcription NF-κB (Kojima et al., 1998).

(2) IL-1α (IL-1F1)

L'IL-1α partage avec l'IL-1β le même récepteur IL-1R1. Il a été proposé que l'IL-1α puisse réguler la migration, la prolifération, la sénescence et la différenciation cellulaires via des mécanismes intracrines et des voies de signalisation indépendantes de l'IL-1R1 (Werman et al., 2004). La translocation dans le noyau du précurseur de l'IL-1α est possible grâce à sa séquence NLS (Nuclear Localization Sequence) située dans sa partie N-terminale (Wessendorf et al., 1993). Cette translocation est essentielle pour les fonctions intracellulaires de l'IL-1α (McMahon et al., 1997). Le précurseur de l'IL-1α a également un rôle essentiel comme activateur pro-inflammatoire de la transcription (Werman et al., 2004). Ainsi, l'IL-1α est une protéine qui possède une fonction double, celle de facteur nucléaire et celle de cytokine pro-inflammatoire.

(3) IL-1Ra (IL-1F3)

L'IL-1Ra (IL-1 Receptor antagonist) est un agoniste naturel du récepteur à l'IL-1, il a donc un effet antagoniste de l'IL-1α et de l'IL-1β. Il se lie à la chaine IL-1R1 ce qui empêche le recrutement de la chaine IL-1RAcP, lui permettant d'agir comme un inhibiteur de l'inflammation dépendante de l'IL-1 (Dinarello, 1998b, 2004). L'inflammation et la fibrose pulmonaires induites par la bléomycine chez les souris nécessitent l'IL-1R1, la signalisation via la molécule MyD88 et la protéine adaptatrice ASC (Gasse et al., 2007). Ce modèle se caractérise par un excès de production d'IL-1β via l'inflammasome NLRP3 et est amélioré par un traitement avec l'IL-1Ra (Gasse et al., 2007). La forme recombinante de l'IL-1Ra, l'Anakinra (Kineret®), est d'ailleurs utilisée dans des traitements anti-inflammatoires comme celui de la goutte chez l'Homme.

(4) IL-33 (IL-F11)

L'IL-33, déjà connue pour son rôle de facteur nucléaire (Schmitz et al., 2005), est impliquée dans la défense de l'hôte ainsi que dans un grand nombre de pathologies dont l'asthme (Gudbjartsson et al., 2009). L'IL-33 est le ligand du récepteur ST2 (appelé aussi T1 ou IL-33Rα) (Schmitz et al., 2005). Deux variants du gène IL-33Rα sont produits par épissage alternatif : la forme transmembranaire ST2L et une forme soluble sST2 qui constitue un récepteur « decoy ». Le récepteur IL-33Rα est composé de deux chaines, le ST2L et l'IL-1RAcP commune avec l'IL-1R1 (Torigoe et al., 1997). L'IL-33 se lie au ST2L et recrute la chaine IL-1RAcP ce qui délivre un signal d'activation permettant la libération de cytokines (Ali et al., 2007; Schmitz et al., 2005) (voir figure 10). Une étude a aussi montré que la signalisation IL-33/ST2 peut être inhibée grâce à un autre récepteur de la famille de l'IL-1R1, SIGIRR (Single Ig IL-1R-Related molecule), également appelé TIR8 (Toll IL-1R8), qui peut former un complexe SIGIRR/ST2 (Bulek et al., 2009), mais ces données n'ont pas été confirmées.

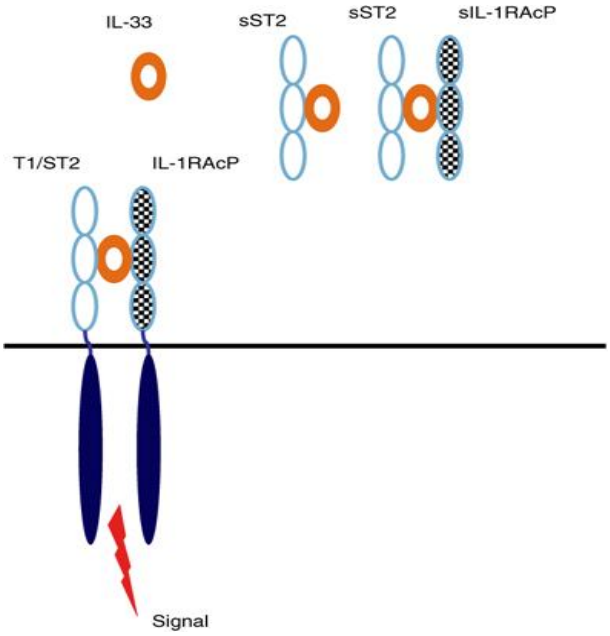


Figure 10 : Les ligands et récepteurs de l'IL-33 (Arend et al., 2008)
L'IL-33 se lie au récepteur T1/ST2 ce qui permet le recrutement de l'IL-1RAcP comme co-récepteur. La forme soluble du ST2 (sST2) est un inhibiteur de l'IL-33 et l'IL-1RAcP soluble peut augmenter cette fonction inhibitrice de sST2. NB : la signalisation via SIGGIR n'est pas incluse.

Le récepteur IL-33Rα est exprimé à la surface d'un grand nombre de cellules de l'Immunité : mastocytes, basophiles, éosinophiles, lymphocytes Th2, iNKT (NKT invariants), NK, macrophages, cellules dendritiques et neutrophiles (Oboki et al., 2010a; Smith, 2010). La fixation de l'IL-33 sur des cellules de type Th2 induit la sécrétion des cytokines Th2 IL-5, IL-6 et IL-13 via l'activation du NF-κB et des MAPK (Schmitz et al., 2005). En particulier, l'IL-33 induit la forte sécrétion de ces cytokines chez un type cellulaire découvert depuis peu, les ILC (Innate Lymphoid Cells) de type 2 retrouvées chez l'Homme (Monticelli, Laurel A. et al., 2011) comme chez la souris (Moro et al., 2009; Price et al., 2010). Les ILC interviennent pour l'Immunité innée ainsi que pour le développement et le remodelage tissulaires (Spits et al., 2013). Les ILC2 ont un rôle important dans les réponses de

l'Immunité innée, par exemple lors de l'infection par *Nippostrongylus brasiliensis* (Price et al., 2010) ou par le virus de l'influenza (Monticelli, Laurel A. et al., 2011).

Contrairement à l'IL-1β et l'IL-18, la forme « Full-Length » (FL) de l'IL-33 est biologiquement active, alors que son clivage par la caspase-1 l'inactive (Cayrol and Girard, 2009). De plus, cette forme FL peut être libérée dans l'espace extracellulaire par les cellules endothéliales endommagées et donc l'IL-33 joue aussi le rôle d'alarmine (Cayrol and Girard, 2009). L'activité de l'IL-33 serait régulée lors de l'inflammation par des protéases sécrétées par les neutrophiles recrutés dans les tissus, en particulier l'élastase et la cathepsine G. Les formes clivées de l'IL-33 sont encore plus actives que la FL (Lefrançais et al., 2012) (voir figure 11). Il a aussi été montré que l'exposition des voies respiratoires à des allergènes, comme le champignon *Alternaria alternata*, induit une libération d'ATP extracellulaire (ATPe) comme signal de danger. Cette ATP permettrait d'augmenter la concentration de calcium intracellulaire et de libérer de l'IL-33 FL via l'activation de récepteurs purinergiques de type P2 (Kouzaki et al., 2011).

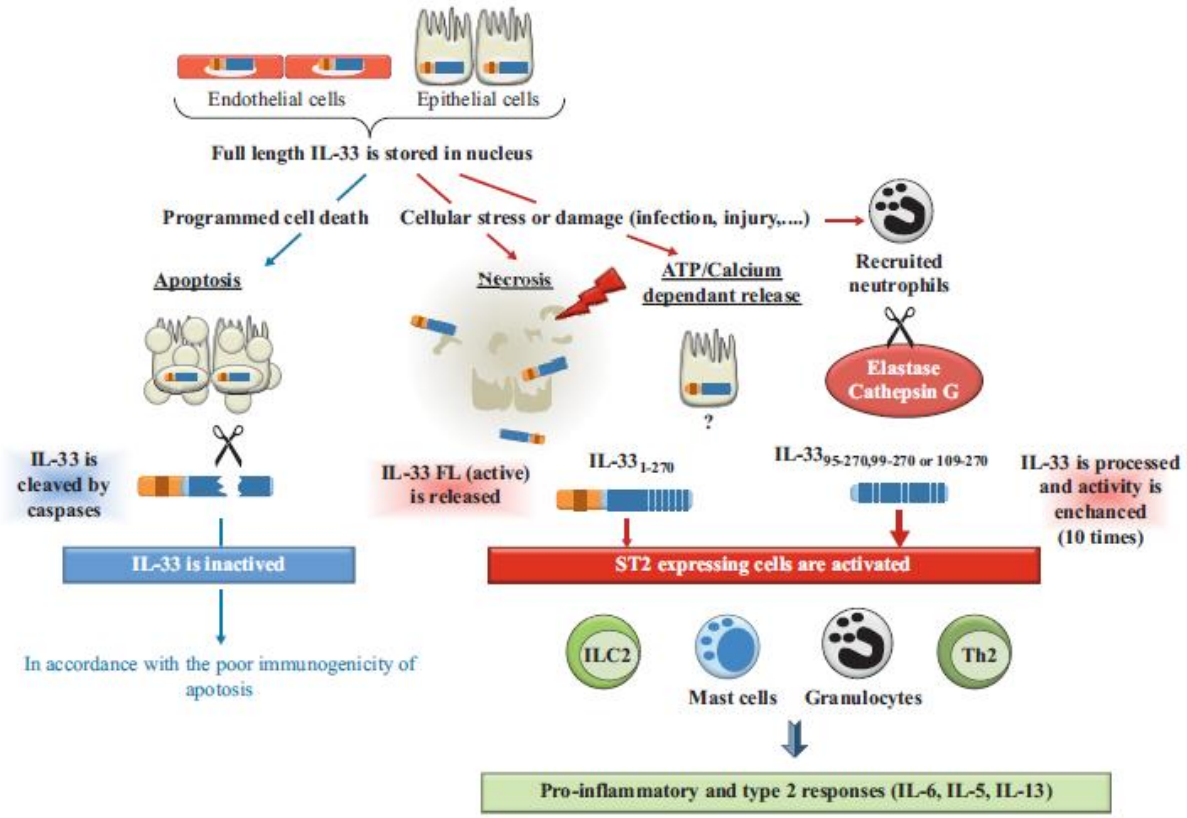


Figure 11 : Les différents modes de sécrétion et de maturation de l'IL-33 (Lefrançais and Cayrol, 2012)
L'IL-33, en tant que facteur nucléaire, est stockée dans le noyau de cellules endothéliales ou épithéliales. Il a été suggéré que lors de l'apoptose, l'IL-33 est clivée par la caspase-1 ce qui l'inactive. Lors de la nécrose, l'IL-33 « Full-Length » (FL) est libérée comme alarmine dans le milieu et active des cellules qui expriment le récepteur à l'IL-33, le ST2. Ces cellules sont en particulier les ILC2, les mastocytes, les granulocytes et les lymphocytes Th2. Leur activation induit une réponse pro-inflammatoire et de type Th2 avec la sécrétion de cytokines comme l'IL-5, l'IL-6 et l'IL-13. Si l'inflammation s'accompagne du recrutement de neutrophiles, ces derniers pourraient cliver l'IL-33 par des élastases ou des cathepsines G en des formes clivées encore plus actives que la FL. Il pourrait également être possible que l'IL-33 soit libérée dans le milieu extracellulaire sans qu'il y ait eu endommagement cellulaire ou nécrose. Cette sécrétion serait dépendante de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire régulée par l'ATP et la signalisation purinergique.

(5) IL-36

La sous-famille de l'IL-36 inclut les IL-36 α, β et γ et l'IL-36Ra (antagoniste), auxquelles on pourrait rajouter l'IL-38 qui se fixe aussi sur l'IL-36R (autrefois IL-1Rpr2). Ces cytokines découvertes récemment ont d'importants rôles dans l'Immunité innée et adaptative. Produites par divers types cellulaires, elles sont également reliées à la physiopathologie de plusieurs maladies. Les IL-36 α, β et γ sont surtout exprimées par les kératinocytes, l'épithélium des bronches, le tissu cérébral, les monocytes et les macrophages. Les IL-36 α et β joueraient un rôle important dans l'homéostasie de la peau (Franzke et al., 2012; Yang et al., 2010). L'expression des cytokines IL-36 est induite dans les cellules épithéliales bronchiales par de sévères stimuli pro-inflammatoires (Chustz et al., 2011). Dans la même étude, il a aussi été suggéré que l'activation de fibroblastes et l'induction de l'IL-36γ pourraient amplifier l'inflammation neutrophilique. Une autre étude a également montré le rôle de l'IL-36α comme cytokine pro-inflammatoire dans l'inflammation pulmonaire (Ramadas et al., 2012). A l'inverse, l'IL-36Ra pourrait recruter le récepteur anti-inflammatoire SIGIRR et donc activer une voie de signalisation non-inflammatoire (Costelloe et al., 2008).

(6) IL-37 (IL-1F7)

L'IL-37 est également un autre membre de la famille de l'IL-1 découvert récemment. Contrairement aux autres cytokines que nous venons de voir elle est spécifique à l'Homme et aucun homologue murin n'a encore été identifié. L'IL-37 possède cinq isoformes, a, b, c, d et e, la forme majoritaire et la mieux étudiée est l'IL-37b. D'après les séquences d'ARN messagers (ARN_m) , un site de clivage par la caspase-1 a été prédit (mais non confirmé), même s'il reste possible que l'IL-37b soit clivée par d'autres protéinases (Kumar et al., 2002). L'IL-37b peut se lier à l'IL-18Rα (Kumar et al., 2002) et à l'IL-18BP (Bufler et al., 2002). Les effets de ces liaisons restent inconnus.

Les cytokines IL-37 sont produites sous forme de précurseurs qui sont clivés lors de stimuli inflammatoires. Dans le cas de l'IL-37b, la forme mature peut être transloquée dans le noyau (Sharma et al., 2008). Les effets de l'IL-37 sont principalement anti-inflammatoires et pourraient nécessiter la protéine Smad3 (Nold et al., 2010).

b) Les chimiokines

Les chimiokines sont de petites protéines solubles principalement connues pour leurs fonctions de contrôle d'adhésion cellulaire, de chimiotactisme (recrutement d'un type cellulaire particulier en suivant un gradient de molécules) et d'activation de leukocytes. Elles ont également d'autres rôles dans l'angiogénèse, l'hématopoïèse, le développement des cellules B et T, la maturation des DC, l'inflammation, l'infection,… Les chimiokines sont divisées en quatre sous-familles suivant leurs résidus conservés dans le domaine N-terminal : CXC, CC, CX3C et C. Leur signalisation passe par des récepteurs couplés à des protéines G (GPCR). La liaison d'une chimiokine à son récepteur sur une

cellule induit une cascade de signalisation pour aboutir à la transcription de gènes impliqués dans le réarrangement du cytosquelette et à la chimiotaxie (déplacement d'un type cellulaire). Le schéma de migration des populations de cellules, surtout des leukocytes, est étroitement corrélé à l'expression des récepteurs de chimiokines. Les chimiokines sont relativement redondantes : certains récepteurs ont plusieurs chimiokines comme ligands et quelques chimiokines peuvent se lier à plusieurs récepteurs. Les chimiokines sont classées comme régulatrices de l'homéostasie ou comme inflammatoires. Les chimiokines homéostatiques sont constitutivement exprimées et régulent la migration des leukocytes et de leurs précurseurs. Les chimiokines inflammatoires sont inductibles et modulent la migration des leukocytes dans les tissus en réponse à des stimuli inflammatoires. Ces chimiokines inflammatoires peuvent agir sur des cellules de l'Immunité innée comme celles de l'Immunité adaptative.

c) Les enzymes protéolytiques

Les enzymes protéolytiques comme l'élastine, les cathepsines et les métalloprotéinases jouent un rôle important dans l'inflammation. En dégradant la matrice extracellulaire ou des protéines, elles peuvent intervenir dans la défense de l'hôte, le remodelage tissulaire et la migration de leukocytes. Une enzyme protéolytique particulièrement intéressante est la cathepsine B. En effet, la cathepsine B est bien connue comme protéase des lysosomes. La phagocytose de particules pourrait induire une rupture des lysosomes suivie d'une activation cytosolique de la cathepsine B induisant l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Tschopp and Schroder, 2010). Cette protéase peut aussi être sécrétée dans des vésicules pour produire des peptides biologiquement actifs. Sous cette forme, elle joue un rôle dans la maladie d'Alzheimer où elle participe à la production des peptides nocifs d'amyloïde-β (Hook et al., 2012).

d) La cascade du complément

En plus de tous les senseurs de type récepteurs cellulaires, des protéines solubles peuvent aussi être activées par des micro-organismes afin de stimuler et / ou d'amplifier l'inflammation. Il s'agit principalement de la cascade du complément (Köhl, 2006). Il existe neuf protéines du complément (de C-1 à C-9) généralement inactives et présentes dans le plasma. Si C3 se lie à un pathogène, il est stabilisé dans une forme active (Volanakis, 1990). De la même façon, les anticorps ou les MBL qui se fixent aux pathogènes peuvent activer l'enzyme C3 convertase (Gadjeva et al., 2004). Chaque composant du complément activé clive le suivant de la cascade en une forme active (voir figure 12). Les parties clivées peuvent se fixer sur le micro-organisme soit pour favoriser l'internalisation du pathogène par des phagocytes (opsonisation) (Ehlers, 2000), soit pour former un pore dans la membrane permettant l'élimination du microbe par une lyse osmotique (Esser, 1991). De plus, certains composés clivés, comme C5a, ne se fixent pas au pathogène mais restent solubles

et constituent des médiateurs proinflammatoires (Gerard and Gerard, 1994). Une étude a également montré le rôle du fragment clivé C3a dans la régulation de l'inflammasome NLRP3 des monocytes humains (Asgari et al., 2013). C3a augmenterait la production de l'IL-1β via l'augmentation de l'efflux d'ATP et par conséquent l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Asgari et al., 2013).

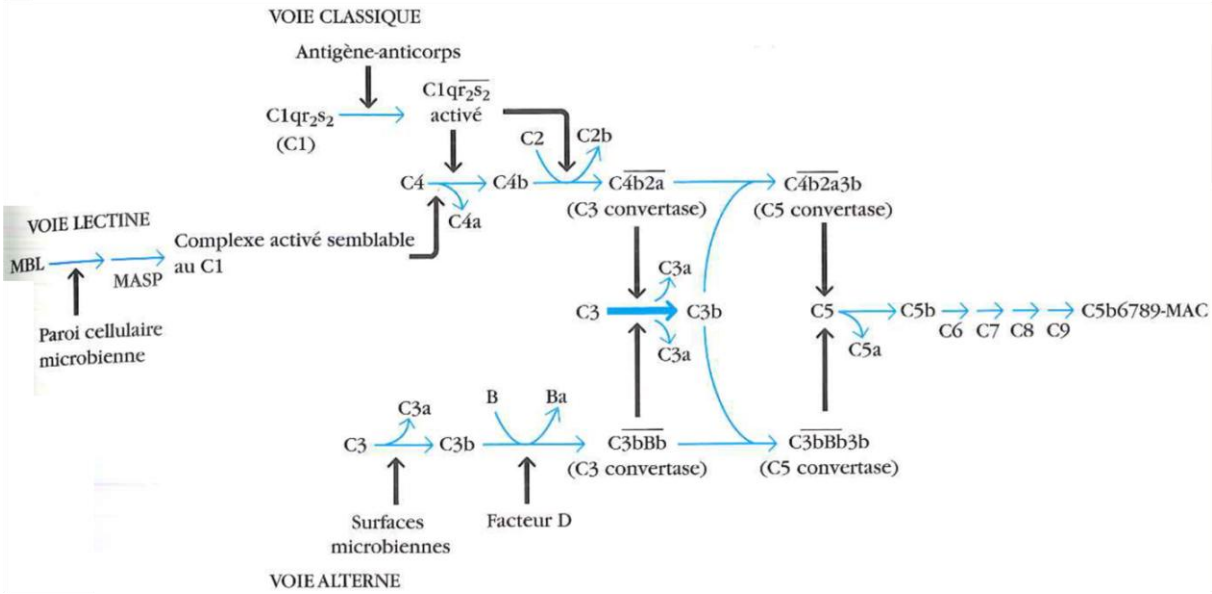


Figure 12 : Les trois voies d'activation du complément (Kindt et al., 2008)
La voie classique est initiée par la liaison du composant C1 aux complexes antigènes-anticorps. La voie alterne est initiée par une liaison spontanée de C3b à des antigènes de surface étrangers comme des parois bactériennes. La voie lectine est initiée par la liaison de la protéine sérique MBL à la surface d'un pathogène. Ces trois voies génèrent les C3 et C5 convertases et le C5b lié, qui est converti en complexe d'attaque membranaire (CAM) par une séquence de réactions terminales communes.

B. L'Immunité adaptative

L'Immunité adaptative est beaucoup plus récente que l'Immunité innée dans l'évolution, où elle est ainsi exclusive aux vertébrés. Lorsqu'une infection ne peut être enrayée par l'Immunité innée, l'activation de l'Immunité adaptative devient nécessaire. Elle est mise en place en trois à cinq jours, ce qui est le temps nécessaire pour générer l'expansion clonale et la différentiation des lymphocytes effecteurs spécifiques. Les récepteurs de l'Immunité adaptative sont codés par des segments de gènes qui peuvent être réarrangés ce qui leur confère une très grande variabilité. Les gènes d'activation des recombinases sont de courtes séquences d'ADN opposées, sans exons, ce qui suggère comme origine des rétrotransposons (Thompson, 1995). Ce type d'Immunité permet la reconnaissance spécifique d'antigènes étrangers et la mise en place d'une « mémoire » immunologique contre des pathogènes déjà rencontrés. Elle est spécifique à l'individu, à l'exception faite du transfert d'anticorps de la mère au fœtus via le placenta. En contrepartie, l'Immunité adaptative peut être dérégulée et être responsable d'allergies ou de maladies auto-immunes.

Les lymphocytes B et T sont produits dans la moelle osseuse. Les cellules B maturent dans la moelle tandis que les précurseurs des cellules T doivent migrer dans le thymus. Les lymphocytes matures naïfs circulent ensuite dans la lymphe et le sang. Une réponse immune adaptative démarre si un lymphocyte rencontre son antigène spécifique dans les organes lymphoïdes secondaires (Murphy et al., 2008)

Les lymphocytes T sont activés lorsque leurs TCR (T Cell Receptors) reconnaissent des fragments antigéniques présentés par des molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) (CMH-I pour les $CD8^+$ et CMH-II pour les $CD4^+$), portés par les CPA. Ces épitopes de l'antigène sont exposés à la surface des CPA qui phagocytent des virus ou des bactéries ou qui sont infectés. Les signaux de co-stimulation font suite aux signaux de stimulation et permettent une modulation fine de l'interaction CMH/TCR. Avec l'environnement cytokinique spécifique mis en place grâce à l'Immunité innée, ces signaux sont indispensables à l'activation complète des lymphocytes B (plasmocytes et cellules mémoires) et T (lymphocytes T cytotoxiques, $CD8^+$ et lymphocytes T auxiliaires ou helper, $CD4^+$). Les récepteurs de co-stimulation permettent l'activation ou l'amplification des cellules, la régulation de la survie cellulaire et la détermination des fonctions des cellules effectrices. Au contraire, les récepteurs de co-inhibition peuvent prévenir, diminuer ou inhiber les processus d'activation et de différenciation. Les molécules de co-stimulation et de co-inhibition appartiennent pour la plupart à la superfamille des Ig (Immunoglobulines). Les CPA, et tout particulièrement les DC, expriment des molécules de co-stimulation comme CD80 et CD86 à leur surface (Magombedze et al., 2013). L'expression des gènes de CD80 et CD86 est régulée par le facteur de transcription NF-κB induit par l'activation des PRR.

Les cellules CD4+ ont un rôle essentiel dans l'Immunité adaptative. Suite à la présentation d'antigènes et suivant l'environnement cytokinique mis en place par les cellules de l'Immunité innée, les $CD4^+$ naïves se différencient en cellules effectrices Th1, Th2 ou Th17 (voir figure 13). La sécrétion de cytokines et l'expression de molécules de co-stimulation par les $CD4^+$ sont nécessaires pour la génération d'anticorps spécifiques et à la formation des cellules B mémoire (Magombedze et al., 2013). Les cytokines sécrétées sont également responsables du recrutement de neutrophiles et de monocytes sur les sites d'inflammation. Les $CD4^+$ peuvent aussi avoir un effet immunosuppresseur via l'action des T_{reg} (thymus-derived regulatory T cells) ou via la production d'IL-10 (Magombedze et al., 2013). Les cellules T naïves $CD4^+$ se différencient principalement en trois types d'effecteurs classés suivant les cytokines produites et le facteur de transcription exprimé :

- Si les CPA sécrètent de l'IL-12, les $CD4^+$ naïves se différencient en Th1 qui expriment T-bet et produisent de l'IFN-γ et du TNF-α. Elles sont impliquées dans la défense de l'hôte contre des pathogènes intracellulaires.

- Si les CPA secrètent de l'IL-4, les $CD4^+$ naïves se différencient en Th2 qui expriment GATA-3 et produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13. Elles sont impliquées dans la défense de l'hôte contre des pathogènes extracellulaires.
- Si les CPA secrètent de l'IL-6 et du TGF-β, les $CD4^+$ naïves se différencient en Th17 qui expriment ROR-γt et produisent de l'IL-17 et de l'IL-22. Elles sont impliquées dans le contrôle des bactéries et des infections fongiques (Cooke, 2006; Magombedze et al., 2013) (voir figure 13).

Il existe au moins deux autres populations de $CD4^+$ effectrices : les T_{reg} et les T_{fh} (T follicular helper cells) (Magombedze et al., 2013). Les T_{reg} expriment FoxP3 et modèrent l'inflammation par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme le TGF-β et l'IL-10. Les T_{fh} expriment Bcl-6 et sont essentielles pour la production des IgG.

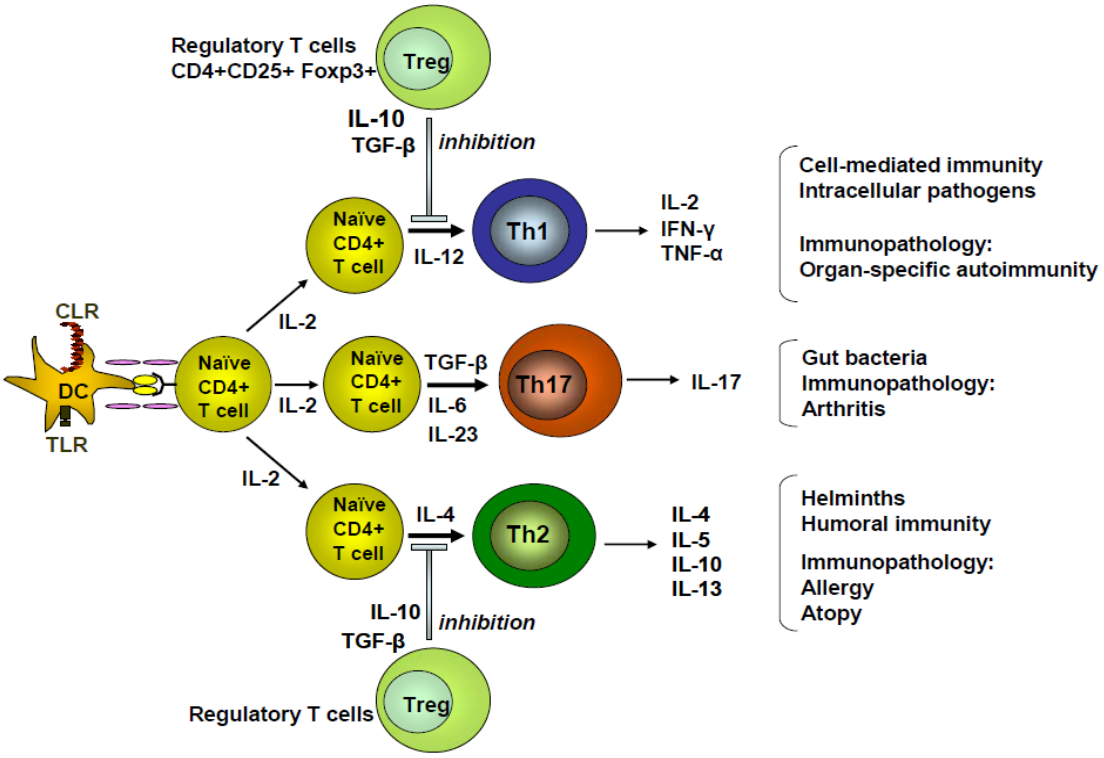


Figure 13 : Développement et fonctions des cellules T hleper (Cooke, 2006)

Les cellules T $CD4^+$ effectrices semblent pouvoir passer d'un phénotype à un autre, à la condition qu'elles ne soient pas trop avancées dans leur maturation (Magombedze et al., 2013). Cette plasticité de phénotype pourrait leur permettre de mieux s'adapter à l'évolution de leur environnement inflammatoire.

Une fois activés par un antigène, les lymphocytes T $CD4^+$ libèrent des médiateurs, comme l'IL-2, qui peuvent activer les lymphocytes B et les lymphocytes T $CD8^+$. Les $CD8^+$ activés libèrent par exocytose des enzymes comme les perforines qui forment des pores dans la membrane des bactéries ou des cellules de l'hôte infectées, permettant de les lyser. Les lymphocytes T agissent donc par cytotoxicité

directe ou indirecte. A l'inverse des lymphocytes T, les lymphocytes B peuvent s'activer par reconnaissance directe d'antigènes via leurs BCR (B-Cell Receptors) sur leur membrane. Une fois activés, ils prolifèrent et se différencient en plasmocytes qui sécrètent spécifiquement des anticorps (IgM) à haute affinité dirigés contre l'antigène reconnu.

L'immunité médiée par les anticorps (dont les IgM et IgD) est appelée réponse humorale. Ils participent à la défense de l'hôte en neutralisant ou en recouvrant (opsonisation) les éléments étrangers ou en activant la voie du complément (voir figure 14). Ils amènent ainsi les phagocytes à éliminer ces éléments étrangers.

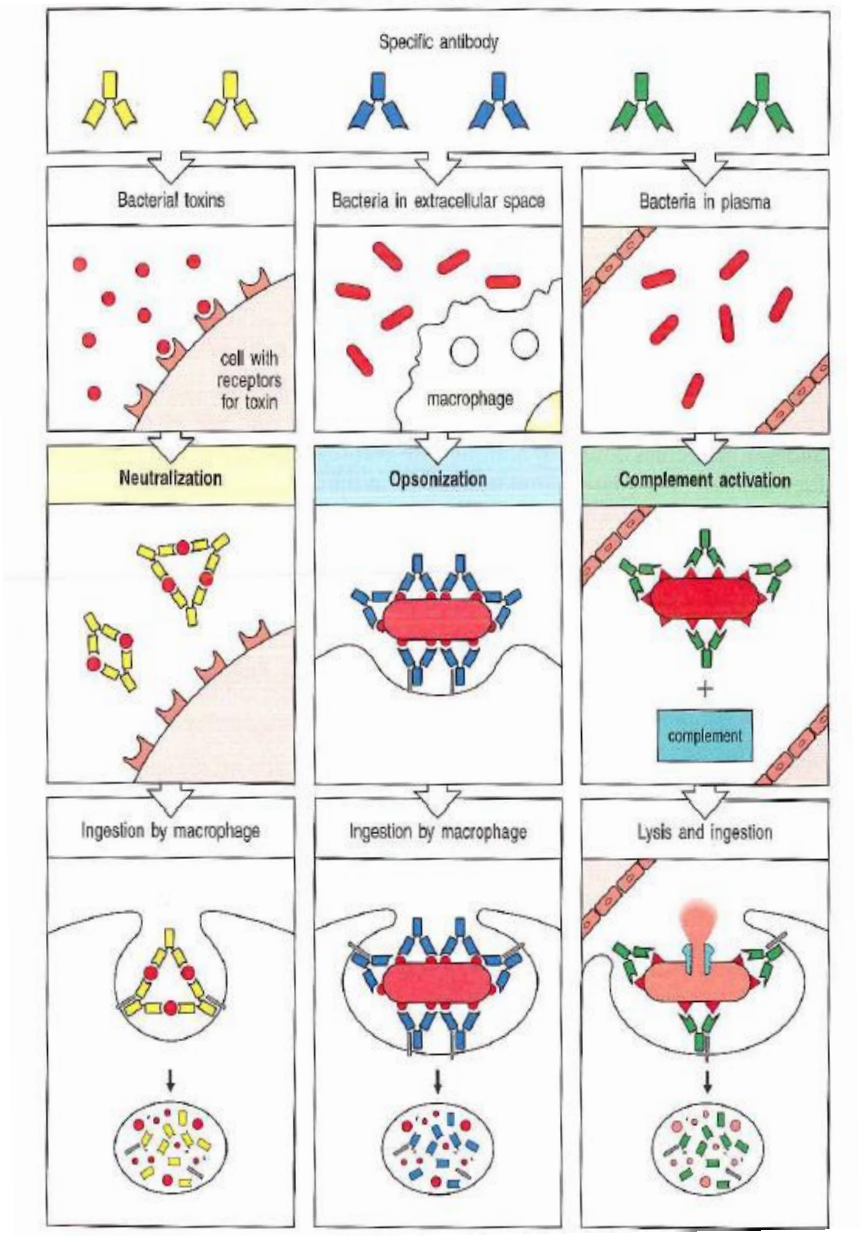


Figure 14 : Mécanismes d'action des anticorps dans la défense de l'hôte (Murphy et al., 2008)
Les anticorps peuvent empêcher des bactéries ou leurs toxines d'entrer dans les cellules en se fixant dessus, ce mécanisme est appelé neutralisation. En recouvrant des bactéries ou des particules étrangères, les anticorps indiquent aux macrophages et aux neutrophiles de phagocyter (opsonisation). La voie du complément est activée lors de l'Immunité innée et ne nécessite pas d'anticorps. Cependant, les régions constantes des anticorps liés aux bactéries constituent le récepteur de la première protéine du complément ce qui augmente l'activation de cette voie qui aboutie à la lyse et à la phagocytose.

Certains lymphocytes B et T se différencient en cellules mémoires capables de créer une réponse immunitaire plus rapide, longue, forte et spécifique de l'antigène qui les a activés. Cette réponse immunitaire secondaire est mise à profit dans les vaccins.

Bien qu'étant des fondamentaux de l'immunologie, les voies de signalisation et l'interconnexion entre Immunité inné et Immunité adaptative ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

II. Les mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3

Au cours de cette étude nous nous intéresserons en particulier à l'activation de l'inflammasome NLRP3 et à ses activateurs.

A. Les signaux de danger endogènes et exogènes

A l'inverse des autres inflammsomes, l'inflammasome NLRP3 peut être activé par de nombreux DAMP et PAMP que nous pouvons classer en signaux de danger endogènes ou exogènes (voir figure 15).

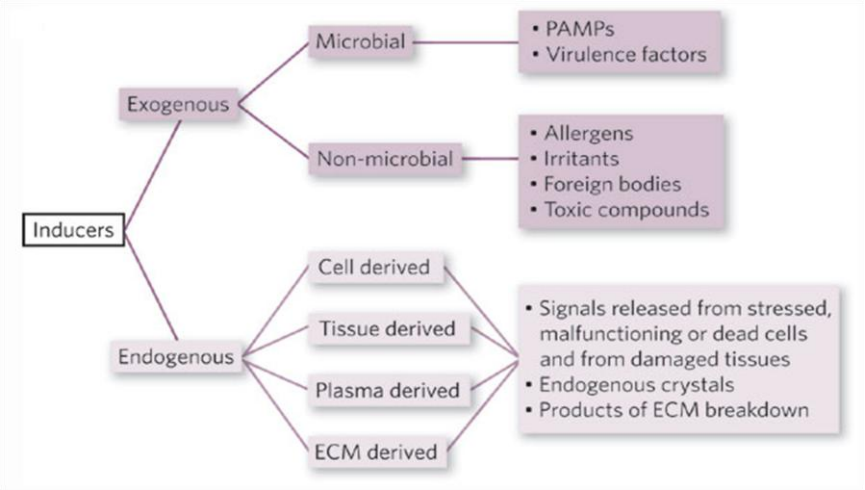


Figure 15 : Les différents inducteurs de l'inflammasome NLRP3 (Medzhitov, 2008)
L'inflammasome NLRP3 se caractérise par un très large panel d'activateurs. Ils sont classés suivant leur origine endogène ou exogène. Parmi les ligands exogènes, on distingue les microbiens des non-microbiens. Les ligands endogènes sont dérivés de la cellule, de la matrice extracellulaire (MEC), du plasma ou des tissus.

Les signaux de danger endogènes sont issus de la cellule elle-même, voire de la matrice extracellulaire (MEC), du plasma ou des tissus. Ils sont issus des cellules ou directement de tissus stressés, endommagés ou d'un fonctionnement cellulaire anormal. Il peut s'agir de molécules modifiées ou libérées dans le milieu extracellulaire lors de la nécrose. La nécrose permet la libération de molécules normalement strictement confinées dans des compartiments cellulaires comme l'ATP

(Mariathasan et al., 2006), les ions potassium (K^+), l'acide urique (Martinon et al., 2006) et le HMGB1 (Lotze and Tracey, 2005).

Les signaux de danger exogènes sont généralement d'origines infectieuses ou environnementales. Plusieurs pathogènes comme *Staphylococcus aureus* (Muñoz-Planillo et al., 2009), *L. monocytogenes* (Kim et al., 2010), *Candida albicans* (Hise et al., 2009) et le virus influenza A (Allen et al., 2009) peuvent activer l'inflammasome NLRP3. Certains DAMP ont pour origine des polluants environnementaux tels que l'amiante, la silice, l'Alum (hydroxyde d'aluminium, principal adjuvant des vaccins actuels) ou encore les nanoparticules (Yazdi et al., 2010).

Certaines maladies pourraient être issues de stress métaboliques comme les fortes concentrations de glucose (Schroder et al., 2010), de MSU, de cholestérol (Duewell et al., 2010) ou d'amyloïde-β (Halle et al., 2008). L'inflammasome NLRP3 contribuerait ainsi à la pathogénèse de maladies inflammatoires stériles comme le diabète de type 2, la goutte, l'athérosclérose et la maladie d'Alzheimer (voir figure 16).

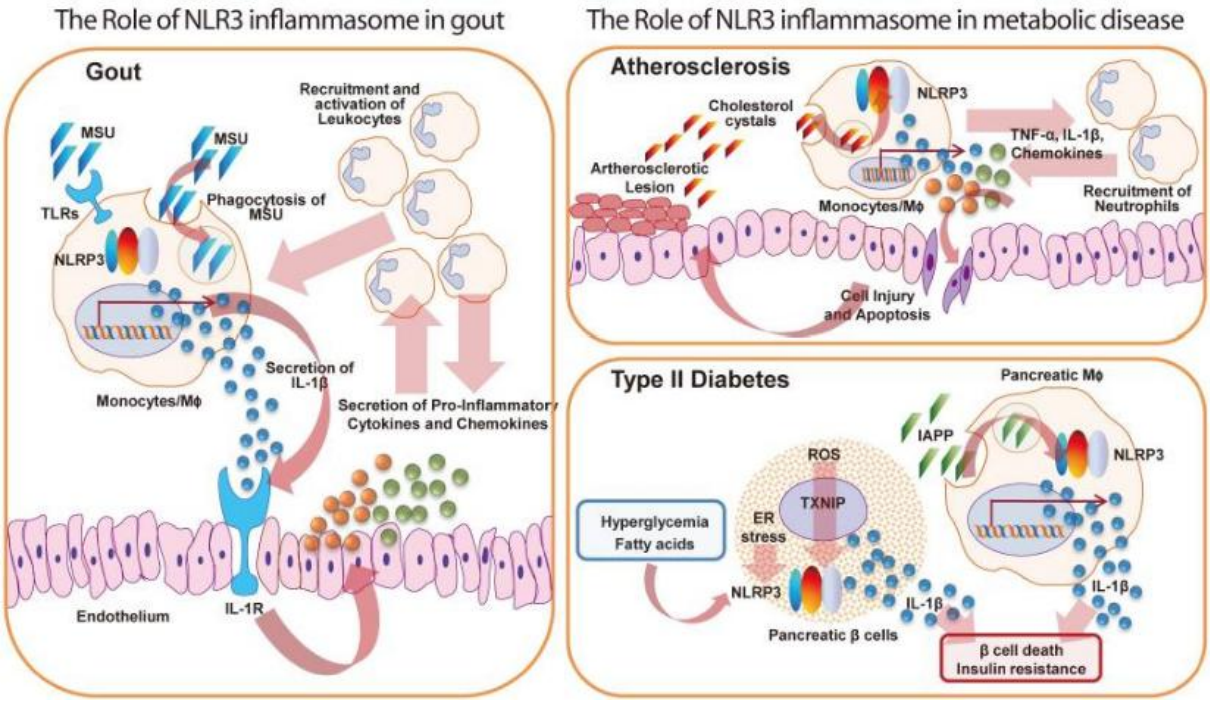


Figure 16 : Implication de l'inflammasome NLRP3 dans des maladies inflammatoires stériles (Yang et al., 2012)
L'inflammasome NLRP3 est impliqué dans la pathogénèse de plusieurs maladies inflammatoires stériles comme la goutte, provoquée par des cristaux de MSU, l'athérosclérose par des cristaux de cholestérol et les diabètes de type 2 par des agrégats d'IAPP. Les cristaux de MSU sont reconnus par les TLR2 et TLR4 ce qui permet la synthèse de pro-IL-1β et sont internalisés par des monocytes ou macrophages ce qui active l'inflammasome NLRP3. L'IL-1β secrétée active le récepteur IL-1R1 de cellules endothéliales qui libèrent des cytokines et chimiokines responsables de l'activation et du recrutement de leukocytes sur le site inflammatoire, généralement au niveau des articulations. Les cristaux de cholestérol forment des plaques et sont aussi internalisés par des macrophages ce qui active l'inflammasome NLRP3. Des neutrophiles sont recrutés et exacerbent l'inflammation. Les cytokines et chimiokines libérées endommagent et font entrer en apoptose les cellules endothéliales ce qui contribue à la formation de lésions athérosclérotiques. Les agrégats d'IAPP sont internalisés par les macrophages pancréatiques. L'hyperglycémie et les acides gras activent également l'inflammasome dans les cellules β pancréatiques via un stress du réticulum endoplasmique et une production de ROS. L'IL-1β sécrétée est à l'origine d'une résistance à l'insuline et de la mort des cellules β et abouti à une diminution de la production d'insuline.

B. Activation de l'inflammasome NLRP3

En considérant la forte hétérogénéité des activateurs de l'inflammasome NLRP3, il apparaît peu probable qu'ils agissent directement sur le domaine LRR du récepteur NLRP3 mais plutôt qu'ils induisent une ou plusieurs dérégulations physiologiques détectées par l'inflammasome. L'activation de l'inflammasome NLRP3 nécessite deux signaux. Le premier signal (le « priming ») est l'augmentation de la transcription de NLRP3 et de la pro-IL-1β via le NF-κB, classiquement par les TLR (Bauernfeind et al., 2009). Le récepteur NLRP3, après transcription, doit également être dé-ubiquitiné pour pouvoir être activé par ses agonistes et ce processus de priming nécessite les ROS induits par les TLR (Juliana et al., 2012). Les chercheurs s'accordent sur le fait que les différents activateurs génèrent des signaux de stress cellulaire qui constituent un deuxième signal activant l'inflammasome NLRP3. Trois processus d'activation de l'inflammasome NLRP3 sont généralement proposés. Le premier est l'efflux de K^+ qui est relié à presque tous les activateurs de l'inflammasome NLRP3. Le second est consécutif à l'endommagement ou la rupture de la membrane des phagolysosomes (« déstabilisation lysosomale ») qui fait suite à l'internalisation de cristaux (Hornung et al., 2008). Le dernier est l'endommagement des mitochondries à l'origine de la libération de ROS et d'ADN mitochondriaux (ADN_{mt}) dans le cytosol ainsi que d'une perte de potentiel membranaire mitochondrial (Δψ) (Nakahira et al., 2010; Shimada et al., 2012; Zhou et al., 2010a). A l'heure actuelle, la question de savoir comment les flux ioniques et autres signaux activent spécifiquement l'inflammasome NLRP3 ou comment les activateurs de l'inflammasome endommagent les mitochondries n'est pas encore élucidée. La compréhension des mécanismes est rendue d'autant plus difficile que les activateurs de NLRP3 peuvent engager de multiples signaux cellulaires. L'objectif de cette partie est de proposer un état des lieux des dernières connaissances acquises sur l'activation de l'inflammasome NLRP3.

1. Le modèle d'efflux de potassium

L'ATP extracellulaire (ATPe) est un activateur de l'inflammasome NLRP3 qui signale via le récepteur purinergique P2X7 et est libérée lors de la mort cellulaire (Cruz et al., 2007; Mariathasan et al., 2006). L'activation de P2X7 par l'ATP provoque un efflux rapide de K^+ de la cellule (Ferrari et al., 2006; Perregaux and Gabel, 1994) ainsi que le recrutement et la formation de pores par la pannexine-1 (Pelegrin and Surprenant, 2006). Les pannexines présentent des homologies avec les innexines des Invertébrés et peuvent former des canaux, appelés pannexons, pour la libération d'ATP par plusieurs types cellulaires. Il existe trois types de pannexines : les pannexines -1, -2 et -3. La pannexine-3 n'est pas exprimée par les cellules épithéliales pulmonaires. La pannexine-1 est exprimée par les cellules épithéliales pulmonaires et contribue à la libération d'ATP par ces cellules (Ransford et al., 2009). L'implication de la pannexine-1 dans la libération d'ATP de façon dépendante de P2X7 est

actuellement controversée, en particulier dans une étude qui a montré, grâce à des BMDM (Bone Marrow-Derived Macrophages) issus de souris déficientes en pannexine-1, que la fixation d'ATP sur le récepteur P2X7 entraîne la perméabilisation de la membrane indépendemment de cet hémicanal (Qu et al., 2011). Cependant, la pannexine-1 joue un rôle dans l'apoptose en augmentant la perméabilité membranaire et en permettant la libération d'ATP, ce mécanisme étant indépendant du récepteur P2X7 (Qu et al., 2011). Toutefois, les pannexines présentent des homologies de fonction avec la famille des connexines et, chez les neutrophiles murins, la libération d'ATP peut se faire via la connexine 43 (Eltzschig et al., 2006). Un modèle d'activation de l'inflammasome NLRP3 propose que la formation de pores par la pannexine-1 permettrait à des activateurs extracellulaires de NLRP3, en particulier des PAMP, d'entrer dans le cytoplasme et d'activer l'inflammasome (Kanneganti et al., 2007) (voir figure 17). D'ailleurs, des toxines bactériennes pouvant former des pores comme l'hémolysine α de *S. aureus* (indépendamment de P2X7) conduisent à un efflux de K^+ et à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Mariathasan et al., 2006; Muñoz-Planillo et al., 2009).

L'ATP extracellulaire mise à part, l'efflux de K^+ et les ROS sont indépendants de l'activité du récepteur P2X7 pour les activateurs de l'inflammasome NLRP3 (Pelegrin and Surprenant, 2006).

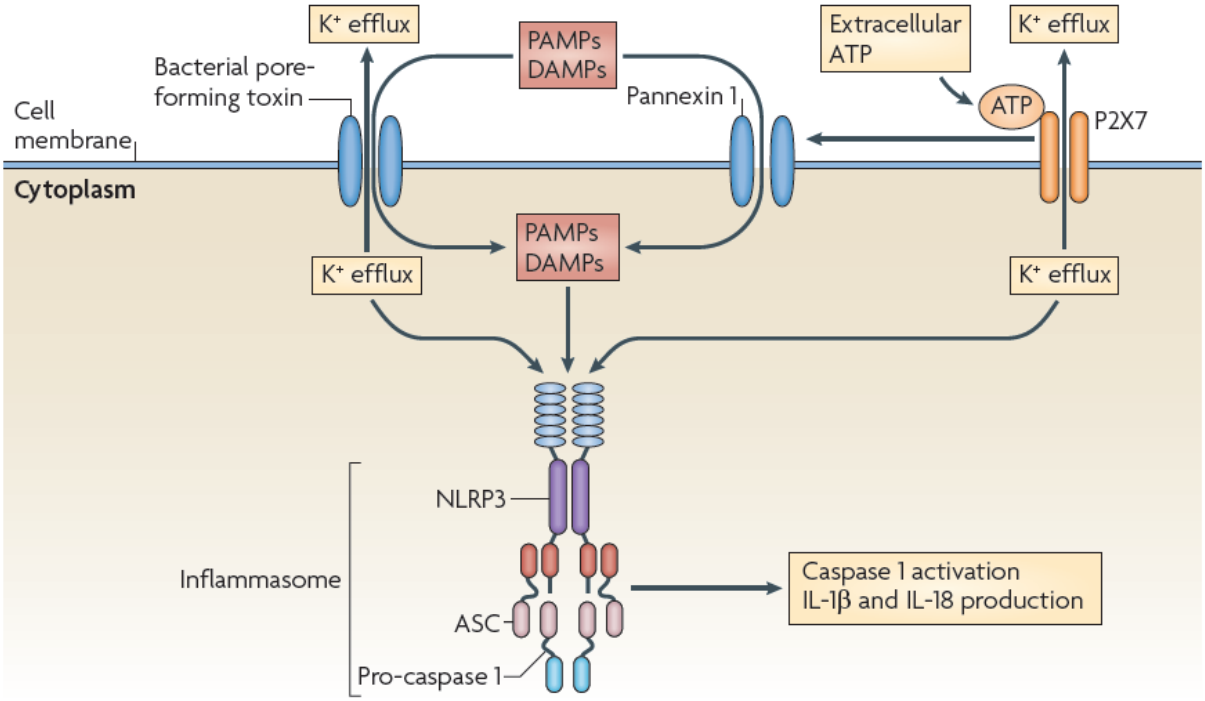


Figure 17 : Modèle d'activation de l'inflammasome NLRP3 par l'efflux de K^+ (Tschopp and Schroder, 2010)
L'ATP extracellulaire (ATPe) active le récepteur ionotropique P2X7 ce qui a pour conséquence un efflux de K^+ et le recrutement et l'activation d'un hémicanal, la pannexine-1 qui forme un pore membranaire. La pannexine-1, tout comme les pores formés par les toxines bactériennes à l'origine d'une sortie de K^+, peut permettre l'entrée de PAMP ou de DAMP dans la cellule. Les PAMP, les DAMP et l'efflux potassique sont des activateurs du récepteur NLRP3 de l'inflammasome.

Une étude a récemment proposé un mécanisme commun à tous les activateurs de NLRP3 et pour lequel l'efflux de K^+ est une étape nécessaire mais pas suffisante pour l'activation de l'inflammasome

(Compan et al., 2012). Comme les activateurs connus de NLRP3 induisent un changement de volume des cellules (gonflement ou diminution) (Schorn et al., 2010; Taylor et al., 2008) et que le gonflement cellulaire induit le recrutement des macrophages *in vivo*, la variation du volume cellulaire est proposée comme signal de danger pouvant être détecté par l'inflammasome (Compan et al., 2012). L'étirement de la membrane cellulaire active des canaux comme la pannexine-1 et le TRPV2 (Transient Receptor Potential Vanilloid 2) qui perméabilisent la membrane à des molécules de grande taille (Pelegrin and Surprenant, 2006). Lors du gonflement cellulaire en condition hypotonique, le potassium sort des cellules via des canaux potassiques ce qui entraînerait un changement conformationnel des récepteurs NLRP3 et favoriserait leur activation. Les canaux TRP (Transient Receptor Potential) modulent le Ca^{2+} intracellulaire lors de la régulation du volume cellulaire et ce changement de concentration est indispensable pour l'activation de TAK1 (Transforming Growth Factor (TGF) -β-Activated Kinase 1) (Fukuno et al., 2011), kinase essentielle à la voie NF-κB dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Gong et al., 2010).

2. Le modèle de la destabilisation lysosomale

L'activation de l'inflammasome NLRP3 par les particules et les cristaux est généralement expliquée par deux modèles qui ne s'excluent pas forcément. L'inflammation issue de l'exposition à l'amiante et à la silice a été reliée à la production de ROS issus de la « phagocytose frustrée », car ces particules seraient trop grosses pour être complétement ingérées (Dostert et al., 2008). L'augmentation des ROS dans le cytoplasme inactive la Thiorédoxine (TRX) ce qui permet à la protéine interagissant avec le TRX (TXNIP) de se fixer directement sur le récepteur NLRP3 pour activer l'inflammasome (Tschopp and Schroder, 2010) (voir figure 18). Il a été montré que le TXNIP, qui est une protéine liée à la résistance à l'insuline, relie l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la pathogénèse des diabètes de type 2 (Zhou et al., 2010b).

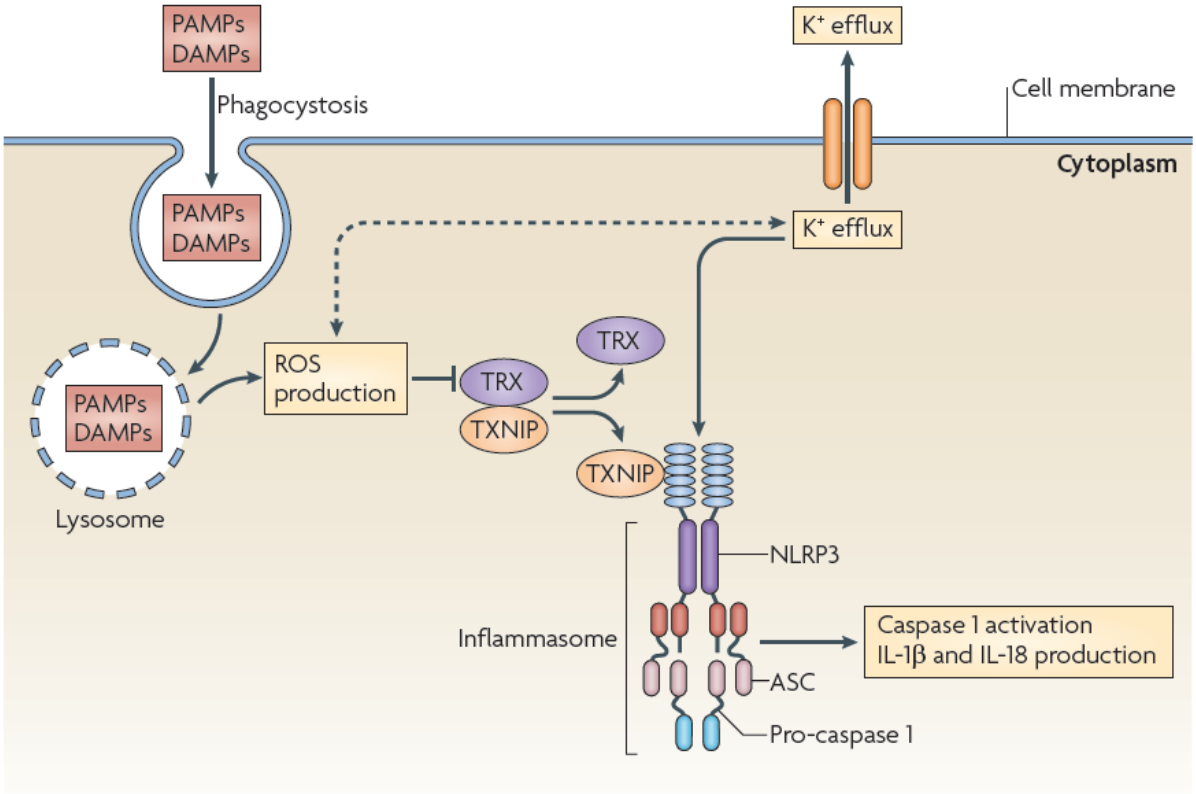


Figure 18 : Modèle d'activation de l'inflammasome NLRP3 par la production de ROS (Tschopp and Schroder, 2010)
En réponse à l'internalisation de particules dans des phagosomes et/ou suite à l'efflux de potassium, des ROS sont produits dans le cytosol. Les ROS dissocient le complexe TXNIP (thioredoxin-interacting protein) – TRX (thioredoxin). Une fois libéré de son inhibiteur, le TXNIP se lie directement à la région LRR du récepteur NLRP3 permettant ainsi la formation de l'inflammasome NLRP3.

Dans un autre modèle, des particules comme l'amiante, la silice ainsi que l'amyloïde-β sont phagocytées puis ces cristaux endommagent la membrane des phagolysosomes. L'acidification des phagosomes et la libération de la cathepsine B lysosomale dans le cytoplasme activent toutes deux l'inflammasome NLRP3 (Halle et al., 2008; Hornung et al., 2008; Sharp et al., 2009). Il a été montré que ces particules ainsi que le dipeptide d'endommagement lysososmal, LL-OMe, induisent un efflux de K^+ (voir figure 19).

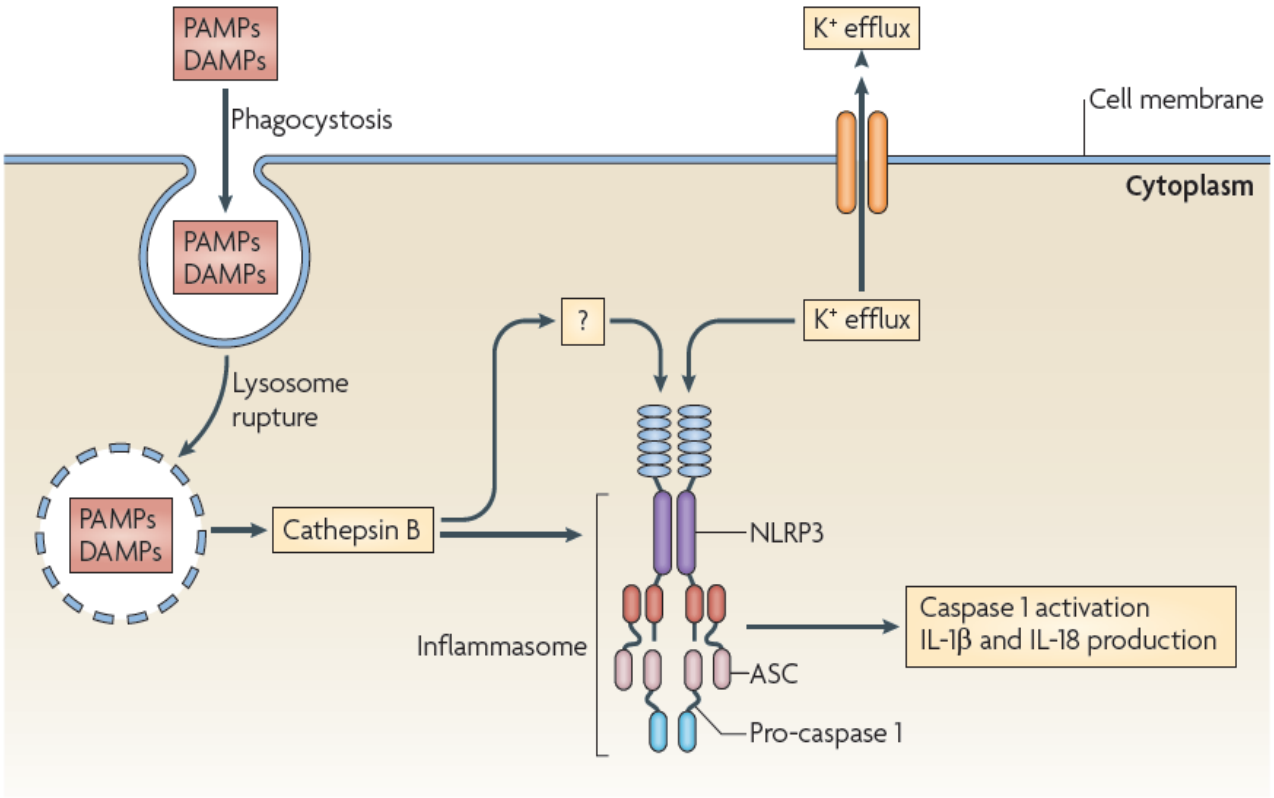


Figure 19 : Modèle d'activation de l'inflammasome NLRP3 par la déstabilisation lysosomale (Tschopp and Schroder, 2010)
L'internalisation de microparticules (les exemples classiques sont l'Alum et la silice) perméabilise la membrane des lysosomes qui libèrent dans le cytoplasme leur contenu, en particulier la cathepsine B. Cette dernière active alors l'inflammasome NLRP3 directement ou indirectement (mécanisme encore non résolu).

3. Le modèle des mitochondries endommagées

La principale source connue de ROS a d'abord été les NADPH oxydases liées aux phagosomes et activées lors de l'internalisation de particules (Dostert et al., 2008). Mais les macrophages murins et humains déficients pour cette enzyme ont une activation normale de l'inflammasome NLRP3 (Bruggen et al., 2010; Hornung et al., 2008). Les ROS mitochondriaux ont été mis en avant pour l'activation de l'inflammasome ce qui a été conforté par la colocalisation des inflammasomes NLRP3 avec les mitochondries dans l'espace périnucléaire lors de l'activation de l'inflammasome (Zhou et al., 2010a). Une étude propose que les activateurs de l'inflammasome NLRP3 perturbent l'homéostasie des mitochondries ce qui permet le recrutement de récepteurs NLRP3 par ces organites endommagés (Misawa et al., 2013). Ces complexes mitochondries-récepteurs NLRP3 sont déplacés via les microtubules (dont les α-tubulines sont acétylées suite au dysfonctionnement des mitochondries) en direction des protéines adaptatrices ASC colocalisées avec le réticulum endoplasmique. Il est ainsi montré que les mitochondries jouent un rôle dans la création de sites optimaux pour l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 (Misawa et al., 2013). Les mitochondries endommagées peuvent également libérer de l'ADN mitochondrial oxydé suite à la perte de leur potentiel de membrane (Δψ) ce qui provoque une activation directe de l'inflammasome NLRP3 lors de l'apoptose (Shimada et al., 2012) (voir figure 20). L'autophagie, en permettant le

renouvellement des organelles du cytoplasme dont les mitochondries, module l'activité de l'inflammasome NLRP3. L'inhibition de l'autophagie augmente le nombre de mitochondries défectueuses et s'accompagne d'une accumulation de ROS et d'ADN_{mt} dans le cytoplasme ce qui est corrélé avec une activation de l'inflammasome NLRP3 (Nakahira et al., 2010). Il a aussi été montré que l'autophagie permet d'éliminer les inflammasomes ubiquitinés (Shi et al., 2012) et la pro-IL-1β dans les cellules activées (Harris et al., 2011).

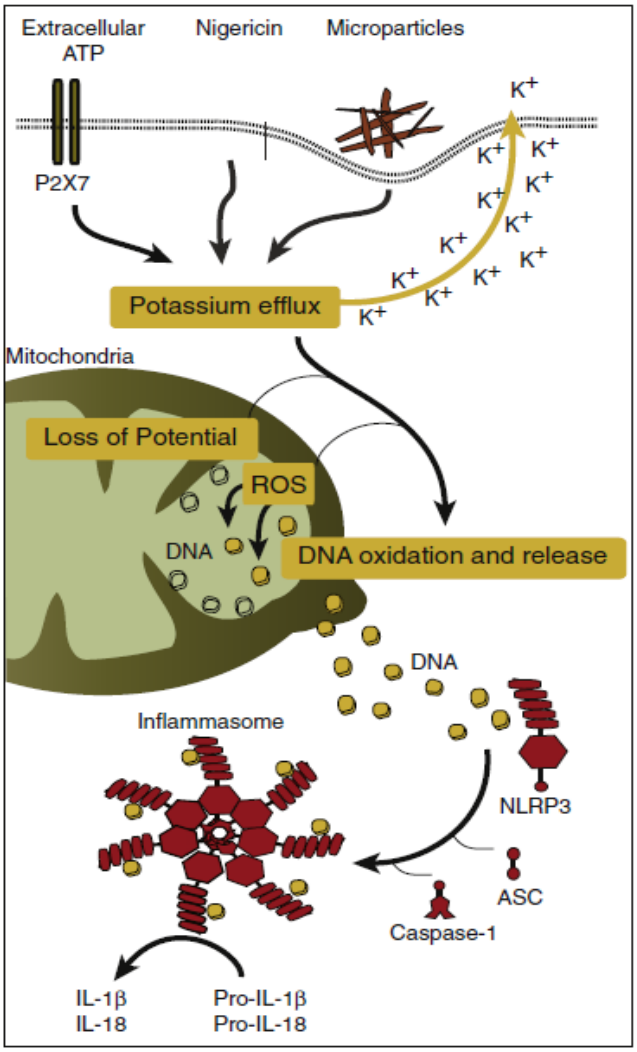


Figure 20 : Modèle d'activation de l'inflammasome NLRP3 via l'ADN mitochondrial oxydé (Martinon, 2012)
La signalisation de l'ATPe via le récepteur P2X7, la nigéricine aux propriétés ionophores bien connues et l'internalisation de microparticules sont à l'origine d'un efflux de potassium de la cellule ayant des effets délétères sur les mitochondries. L'endommagement de ces organites, et en particulier de la chaîne respiratoire, est responsable d'une diminution du potentiel de membrane (Δψ) et d'une augmentation de la production de ROS. Dans ce modèle, l'ADN_{mt} oxydé libéré dans le cytosol est proposé comme un ligand direct du récepteur NLRP3.

Une étude récente montre que plusieurs activateurs de l'inflammasome NLRP3, dont l'ATPe, la nigéricine et le MSU, nécessitent une signalisation par le calcium (Murakami et al., 2012). Le calcium est fourni par le milieu extracellulaire via les canaux d'entrée de calcium et est aussi libéré par le récepteur à l'inositol triphosphate (IP_3R) du réticulum endoplasmique. Il est suggéré que l'efflux de K^+ et la rupture de lysosomes induisent, comme étape intermédiaire, un influx de Ca^{2+} dans le cytosol ce

qui serait essentiel pour endommager les mitochondries et par la suite activer l'inflammasome NLRP3 (Murakami et al., 2012) (voir figure 21).

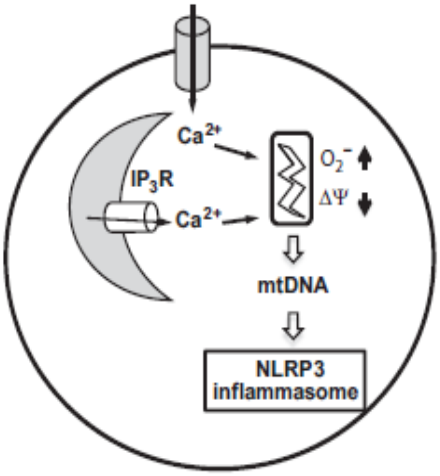


Figure 21 : Modèle d'activation de l'inflammasome NLRP3 par le calcium (Murakami et al., 2012)
En réponse à l'ATPe, et éventuellement à d'autres activateurs comme la nigéricine et le MSU, l'influx de Ca^{2+} dans le cytosol va induire la libération de ROS (O^-) et d'ADN_{mt} dans le cytoplasme ainsi qu'une perte de potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi$). L'endommagement des mitochondries active alors l'inflammasome NLRP3.

Il a ensuite été démontré que l'inflammasome NLRP3 est activé via la signalisation PLC (phospholipase C) par les récepteurs senseurs du calcium (CASR). L'activation de CASR par du Ca^{2+} extracellulaire inhibe l'adénylate cyclase (AC) et diminue donc les taux d'AMP_c (Adénosine MonoPhosphate Cyclique), l'AMP_c étant un inhibiteur de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Lee et al., 2012b).

Les mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 sont, comme nous pouvons le voir, extrêmement variés et souvent complémentaires (voir figure 22). Trouver un mécanisme commun à tous les activateurs ou alors le mécanisme suffisant et nécessaire (s'il existe) pour l'activation de l'inflammasome constituerait une grande avancée. Il n'est pas à exclure que, suivant les types d'activateurs, les mécanismes d'activation ne soient pas les mêmes, ce qui pourrait expliquer les différents modèles.

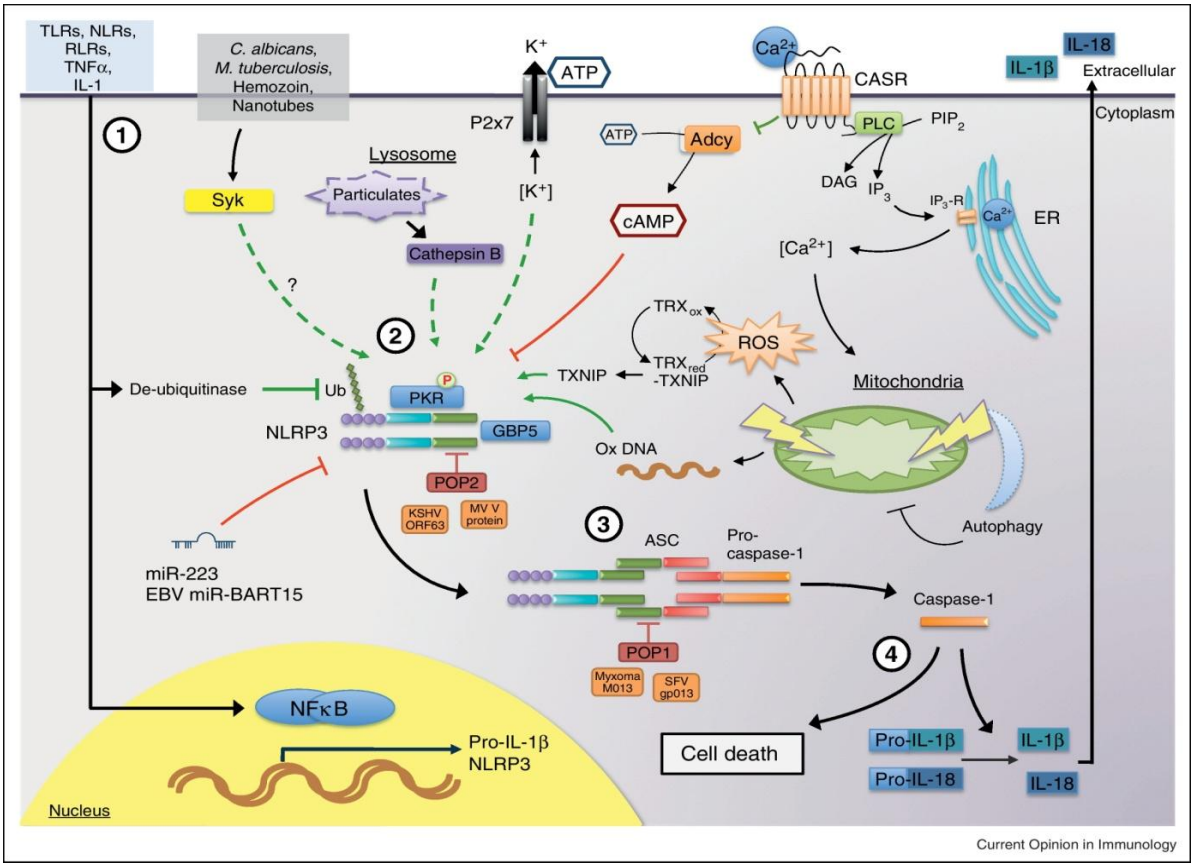


Figure 22 : Récapitulatif de tous les mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 actuellement répertoriés (Haneklaus et al., 2013)

4. Le point sur l'activation de l'inflammasome NLRP3

Le rôle des mitochondries endommagées (Zhou et al., 2010a) et des pores dans la membrane plasmique en réponse aux toxines bactériennes et aux particules a été très récemment controversé dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Muñoz-Planillo et al., 2013). Dans cette étude, il est montré que l'ATP, la nigéricine et la gramicidine (une toxine bactérienne formant des pores) entraînent une augmentation rapide de la consommation de dioxygène (O_2) (facteur révélateur de l'endommagement des mitochondries, au même titre que l'acidification extracellulaire). Mais contrairement à ce qui avait été auparavant suggéré (Shimada et al., 2012), les dommages mitochondriaux suite à la stimulation des cellules par de l'ATP ou de la nigéricine seraient dus à des effets cytotoxiques et l'endommagement mitochondrial ne serait pas responsables de l'activation de l'inflammasome NLRP3. Quant à la gramicidine, bien qu'elle endommage la mitochondrie lors de stimulations cellulaires prolongées, l'augmentation de la dégradation mitochondriale serait médiée par des pompes sodium-potassium (Na^+/K^+-ATPases) et ne serait pas liée à l'activation de NLRP3. En utilisant les mêmes substances altérant la chaîne respiratoire mitochondriale que dans l'étude de Zhou, l'activation de NLRP3 n'a pas été observée, de même qu'avec des inhibiteurs de l'autophagie ou en stimulant les cellules avec de l'H_2O_2. Il avait déjà été montré que les inhibiteurs de ROS empêchaient le « priming » des cellules mais pas l'activation de NLRP3 induite par la nigéricine et la

silice (Bauernfeind et al., 2011b).

Même s'il avait été suggéré que l'activation de l'inflammasme NLRP3 par les différents agonistes puisse être bloquée par de fortes concentrations de potassium extracellulaire et donc de faibles concentrations de K^+ intracellulaire (Pétrilli et al., 2007), il avait été ensuite mis en évidence une absence de preuves concernant le rôle de l'efflux de K^+ dans l'activation de NLRP3 par les particules (Tschopp and Schroder, 2010). Dans cette revue, le mécanisme suggéré pour unifier l'activation de NLRP3 par les activateurs repose d'ailleurs sur les ROS. Muñoz-Planillo propose que l'activation de NLRP3 par de fortes concentrations de Ca^{2+} soit due à l'efflux de K^+ et pourrait être expliquée par la formation de particules. Il présente un modèle de diminution de la concentration de K^+ intracellulaire unifiant l'activation de NLRP3 par des particules et des molécules perméabilisant la membrane : la phagocytose de particules induirait un endommagement de la membrane des lysosomes ce qui permettrait l'ouverture de pores membranaires perméables au potassium. Cependant, cette théorie devra être soumise à la critique.

III. La signalisation purinergique

L'ATP est la molécule universelle qui, hydrolysée, fournit l'énergie nécessaire aux réactions chimiques du métabolisme de tous les organismes vivants connus. Elle contribue à des processus aussi divers que la contraction musculaire, les phosphorylations et le transport actif de molécules. L'ATP est un nucléotide constitué d'adénosine (adénine et ribose) et de trois groupements phosphates. En condition basale, la concentration intracellulaire d'ATP est d'approximativement de 10mM alors qu'elle n'est que de 10nM dans le milieu extracellulaire (Schwiebert and Zsembery, 2003). Il a été montré que l'ATP peut être libérée dans le milieu extracellulaire, lors de la mort cellulaire par exemple. Lors de la nécrose, l'ATP a un rôle de signal de danger qui va initier une inflammation et lors de l'apoptose, celui d'un signal « find me » pour faciliter la phagocytose (Elliott et al., 2009). La concentration d'ATP extracellulaire (ATPe) est maintenue basse par l'action d'ecto-ATP/ADPases. L'ATPe est donc rapidement dégradée par diverses nucléotidases en ADP, AMP (respectivement Adénosine Di- et Mono- Phosphate) puis adénosine. L'ATP et ses métabolites peuvent agir sur plusieurs familles de récepteurs via ce que l'on appelle une signalisation purinergique (voir figure 23). La signalisation purinergique est étroitement liée à l'Immunité innée. Par exemple, l'ATPe peut induire une inflammation pulmonaire en activant des DC (Idzko et al., 2007). L'adénosine, issue de la dégradation de l'ATPe ou activement libérée, peut moduler les fonctions de neutrophiles et des macrophages (Barletta et al., 2012; Haskó and Pacher, 2012).

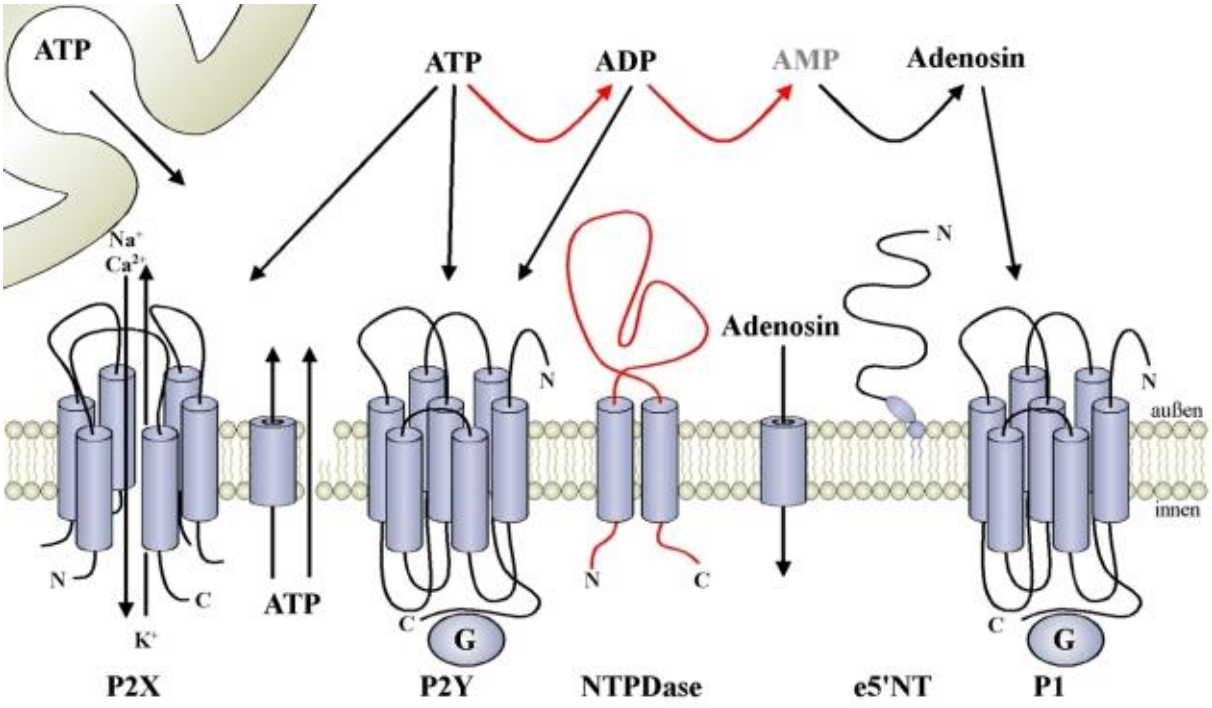


Figure 23 : La signalisation purinergique

D'après http://www.uni-leipzig.de/~straeter/research/ntpdase.html

L'ATP peut être activement libérée dans l'espace extracellulaire par exocytose ou via des canaux. Elle peut agir sur des récepteurs ionotropiques P2X ou sur des récepteurs couplés à des protéines G P2Y. L'ATP est rapidement dégradée par des ectonucléotidases dont les NTPDases et e5'NT. Plusieurs de ses métabolites peuvent se fixer sur des récepteurs : l'ADP sur des P2Y et l'adénosine sur des récepteurs P1. Cette signalisation par l'ATP et ses métabolites est qualifiée de purinergique.

1. Les purines

Les purines sont des molécules aromatiques hétérocyliques. L'ATP fournit l'énergie des réactions biologiques intracellulaires des mammifères. Les purines telles que l'ATP, l'ADP et l'adénosine peuvent aussi participer à la signalisation extracellulaire. Elles passent par des récepteurs purinergiques P1 ou P2Y couplés à des protéines G ou des canaux ioniques P2X (voir figure 23). Le métabolisme des nucléotides est assuré par des ectonucléotidases comme des adénylate kinases et des diphosphokinases de nucléosides présentes dans les surfaces respiratoires humaines (Donaldson et al., 2002). Les NTP (Nucléosides TriPhosphates) sont présents dans la couche liquide des voies respiratoires et participent aux événements physiologiques importants via des interactions avec des récepteurs de nucléotides. Par exemple, l'activation de récepteurs P2Y2 stimule la fréquence de battement ciliaire (Weiss et al., 1992) et la sécrétion de mucus par les cellules de goblet (Ratner et al., 2001).

2. Sécrétion des purines

Les cellules de mammifères contiennent physiologiquement de hautes concentrations d'ATP (de 5 à 8mM). Cette ATP peut être libérée dans le milieu extracellulaire comme signal de danger endogène ou DAMP en réponse à des conditions pathologiques comme un stress, un endommagement

cellulaire ou une inflammation (Riteau et al., 2010). L'ATP est libérée différemment suivant le type de mort cellulaire. Lors de l'apoptose, la libération d'ATP est contrôlée via des hémicanaux, les pannexines. Cette ATP agit comme un signal chimiotactique (« find-me ») pour les phagocytes afin d'éviter une nécrose secondaire (Ravichandran, 2011). Lors de la nécrose, l'ATP est libérée brutalement lors de la rupture de la membrane. Les cellules endothéliales et les cellules inflammatoires activées, comme les neutrophiles, libèrent l'ATP plutôt via d'autres hémicanaux, les connexines (Eltzschig et al., 2006, 2008). Les récepteurs P2 eux-mêmes peuvent participer à l'efflux d'ATP, en particulier le sous-type P2X7 par la formation de pores (Suadicani et al., 2006). Les plaquettes libèrent préférentiellement de l'ADP sous forme de granules (voir figure 24).

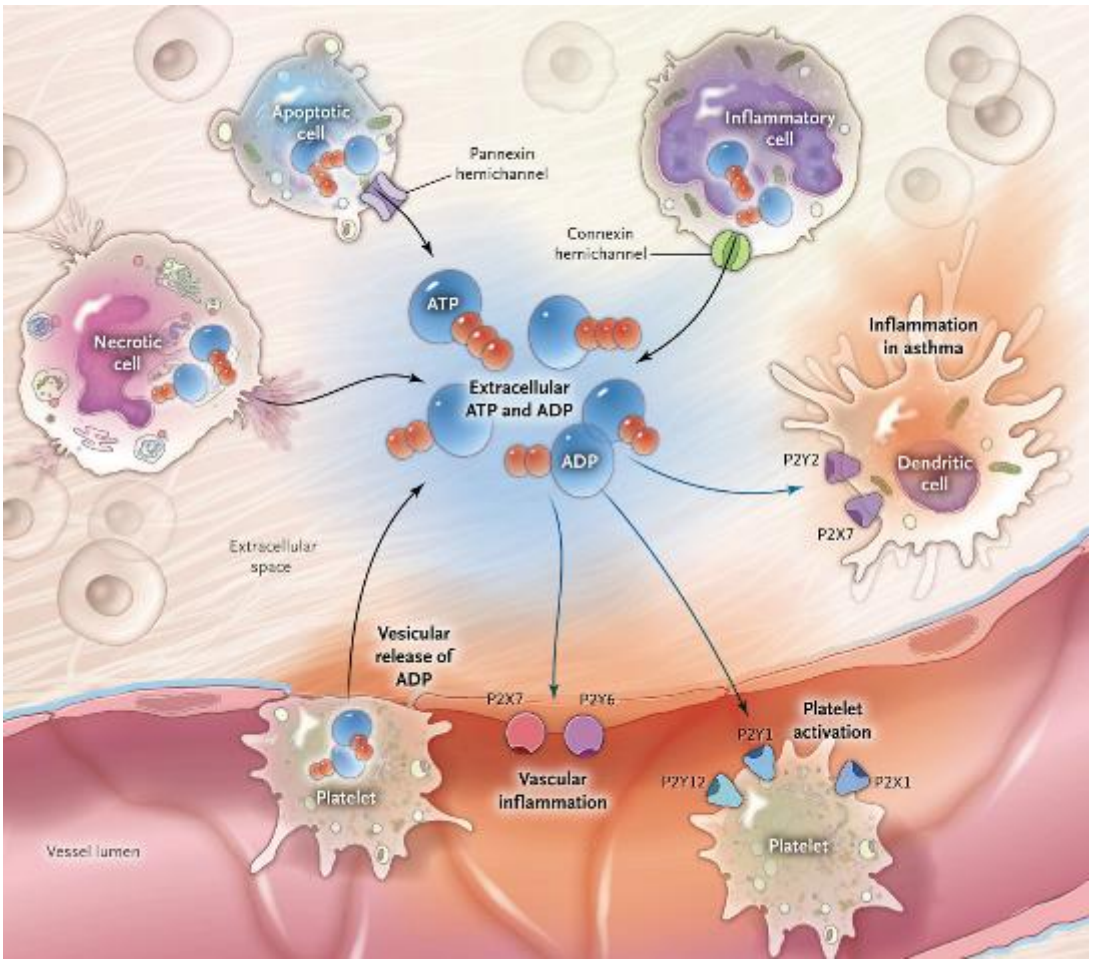


Figure 24 : Voies de sécrétion et d'action de l'ATP et de l'ADP extracellulaires (Eltzschig et al., 2012)
L'ATP est libérée brutalement par les cellules en nécrose ou via des hémicanaux, les pannexines pour les cellules apoptotiques et les connexines par les cellules inflammatoires. De l'ADP contenue dans des vésicules peut également être libérée par les plaquettes. Ces nucléotides agissent ensuite sur différents récepteurs P2X et P2Y.

3. Voie de signalisation des récepteurs P1 et P2

Les récepteurs purinergiques P2 sont les récepteurs de NTP (purines et pyrimidines) et peuvent également être considérés comme des PRR. Deux sous-familles ont été identifiées les P2X et les P2Y. Les P2X comprennent sept membres, de PX1 à P2X7, et forment des canaux membranaires trimériques qui fixent l'ATP (Khakh and North, 2006). Il a été découvert huit sous-types de récepteurs P2Y : P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 et P2Y11 pour ceux couplés à des protéines G_q et P2Y12, P2Y13 et P2Y14 pour ceux couplés à des protéines G_i. L'ATP à faible concentration se fixe préférentiellement sur les P2Y qui sont à haute affinité. Cependant, lorsque l'inflammation est forte, l'ATP est libérée à des concentrations plus élevées et se fixe surtout sur P2X7, qui est un récepteur à faible affinité. Le récepteur P2X7 est bien connu comme activateur potentiel de l'inflammation et est impliqué dans la maturation et la sécrétion de l'IL-1β (Piccini et al., 2008). L'activation de P2X7 avec des concentrations d'ATP de l'ordre du millimolaire permet la formation de larges pores qui conduisent à l'apoptose de la cellule (Jarvis and Khakh, 2009).

Il y a quatre sous-types de récepteurs à l'adénosine (AR) ou récepteurs P1 : A_1, A_{2A}, A_{2B} et A_3 (Blackburn et al., 2009). Ils sont retrouvés dans la membrane des cellules alvéolaires épithéliales ou pneumocytes de type 1 (AEC1) et de type 2 (AEC2), avec une expression particulièrement forte d'A_{2B} chez les AEC2 (Cagnina et al., 2009). A_{2A} et A_{2B} sont couplés à des protéines G_s qui activent l'Adénylate Cyclase (AC) et A_1 et A_3 sont couplés à des protéines G_i qui inhibent AC et induisent un efflux de K^+ (Landolt et al., 2012). Si elle est activée, AC peut produire de l'AMP_c à partir d'ATP ce qui est à l'origine d'une entrée de Ca^{2+} dans la cellule (voir figure 25). Or, il a été montré que l'AMP_c est un inhibiteur de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Lee et al., 2012b). Ce qui permet de suggérer que l'activation des récepteurs P1 par l'adénosine pourrait moduler l'activation de l'inflammasome NLRP3. La concentration d'adénosine pourrait être un facteur important dans cette régulation car A_1 et A_{2A} sont des récepteurs à forte affinité tandis que les récepteurs A_{2B} et A_3 sont à faible affinité (Junger, 2011).

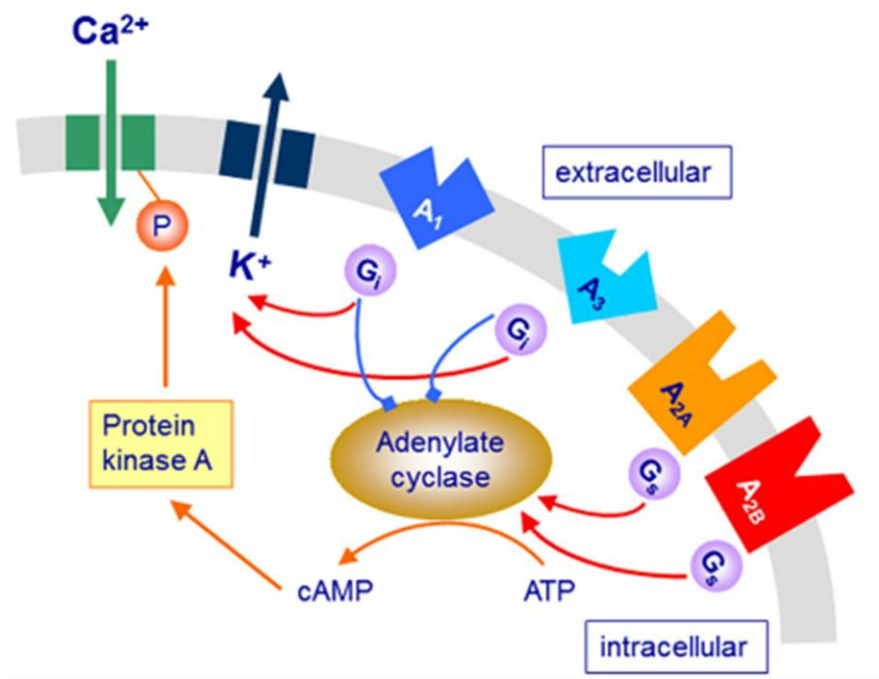


Figure 25 : Voies de signalisation simplifiées des récepteurs P1, modifiée à partir de (Landolt et al., 2012)
Les récepteurs à l'adénosine P1, membranaires, sont au nombre de quatre : A_1, A_{2A}, A_{2B} et A_3. L'activation de A_1 et de A_3 inhibe l'adénylate cyclase (AC) tandis que l'activation d'A_{2A} et A_{2B} la stimule, via leurs protéines G respectives. L'AMP_c, produite à partir de l'ATP par AC, induit un influx de Ca^{2+}. A_1 et A_3 sont également reliés à un efflux de K^+.

Les récepteurs P1 et P2Y ont la même structure de GPCR c'est-à-dire sept domaines transmembranaires à hélices α, un domaine N-terminal du côté extracellulaire et un domaine C-terminal dans le cytoplasme.

L'ATP sécrétée dans le milieu extracellulaire est très rapidement dégradée par des ecto-enzymes en ADP, puis en AMP, ensuite en adénosine et pour finir en inosine. Les enzymes qui hydrolysent les nucléotides sont de la famille des E-NTPDases (Ecto-Nucléosides TriPhosphate Diphosphohydrolases), des E-NPP (Ecto-Nucléotides PyroPhosphatases/PhosPhodiestérases), les ecto-5'-nucléotidases et les phosphatases alkalines (Yegutkin, 2008). La NTPDase1 (ou CD39) est une enzyme majeure de l'hydrolyse de nucléotides comme le montrent les signes d'inflammation exacerbée chez les souris déficientes en CD39 (Mizumoto et al., 2002). CD73 qui est une ecto-5'-nucléotidase responsable de la dégradation de l'AMP en adénosine joue aussi un rôle essentiel dans l'inflammation grâce à son activité anti-inflammatoire (Zernecke et al., 2006). L'adénosine extracellulaire peut être dégradée par l'adénosine déaminase (ADA) en inosine ou être internalisée dans la cellule par des CNT (Concentrative Nucleoside Transporters ou famille des SLC28) (Gray et al., 2004) et des ENT (Equilibrative Nucleoside Transporters, famille des SLC29) (Baldwin et al., 2004). L'adénosine extracellulaire peut également être reconvertie en AMP par l'adénosine kinase (AK) (Yegutkin, 2008). Deux adénosines déaminases peuvent être retrouvées à la surface cellulaire, ADA et ADA2 (ou CECR1). Il existe des patients présentant une déficience en ADA ce qui cause une ImmunoDéficience Sévère Combinée (IDSC), caractérisée par un grave défaut de développement des cellules T et B et un risque accru d'infections, avec une activation excessive du récepteur A_{2A} (Apasov et al., 2000; Cristalli

et al., 2001). Si l'AMP_c intracellulaire est en excès, elle peut être secrétée via les MRP 4 et 5 (Multidrug Resistant Proteins) (Sager and Ravna, 2009) (voir figure 26).

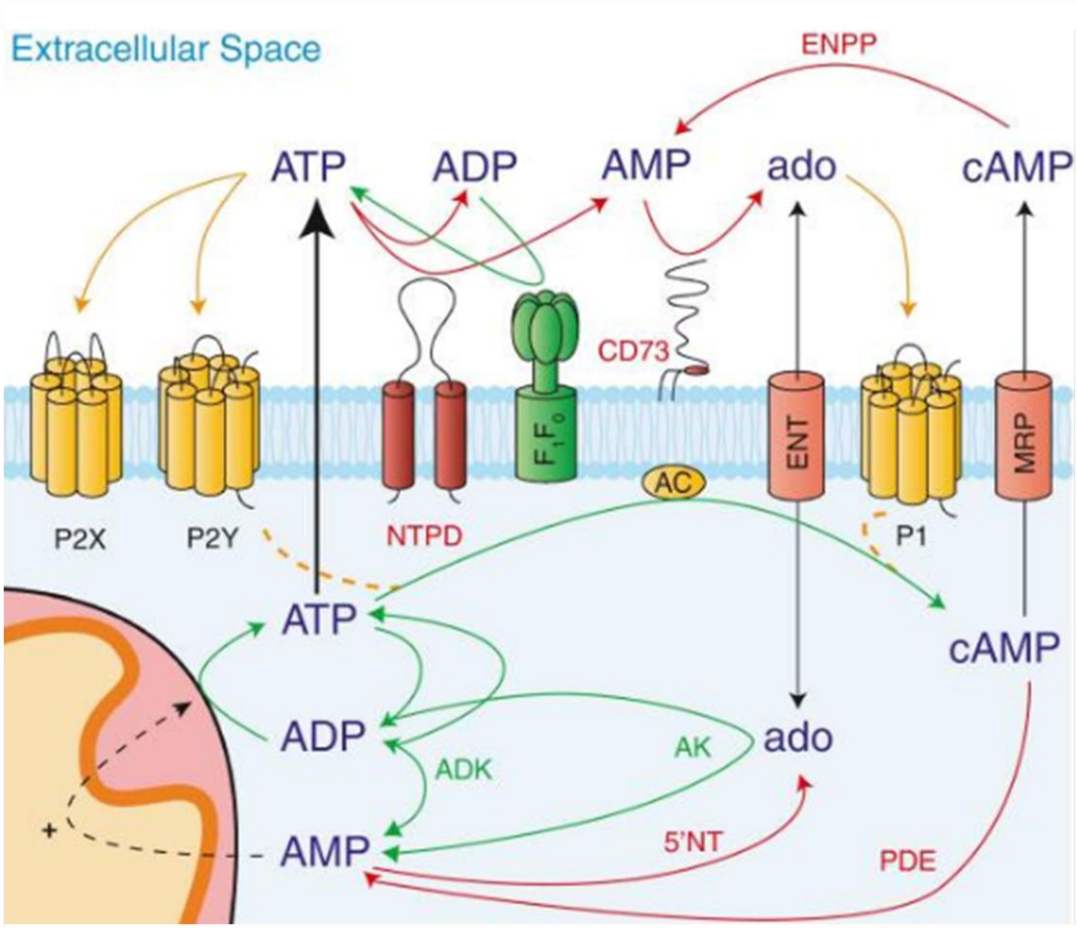


Figure 26 : Voies de signalisation des récepteurs P1 et P2 (Corriden and Insel, 2012)
L'ATP extracellulaire a pour cible les récepteurs P2Y couplés aux protéines G ou les récepteurs ionotropiques P2X. Elle est également dégradée par des ecto-enzymes comme des NTPDases (CD39) ou des ecto-5'-nucléotidases (CD73) en ADP, AMP puis adénosine (ado). L'ADP peut être reconvertie en ATP via la synthase F1F0. L'adénosine peut entrer ou sortir des cellules via des ENT (Equilibrative Nucleoside Transporters) et activer des récepteurs P1 couplés aux protéines G lorsqu'elle est extracellulaire. L'adénosine peut être générée par des pyrophosphatases et des phosphodiestérases (E-NPP) à partir d'AMP cyclique (AMPc) extracellulaire. Dans le cytoplasme, l'ATP peut être synthétisée par des Adénosines Kinases (AK), des Adénylates Kinases (ADK) et des PhosphoDiEstérases (PDE). L'adénosine est produite par des 5'NT. La conversion de l'ADP vers l'ATP est médiée par la mitochondrie lorsque la concentration d'AMP intracellulaire augmente.

Les ecto-nucléotidases sont virtuellement retrouvées à la surface de tous les types cellulaires chez les mammifères mais des distributions préférentielles permettent d'avoir des microenvironnements immunologiques spécifiques.

4. Rôles des récepteurs purinergiques et des purines dans les voies respiratoires

Les stress mécaniques subis par les cellules épithéliales pulmonaires induisent une libération locale d'ATP à l'origine d'une augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire (Hansen et al., 1993) qui peut s'étendre à d'autres cellules via les récepteurs P2Y (Homolya et al., 2000). Il a été prouvé que la concentration d'ATP libérée est suffisante pour activer les récepteurs P2Y2 dans les voies

respiratoires (Okada et al., 2006). De même, P2Y2 est bien exprimé au niveau de l'épithélium pulmonaire et plus particulièrement par les cellules de Clara (Proost et al., 2009). L'activation des récepteurs P2Y2 des cellules épithéliales pulmonaires humaines par des nucléotides permet la libération d'IL-6 (Douillet et al., 2006).

Il a été montré que les AEC1 peuvent sécréter quatre fois plus d'ATP que les AEC2. Les AEC1 sont les senseurs mécaniques des poumons et la stimulation paracrine des AEC1 par l'ATPe joue un rôle dans la régulation de la sécrétion du surfactant par exocytose (Patel et al., 2005). La déformation cellulaire par les forces de tension provoque une exocytose d'ATP dépendante du calcium (Ramsingh et al., 2011). L'activation des récepteurs P2X7 augmente la sécrétion de surfactant pulmonaire via la libération d'ATP par les cellules AEC1 ce qui a pour conséquence la stimulation de récepteur P2Y2 sur les cellules AEC2 (Mishra et al., 2011).

Comme la sécrétion est Ca^{2+}-dépendante, la libération d'ATP, comme d'UTP et d'adénosine, se fait probablement par exocytose par les AEC2 (Tatur et al., 2008). Malgré la controverse actuelle, l'intervention de la pannexine-1 dans la libération d'ATP par l'épithélium pulmonaire reste possible (Ransford et al., 2009).

Le volume cellulaire est régulé de façon autocrine par des canaux ioniques K^+ et Na^+ dits « volumes sensibles ». En plus d'être impliqué dans la modulation de l'activation de l'inflammasome NLRP3, le gonflement des cellules provoque une sortie d'ATP qui va être dégradée en adénosine pour agir sur les récepteurs P1 (Musante et al., 1999). L'adénosine est impliquée via A_{2A} et l'activation de protéines kinases A dans la migration de cellules épithéliales bronchiques. Chez la lignée A549 qui est de type AEC2, l'adénosine induit une expression de la fibronectine qui est potentiellement impliquée dans le remodelage tissulaire. De plus, en cas de concentrations d'adénosine trop importantes, le développement alvéolaire est anormal (Musante et al., 1999).

En conditions basales, la concentration d'adénosine extracellulaire est de l'ordre de 1 nM. Lors d'une inflammation, la libération et la production d'adénosine est fortement augmentée dans les tissus pour atteindre des taux jusqu'à cent fois supérieurs à ceux des conditions physiologiques (Fredholm, 1997). Cependant, une fois générée, l'adénosine est très rapidement dégradée, et sa demi-vie est de l'ordre de quelque secondes (Moser et al., 1989).

L'adénosine a aussi un rôle fondamental dans la régulation des fonctions de phagocytes et peut donc moduler la réponse inflammatoire (Haskó and Pacher, 2012). Via A_{2B}, l'adénosine peut induire une différenciation des monocytes en DC. L'adénosine peut également diminuer l'activation des macrophages classiques via A_{2A} et augmenter celle des macrophages alternatifs via A_{2B} (Haskó and Pacher, 2012).

Lors d'endommagements tissulaires, l'environnement extracellulaire peut contenir des concentrations de nucléotides aberrantes par la stimulation excessive de cellules, la libération non contrôlée de contenus cytoplasmiques ou par la dégradation insuffisante des purines. Etant donné qu'une grande variété de types cellulaires peut libérer de l'ATP par divers mécanismes, comme l'exocytose ou via les hémicanaux pannexines ou connexines, et que l'ATP est rapidement dégradée dans le milieu extracellulaire en métabolites agissant sur d'autres récepteurs, la compréhension des mécanismes est encore incomplète.

IV. Le système respiratoire

Avant d'être amenée à s'intéresser à l'inflammasome NLRP3 et à ses mécanismes d'activation, la recherche de notre équipe était focalisée sur l'inflammation pulmonaire. Nous avons étendu notre axe de recherche à l'inflammation pulmonaire en réponse à des activateurs endogènes comme le MSU ou exogènes comme la silice, l'Alum ou les nanoparticules. L'exposition des voies respiratoires humaines à la silice ou aux nanoparticules, en particulier chez les professionnels exposés, est un risque potentiel car ces particules sont des polluants environnementaux.

Le système respiratoire, qui rend possible les échanges gazeux, s'est développé différemment suivant les branches de l'évolution. Pour les organismes unicellulaires, il s'agit d'une simple diffusion. Pour les poissons, c'est une diffusion aqueuse via les branchies. Pour les amphibiens et les mammifères, les gaz sont échangés entre l'air respiré et la circulation sanguine grâce à la diffusion à travers des cellules très fines. Les poumons de mammifères sont des organes particulièrement complexes et hautement spécialisés dans les échanges gazeux et la défense de l'hôte. Leur large surface (jusqu'à 70m^2 de surface respiratoire pour 0,1µm d'épaisseur) favorise les échanges avec l'environnement externe mais les expose également aux risques d'infection et de dommages environnementaux. En tant qu'interface entre l'environnement extérieur et la muqueuse, l'épithélium des voies respiratoires représente la première ligne de défense de l'organisme contre des agents aériens pathogènes, allergènes ou toxiques. Tout endommagement de cet épithélium conduit à une cascade inflammatoire et de signalisation cellulaire afin d'induire des mécanismes de régénération ou de réparation cellulaire et tissulaire. La différence entre ces deux processus est essentielle. Alors que la régénération restaure les structures et les fonctions physiologiques du tissu, la réparation stabilise le tissu mais échoue dans la pleine restauration des structures ou des fonctions. Une réparation excessive suite à un endommagement peut aboutir à une inflammation chronique, à un remodelage et au final à une fibrose. Chez l'adulte, les poumons ont une excellente capacité de régénération face à de graves dommages. Cependant, des endommagements chroniques sont souvent non réparables

ce qui peut conduire à des pathologies comme l'emphysème où les parois des alvéoles sont détruites.

A. L'architecture pulmonaire

1. Mise en place de la structure pulmonaire

Les types cellulaires pulmonaires dérivent de deux sources embryonnaires : l'endoderme et le mésoderme (Xing et al., 2010). Les étapes de ce développement sont divisées en phases : embryonnaire (de quatre à sept semaines), pseudoglandulaire (de sept à seize semaines), canaliculaire (de seize à vingt-quatre semaines) puis de sac terminaux (de vingt-quatre semaines jusqu'au terme) (Rawlins, 2011). Lors de la phase embryonnaire, l'endoderme se divise par dichotomie formant l'arbre bronchial qui acquiert rapidement sa forme lors de la phase pseudogladulaire. La spécialisation des parties respiratoires débute à la fin de la phase canaliculaire avec la dilatation des voies respiratoires, le développement de la vascularisation et la différenciation dans l'épithélium pulmonaire des AEC1 et des AEC2 (Cardoso and Whitsett, 2012). Les cellules ciliées se différencient et apparaissent du côté des muscles lisses de la trachée. Les cellules non ciliées contenant les granules de sécrétion et les glandes sub-mucosales se développent dans la partie cartilagineuse de la trachée. Lors de la dernière phase, les sacs terminaux se développent en conduits alvéolaires matures et en alvéoles (Warburton et al., 2000).

2. Structure pulmonaire

Les différentes populations de cellules épithéliales pulmonaires sont réparties suivant les fonctions spécifiques des voies respiratoires. Dans les voies hautes (trachée et bronches), l'épithélium est pseudo-stratifié et contient des cellules de Clara, non ciliées et sécrétrices, des cellules épithéliales ciliées qui participent à exporter hors des poumons des particules étrangères, des cellules mucipares (ou caliciformes à mucus) productrices de mucus, des cellules basales et des cellules neuroendocrines. Les cellules de Clara sont les cellules sécrétrices non ciliées les plus importantes des voies aériennes hautes. Dans les bronchioles, l'épithélium diffère suivant qu'il s'agisse d'une portion entre lobes ou d'une alvéole. Les bronchioles ont un épithélium constitué d'une seule couche de cellules ciliées et de cellules de Clara. Les alvéoles sont délimitées par une couche squameuse d'AEC1 et d'AEC2 qui assurent les échangent gazeux. Les AEC2 sont spécialisées dans la production de surfactant qui limite la tension superficielle et empêche le collapsus des alvéoles. Les cellules épithéliales alvéolaires sont étroitement associées avec des cellules mésenchymateuses (fibroblastes, myofibroblastes et lipocytes), des cellules endothéliales et des péricytes (voir figure 27).

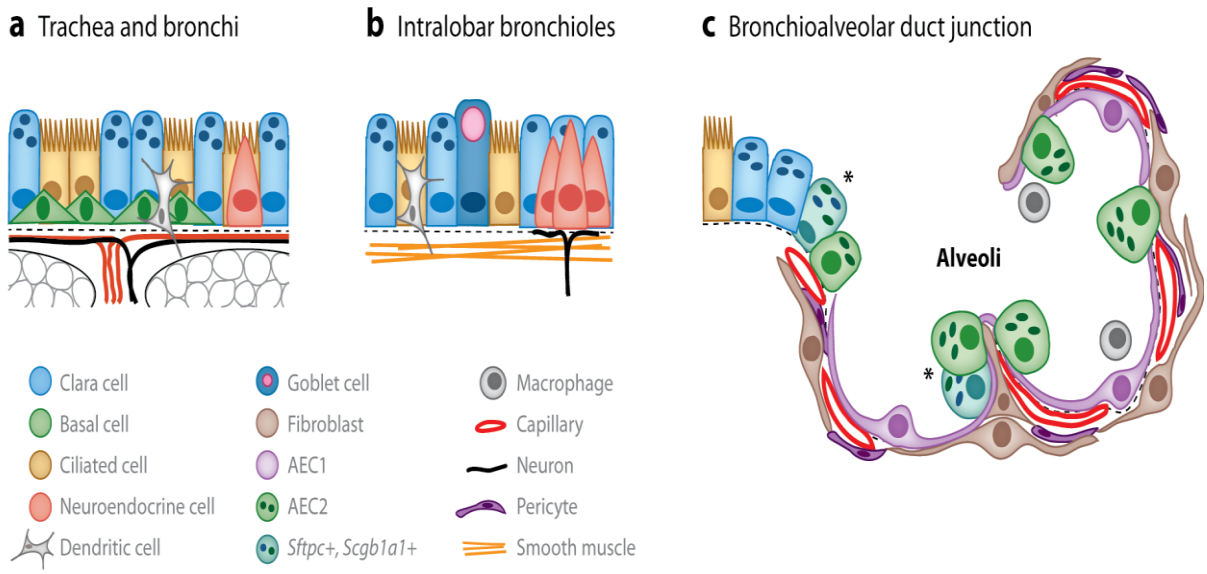


Figure 27 : Types cellulaires du système respiratoire (Rock and Hogan, 2011)
Dans la trachée et les bronches **(a)**, l'épithélium est caractérisé par des cellules ciliées et des cellules de Clara à la surface et des cellules basales et des pneumocytes de type 2 (AEC2), contre la muqueuse. Plus bas, dans les bronchioles **(b)**, apparaissent des cellules muqueuses caliciformes. Ensuite, dans les alvéoles **(c)**, lieux d'échanges respiratoires, l'épithélium est extrêmement fin et est composé principalement de pneumocytes de types 1 (AEC1) et 2 (AEC2), soutenus par des péricytes et des fibroblastes.

B. Les mécanismes de défense pulmonaire

1. Les défenses spécifiques de l'épithélium pulmonaire

En tant que surface d'échanges respiratoires placée à l'interface entre l'environnement externe et l'organisme, les poumons possèdent un large panel de défenses immunitaires, plus ou moins spécifiques à cet organe.

a) L'épithélium, une barrière

L'épithélium des voies respiratoires est une barrière muqueuse pseudo-stratifiée composée de plusieurs types cellulaires et qui sert d'interface entre l'environnement externe et le milieu interne des poumons. Ces cellules constituent d'elles-mêmes une barrière, passive et mécanique, capable en temps normal de se restaurer correctement après un endommagement.

b) Le mucus, la clairance ciliaire et les composés antimicrobiens

Le mucus, produit par les cellules muciformes (cellules de goblet) ou les glandes submucosales (voies cartiligineuses), a différents rôles : il réchauffe et humidifie l'air inspiré dans les poumons et protège le système respiratoire en captant nombre de particules étrangères qui sont exportées hors des poumons grâce aux cils vibratiles des cellules ciliées. Il contient également un certain nombre de

composés antimicrobiens qui maintiennent les poumons stériles. Le composant majeur du mucus est une famille de macromolécules très hétérogènes formant des gels, les mucines, sécrétées sous forme de granules (Rogers, 2003). Elles possèdent des sites de liaison pour les adhésines de bactéries et de virus. Les mucines sont mélangées avec d'autres protéines, des lipides et des composants glycoconjugués pour former une solution aqueuse diluée, le mucus. Les particules piégées par le mucus sont remontées en haut des voies aériennes grâce aux cellules ciliées afin d'être éliminées, le processus est appelé clairance mucociliaire.

Les cellules épithéliales humaines des voies respiratoires produisent des peptides antimicrobiens dont les défensines β et les cathélicidines. Les défensines β sont induites par des cytokines comme l'IL-17A (Kao et al., 2004), des produits bactériens et des virus comme le HRV (Human RhinoVirus) (Proud et al., 2004). Les défensines β éliminent les bactéries en dépolarisant et en créant des pores dans leur membrane (Sahl et al., 2005). C'est la liaison de pathogènes avec les PRR des cellules épithéliales qui induit la libération de composés antimicrobiens retrouvés dans le mucus. L'enzyme lysozyme clive des composés de membrane bactérienne ce qui tue les bactéries gram positives. La lactoferrine, chélateur de fer peut altérer la membrane externe des bactéries gram négatives. Des inhibiteurs de protéases comme SLPI (Secretory Leukocyte Protease Inhibitor) et l'élafine ont des propriétés antimicrobiennes. Ces composés sont retrouvés dans le mucus et agissent en synergie (voir figure 28).

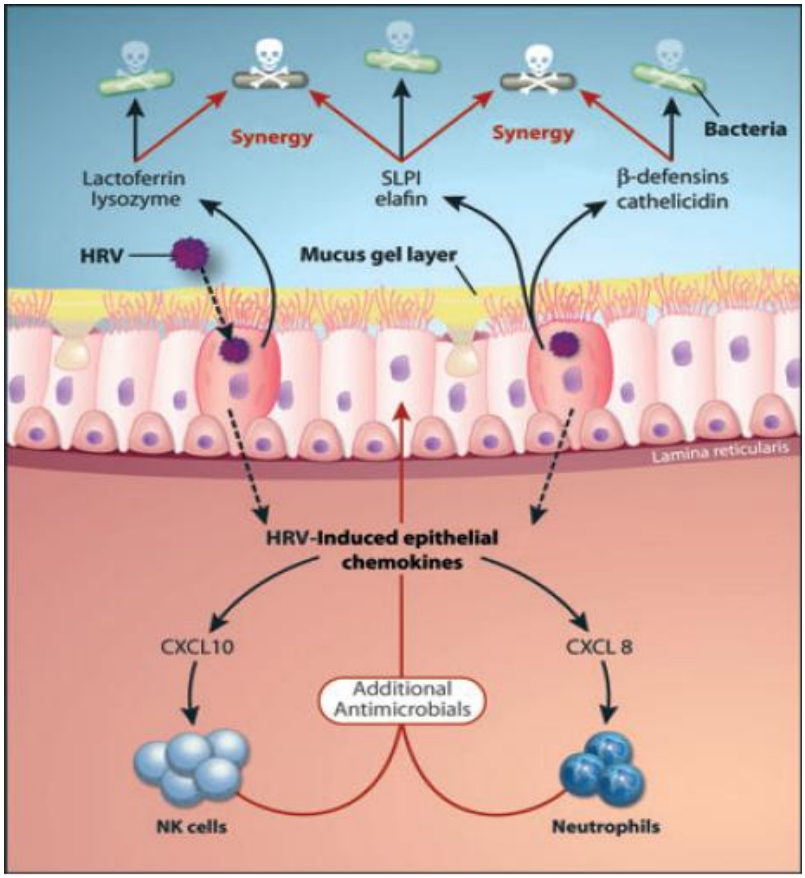


Figure 28 : Défenses antibactériennes et antimicrobiennes des cellules épithéliales alvéolaires (Proud and Leigh, 2011)
Les cellules épithéliales pulmonaires peuvent, en réponse à une infection, sécréter tout un panel de médiateurs inflammatoires qui agissent en synergie. Elles peuvent sécréter des chimiokines qui vont recruter et/ou activer des cellules inflammatoires directement sur le site d'infection, mais également des composés antimicrobiens qui agissent directement sur les pathogènes pour les éliminer. Les particules, les débris cellulaires et les pathogènes piégés par le mucus sont évacués des voies respiratoires par les mouvements vibratoires des cellules ciliées.

c) Le surfactant

Le surfactant, produit principalement par les AEC2 mais aussi par les cellules de Clara, en plus de décroître la tension de surface des alvéoles, participe aussi à la défense de l'hôte (voir figure 29). Il est principalement composé de phospholipides et seulement à 10% de protéines. Quatre protéines de surfactant ont été définies : SP-A, SP-B, SP-C et SP-D. SP-B et SP-C sont de petites protéines hydrophobes. SP-B est essentielle pour la réduction de tension et sa mutation est létale (Nogee, 2004). SP-A, SP-C et SP-D peuvent se lier au LPS (Augusto et al., 2001). La défense de l'hôte via le surfactant passe principalement par SP-A et SP-D qui appartiennent à la famille des collectines. Les collectines se distinguent par des domaines particuliers : une région N-terminale like-collagène avec des répétitions de triplets en triple hélice qui confèrent une stabilité structurelle à la protéine. Le domaine C-terminal a une activité CTL calcium-dépendant et est responsable de l'interaction des collectines avec une large gamme de pathogènes. Une des conséquences de cette interaction est l'opsonisation et l'augmentation de la phagocytose du pathogène grâce à la formation d'agrégats collectines-pathogènes (Shepherd, 2002). Les collectines peuvent se lier à des bactéries, mais aussi à

des virus, des champignons et des allergènes. Elles augmentent également l'expression de certains récepteurs situés à la surface cellulaire (Crouch and Wright, 2001).

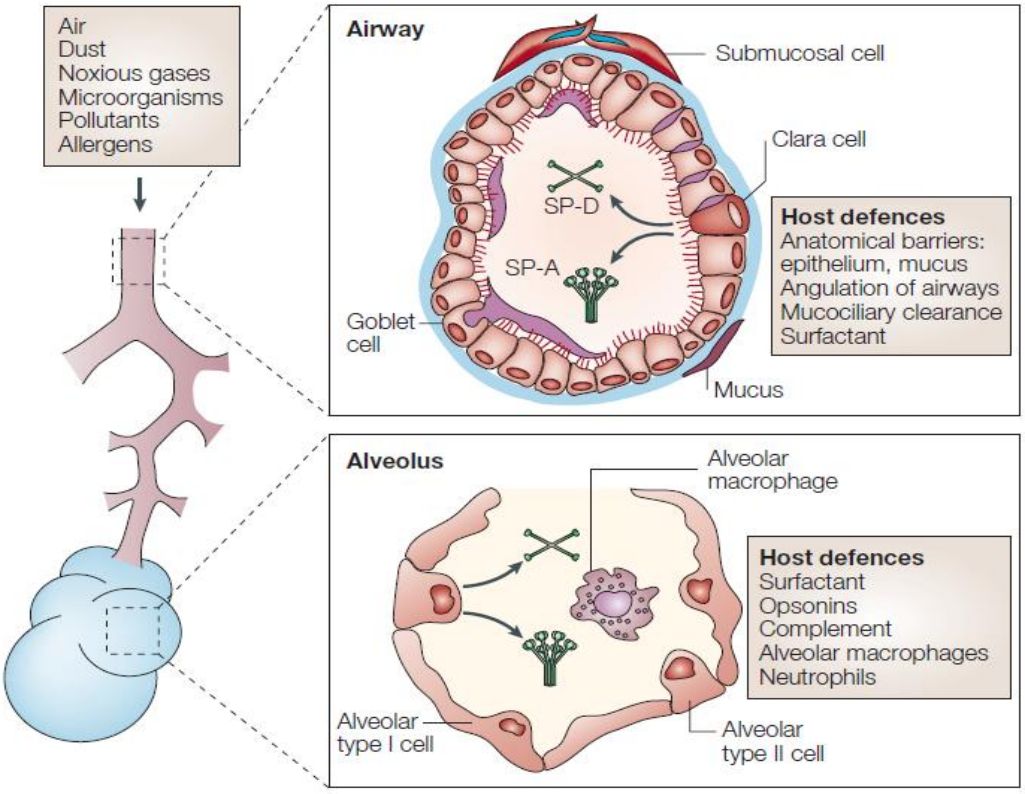


Figure 29 : Mécanismes de défense pulmonaire (Wright, 2005)
Les poumons sont des structures particulièrement exposées aux pathogènes et aux particules nocives. Leur défense est assurée par divers mécanismes mécaniques (épithélium lui-même, mucus et action des cils), plutôt spécifiques des voies aériennes hautes, ou immunologiques (protéines du surfactant, cascade du complément et cellules immunitaires résidentes) plus spécifique aux alvéoles.

Les polluants environnementaux, comme la fumée de cigarette, les aérosols acides, les métaux, les composés inorganiques et les produits de combustion, en plus d'être soupçonnés d'être responsables de maladies, sont impliqués dans l'exacerbation d'infections et de maladies allergiques pulmonaires en interférant avec les systèmes de défense pulmonaire (Gilmour et al., 2001). En particulier, les nanoparticules de dioxide de titane (TiO_2) diminuent la capacité pulmonaire à éliminer les bactéries inhalées en amoindrissant la phagocytose par les macrophages. Les hypothèses avancées sont une surcharge de particules par les macrophages, une toxicité directe des particules, qu'elles soient internalisées ou extracellulaires, ainsi que la production de médiateurs suppresseurs comme les prostaglandines et les corticostéroïdes (Gilmour et al., 2001).

d) Les interactions entre les cellules épithéliales et les cellules inflammatoires

Les cellules épithéliales jouent un rôle dans la régulation de l'inflammation des voies respiratoires en produisant des médiateurs inflammatoires comme des cytokines, des chimiokines, des acides arachidoniques et des nucléotides extracellulaires.

Les cytokines et les facteurs de croissance produits par les cellules épithéliales sont responsables de la régulation de la survie, de la prolifération ou de l'activation d'un grand nombre de populations de lymphocytes et de granulocytes lors de l'inflammation. L'IL-6 est particulièrement intéressante car elle est impliquée dans la différenciation des cellules B (Kishimoto et al., 1992), la stimulation des cellules T et le développement d'une inflammation de type Th2 (Rincón et al., 1997). L'IL-6 peut être produite en réponse à des champignons (Tomee et al., 1997) ou des virus respiratoires communs (Subauste et al., 1995). Les chimiokines sont nécessaires au recrutement des populations cellulaires de l'Immunité. Chaque type cellulaire est spécifiquement recruté par un ensemble précis de chimiokines. L'infiltration des neutrophiles sur les sites inflammatoires est une réponse commune aux bactéries (Ratner et al., 2001), champignons (Tomee et al., 1997) et virus respiratoires (Subauste et al., 1995) qui induisent tous l'expression de CXCL8 par les cellules épithéliales, en plus d'autres chimiokines (voir figure 28). Les nanoparticules, comme celles de titane, induisent également un recrutement de neutrophiles dans les voies respiratoires murines via une augmentation de la sécrétion de CXCL10 (ou KC pour Keratinocyte-derived Chemokine) (Yazdi et al., 2010). Dans le cas de RANTES (CCL5), chimiokine chimioattractante pour les éosinophiles, les challenges d'allergènes chez les patients asthmatiques induisent un recrutement d'éosinophiles corrélé avec une augmentation de la sécrétion de CCL5 dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) (Venge et al., 1996). Des chimiokines comme CXCL10 peuvent recruter des lymphocytes et des cellules NK tandis que CXCL20 peut recruter des DC immatures ce qui augmente la surveillance et la capture des antigènes. Les cellules épithéliales des voies respiratoires produisent aussi des acides arachidoniques actifs via la voie des cyclooxygénases (COX) par exemple. COX-1 et COX-2 sont exprimées constitutivement et, en réponse à des cytokines, de la bradykinine ou des polluants, l'expression de COX-2 est augmentée (Zhao et al., 2009). Les nucléotides extracellulaires jouent également un rôle important dans la défense pulmonaire.

2. Les cellules pulmonaires de l'Immunité innée

a) Les macrophages

Les macrophages constituent la population de cellules immunes la plus importante dans des poumons normaux. Ils jouent un rôle autant dans l'Immunité innée que dans l'Immunité adaptative. Les macrophages pulmonaires se situent à l'interface entre la surface respiratoire et l'environnement. Ils sont issus des monocytes ayant quitté la circulation sanguine pour entrer dans les tissus. Leur rôle est l'élimination de pathogènes, de particules étrangères et des débris issus de cellules en nécrose ou en apoptose. Ils sont activés lorsque des ligands se fixent à leurs récepteurs de surface cellulaires spécifiques et produisent alors divers médiateurs pour recruter des neutrophiles et induire une inflammation (Galli et al., 2011). Par exemple, l'IFN-γ induit une voie de signalisation

classique qui active les macrophages classiques M1. Ces macrophages ont des capacités accrues pour la phagocytose et la présentation d'antigènes mais aussi pour la production de cytokines Th1, comme l'IL-1β, l'IL-6, l'IL-12 et le TNF-α (Gordon and Martinez, 2010). C'est une toute autre voie de signalisation qui est engagée lorsque les macrophages sont stimulés avec des cytokines Th2 comme l'IL-4 et l'IL-13 impliquées dans le développement de maladies respiratoires chroniques. La voie M1 est alors bloquée et les macrophages sont activés en AAM (Alternatively Activated Macrophages) qui ont leurs propres récepteurs de surface, enzymes et protéines spécifiques (Gordon and Martinez, 2010). Suivant la définition, les AAM peuvent inclure les macrophages alternatifs M2, activés par l'IL-4 et l'IL-13, ou tous les macrophages différenciés par d'autres signaux que l'IFN-γ : activation des récepteurs Fc (FcR), activation par les glycocorticoïdes, l'IL-10, le TGF-β, ou le GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor) (Martinez et al., 2009). Les macrophages M2 ont un rôle anti-inflammatoire et participent à l'élimination de parasites extracellulaires mais ils sont également mis en cause dans le développement de maladies inflammatoires respiratoires. Les monocytes peuvent également se différencier, suivant leur microenvironnement, en d'autres catégories de macrophages suppresseurs (voir figure 30) (Galli et al., 2011). Les macrophages régulateurs, sécréteurs d'IL-10 et de TGF-β, sont induits par l'activation de leurs TLR, en présence de complexes immuns IgG. Les macrophages régulateurs, mais aussi les TAM (Tumor-Associated Macrophages) et les MDSC (Myeloid-Derived Suppressor Cells) qui constituent une sous-population de monocytes, en inhibant l'Immunité antitumorale, favorisent la croissance et la dissémination des tumeurs (Galli et al., 2011)

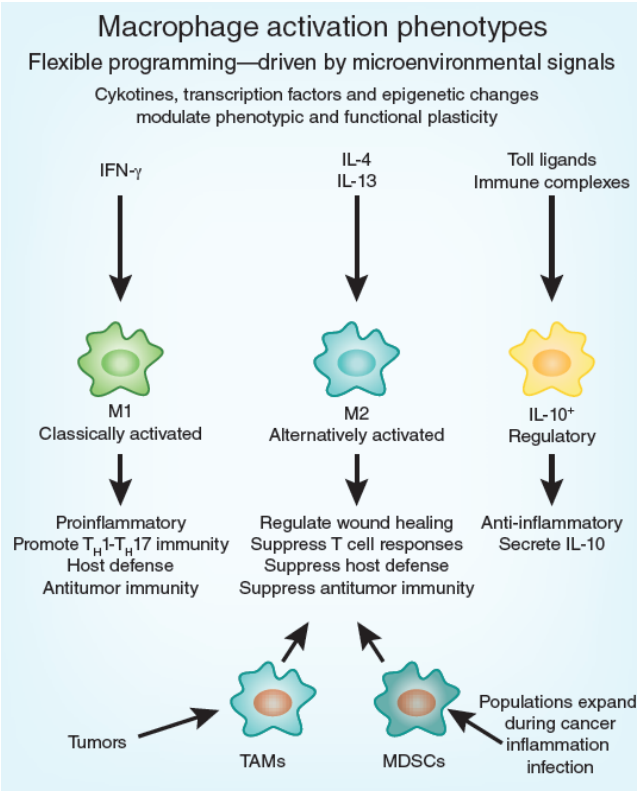


Figure 30 : Classification des macrophages selon leur phénotype fonctionnel (Galli et al., 2011)

Cependant, les macrophages démontrent une certaine plasticité : ils sont capables, suivant les signaux issus de leurs microenvironnent, de passer d'un phénotype à un autre, leur permettant ainsi de moduler l'Immunité innée et adaptative (Galli et al., 2011).

b) Les cellules épithéliales

Elles forment une barrière entre l'environnement externe et l'organisme et assurent les échanges respiratoires. Par les molécules qu'elles sécrètent, elles jouent également un rôle essentiel dans l'Immunité innée et adaptative. Elles peuvent agir directement sur les éléments nocifs et les pathogènes grâce à la production de mucus (qui joue un rôle de film protecteur mais aussi grâce à ses composés antimicrobiens) et à la clairance ciliaire mais aussi indirectement par le biais de médiateurs pro-inflammatoires (cytokines, chimiokines, acides arachidoniques, etc) qui recrutent et activent les cellules inflammatoires.

c) Les neutrophiles

Les neutrophiles représentent 50 à 75% des leukocytes circulants et sont les plus abondants phagocytes spécialisés du corps (Jandl, 1987). Ils sont libérés quasiment matures dans la circulation sanguine et sont activés par des cellules endothéliales actives sur des sites inflammatoires et / ou d'infection (Galli et al., 2011). Leur maturation se poursuit dans les tissus avec la transcription de gènes de médiateurs inflammatoires et la libération de leurs granules (Galli et al., 2011). Ils ont un rôle primordial dans la défense de l'hôte et sont souvent impliqués dans la pathogénèse de maladies inflammatoires. Leur courte durée de vie (quelques heures voire quelques jours dans la circulation) se termine souvent par l'engagement d'une mort cellulaire précise qui contribue à leur fonction inflammatoire dans les tissus où ils ont été recrutés (Galli et al., 2011). Les mécanismes antimicrobiens des neutrophiles incluent la phagocytose suivie de la mort intracellulaire, la libération d'enzymes extracellulaires et de granules antimicrobiennes et la formation de NET (Neutrophil Extracellular Trap), c'est-à-dire la création d'une matrice extracellulaire de fibres de chromatine permettant de colocaliser les pathogènes et les molécules antimicrobiennes. La phagocytose des neutrophiles est améliorée par l'opsonisation des pathogènes par la cascade du complément, des anticorps et des opsonines. Le FcR des neutrophiles et les récepteurs du complément sont essentiels. Après la fusion du phagosome avec le lysosome, les pathogènes sont tués dans le phagolysosome par la production de ROS et par des composants antimicrobiens non oxydatifs. Les neutrophiles sont également une source d'adénosine et de ses précurseurs. Ils possèdent les quatre types de récepteurs P1 (Cronstein et al., 1990; Fredholm et al., 1996; Gessi et al., 2002) et l'adénosine peut stimuler ou inhiber les fonctions des neutrophiles suivant sa concentration et le profil de récepteurs exprimés à la surface des cellules (Fredholm, 1997; Junger, 2011). L'adénosine secrétée par les neutrophiles peut inhiber la libération de CXCL8, chimioattractant des neutrophiles, par les cellules

endothéliales, ce qui permettrait aux neutrophiles de sortir de la circulation sanguine et de migrer vers des cellules ou des tissus endommagés. Le récepteur Fc est modulé par les récepteurs A_1 et A_{2B} : la fixation de l'adénosine sur A_1 augmente la phagocytose et la production de ROS par les neutrophiles tandis qu'A_{2B} supprime la production de ROS (van der Hoeven et al., 2011; Salmon, J. E. and Cronstein, B. N., 1990). Chez les neutrophiles, l'activation de A_{2A} par l'adénosine augmente l'expression de COX-2 et par conséquent la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine E_2, agent anti-inflammatoire qui inhibe le chimiotactisme des neutrophiles et la production des ROS (Cadieux et al., 2005; Pouliot et al., 2002). A_3 joue surtout un rôle dans l'induction du chimiotactisme. Il a été montré que les neutrophiles humains libèrent localement de l'ATP qui est détectée par les récepteurs P2Y2 et est ensuite rapidement dégradée par CD73 en gradient d'adénosine qui agit sur les récepteurs A_3. L'ATP détectée par P2Y2R et l'adénosine par A_3 forment une signalisation autocrine qui favorise le chimiotactisme des neutrophiles (Chen et al., 2006). Des concentrations d'adénosine de l'ordre du nanomolaire activent les récepteurs à forte affinité A_1 et A_3 qui favorisent l'attraction des neutrophiles et la phagocytose tandis que des concentrations plus faibles, de l'ordre du micromolaire, activent les récepteurs à faible affinité A_{2A} et A_{2B} qui inhibent les fonctions inflammatoires des neutrophiles. Les neutrophiles sont ainsi impliqués dans la génération d'adénosine et un grand nombre de leurs fonctions est régulé par leur environnement inflammatoire dont l'ATP et ses métabolites, en plus des chimiokines et cytokines.

Il existe une sous-population de neutrophiles particulière : les MSDC granulocytes, responsables de la suppression des cellules T chez les souris et les patients atteints de tumeurs. Cette population semble être produite ou être altérée en réponse au microenvironnement de cytokines et de facteurs de croissance particuliers des cellules tumorales (Galli et al., 2011)

d) Les NK, NKT et iNKT

Les lymphocytes NK (Natural Killers) sont des lymphocytes de l'Immunité innée circulants dans le sang, la lymphe et les tissus et qui détectent les cellules anormales ou infectées par des pathogènes (en théorie, toute cellule dépourvue de CMH de classe 1), sans nécessiter d'antigène et sans activation préalable. Contrairement aux lymphocytes, ils sont dépourvus de récepteurs spécifiques d'antigènes. Les NK humains sont des cellules $CD3^-CD56^+$. Les NK $CD16^+$ sont hautement cytotoxiques mais sécrètent peu de cytokines inflammatoires. Les NK $CD16^-$ ne peuvent pas éliminer directement des cellules cibles mais sécrètent de fortes quantités de cytokines inflammatoires (Lanier, 2008). Les NK peuvent produire par exemple de l'IFN-γ qui contribue à la polarisation des macrophages vers le phénotype M1 (Galli et al., 2011).

Les lymphocytes NKT sont un groupe hétérogène de lymphocytes T qui sont $CD3^+$ et expriment le TCRα/β ainsi que des marqueurs spécifiques aux cellules NK comme le NK1.1 pour la souris. Le

TCRα/β a une diversité très réduite et ne reconnaît pas des complexes CMH-peptides mais plutôt des lipides et des glycolipides, comme l'α-galactosylcéramide (α-Gal-Cer), présentés par une molécule présentatrice d'antigènes, le CD1d. Comme les NK, les NKT humains sont $CD16^+$ et $CD56^+$ et peuvent produire des granzymes.

Les iNKT (NKT invariants) ou NKT de type 1 sont une sous-population de lymphocytes T CD1 qui expriment le TCR et plusieurs NK. Les iNKT tiennent leur nom de l'expression pour le TCR d'une chaîne α invariante composée de 18 segments Vα14-Jα chez la souris et de 18 segments Vα24-Jα chez l'Homme, associée avec des chaînes β utilisant un nombre limité de Vβ. Ils reconnaissent des antigènes présentés par le CD1d et sécrètent des cytokines comme l'IL-4 et l'IFN-γ. Les iNKT peuvent aggraver des maladies comme l'arthrite, l'asthme allergique et l'athérosclérose.

e) Les ILC (Innate Lymphoid Cells)

Les ILC (Innate Lymphoid Cells) sont une population de cellules hétérogènes qui jouent des rôles clés dans l'Immunité innée et l'inflammation en particulier au niveau des épithéliums. Elles partagent des similitudes morphologiques, fonctionnelles et de développement avec les cellules T helper (Th) $CD4^+$ mais sans présenter de récepteurs spécifiques aux antigènes. Elles sont divisées en trois classes d'après leur profil de transcription et les cytokines exprimées :

- les cellules NK classiques ou ILC cytotoxiques. Elles nécessitent de l'IL-15 pour se développer. Elles participent à l'Immunité innée en aidant à la lutte contre les infections virales. Elles tiennent leur nom de leur capacité à tuer des cellules cibles et produisent de l'IFN-γ.
- les ILC $ROR\gamma t^+$ car expriment RORγt (RA receptor-related Orphan Receptor γt). Pour leur développement et leur survie, elles ont besoin d'IL-7 et elles peuvent produire les cytokines IL-17 et IL-22 associées aux Th17 (T helper 17). Elles éliminent plus particulièrement les bactéries.
- les ILC RORγt indépendants ou ILC2. Elles ont aussi besoin de l'IL-7. Elles produisent des cytokines de type Th2 comme l'IL-5 et l'IL-13 et elles sont plus spécialisées dans l'élimination des parasites extracellulaires. Elles peuvent aussi participer à la polarisation des macrophages suppresseurs M2 (Galli et al., 2011; Spits et al., 2013) (voir figure 31).

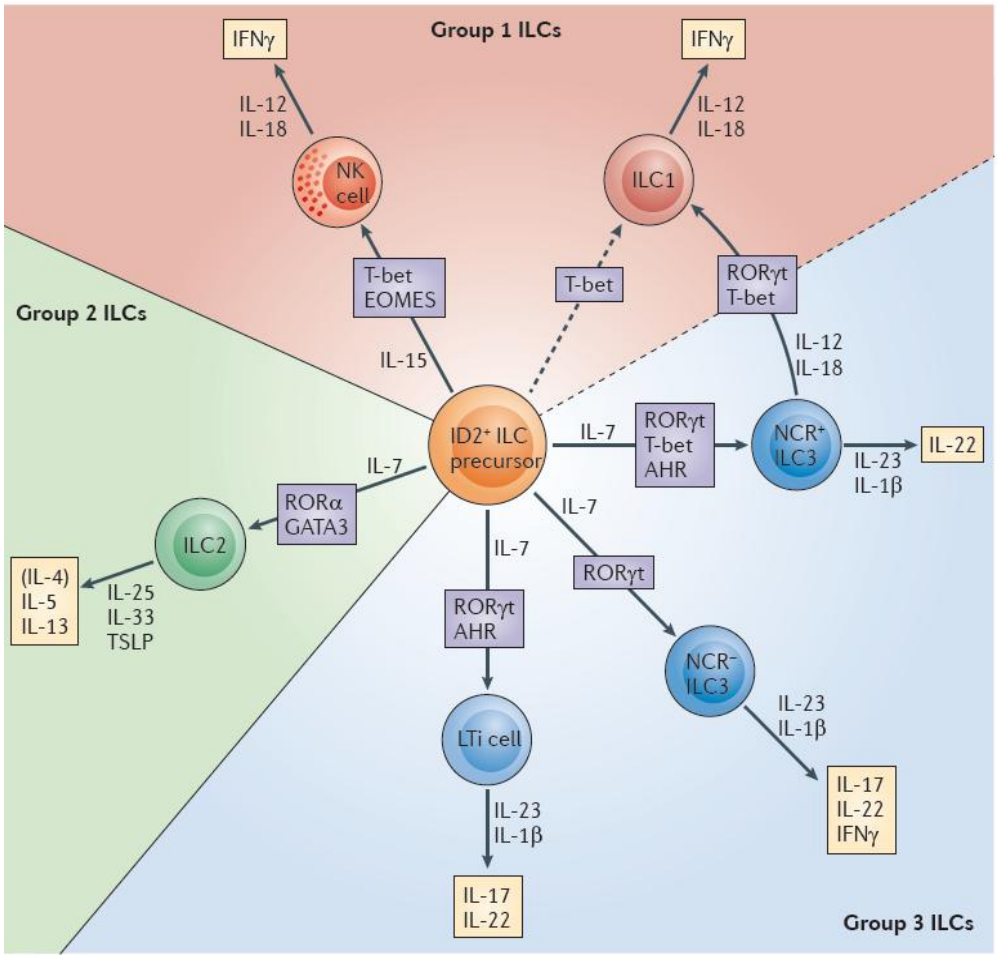


Figure 31 : Classification des ILC suivant leur phénotype (Spits et al., 2013)

Dans les pathologies de type Th2, les cellules immunes et les cytokines provoquent des dommages tissulaires et des inflammations pathologiques. L'asthme et l'allergie sont les maladies de type Th2 les plus fréquentes des voies aériennes. L'IL-25 et l'IL-33, impliquées dans les allergies respiratoires (Hvid, M. et al., 2011; Liew, F. Y. et al., 2010), affectent surtout les ILC2 qui pourraient constituer des effecteurs. Les ILC2 sont les sources principales d'IL-5 et d'IL-13, et ces cytokines sont inductrices de la voie Th2 (Halim et al., 2012). Il paraît alors raisonnable de penser que les ILC2 jouent un rôle dans les pathologies pulmonaires de type 2 comme l'asthme et les allergies (Klein Wolterink et al., 2012) et que, dans des conditions physiologiques, tout comme dans la défense contre les vers dans l'épithélium intestinal, les ILC2 ont un rôle dans l'Immunité innée de l'épithélium pulmonaire.

f) Les cellules dendritiques (DC)

Les DC jouent un rôle clé dans l'Immunité par leur rôle de sentinelle grâce à leur PRR mais également grâce à leurs récepteurs à divers médiateurs inflammatoires dont la prostaglandine, l'ATP et l'acide urique. Elles peuvent également stimuler les cellules de l'Immunité innée puis initier une réponse immune spécifique de l'agent étranger en migrant aux ganglions lymphatiques pour y présenter des antigènes aux lymphocytes T naïfs. Ces différentes capacités placent les DC à l'intersection de l'Immunité innée et de l'Immunité adaptative dans les poumons.

Suivant leur origine, leur localisation et leur fonction, les DC sont classées en au moins cinq populations différentes (Hammad and Lambrecht, 2011). En homéostasie, sont retrouvées dans les voies respiratoires des DC résidentes intraépithéliales $CD11c^{hi}CD11b^{+}$ capables de projeter leurs dendrites dans le lumen ainsi que des DC résidentes dans la lamina propria $CD11c^{hi}CD11b^{-}$ qui sont une source de chimiokines proinflammatoires. De la même façon, les DC interstitielles de la région distale des poumons peuvent également être divisées en populations $CD11c^{hi}CD11b^{+}$ et $CD11c^{hi}CD11b^{-}$. L'espace alvéolaire abrite aussi des DC $CD11c^{hi}$. Toutes ces populations $CD11c^{hi}$ sont regroupées sous le terme de DC conventionnelles (cDC) par opposition aux DC plasmacytoïdes (pDC) qui sont $CD11c^{int}$ et dont la localisation est moins tranchée. Lors d'une inflammation pulmonaire, des DC $CD11b^{+}$ dérivées de monocytes sont recrutées dans les voies respiratoires. Lors d'infections virales, des IKDC (Interferon-producing Killer DC) peuvent aussi être recrutées (voir figure 32). Les DC résidentes sont majoritairement dérivées, non pas de progéniteurs des organes lymphoïdes centraux, mais de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells). De plus, les différentes sous-populations de DC dérivent également de différentes sous-populations de monocytes (Lambrecht and Hammad, 2009).

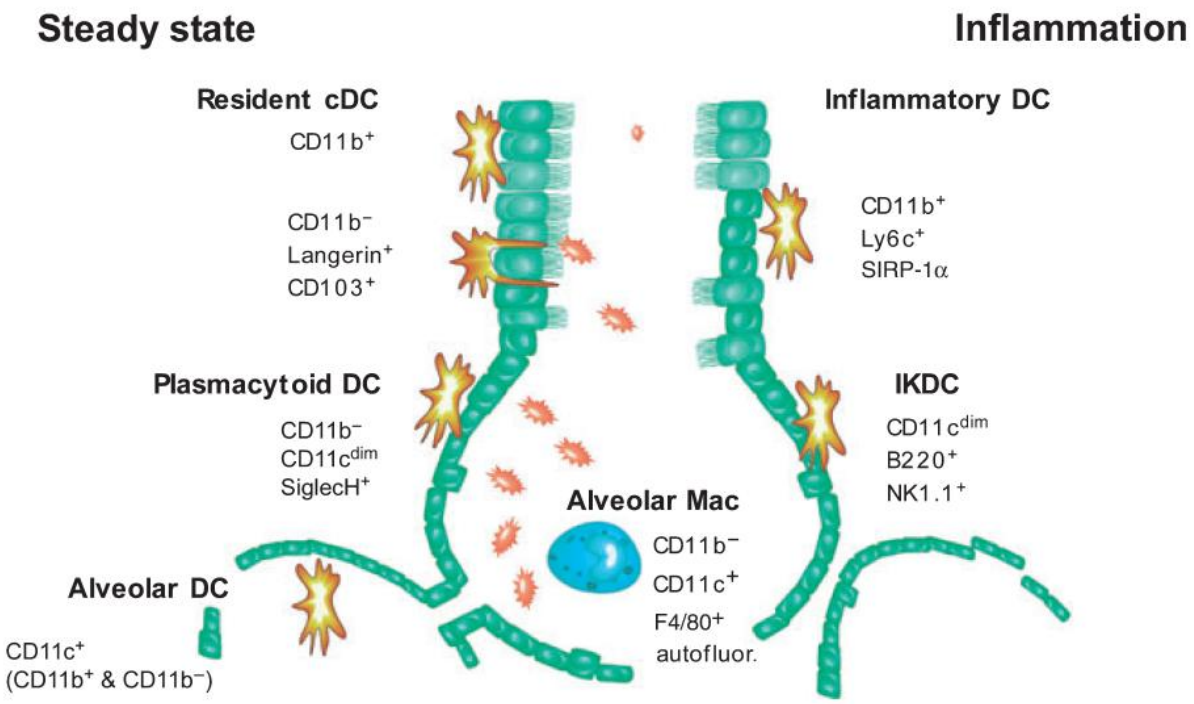


Figure 32 : Les différentes populations de DC pulmonaires (Hammad and Lambrecht, 2011)
Les DC sont physiologiquement présentes dans les poumons en tant que sentinelles du système immunitaire. Lors d'une inflammation de nouvelles populations de DC sont recrutées dans les voies respiratoires.

Même si les DC expriment des PRR tels que les TLR, les NLR et les CLR, il a été montré, dans les modèles d'allergie pulmonaire, que leur recrutement, leur activation et leur migration intraépithéliales nécessitent la voie de signalisation TLR4 des cellules épithéliales pulmonaires (Lambrecht and Hammad, 2012). L'activation des cellules épithéliales est à l'origine d'une production

de chimiokines qui attirent les DC immatures ou les monocytes précurseurs dans les poumons où ils se différencient rapidement en DC inflammatoires (Hammad and Lambrecht, 2011).

C. L'inflammation pulmonaire

1. L'inflammation

Décrite par Celsus il y a plus de 2000 ans, une inflammation se visualise classiquement par quatre signes : rougeur, chaleur, gonflement et douleur. L'inflammation est une réponse aiguë aux infections et aux dommages tissulaires afin de limiter les dégâts au corps en éliminant les pathogènes et en retirant les débris cellulaires (Medzhitov, 2008). Cette réponse immunitaire classée comme adaptative a été particulièrement bien caractérisée pour les infections microbiennes détectées par des récepteurs de l'Immunité innée, dont les TLR et les NLR. L'inflammation n'est pas seulement induite par des pathogènes, mais aussi par des endommagements stériles, une stimulation excessive des mastocytes et des nerfs (Steinhoff et al., 2000) ou la mort cellulaire. La mort cellulaire par nécrose induit rapidement un recrutement de neutrophiles suivi par une accumulation de monocytes.

Les premières cellules impliquées sont les macrophages résidents et les mastocytes qui vont produire des médiateurs inflammatoires variés : des cytokines, des chimiokines, des amines vasoactives (histamine, sérotonine), des éicosanoïdes (à partir de l'acide arachidonique) et des produits de cascades protéolytiques. Ces médiateurs induisent le recrutement de protéines plasmatiques et de leukocytes (principalement des neutrophiles) sur le site inflammatoire. Le recrutement des leukocytes circulants dans le sang est permis par la liaison des sélectines des cellules endothéliales avec les intégrines des leukocytes ainsi que par chimiotactisme (Pober and Sessa, 2007). Arrivés sur le site inflammatoire, les leukocytes sont activés par contact direct avec des pathogènes ou via les cytokines sécrétées par les cellules résidentes. Les neutrophiles activés libèrent alors le contenu de leur cytosol : ROS, protéinase 3, cathepsine G et élastase qui, n'étant pas sélectifs, endommagent aussi bien les pathogènes que les cellules de l'hôte (Nathan, 2002, 2006). Dans la plupart des cas, la réponse inflammatoire aiguë aboutit à la destruction des pathogènes et précède une phase de réparation principalement induite par les macrophages résidents et recrutés. De nouveaux médiateurs font leur apparition : des lipoxines, des résolvines et des protectines. Ces médiateurs inhibent le recrutement des neutrophiles et permettent le recrutement de monocytes qui vont éliminer les cellules mortes et initier le remodelage tissulaire.

2. L'inflammation aiguë

Immédiatement après un endommagement des cellules pulmonaires, une phase inflammatoire aiguë est initiée par la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNFα. Les cellules progénitrices résidentes proches prolifèrent et migrent pour recouvrir rapidement la lésion en quelques heures. Une barrière constituée de cellules squameuses non différenciées est ainsi rapidement mise en place ce qui limite le passage de substances, particules ou microorganismes de l'environnement dans le corps. Les cellules progénitrices recrutées prolifèrent, commencent à se différencier et à restaurer l'endommagement (Erjefält et al., 1995, 1997) (voir figure 33). Contrairement à l'épithélium intestinal, en conditions physiologiques, le renouvellement cellulaire des cellules épithéliales des voies respiratoires est très long : six mois pour une cellule épithéliale de la trachée et dix-sept mois pour une cellule épithéliale des poumons (Roth et al., 2012). Cependant, dans un contexte d'endommagement, la prolifération cellulaire est exacerbée, et la fonction de barrière et les proportions cellulaires sont rapidement restaurées (Hong et al., 2004; Rawlins et al., 2009; Rock et al., 2009).

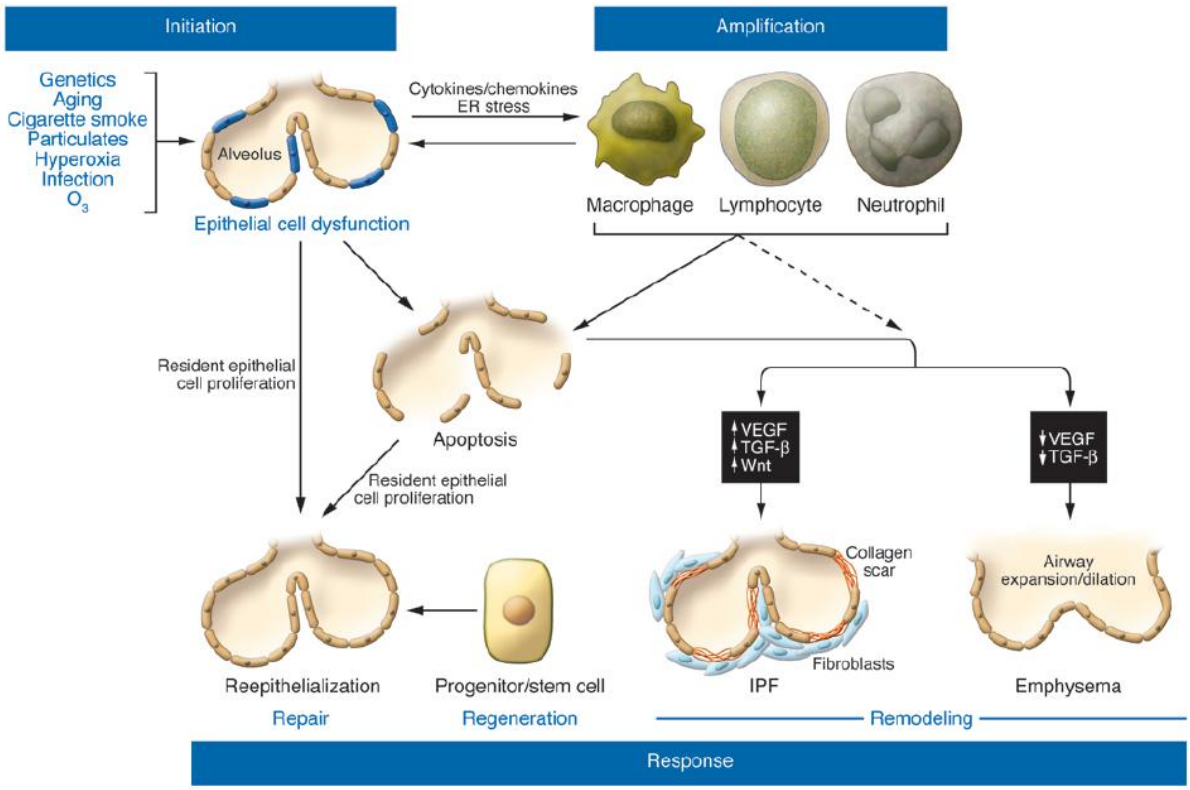


Figure 33 : Modèle d'inflammation / réparation de l'épithélium pulmonaire (Beers and Morrisey, 2011)

Tout stress ou endommagement de l'épithélium pulmonaire induit une réponse :

- une prolifération des cellules épithéliales résidentes pour une réparation et / ou une différenciation des cellules progénitrices pour une régénération tissulaire
- une entrée en apoptose des cellules épithéliales abîmées, phénomène non inflammatoire, laissant les cellules épithéliales résidentes et les progéniteurs prendre le relais
- une activation et un recrutement des cellules inflammatoires par la libération de signaux de danger et de cytokines et chimiokines. Des endommagements répétés ou une apoptose persistante peuvent induire un remodelage des voies respiratoires. Il peut s'agir d'une multiplication excessive de fibroblastes avec une

sécrétion exagérée de collagène par exemple lors d'une Fibrose Pulmonaire Idiopathique (FPI). A l'inverse, il peut y avoir perte ou destruction des cellules, c'est le cas de l'emphysème. Lors de ces deux types de pathologies, la fonction respiratoire des parties pulmonaires affectées est perdue.

Le temps de régénération de l'épithélium en une barrière complètement fonctionnelle dépend de la gravité de l'endommagement mais aussi du type d'épithélium affecté : l'épithélium pseudo-stratifié prend davantage de temps à être réparé que la simple couche de cellules des bronchioles.

Il pourrait y avoir, dans les voies respiratoires, pas une, mais plusieurs populations de progéniteurs, spécifiques de régions spatiales (Rawlins et al., 2009). C'est le cas d'une partie des cellules de Clara, dites variantes (Clara^{var}) et qui semblent être capables de repeupler l'épithélium des bronches (Reynolds et al., 2000). Les cellules de Clara sont aussi capables de générer un épithélium cilié après un endommagement ce qui ferait de ces cellules une des sources de cellules progénitrices (Rawlins et al., 2009). Dans les alvéoles, les AEC2 peuvent également agir comme des progéniteurs facultatifs et sont capables de remplacer les AEC2 endommagés ou de se différencier en AEC1 après une lésion pulmonaire (Adamson and Bowden, 1975).

3. L'inflammation chronique

Le processus normal de l'inflammation conduit suite à l'infection ou à l'endommagement, à la restauration et à la réparation tissulaires. Cependant, s'il y a un déséquilibre dans les phases de destruction ciblée et de réparation / remodelage contrôlée, l'inflammation peut aboutir à un dommage tissulaire récurrent par les leukocytes, les lymphocytes et / ou le collagène. L'infiltration dans les tissus d'agrégats de lymphocytes et de leukocytes forme des granulomes parfois accompagnés de fibroblastes synoviaux proliférants ou d'une perte de la structure tissulaire avec un dépôt excessif de fibres de collagène (fibrose). L'ADN peut même être suffisamment oxydé pour être à l'origine de transformations néoplasiques.

Ces inflammations chroniques ne semblent pas être induites par l'infection ou les dommages tissulaires directement mais plutôt par la dérégulation d'un ou plusieurs systèmes physiologiques qui ne sont pas directement reliés à la défense de l'hôte ou à la réparation tissulaire (Medzhitov, 2008). L'inflammation chronique pulmonaire peut aboutir à des conséquences désastreuses pour l'organisme, avec pour cas extrêmes le développement de pathologies sévères et sans autres traitements à l'heure actuelle que la greffe pulmonaire, comme c'est le cas chez les patients atteints de fibrose (multiplication excessive des cellules) ou d'emphysème (destruction et perte des cellules) (voir figure 33). Ces deux pathologies aboutissent progressivement à une perte complète de la fonction respiratoire. Ces changements de structures des voies aériennes sont qualifiés de remodelage.

4. Le microbiote pulmonaire

Bien que les poumons soient considérés comme stériles en conditions physiologiques, des études récentes montrent que les voies aériennes abritent des bactéries résidentes (Marsland, 2013). Il semblerait également que la charge et la diversité bactériennes diffèrent entre des individus sains et des patients atteints d'asthme ou de COPD. Chez les souris axéniques (dites « germ-free »), l'absence de microbiote conduit à l'activation dérégulée des cellules dendritiques et des macrophages pulmonaires ainsi qu'à des réponses inflammatoires pulmonaires biaisées (Marsland, 2013). Ces découvertes étant récentes, les origines de la colonisation ainsi que les rôles fonctionnels de ce microbiome restent à identifier (Gollwitzer and Marsland, 2013; Marsland, 2013). Néanmoins, le rôle du microbiote des voies respiratoires pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes des réponses inflammatoires pulmonaires.

5. L'exposition des voies respiratoires aux nanoparticules

Les nanoparticules sont définies comme de la matière d'une taille comprise entre 1 et 100 nm. Elles existent à l'état naturel (dans les cendres volcaniques par exemple) ou sont le résultat de l'activité humaine (manufacturation ou polluants). Elles suscitent un fort engouement dans plusieurs domaines, de part leurs propriétés innovantes conférées par leur taille (en particulier, l'augmentation du ratio surface sur volume par rapport à des matériaux de même composition mais de taille micrométrique ou millimétrique). Dans l'industrie, elles sont largement utilisées dans divers domaines comme l'automobile, l'électronique, le bâtiment mais également l'alimentaire. Elles font aussi l'objet de travaux dans la recherche médicale, surtout dans le but d'être utilisées comme vecteurs de traitements. Les nanoparticules à base de carbone sont aussi un polluant environnemental issu de la combustion (par exemple des pots d'échappement des véhicules diesel). Les particules de la pollution ambiante sont connues pour induire des effets indésirables sur la santé et, en particulier, aggraver des pathologies respiratoires déjà établies comme l'asthme et les COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Diseases) (Hussain et al., 2010). Même si le carbone ou le titane sont considérés comme des particules chimiquement inertes, à la taille nanométrique ils peuvent induire une réponse inflammatoire chez le rat et la souris (Chen et al., 2009; Muller et al., 2005). Cette utilisation en pleine expansion a mené à des questions sur des risques potentiels pour la santé humaine et l'environnement dès les années 1990. L'étude de la toxicité potentielle des nanomatériaux est à l'origine d'un nouveau champ disciplinaire, la nanotoxicologie. Les rapports nanotoxicologiques sont souvent contradictoires et les relations entre les cellules et les nanoparticules encore mal comprises. Il a été fait état que la cytotoxicité des nanomatériaux dépend de la composition et de la taille des nanoparticules ainsi que du type cellulaire exposé (Rabolli et al.,

2010; Sohaebuddin et al., 2010). Ce qui, dans un contexte où les populations humaines sont mises en contact avec des nanoparticules aux compositions hétérogènes, rend les études très complexes.

Il a été montré que les nanoparticules ont la capacité de franchir la barrière épithéliale. De même, les nanoparticules inhalées peuvent passer outre le mécanisme de clairance ciliaire et atteindre les alvéoles pulmonaires pour entrer dans la circulation sanguine et entrer dans d'autres organes (Hackenberg et al., 2010). Certaines nanoparticules peuvent activer l'inflammasome NLRP3 et induire une inflammation pulmonaire caractérisée par un recrutement de neutrophiles et une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Yazdi et al., 2010). Les cellules de mammifères, comme les macrophages et les AEC1, peuvent internaliser les nanoparticules dont certaines induisent la production de ROS qui pourraient provenir de deux sources : soit de la chaîne respiratoire mitochondriale soit de l'oxydation des nanoparticules elles-mêmes (VanWinkle et al., 2009). L'internalisation des nanoparticules dans les voies respiratoires semble être modulée par le surfactant pulmonaire (Vranic et al., 2013). L'activation de l'inflammasome NLRP3 après internalisation de nanoparticules, éventuellement via les ROS produites, peut aussi induire une pyroptose (Reisetter et al., 2011). Il a également été montré que les nanoparticules peuvent induire une apoptose des cellules après stimulation de cellules épithéliales bronchiques ; via des ROS mitochondriaux pour le carbone et via une déstabilisation des lysosomes pour le dioxyde de titane (Hussain et al., 2010). Dans cette étude, la réponse proposée pour expliquer ces différences tient à la nature chimique des nanoparticules. Le dioxyde de titane semble également provoquer, en plus du stress oxydatif et d'une apoptose, une génotoxicité *in vitro* (Hackenberg et al., 2010; Park et al., 2008). Une étude montre qu'administrées en intra-péritonéal à des doses très élevées, les nanoparticules de titane peuvent provoquer la mort des animaux (Chen et al., 2009). L'accumulation des nanoparticules dans la cavité abdominale associée à des lésions de divers organes internes révèle, dans ce contexte, une toxicité aiguë.

Les nanoparticules d'oxydes de métaux sont parmi les plus utilisées. Dans nos travaux, nous étudions l'inflammation provoquée par les nanoparticules de dioxyde de titane et de dioxyde de silice, mais pas par celles d'oxyde de zinc. A l'exception du dioxyde de silice dont la taille est comprise entre 10 et 20 nm, les autres particules sont calibrées à 20 nm. Le dioxyde de titane est un minéral tétragonal qui peut se présenter sous la forme anatase, rutile ou brookite. Ces formes, de même composition chimique, diffèrent par leur structure cristalline. L'anatase, que nous utilisons, est principalement employée comme pigment ou agent opacifiant dans divers matériaux comme la peinture, le papier, le dentifrice, les produits cosmétiques, …. Les nanoparticules de silice sont développées pour leur potentiel dans des applications biomédicales et biotechnologiques (Hernández-Ortiz et al., 2012). La silice peut se présenter sous forme cristalline ou de silice amorphe qui semblent différer en terme de biocompatibilité (Hernández-Ortiz et al., 2012). Les nanoparticules de silice que nous utilisons

contiennent de la silice cristalline. L'oxyde de zinc, que nous utilisons comme contrôle négatif *in vitro*, est retrouvé dans la composition d'aliments et de crèmes solaires.

Les interactions entre les protéines et les nanoparticules sont de plus en plus étudiées pour la nanomédecine et la nanotoxicité. Cette couche dynamique de protéines ou d'autres molécules biologiques dépend de la composition, de la taille et de la surface des nanomatériaux (Hernández-Ortiz et al., 2012). L'exposition pulmonaire aux nanoparticules pourrait gravement impacter la santé en induisant notamment la formation de granulomes, une inflammation des bronches, une fibrose interstitielle progressive, des réponses inflammatoires chroniques, un stress oxydatif, des lésions de la plèvre et des mutations de gènes (Ferreira et al., 2013). Par leur facilité à franchir les barrières du corps, les nanoparticules peuvent se retrouver dans des organes ou des tissus différents de leur voie d'entrée (cutanée, voies respiratoires ou ingestion) (voir figure 34).

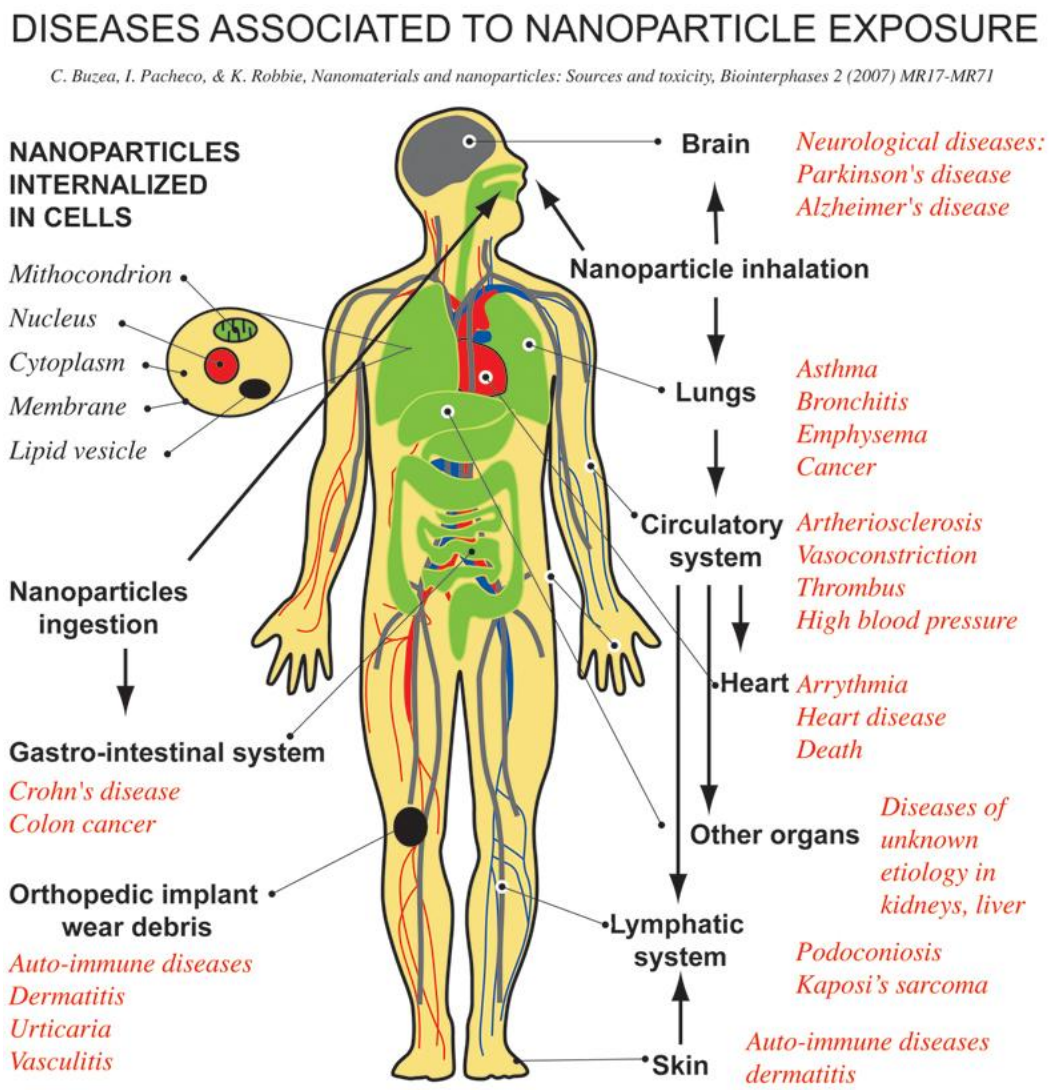


Figure 34 : Maladies associées à l'exposition aux nanoparticules (Buzea, 2007)
Une des principales voies d'entrée des nanoparticules est le système respiratoire d'où, via le système circulatoire et / ou lymphatique, elles peuvent parvenir à divers organes comme le cerveau ou le cœur. D'autres voies d'entrée peuvent être prises en compte comme l'ingestion ou la voie cutanée. Plusieurs études font état de maladies associées ou aggravées par les nanoparticules.

OBJECTIFS

Les travaux de ma thèse ont eu pour objectif d'aller plus en avant dans la compréhension des mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3. En effet, malgré une bibliographie de plus en plus documentée sur les inflammasomes en général, sur leurs activateurs et les voies de signalisation engagées, le ou les processus exacts qui enclenchent la formation de ces complexes cytoplasmiques sont encore sujets à débats. L'inflammasome NLRP3, le plus étudié encore à l'heure actuelle, a révélé, et révèle encore, une incroyable diversité dans ses activateurs. De part leur différences structurelles et chimiques, ils incitent à penser qu'il ne peut pas s'agir d'une activation directe entre agonistes et région LRR des récepteurs NLRP3 mais plutôt que l'inflammasome détecte des produits ou des différences physiologiques de la cellule en réponse aux toxines bactériennes, polluants environnementaux et signaux de danger. Au fur et à mesure de l'avancée de la recherche, deux axes principaux ont été mis en évidence. Le premier est la déstabilisation des phagolysosomes qui résulte de l'internalisation de particules, généralement des polluants externes difficilement dégradés par les phagocytes, et qui aboutit à la libération dans le cytoplasme de ROS et d'enzymes lysosomales (Hornung et al., 2008). Le deuxième est une perméabilisation de la membrane plasmique et / ou la signalisation de l'ATP extracellulaire via le récepteur purinergique P2X7 qui aboutit à des changements dans les flux ioniques de la cellule (Cruz et al., 2007; Zhou et al., 2010a). Ces mécanismes seraient ce qui permet d'enclencher la formation de l'inflammasome NLRP3 et, au final, la maturation de cytokines pro-inflammatoires sécrétées dans le milieu extracellulaire pour engager une réponse inflammatoire, locale ou systémique, de l'organisme.

Mon étude s'est portée sur le poumon, organe aussi complexe qu'intéressant, qui doit concilier deux fonctions à la limite de l'antagonisme : présenter une surface d'échange respiratoire la plus grande possible et assurer la défense de l'organisme contre tout intrus venant de l'environnement externe.

J'ai commencé ma thèse par l'étude des cristaux de MonoSodium d'Urate (MSU), de silice, d'Alum et d'allopurinol, comme contrôle. Ces particules, à l'exception de l'allopurinol, ont été décrites comme inflammatoires (Dostert et al., 2008; Eisenbarth et al., 2008; Martinon et al., 2006) car activent l'inflammasome NLRP3. Elles ont été choisies pour leur diversité : le MSU en tant que constituant endogène de l'organisme, la silice comme polluant externe pouvant être à l'origine d'une fibrose pulmonaire si inhalée et l'Alum qui est un adjuvant universel. Nous avons également étudié le rôle de l'ATP, comme signal de danger, et de ses récepteurs purinergiques dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Riteau et al., 2010).

J'ai ensuite élargi la thématique aux nanoparticules qui sont définies comme des composés naturels, manufacturés ou résultants de pollutions, d'une taille comprise entre un et cent nanomètres. Elles peuvent être retrouvées dans l'air ambiant, et de par leur petite taille, parviennent à franchir les

différentes barrières de l'organisme, avec plus ou moins de facilité (Chen et al., 2009; Hackenberg et al., 2010). Leur intégration dans des produits de la vie courante ou industriels a fait l'objet d'un fort engouement lors de la découverte que l'augmentation du ratio surface sur volume confère aux nanoparticules des propriétés particulièrement innovantes. Des études sérieuses sur les risques potentiels pour la santé humaine et l'environnement sont menées (une nouvelle discipline, la nanotoxicologie (Oberdörster et al., 2005)) et une augmentation de la fréquence des maladies respiratoires a été relevée pour des travailleurs exposés aux particules de titane (Garabrant et al., 1987). Comme les nanoparticules les plus fréquemment utilisées sont les métaux inorganiques, et en particulier le dioxyde de titane (TiO_2) et le dioxyde de silice (SiO_2), ce sont celles-ci qui sont utilisées dans mes travaux, avec les nanoparticules de zinc (ZnO) comme contrôle. Une étude précédemment publiée en collaboration par l'équipe (Yazdi et al., 2010) montre que les nanoparticules de SiO_2 et de TiO_2, mais pas de ZnO, activent l'inflammasome NLRP3 et qu'*in vivo*, l'inhalation de TiO_2 induit une inflammation pulmonaire caractérisée par une sécrétion des Interleukine-1α (IL-1α) et Interleukine-1β (IL-1β).

Mon axe de travail a été étendu à l'implication de l'IL-33 et de son récepteur ST2 dans la réponse inflammatoire aux nanoparticules. L'IL-33 est une cytokine pro-inflammatoire de type Th2 (T helper type 2) donc plutôt impliquée dans les maladies comme l'asthme allergique (Kearley et al., 2009). Cependant, comme il a été montré que l'IL-33, associée à la chaine ST2 soluble, peut avoir un effet anti-inflammatoire (Smith, 2010; Tajima et al., 2003), nous nous sommes intéressés à l'implication éventuelle de l'IL-33 dans une modulation de l'inflammation induite par les nanoparticules. De plus, une étude a montré que cette cytokine de la famille de l'IL-1 est libérée comme signal de danger dans des modèles d'endommagement pulmonaire caractérisés par une infiltration de neutrophiles (Lefrançais et al., 2012). Ce qui se révèle particulièrement intéressant dans notre modèle d'inflammation pulmonaire en réponse aux nanoparticules avec recrutement de neutrophiles.

Afin de répondre à ces différents axes, nous avons utilisé un modèle *in vivo* d'instillation des nanoparticules chez la souris ainsi que différentes cultures de cellules primaires murines et de lignées de monocytes humains. Dans le modèle murin d'inflammation pulmonaire, des souris sauvages C57BL/6 ou déficientes (« knock-out ») pour des gènes d'intérêt (récepteurs purinergiques, cytokines inflammatoires,…) sont anesthésiées afin de leur administrer en intranasal des solutions de nanoparticules de SiO_2 ou TiO_2 et de mimer l'exposition respiratoire. Les animaux sont ensuite sacrifiés six ou vingt-quatre heures après, le temps qu'une réponse inflammatoire s'installe. Différents paramètres comme les cytokines, les chimiokines et les recrutements cellulaires sont étudiés dans les poumons. Des cultures de macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris sauvages ou « knock-out » ainsi que les THP-1, lignée de monocytes/macrophages humains, sont stimulées avec des micro- et nano- particules, en présence ou non d'agonistes, d'inhibiteurs ou

d'enzymes d'intérêt. Après trois, quatre ou six heures de stimulation (suivant le type cellulaire et les particules), la concentration d'IL-1β est mesurée dans le surnageant.

Au cours de ces recherches, nous avons montré qu'en réponse aux microparticules, l'inflammasome NLRP3 est activé grâce à la sécrétion d'ATP extracellulaire libérée par des hémicanaux de type pannexines et connexines et la signalisation via les récepteurs purinergiques P2X. L'ADP, métabolite issu de la dégradation de l'ATP extracellulaire, joue également un rôle important en activant les récepteurs purinergiques de type P2Y. Nous mettons ainsi en évidence que des particules aussi différentes que le MSU, la silice et l'Alum activent l'inflammasome NLRP3 par une voie d'activation commune qui nécessite de l'ATP, de l'ADP, des hémicanaux et des récepteurs purinergiques P2X et P2Y.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que l'inflammation induite par les nanoparticules de SiO_2 et de TiO_2 nécessite un métabolite de l'ATP aussi important que l'ATP lui-même ou l'ADP, l'adénosine. L'adénosine extracellulaire signale via des récepteurs purinergiques P1 composés d'A_1, A_{2A}, A_{2B} et A_3. L'adénosine joue un rôle régulateur dans l'inflammation en tendant à la diminuer et passe principalement par les récepteurs A_{2A} et A_{2B}.

Pour terminer, même si l'inflammation par les nanoparticules induit une réponse de type Th1, nous émettons l'hypothèse que l'axe IL-33/ST2 a également un rôle modulateur. S'il y a une déficience en IL-33 ou ST2, l'inflammation est exacerbée mais une quantité excessive de ces éléments induit une réponse de type Th2 avec une éosinophilie. Ceci ferait penser à une balance étroitement régulée : l'IL-33 tend à diminuer la réponse inflammatoire aux nanoparticules de SiO_2 et de TiO_2 mais l'IL-33 en excès exacerbe l'inflammation.

L'ensemble de ces données permet de proposer l'adénosine et l'IL-33 comme cibles potentielles pour des traitements aux maladies inflammatoires pulmonaires.

RESULTATS

1ère partie : Mécanisme commun d'activation de l'inflammasome NLRP3 par les microparticules : libération d'ATP et signalisation purinergique (Article 1)

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

Nicolas Riteau*, **Ludivine Baron***, Bérengère Villeret, Noëlline Guillou, Florence Savigny, Bernhard Ryffel, François Rassendren, Marc Le Bert, Aurélie Gombault* and Isabelle Couillin*

*These authors contributed equally to this work.
Cell Death and Disease, 2012, 3, e403.

L'inflammasome est une plateforme multi-protéique cytoplasmique décrite pour la première fois par Jürg Tschopp en 2002 (Martinon et al., 2002). Il permet de détecter des pathogènes, des polluants externes ou des signaux de danger (DAMP) endogènes et d'induire la maturation de cytokines pro-inflammatoires ou de déclencher la mort de la cellule. L'inflammation induite par les DAMP est dite « stérile » car elle n'est pas induite par des pathogènes mais par des molécules appartenant au « soi ». L'inflammasome NLRP3 a la particularité de reconnaître une grande diversité de ligands structurellement très différents et ses mécanismes d'activation sont encore débattus. Une fois activés par ces ligands, les récepteurs NLRP3 s'oligomérisent, recrutent une protéine adaptatrice ASC puis une protéine effectrice, la caspase-1 qui clive la pro-IL-1β en IL-1β, une cytokine hautement inflammatoire sécrétée par les cellules.

Notre choix d'agonistes de l'inflammasome NLRP3 s'est porté sur des micro-cristaux endogènes comme le MSU (Martinon et al., 2006) ou exogènes, ici la silice (Dostert et al., 2008) et l'Alum (Eisenbarth et al., 2008). L'acide urique est un produit du catabolisme des purines. En excès, il peut former des cristaux de MSU dans les articulations ce qui est à l'origine d'une maladie inflammatoire communément appelée goutte. L'inhalation de silice, difficilement éliminée des poumons et donc responsable de stimuli persistants, peut à la longue aboutir à une fibrose appelée silicose (Huaux, 2007). Les sels d'aluminium (Alum) constituent l'adjuvant vaccinal le plus employé au monde. Un adjuvant vaccinal est une substance non antigénique mais qui, administrée en même temps que l'antigène, permet d'accélérer, de prolonger ou d'augmenter la réponse immune spécifique à l'antigène (Vogel, 1995).

Il a été montré que la pannexine-1 est un hémicanal non sélectif recruté et ouvert suite à l'activation de P2X7 ce qui forme un pore (Pelegrin and Surprenant, 2006). Les hémicanaux formés par les pannexines ou connexines peuvent s'ouvrir en réponse à des stimuli physiologiques et

pathologiques, lorsqu'ils ne forment pas des jonctions gap. Une fois ouverts, ils sont perméables à de grosses molécules comme l'ATP (Eltzschig et al., 2006; Pelegrin and Surprenant, 2006).

Les microparticules sont internalisées par les phagocytes professionnels que sont les macrophages. Cependant, elles sont peu, ou pas, dégradées par la cellule ce qui résulte en un phénomène de « frustration » des phagolysosomes avec pour conséquence une déstabilisation lysosomale. Les lysosomes libèrent alors dans le cytoplasme leur contenu, et en particulier des ROS et de la cathepsine B, et induisent un efflux de potassium. Par des mécanismes encore à éclaircir l'inflammasome NLRP3 est activé : les récepteurs NLRP3 s'oligomérisent, recrutent des protéines adaptatrices ASC qui recrutent des protéines effectrices caspase-1 ce qui permet la maturation de la cytokine pro-inflammatoire IL-1β.

Avec des monocytes humains dérivés en macrophages (lignée THP-1), nous montrons que l'internalisation des microparticules est essentielle pour la sécrétion d'IL-1β et induit une libération d'ATP extracellulaire (ATPe) ce qui constitue un DAMP. L'implication des protéases à cystéine et de la cathepsine B est vérifiée et confirmée. Des inhibiteurs spécifiques du récepteur purinergique P2X7 et des connexines et pannexines diminuent les libérations d'IL-1β et d'ATPe en réponse aux cristaux. La diminution de l'IL-1β avec ces inhibiteurs et avec le blocage des récepteurs purinergiques P2Y est également démontrée pour la stimulation de macrophages murins dérivés de la moelle osseuse (BMDM). Cependant, les BMDM issus de souris déficientes pour les gènes de P2X4, P2X7 et P2Y2 ne présentent pas de différence significative en termes de sécrétion d'IL-1β comparés aux BMDM de souris sauvages. Ces données suggèrent une implication redondante des récepteurs purinergiques.

L'utilisation d'apyrase grade VII, qui dégrade à la fois ATP et ADP, entraîne une inhibition importante de la sécrétion d'IL-1β par les BMDM en réponse à la silice. De plus, la sécrétion d'IL-1β résultante des microparticules est augmentée en présence d'ATP, d'ADP et d'UTP (agoniste des P2Y), sans que ces nucléotides induisent une réponse sécrétrice à eux seuls. Ces résultats démontrent l'implication de l'ATP, de l'ADP et de l'UTP dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les cristaux.

Au cours de cette étude, nous avons montré que les cristaux activateurs de l'inflammasome NLRP3 vont premièrement induire une libération d'ATP dans le milieu extracellulaire via des hémicanaux, soit des pannexines et connexines. L'ATPe active des récepteurs purinergiques et en particulier le récepteur P2X7 capable de recruter la pannexine-1 et donc d'amplifier le signal par une boucle autocrine. L'ATP est également dégradée dans le milieu extracellulaire en ADP qui peut activer des récepteurs purinergiques P2Y. Nous mettons en évidence que cette signalisation purinergique débutant par la libération d'ATP extracellulaire par des hémicanaux est essentielle pour l'activation de l'inflammasome NLRP3 qui résulte en une sécrétion d'IL-1β mature.

Citation: Cell Death and Disease (2012) 3, e403; doi:10.1038/cddis.2012.144
© 2012 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 2041-4889/12
www.nature.com/cddis

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

N Riteau[1,3], L Baron[1,3], B Villeret[1], N Guillou[1], F Savigny[1], B Ryffel[1], F Rassendren[2], M Le Bert[1], A Gombault[1,3] and I Couillin*[,1,3]

Deposition of uric acid crystals in joints causes the 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 salt (Alum) crystals are frequently used as vaccine adjuvant. The mechanisms by which crystals activate innate immunity through the Nlrp3 inflammasome are not well understood. Here, we show that uric acid, silica and Alum crystals trigger the extracellular delivery of endogenous ATP, which just precedes the secretion of mature interleukin-1β (IL-1β) by macrophages, both events depending on purinergic receptors and connexin/pannexin channels. Interestingly, not only ATP but also ADP and UTP are involved in IL-1β production upon these Nlrp3 inflammasome activators through multiple purinergic receptor signaling. These findings support a pivotal role for nucleotides as danger signals and provide a new molecular mechanism to explain how chemically and structurally diverse stimuli can activate the Nlrp3 inflammasome.
Cell Death and Disease (2012) **3,** e403; doi:10.1038/cddis.2012.144; published online 11 October 2012
Subject Category: Immunity

Endogenous or environmental particulate dangers trigger innate immunity through assembly of the Nlrp3 inflammasome, an intracellular molecular platform which under activation allows the cleavage of the potent pro-inflammatory cytokine interleukin-1β (IL-1β). Numerous studies showed that a first signal triggers synthesis of pro-IL-1β and Nlrp3 by transcriptional induction, whereas a second stimulus leads to inflammasome oligomerization, caspase-1 auto-activation, caspase-1-dependent cleavage and release of the biologically active, mature IL-1β. This second signal may be triggered by a group of chemically and biologically unrelated molecules such as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), toxins or danger-associated molecular patterns (DAMPs). DAMPs originate from environmental pollutants such as silica and asbestos,[1,2] from vaccines such as aluminum salt (Alum) adjuvant[3] or from endogenous metabolic stresses such as high glucose,[4] cholesterol,[5] β-amyloid protein,[6] biglycan,[7] ATP[8] and monosodium urate crystals (MSU).[3,9] Several major upstream mechanisms are currently proposed for Nlrp3 inflammasome activation such as membrane disruption (for bacterial toxins and soluble ATP) or internalization of particulate activators by phagocytosis.[10] Extracellular ATP (eATP) or bacterial toxins lead to K^+ efflux and pannexin-1 (Panx-1) pore formation, both required for Nlpr3 activation.[11] Phagocytosis of particles including silica, Alum, fibrilar amyloid-β or MSU was shown to result in lysosomal destabilization/permeabilization with release of the endosomal-lysosomal protease cathepsin B into the cytoplasm[2,6] and/or to mediate reactive oxygen species (ROS) driven activation.

We hypothesized that eATP release from stimulated cells and further purinergic signaling may be a corner stone of Nlrp3 inflammasome activation pathway. ATP signaling is emerging as an important mechanism to control various cell functions.[12] Cellular stimulation triggers ATP release and subsequently activation of purinergic receptors (P2X or P2Y receptors) at the cell surface (autocrine activation) and/or in adjacent cells (paracrine activation), thereby regulating or modulating cellular functions in particular immunity. Essentially all cells are able to release nucleotides nevertheless the mechanisms of nucleotide release in epithelia, endothelial cells or other non-excitable cells are poorly understood.[12,13] After release, eATP interacts with specific purinergic receptors or is degraded *via* different ecto-ATPases to di- and monophosphates and then to adenosine, ATP or its metabolites being able to signal through different purinergic receptors (P2X, P2Y or adenosine P1 receptors).[14] In pathological conditions, high level of ATP is released from necrotic cells and acts as a pro-inflammatory danger signal, activating the Nlrp3 inflammasome through binding to the ionotropic receptor P2X7.[15]

Here, for the first time we provide evidence that uric acid, silica and aluminum particles induce the active release of

[1]University of Orleans, CNRS, UMR7355, INEM, Transgenose Institute, Orleans, France and [2]IGF, CNRS UMR 5203, INSERM U661, University of Montpellier I & II, Montpellier, France
*Corresponding author: I Couillin, Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, UMR7355, 3B rue de la Férollerie, Orleans 45071, France.
Tel: +33 238 25 54 43; Fax: +33 238 25 79 79; E-mail: couillin@cnrs-orleans.fr
[3]These authors contributed equally to this work.
Keywords: ATP; danger signal; inflammasome; P2R; NLR
Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; IL-1β, interleukin-1 beta; NLR, Nod-like receptor; MSU, monosodium urate crystal; PAMPs, pathogen-associated molecular patterns; DAMPs, danger-associated molecular patterns; ROS, reactive oxygen species
Received 14.2.12; revised 03.9.12; accepted 06.9.12; Edited by A Finazzi-Agró

intracellular ATP to the outside of human macrophages, depending in some extent to functional P2X7 receptor and connexin/pannexin channels. Moreover, we show a strong correlation between ATP release and secretion of mature IL-1β after stimulation of primed human macrophages. In addition, crystals exposure to primed murine macrophages leads to maturation of IL-1β that highly depends on purinergic receptor signaling with the involvement of multiple autocrine purinergic receptor loops.

We identify a new mechanism for crystals-mediated Nlrp3 inflammasome activation and mature IL-1β release through multiple purinergic receptors and connexin/pannexin pore activation. We provide a link between ATP- and crystals-mediated inflammasome activation demonstrating that crystals act through ATP release to induce inflammasome activation and propose a new hypothesis allowing understanding how such a variety of activators can activate Nlrp3 inflammasome.

Results

MSU, silica or Alum crystals trigger active ATP release and IL-1β secretion in human macrophages. Recently, we showed that stimulation of lung epithelial cells with bleomycin, a cytotoxic agent that causes DNA damage, leads to a rapid release of ATP partly dependent on functional P2X7 receptor and Panx-1 pore formation.[16] Since activated or stressed cells were shown to release ATP, we investigate whether crystals or particles known as activators of the Nlrp3 inflammasome may act through ATP leakage to trigger IL-1β maturation.[13,17] We observed that MSU or silica crystals cause active ATP release by pulmonary epithelial cell lines, which depends on purinergic receptors and pannexin/connexin channels but not mature IL-1β production (data not shown). To determine whether particulate Nlrp3 inflammasome activators are able to trigger the release of endogenous ATP by the macrophage lineage, the human monocyte/macrophage cell line THP-1 was stimulated with MSU crystals during various times. Luciferase ATP assays revealed that MSU crystals trigger the release of ATP by human macrophages, which peaks at 2 h (Figure 1a). Since the extracellular accumulation of ATP reflects the balance between ATP release by cells and ATP hydrolysis by ectonucleotidases,[18] we used the ecto-ATPase inhibitor ARL67156 to limit ATP catabolism. In the presence of ARL67156, the levels of ATP detected in the different supernatants increased up to sixfold (Figure 1b). From the same macrophage culture and at a given end time point, we co-analyzed ATP release and mature IL-1β in the presence of ARL67156 and observed that ATP release is strongly correlated with IL-1β secretion (Figure 1c). Hence, ATP release induced by MSU or Alum is transient and precedes sustained IL-1β production by the same macrophages. After silica stimulation, responses were delayed and we did not observe the peak of ATP release even after 6 h. In contrast allopurinol crystals, known to fail in activating the Nlrp3 inflammasome,[9] induced neither ATP release nor IL-1β secretion (Figure 1c). Importantly, cell death measured by MTT was minimal, suggesting that ATP release is not the consequence of any macrophage death (Figure 1d). These data suggest that IL-1β secretion is a consequence of ATP leakage induced by particulate Nlrp3 activators.

Phagocytosis or cystein proteases inhibition blocks both ATP release and IL-1β production in human macrophages. Particle phagocytosis is known to be

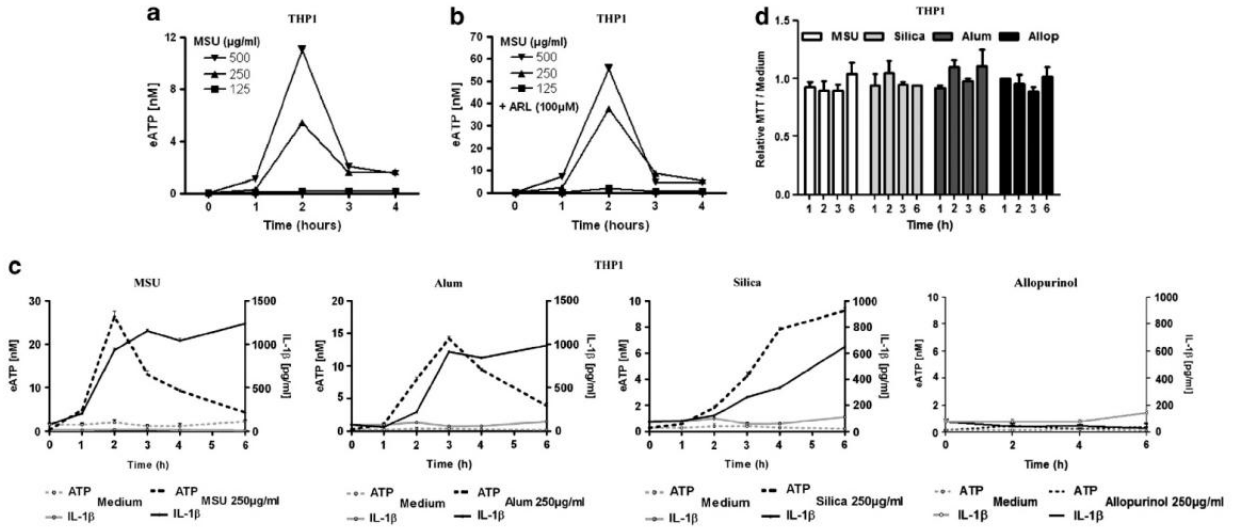


Figure 1 MSU, silica or Alum crystals trigger active release of ATP by human macrophages. PMA-primed THP-1 cells incubated with MSU crystals release ATP in the supernatant that peaks after 2 h and rapidly return to baseline (**a**). Higher concentrations were obtained using the ecto-ATPase inhibitor ARL67146 (ARL) to preserve ATP (**b**). In the presence of ARL67146, there is a strong correlation between MSU, silica and Alum-induced ATP release and IL-1β production, whereas allopurinol crystals do not induce ATP release or IL-1β secretion (**c**). MTT assay revealed no significant change in cell viability at studied time points (**d**). Data are representative of three independent experiments and are expressed as mean values ± S.D.

essential for inflammasome activation and mature IL-1β production.[2] However, cytoskeleton is not necessary for IL-1β secretion.[3] Here, we show that ATP leakage is completely impaired by cytochalasin D, which inhibits actin polymerization, demonstrating that ATP release is a physiologic process needing particle phagocytosis by human macrophages (Figure 2a). Moreover, we confirmed that cytochalasin D abrogates IL-1β production (Figure 2b). Importantly, cysteine proteases, for example, cathepsin B and L, were shown to be involved in Nlrp3 activation in response to particles.[2,5] We show here that E-64d, a broad inhibitor of cysteine proteases is able to dramatically reduce ATP release and IL-1β secretion (Figure 2b) whereas the control acidic protease inhibitor pepstatin A had no effect (Figures 2a and b). In addition, cathepsin B specific inhibitor Ca074-Me dose dependently reduced eATP and IL-1β production induced by silica, suggesting a specific role for cathepsin B (Figure 2c). Altogether, these data suggest that particle internalization/lysosome destabilization with lysosomal cathepsin leakage precedes ATP release and IL-1β production by human macrophages.

Purinergic signaling and pannexin/connexin hemichannels are required for ATP release and IL-1β secretion in human macrophages. We then investigated the mechanisms of particle-induced ATP release leading to IL-1β secretion. Since P2X7 receptor and Panx-1 hemichannel were involved in ATP release from different cell types after stress or activation, we next investigated their role in a particle-induced context.[19] Three potential mechanisms for regulated nucleotide release after cell stimulation, exocytosis, blebbing or passage *via* a plasma membrane channel may be considered.[14] We focused on channel(s) that have been shown to mediate nucleotide release and among them the connexin and pannexin family channels.[20] Connexins were first shown to form gap junctions between cells, mediating intercellular communication, but emerging literature reports direct hemichannel activity,[21] hence able to act similarly as pannexin hemichannels which upon activation mediate molecule and ion transfers between intracellular and extracellular compartments.[20,22] Using pharmacological inhibitors, we show that the connexin/pannexin channel blocker carbenoxolone (CBX) and the connexin channel blocker flufenamic acid (FFA) reduced significantly both ATP and IL-1β release, indicating that connexin and/or pannexin hemichannels are involved in ATP release and IL-1β production (Figures 3a and b). Moreover, specific inhibition of the P2X7 receptor by A740003[23] at 10 μM led to partial inhibition of ATP release and IL-1β production by Alum but not by silica, whereas higher concentrations were efficient in both ATP and IL-1β releases (Figures 3a and b). In conclusion, particles induce P2X7 receptor-dependent ATP release through connexin and/or pannexin channels leading to mature IL-1β secretion in the same extent.

IL-1β production by murine macrophages depends on cysteine proteases, purinergic receptors and pannexin/connexin hemichannels. Conversely to THP-1 human monocyte/macrophage cell line, we could not measure significant ATP increase in the supernatant of stimulated murine bone marrow-derived macrophages (BMDM) or dendritic cells (BMDC) even adding the ecto-ATPase

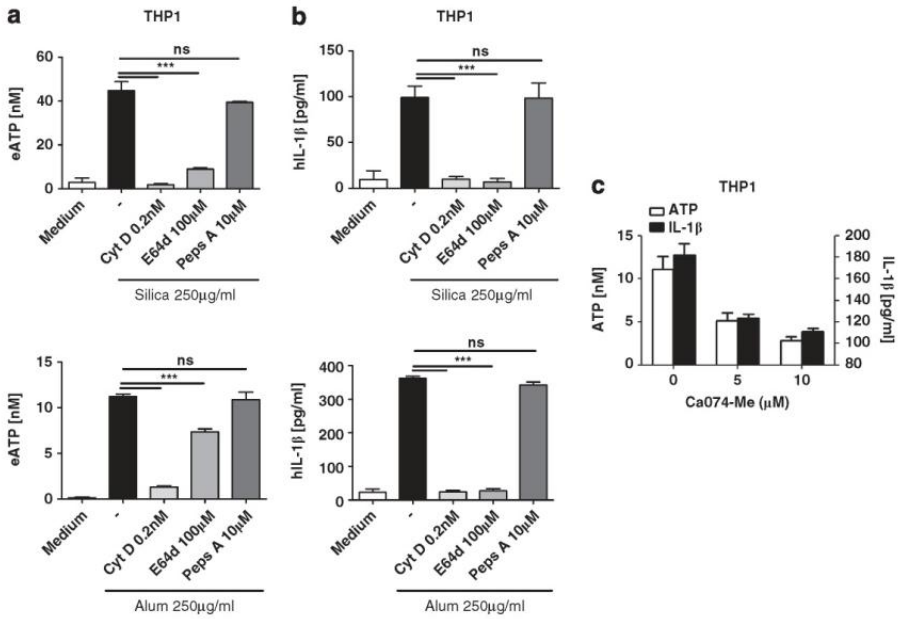


Figure 2 Phagocytosis or cysteine proteases inhibitors block both IL-1β production and ATP release by human macrophages. PMA-primed THP1 cells were incubated with silica or Alum salt crystals for 3 h. Phagocytosis inhibitor cytochalasin D (Cyt D) and cysteine proteases inhibitor E-64d but not acidic protease inhibitor pepstatin A (Peps A) were able to strikingly decrease both silica- or Alum-induced ATP release (**a**) and IL-1β production (**b**) in PMA-primed THP-1 cells. Cathepsin B specific inhibitor Ca074-Me dose dependently reduced eATP and IL-1β production induced by silica (**c**). Data are representative of three independent experiments and are expressed as mean values ± S.D. (***$P<0.001$; ns, non-significant)

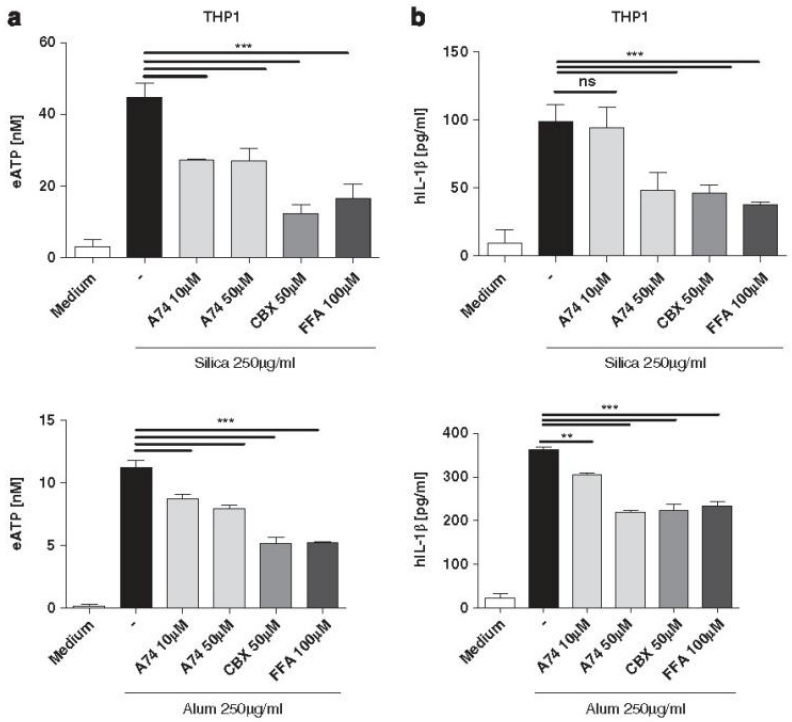


Figure 3 P2X7 receptor or pannexin/connexin hemichannel involvement in ATP release and IL-1β secretion in human macrophages. PMA-primed THP-1 cells were incubated with silica or Alum salt crystals. Connexin/pannexin channel blocker carbenoxolone (CBX) and connexin channel blocker flufenamic acid (FFA) significantly reduced both ATP and IL-1β release induced by silica and Alum (**a** and **b**). Specific inhibition of the P2X7 receptor with 10 μM A740003 leads to partial inhibition of ATP release without inhibition of IL-1β production, whereas higher concentrations are efficient in both ATP release and IL-1β production but might be non-specific (**a** and **b**). Data are representative of three independent experiments and are expressed as mean values ± S.D. (**$P<0.01$; ***$P<0.001$; ns, non-significant)

inhibitor ARL67156. This may be due to fastest ATP degradation by these cells and/or to limitation of our measurement assay. Using cytochalasin D, we first confirmed that MSU, silica or Alum salt crystal-induced IL-1β secretion by murine macrophages required phagocytosis (Supplementary Figures 1a and b) whereas allopurinol crystals did not induce IL-1β (Supplementary Figure 1c). Conversely, ATP- or nigericin-induced IL-1β secretion was not affected by cytochalasin D confirming cytochalasin D abrogates particle phagocytosis but not P2X7 receptor and/or pannexin channel activities (Supplementary Figure 1d). Since a role for cathepsin B in crystal-induced inflammasome activation is still controversial, we analyzed the effect of protease inhibitors. The cysteine cathepsin and calpain inhibitors (E64d, Z-FA-FMK), the cysteine cathepsin B inhibitor (Ca074-Me) but not the cysteine cathepsin L inhibitor or the aspartic acid protease cathepsin D inhibitor (pepstatin A) dose dependently decreased IL-1β upon silica and Alum crystals (Supplementary Figures 1a and b). In addition, macrophages from cathepsin B-deficient mice stimulated with MSU, silica or Alum crystals presented a significant decrease of IL-1β (Supplementary Figure 1e). These data indicate that mature IL-1β secretion depends at least partially on the cysteine protease cathepsin B but not on the cysteine protease cathepsin L and the aspartic acid protease cathepsin D. Moreover, the P2X7 receptor specific inhibitor A740003, the broad-spectrum P2 receptor inhibitor oATP or the phospholipase C inhibitor U73122 blocking signaling through the P2Y1-like subfamily (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11) strikingly decreased or suppressed IL-1β production upon MSU, silica or Alum crystals in murine BMDM (Figure 4a) and BMDC (not shown) in a dose-dependent manner. CBX and FFA were also efficient in inhibiting IL-1β secretion upon silica or Alum in BMDM (Figure 4b). The use of oATP, A740003 or CBX blocked crystal-induced IL-1β but not TNF-α production by BMDM (Supplementary Figure 2). These data demonstrate a specific effect of purinergic signaling and connexin/pannexin inhibition in Nlrp3 inflammasome activation pathway without toxic effect. Western blotting analysis confirmed that inhibition of purinergic signaling or connexin activity decreased amount of secreted 17 kDa mature IL-1β produced by BMDM upon silica or Alum particles stimulation (Figure 4c). Altogether, purinergic receptors and connexin/pannexin channels are required for IL-1β production by the three tested Nlrp3 inflammasome activators.

Single deletion in P2X7, P2X4 or P2Y2 receptor does not affect IL-1β production by murine macrophages. In an attempt to better delineate particle-mediated IL-1β production, we performed experiments with macrophages from Nlrp3 inflammasome components or for ATP purinergic receptors deficient mice. Consistent with published reports,[1,2,9], IL-1β but not TNF-α secretion upon MSU,

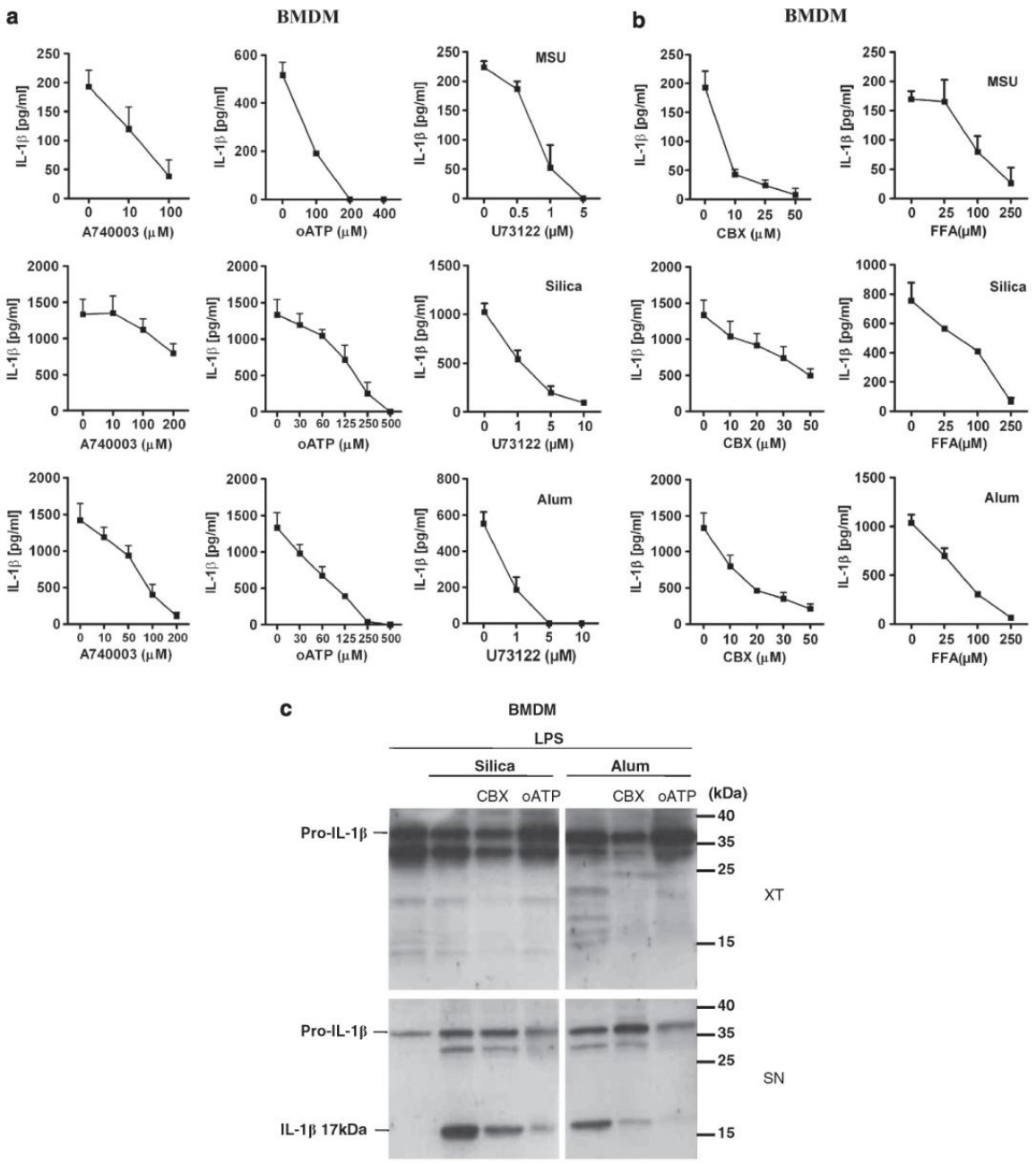


Figure 4 IL-1β production by murine macrophages upon MSU, silica or Alum depends on purinergic signaling and pannexin/connexin hemichannels. IL-1β production by LPS-primed BMDM stimulated with silica or Alum is dose dependently decreased using P2X7 inhibitor A740003 and more potently with the broad-spectrum purinergic inhibitor oATP or with the phospholipase C inhibitor U73122 blocking several P2YRs (**a**). The same inhibitory effect is observed with the connexin/pannexin inhibitor CBX and with the connexin channel blocker FFA (**b**). Western blot analysis of LPS-primed BMDM cell extracts (XT) and supernatants (SN) confirmed that oATP (500 μM) or CBX (50 μM) significantly decreased 17 kDa mature IL-1β production in response to silica or Alum (**c**). Molecular weight markers are shown at the right (**c**). Data are representative of three independent experiments and are expressed as mean values ± S.D.

silica or Alum, was Nlrp3 inflammasome dependent (Supplementary Figures 3a and b), whereas deficiency for Nlrc4 in macrophages (Supplementary Figure 3c) or dendritic cells (Supplementary Figure 3d) had no effect. In contrast, macrophages from P2X7 receptor-deficient mice stimulated with MSU, silica or Alum did not present a significant decrease in IL-1β production (Figure 5a). As expected, P2X7 receptor but not P2X4 receptor, was fully required for Nlrp3 activation in response to high ATP concentrations (Figure 5b). In addition, single deletion of the ATP ionotropic

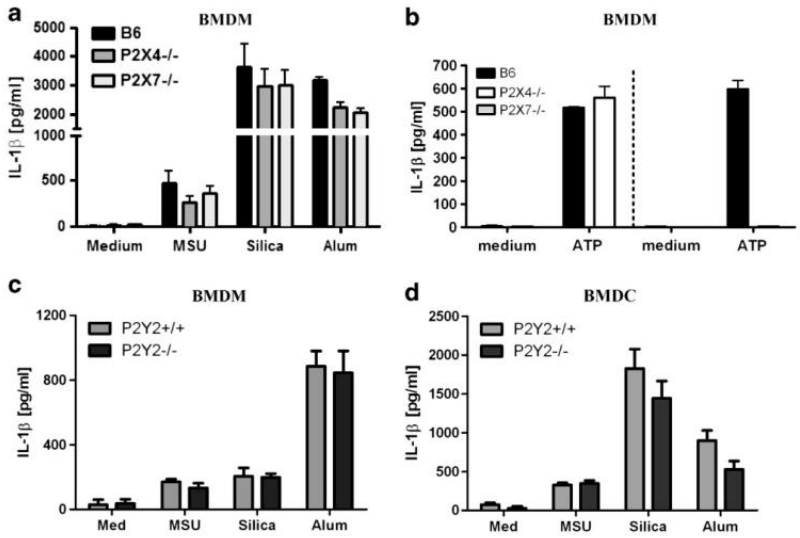


Figure 5 Single P2R deficiency does not lead to reduced IL-1β production. BMDM deficient for P2X7 or P2X4 receptors were LPS-primed for 3 h and stimulated with MSU, silica or alum for 6 h IL-1β production is not significantly decreased (**a**). In contrast, high exogenous ATP (5 mM; 45 min)-induced IL-1β production is fully dependent on P2X7 but not on P2X4 receptors (**b**). P2Y2 receptor-deficient BMDM (**c**) or BMDC (**d**) presented no significant decrease in IL-1β production. Data are representative of three independent experiments and are expressed as mean values ± S.D.

P2X4 receptor (Figure 5a) known to act together with P2X7 receptor[7] or of the ATP/UTP metabotropic P2Y2 receptor involved in cell chemotaxis in response to ATP leakage,[24] did not lead to significant impairment in IL-1β production by BMDM (Figure 5c) or BMDC (Figure 5d). Discrepancies between strong effect of biochemical inhibitors and single gene deficiency may reflect redundancy between purinergic receptors or multiple purinergic receptors signaling.

ATP, ADP and UTP nucleotides are involved in particle-mediated inflammasome activation. In order to confirm the role of ATP and purinergic signaling in microparticle-induced IL-1β secretion, we stimulated murine macrophages in the presence of apyrase, an ATP consuming enzyme. Figure 6a shows apyrase (grade VII that hydrolyzes ATP and ADP) abrogated silica-induced IL-1β secretion similarly to ATP-induced IL-1β whereas apyrase alone had no effect on IL-1β secretion and cell viability (not shown). These results demonstrate the role of ATP and/or ADP in particle-mediated IL-1β secretion. To further study the involvement of multiple purinergic receptors signaling in sensing Nlrp3 inflammasome particulate activators, we stimulated macrophages with particles in the presence of different nucleotides or purinergic receptor agonists. Addition of 500 μM ATP, UTP or ADP to LPS-primed murine macrophages did not lead alone to IL-1β secretion but exacerbated MSU, silica or Alum-induced production of IL-1β (Figure 6b). Consistently, stable ATPγS or ADPβS agonists were more potent than ATP or ADP to enhance particles-induced IL-1β production (Figure 6b). Interestingly, addition of equivalent concentrations of MeATP (P2X agonist) or UTP (P2Y agonist) were not able to induce IL-1β but potentiated the response to MSU or silica crystals (Figure 6c). We obtained similar results using human macrophages and smaller concentration of ATP, ATPγS, ADP or ADPβS (1, 10, 50, 100 or 200 μM) which dose dependently increased IL-1β production induced by sub-optimal quantities of silica or Alum whereas they had not effect alone (Figure 6d). Moreover, a small effect of UTP was observed (Figure 6d). The same results with lower concentrations of ATP, ATPγS, ADP or ADPβS were obtained with murine BMDM macrophages (not shown). In addition, ADP, a specific ligand for P2Y receptors, dose dependently increased the murine macrophage response to MSU or silica further, suggesting the involvement of ADP purinergic receptors (Figure 6e). In contrast, the downstream nucleotide catabolism product adenosine inhibited MSU and silica-induced production of IL-1β by murine dendritic cells (Figure 6f). These data demonstrate that not only ATP but also its metabolic derivative ADP or UTP play an active role in inflammasome activation in response to microparticles. In conclusion, purinergic signaling by both P2X and P2Y receptors in the context of particle-induced cell response is necessary for efficient IL-1β production by the Nlrp3 inflammasome.

Discussion

Here, we provide a link between ATP- and crystal-mediated inflammasome activation, demonstrating that crystals act through ATP release to induce IL-1β maturation. Large amount of eATP (5 mM) was identified as a powerful second signal inducing pro-IL-1β processing into mature IL-1β in a two-step model for IL-1β secretion by murine[25] and human macrophages[9] through P2X7 receptor signaling.[26] In contrast, primary human monocytes were shown to require only one signal since exogenous LPS was sufficient to induce secretion of mature IL-1β, although exogenous ATP strongly accelerates IL-1β processing and secretion.[27,28] In addition in

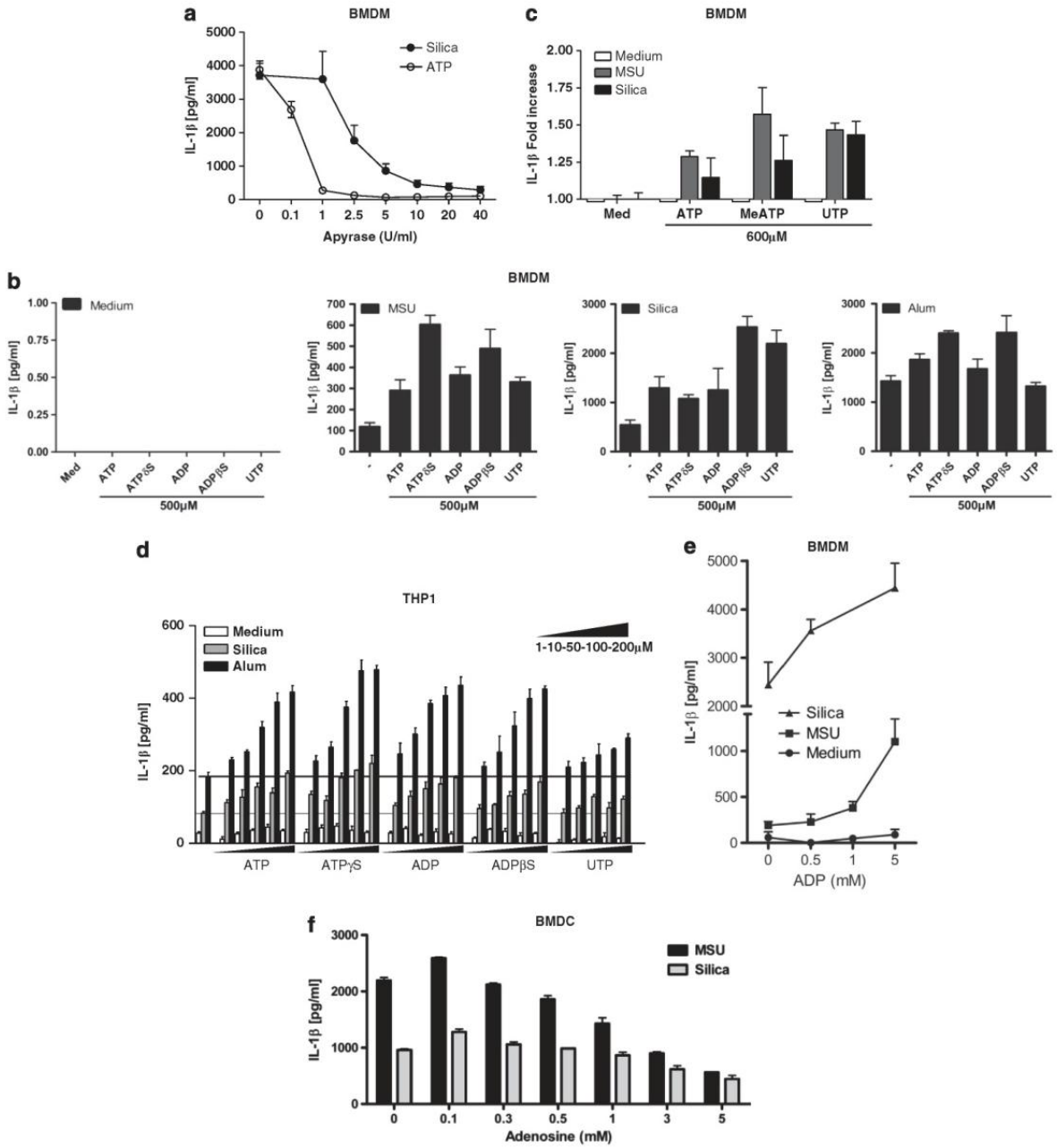


Figure 6 Involvement of ATP, ADP and UTP nucleotides in crystal-induced inflammasome activation. IL-1β secretion by LPS-primed murine BMDM stimulated for 6 h with silica crystals (250 μg/ml) or ATP (5 mM) was dose dependently abrogated in the presence of apyrase (**a**). LPS-primed murine BMDM stimulated with 500 μM of ATP, ADP or stable derivatives, respectively, ATPγS and ADPβS, do not lead alone to production of IL-1β. However, they strongly enhance IL-1β production induced by particles (**b**). Similarly, 600 μM of P2X receptor agonist MeATP or P2YRs agonist UTP are able to increase the IL-1β production from 25 to 50% (**c**). The same synergistic effects of ATP, ATPγS, ADP and ADPβS are observed in PMA-primed THP1 stimulated with alum (125 μg/ml) or silica (250 μg/ml) dose dependently (1, 10, 50, 100 or 200 μM) (**d**). UTP also slightly increased IL-1β production (**d**). ADP up to 5 mM is not sufficient alone for IL-1β maturation, but it highly exacerbates MSU or silica-induced IL-1β production by LPS-primed BMDM (**e**). By contrast, adenosine dampens MSU or silica-induced IL-1β production by BMDC (**f**). Data are representative of two to three independent experiments and are expressed as mean values ± S.D.

human monocytes several PAMPs and one DAMP were shown to trigger both the first and the second signals with extracellular release of endogenous ATP acting on the P2X7 receptor in an autocrine loop, triggering mature IL-1β secretion in a one-step model of inflammasome activation.[29] Here, we demonstrate that in the presence of the first signal, MSU, silica or Alum salt crystals trigger the second one leading to mature IL-1β production by human macrophages

through ATP release and subsequent purinergic signaling. Importantly, allopurinol crystals known to fail in Nlrp3 inflammasome activation[9] are unable to trigger ATP release.

We show that oATP recognized as a broad inhibitor of P2X and P2Y receptor was able to prevent crystal-induced maturation of IL-1β by murine or human macrophages, highlighting the importance of the P2 purinergic receptor family. Moreover, crystal-induced secretion of mature IL-1β was abrogated by ATP/ADP consuming enzyme apyrase confirming the role of ATP and purinergic signaling in inflammasome activation. Nevertheless, P2X7 receptor deficiency in murine macrophages does not change the cell capacity to produce IL-1β albeit high concentrations of the P2X7 receptor inhibitor A740003 were able to severely impair the cytokine production, suggesting the involvement of other P2 receptors. Several works have reported that blocking or deleting P2X7 receptor did not affect MSU,[9] silica[15] or Alum salt[3] crystals-induced IL-1β production, supporting a role for other purinergic receptors in non-pathologic conditions. In the opposite, Alzheimer disease-related amyloid-β protein aggregates were shown to promote IL-1β release through P2X7 receptor-mediated ATP release.[30] Similarly single deficiency in P2X4 or P2Y2 receptors had no major effects on mature IL-1β production. Even if further experiments need to be performed to better decipher the role of each receptor, our data suggest the involvement of multiple purinergic signaling.

Nlrp3 inflammasome activation by large amount of ATP (5 mM, 30 min) in the presence of LPS constitutes an *in vitro* model as prolonged stimulation results in membrane disruption and cell death underlying the pathological impact of high ATP levels. Importantly, we demonstrate that mild doses of ATP, and unexpectedly also of ADP and UTP, albeit having no effect by themselves, synergize with particles for highest IL-1β production. These data strongly suggest that the two purinergic receptor families P2X and P2Y are involved since both ADP and UTP acting only on P2Y, seem to play a role. As mild doses of ATP, ADP or UTP were unable alone to promote mature IL-1β production, another signal triggered by crystal stimulation may be required, for example, a P2X7 receptor-independent potassium efflux. All particles affecting inflammasome activity were shown to be fully dependent on potassium efflux, suggesting a role for ionotropic P2X receptors or other potassium channels. It was shown before that not only ATP but other nucleotides such as ADP, UTP or UDP are released in the extracellular space from mechanically stressed cells, in particular endothelial and epithelial cells.[13,31] These compounds may act on different purinergic receptors to generate a fine-tuned response.

In contrast to human macrophages, we were unable to detect eATP after murine macrophages stimulation by crystals. This is likely due to a higher level of ecto-ATPase activity by murine cells since we observed that exogenous ATP added to murine macrophages rapidly became undetectable in contrast to the same amount of exogenous ATP added to human macrophages. These observations suggest a local increase of ADP/AMP/adenosine and possible action on IL-1β 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.[32]

Using pharmacological inhibitors, we found that MSU, silica or Alum crystal-induced mature IL-1β secretion by murine or human macrophages is dependent on connexin/pannexin channels. Panx-1 hemichannel has been involved in Nlrp3 inflammasome activation in response to high ATP, nigericin, maitotoxin and bacterial components.[33–35] Nevertheless, a recent work using Panx-1-deficient mice observed no impact on mature IL-1β production upon ATP, MSU or silica particles.[36] Compensation between pannexins and/or connexins able to form hemichannels may exist in classical deficient mice and conditional Panx-1 mice would be useful. The use of pharmacologic inhibitors indicates that ATP is released through pannexin/connexin hemichannels as shown elsewhere.[36,37] We also show that ATP release by human macrophages depends on purinergic signaling and in particular on P2X7 receptor, suggesting the existence of an amplification loop allowing ATP-dependent ATP release. Importantly using cytochalasin D, we show that ATP release requires particle phagocytosis as mature IL-1β production. Importantly, ATP- or nigericin-induced IL-1β secretion was not affected in the presence of cytochalasin D, confirming that cytochalasin D acts on particle phagocytosis but not P2X7 receptor and/or pannexin channel activities. Our results do not rule out previous finding showing that phagolysosomal acidification and disruption with cathepsin B release are required for Nlrp3 inflammasome activation.[1,2] We confirm the involvement of cysteine cathepsins in the production of mature IL-1β but for the first time we demonstrate that these proteases including cathepsin B play a role in ATP release, suggesting they may be involved in channel maturation and/or opening processes upstream of Nlrp3 inflammasome assembly. In an attempt to summarize our data, we propose the model presented in Figure 7.

We show that phagocytosis of particulate activators induces membrane permeabilization through membrane channel opening with sequential ATP release and purinergic signaling leading to inflammasome activation. This model provides a link between particle internalization- and membrane permeabilization-mediated Nlrp3 inflammasome activation since particulate molecules and eATP are still considered as two completely independent ways to activate the Nlrp3 inflammasome. We show here that ATP release and purinergic signaling is a step of crystal-induced inflammasome stimulation. This is of clear account in regards to extensive work showing that eATP could act as a danger signals released in numerous situations.

Materials and Methods

Reagents. MSU (average length 14.02 μM ± 7.72) and allopurinol crystals (prepared as described[38]) silica (Dr. F Huaux, Bruxelles, Belgium) and Alum (Imject Alum, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) were used at 125–500 μg/ml as mentioned. Particles were sonicated 30 min prior use.

A740003 is a gift from Dr. F Rassendren (Montpellier, France). ATP, ATPγS, ADP, ADPβS, MeATP, UTP, nigericin, A438079, oATP, CBX, FFA, bafilomycin A1, pepstatin A, ARL67156 and apyrase grade VII were from Sigma (St. Quentin Fallavier, France), Ca074-Me, E64d and cytochalasin D from Calbiochem Merck (Fontenay sous bois, France).

Mouse bone marrow-derived cells culture and stimulation. Deficient mice and methods used to prepare primary BMDM and BMDC are described in Supplementary Information. BMDM and BMDC were plated in 96-well microculture plates (2×10^5 cells/well) and primed 3 h with 100 ng/ml ultrapure

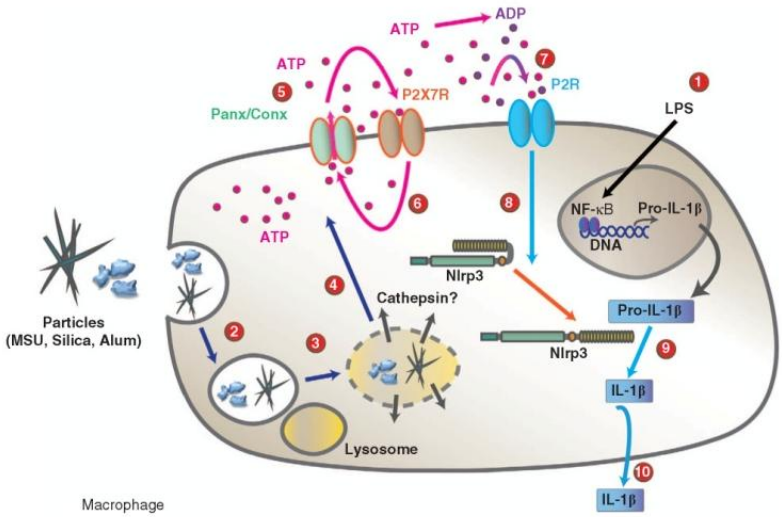


Figure 7 Schematic diagram illustrating the specific cascade and signaling pathway in LPS-primed macrophages stimulated with MSU, silica or Alum salt crystals. LPS priming induces transcription of pro-IL-1β gene and other genes in the nucleus upon activation of the transcription factor NFκB and subsequent production of pro-IL-1β protein in the cytosol (1). Particle internalization (2), fusion to lysosome (3) and further phagolysosome destablization may lead to cathepsin leakage (4), which precedes pannexin/connexin (Panx/Conx) hemichannel and purinergic signaling dependent intracellular ATP release (5). Extracellular ATP may act through P2X7 receptor to amplify ATP release in a P2X7 receptor dependent way (6). ATP or its derived degradation products such as ADP, generated by ecto-endonucleases, act through an autocrine loop on other purinergic receptor P2X and/or P2Y receptors (7) leading to Nlrp3 receptor activation (8). This allows inflammasome complex formation and maturation of pro-IL-1β to IL-1β production (9) and IL-1β secretion (10)

LPS (*Escherichia coli*, serotype O111.B4, Invivogen, Toulouse, France) then washed and stimulated by particles and listed compounds for 6 h or 30–45 min with ATP (5 mM). Supernatants were collected and IL-1β or TNF-α cytokines were assayed by ELISA assay.

Human monocytes/macrophages THP1 cells culture and stimulation. THP1 cells were cultured in RPMI, 10% FCS (Hyclone, Cramlington, UK), penicillin (100 U/ml, Invitrogen, Illkirch, France) and streptomycin (100 μg/ml, Invitrogen). For experiments, THP-1 cells were differentiated 3 h with 0.5 μM phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), washed and overnight plated (2×10^5 cells/well). Cells were stimulated for indicated time, supernatant collected for concomitant ATP measurement and/or further IL-1β quantification.

ATP measurement. eATP in cell culture supernatant was quantified using ATP Lite One-Step kit (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Quick centrifugation of the plates was performed to avoid any cell debris contamination. Luminescence was measured with a luminometer (Mithras, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) and ATP concentration determined using standard curve allowed samples quantification.

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

Immunoblotting. Supernatants were collected and stored for further analysis. Cells were washed with cold PBS and scraped in lysis buffer solution (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA, 0.2% SDS and 1% Nonidet P-40) supplemented with a protease inhibitor cocktail (1%) and pefabloc (0.1 mg/ml) (Roche Applied Science, Meylan, France). Lysis extracts were sonicated and after centrifugation, supernatants were collected and protein content measured (DC protein assay, Bio-Rad, Munich, Germany). Proteins were denatured by boiling (95 °C, 5 min), separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were immunoblotted with primary goat anti-IL-1β antibody (Sigma Aldrich) and proteins detected with appropriate secondary rabbit polyclonal antibody (Sigma Aldrich) conjugated to horseradish peroxidase followed by enhanced chemiluminescence (ECL; Fisher, Illkirch, France).

Statistics. Statistical evaluation of differences between the experimental groups was determined by Mann–Whitney test using Prism software (La Jolla, CA, USA). *P*-values of <0.05 were considered statistically significant.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. We are grateful to the support of the 'Agence National de Recherche' (France) and the 'Conseil Général du Loiret' (France). We thank Dr. B Robaye (IRIBHM, Gosselies, Belgium) for the kind gift of P2Y2 receptor-deficient mice and Dr. Amir Yazdi (Tuebingen, Germany) for the gift of human monocyte/macrophage THP-1 cell line. We are grateful to Léa Brault for mice breeding management and François Erard and Valérie Quesniaux for scientific discussion and to David Kugler (NIH/NIAID, Bethesda, MD, USA) for technical assistance in the illustration. This study grant was supported by the French «Agence Nationale de Recherche» and the «Conseil Général du Loiret».

1. 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.
2. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL *et al.* Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 2008; **14**: 1256–1263.
3. 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.
4. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 2010; **11**: 136–140.
5. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010; **464**: 1357–1361.
6. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T *et al.* The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol* 2008; **9**: 857–865.
7. Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W, Zeng-Brouwers J, Eickelberg O, Young MF *et al.* Biglycan: a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *J Biol Chem* 2009; **284**: 24035–24048.

8. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006; **440**: 228–232.
9. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; **440**: 237–241.
10. Cassel SL, Joly S, Sutterwala FS. The NLRP3 inflammasome: a sensor of immune danger signals. *Semin Immunol* 2009; **21**: 194–198.
11. Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1beta release through a dye uptake-independent pathway. *J Biol Chem* 2007; **282**: 2386–2394.
12. Praetorius HA, Leipziger J. ATP release from non-excitable cells. *Purinergic Signal* 2009; **5**: 433–446.
13. 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.
14. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1783**: 673–694.
15. Iyer SS, Pulskens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK *et al.* Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 20388–20393.
16. Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L *et al.* Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; **182**: 774–783.
17. 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.
18. Joseph SM, Buchakjian MR, Dubyak GR. Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. *J Biol Chem* 2003; **278**: 23331–23342.
19. Bao L, Locovei S, Dahl G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett* 2004; **572**: 65–68.
20. Harris AL. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog Biophys Mol Biol* 2007; **94**: 120–143.
21. Orellana JA, Froger N, Ezan P, Jiang JX, Bennett MV, Naus CC *et al.* ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *J Neurochem* 2011; **118**: 826–840.
22. Scemes E, Spray DC, Meda P. Connexins, pannexins, innexins: novel roles of 'hemi-channels'. *Pflugers Arch* 2009; **457**: 1207–1226.
23. King BF. Novel P2X7 receptor antagonists ease the pain. *Br J Pharmacol* 2007; **151**: 565–567.
24. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A *et al.* ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 2006; **314**: 1792–1795.
25. Perregaux D, Gabel CA. 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* 1994; **269**: 15195–15203.
26. Di Virgilio F. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci* 2007; **28**: 465–472.
27. Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M *et al.* The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* 2006; **176**: 3877–3883.
28. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH *et al.* Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* 2009; **113**: 2324–2335.
29. Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglie D, Fossati G, Rubartelli A. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 8067–8072.
30. Sanz JM, Chiozzi P, Ferrari D, Colaianna M, Idzko M, Falzoni S *et al.* Activation of microglia by amyloid {beta} requires P2X7 receptor expression. *J Immunol* 2009; **182**: 4378–4385.
31. Di Virgilio F, Borea PA, Illes P. P2 receptors meet the immune system. *Trends Pharmacol Sci* 2001; **22**: 5–7.
32. 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.
33. Brough D, Pelegrin P, Rothwell NJ. Pannexin-1-dependent caspase-1 activation and secretion of IL-1beta is regulated by zinc. *Eur J Immunol* 2009; **39**: 352–358.
34. Franchi L, Kanneganti TD, Dubyak GR, Nunez G. Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K+ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *J Biol Chem* 2007; **282**: 18810–18818.
35. Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *Embo J* 2006; **25**: 5071–5082.
36. Qu Y, Misaghi S, Newton K, Gilmour LL, Louie S, Cupp JE *et al.* Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *J Immunol* 2011; **186**: 6553–6561.
37. Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER *et al.* Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 2010; **467**: 863–867.
38. Gasse P, Riteau N, Charron S, Girre S, Fick L, Petrilli V *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.

Cell Death and Disease **is an open-access journal published by** ***Nature Publishing Group.*** **This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/**

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Disease website (http://www.nature.com/cddis)

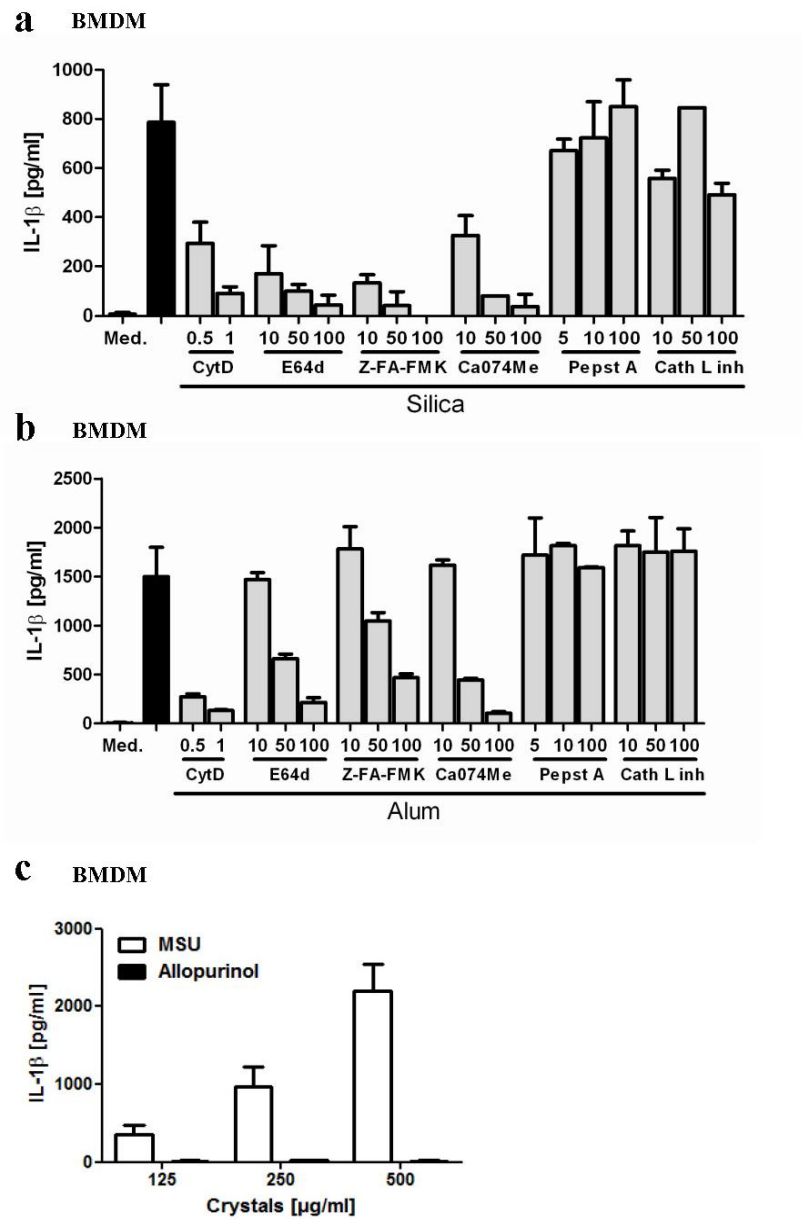
Supplementary data

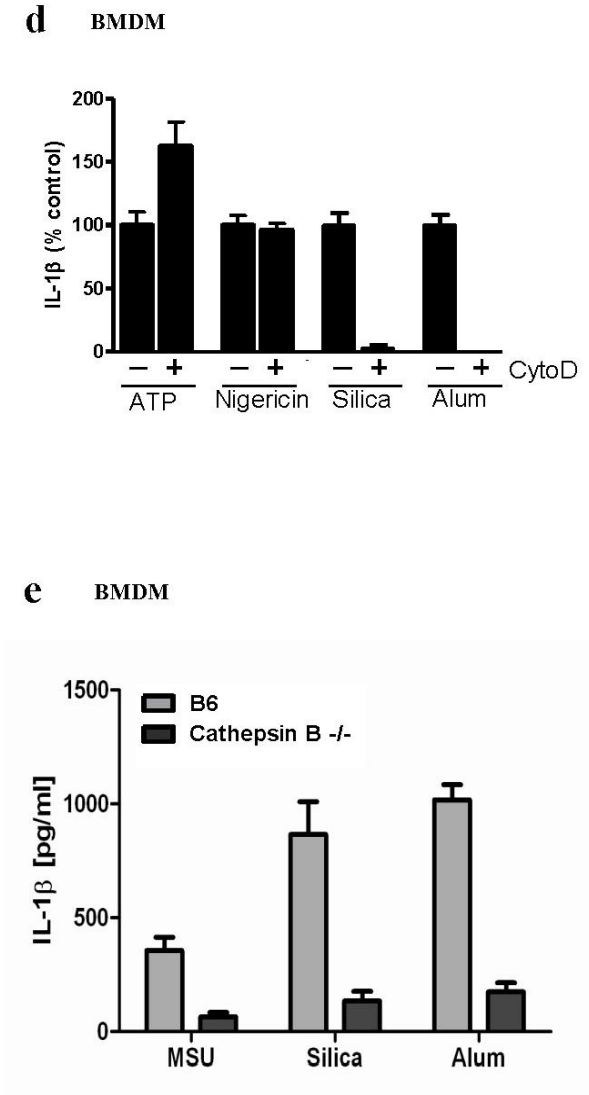
Mice

The following mice deficient for Nlrp3, ASC, Casp-1, Nlrc4, P2X7 receptor, P2X4 receptor and P2Y2 receptor, cathepsin B were used to prepare primary bone marrow-derived macrophages (BMDM) and dendritic cells (BMDC). Mice were backcrossed at least 10 times on the wild type C57BL/6 genetic background except Nlrp3 deficient mice, which were directly generated on the C57BL/6 genetic background. Deficient mice were compared to wild type C57BL/6 except for P2Y2R deficient mice, which were compared to their P2Y2R wild type littermate. Deficient mice, were bred in our animal facility at the Transgenose Institute (CNRS, Orleans) and C57BL/6 from Janvier (Le Genest Saint Isle, France), Experiments were conduct with adult (6-10 weeks old) animals and were kept in sterile isolated ventilated cages. All animal experiments complied with the French Government's ethical and animal experiment regulations.

Bone marrow derives macrophages and dendritic cells preparation

BMDM were cultured at 10^6 cells/mL for 7 days in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM, Sigma) supplemented with L-glutamine (2µM, Invitrogen), penicillin (100U/ml, Invitrogen), streptomycin (100µg/ml, Invitrogen), 20% horse serum and 30% L929 cell conditioned medium as a source of M-CSF. Cells were washed, fresh medium was added and replated for 3 more days. BMDC were seeded at 4.10^5 cells/mL in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% FCS (Hyclone), L-glutamine (2µM, Invitrogen), β-Mercaptoethanol (50nM, Invitrogen), penicillin (100U/ml, Invitrogen), streptomycin (100µg/ml, Invitrogen) and 5% J558L cells supernatant as a 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.



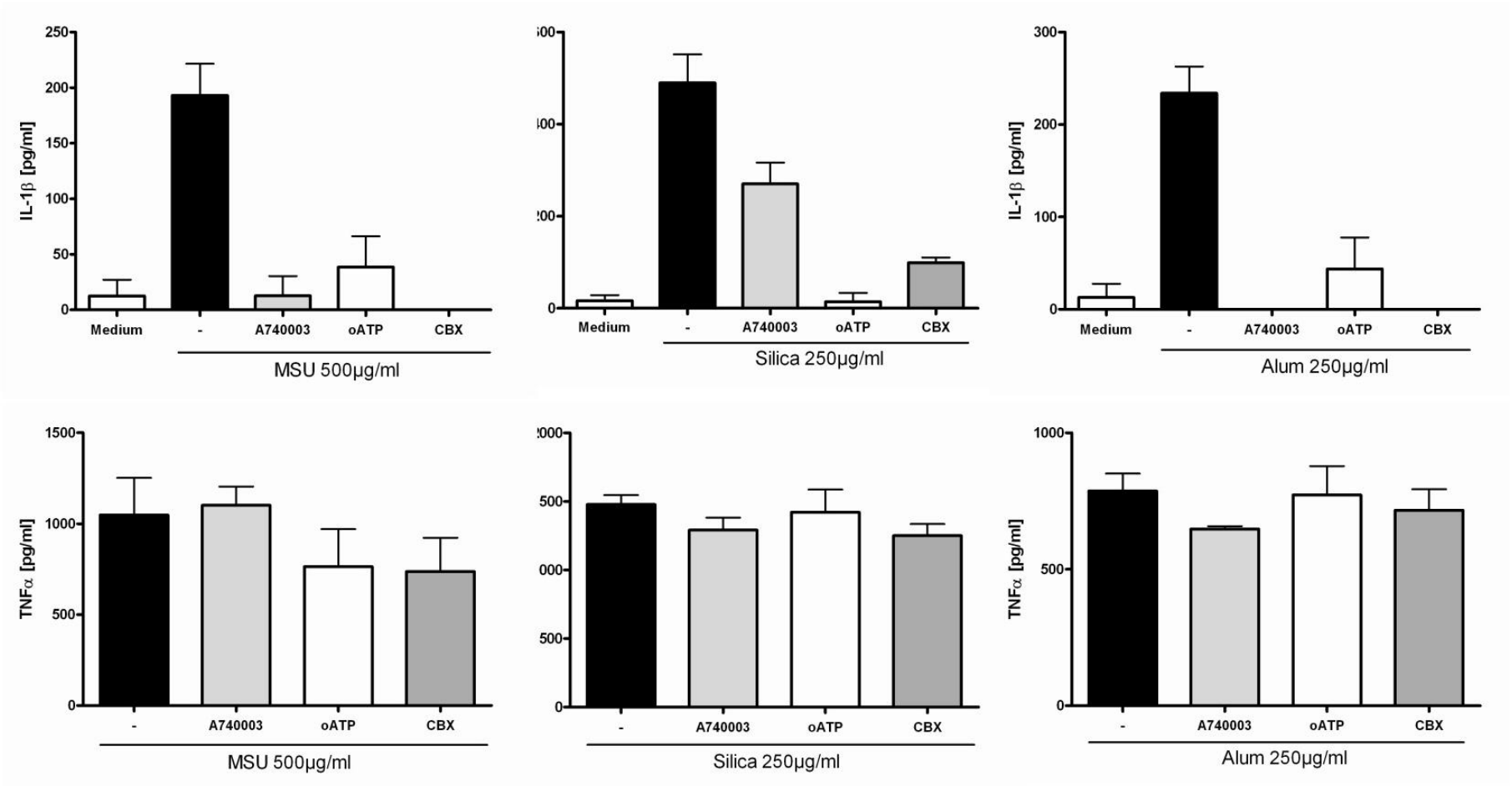


Supplementary data 1

MSU, silica or Alum crystals-induced IL-1β production depends on cystein cathepsin proteases.

Particle phagocytosis is inhibited by cytochalasine D (Cyt D) (a and b). Cystein cathepsin and/or calpain inhibitors (E64d, Z-FA-FMK), cystein cathepsin B inhibitor (Ca074Me) but not cathepsin L inhibitor and aspartic acid protease cathepsin D (pepstatin A) dose-dependently decreased IL-1β production in response to silica (a) or Alum (b) crystals by LPS-primed BMDM. MSU but not allopurinol crystals induce IL-1β production (c). Particle-induced IL-1β secretion is impaired in presence of cytochalasin D whereas ATP- or nigerin-induced IL-1β secretion is not affected (d). Crystal-induced IL-1β productions were dampened in cathepsin-B deficient macrophages (e). Data are representative of 3 independent experiments and are expressed as mean values ± SD.

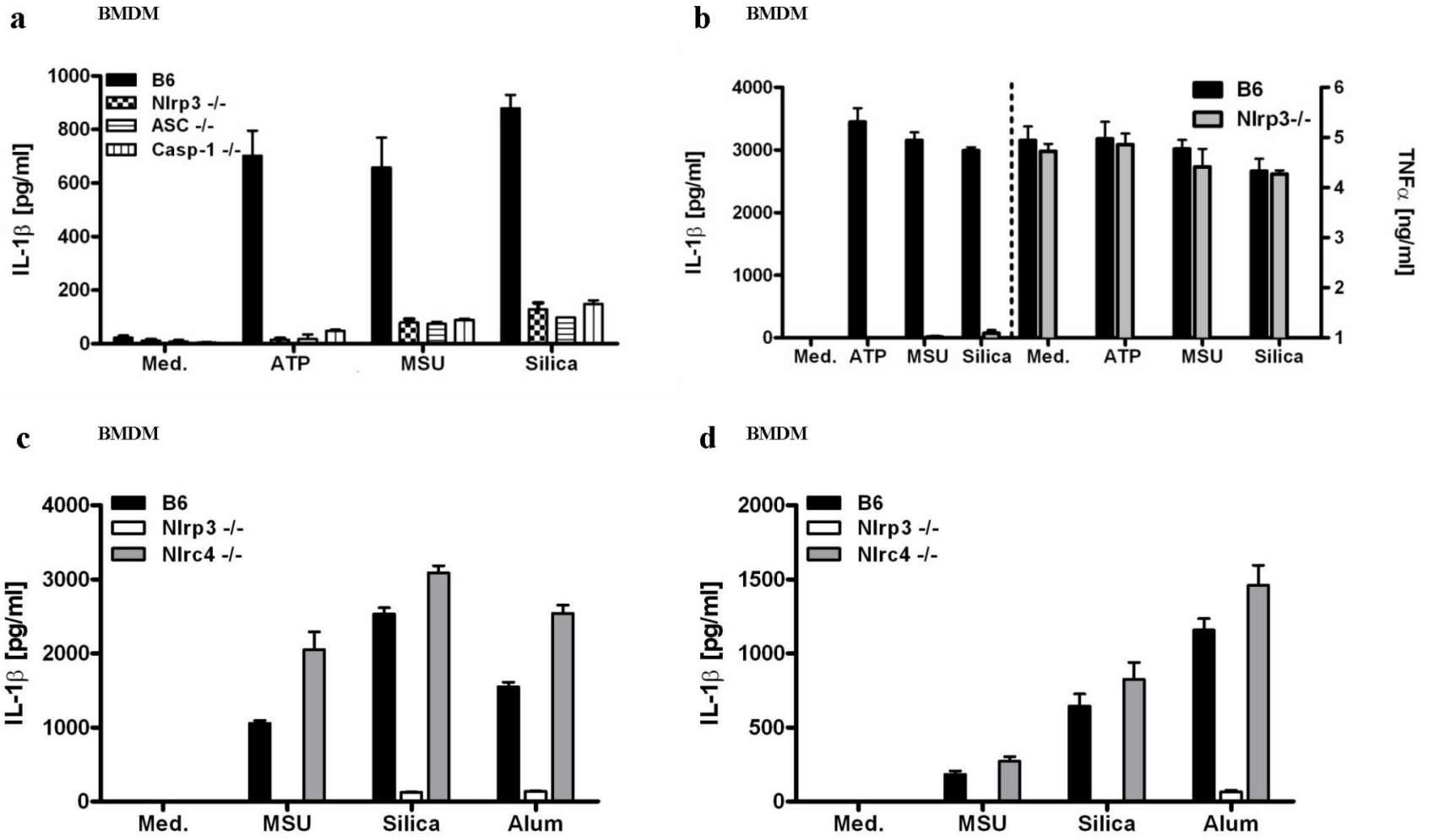
BMDM



Supplementary data 2

P2Rs and connexin/pannexin Specific are required for IL-1β production by murine macrophages by MSU, silica or Alum.

A740003 (100µM), oATP (500µM) and carbenoxolone (CBX) (50µM) affect IL-β but not TNFα production of LPS-primed BMDM stimulated with MSU, silica or Alum crystals. Data are representative of 3 independent experiments and are expressed as mean values ± SD.



Supplementary data 3

MSU, silica or Alum crystals-induced IL-1β production depends on the Nlrp3 inflammasome.

ATP or crystals-induced IL-1β productions are impaired in LPS-primed Nlrp3, ASC or Casp-1 deficient BMDM (a) whereas TNFα production is not affected in Nlrp3 deficient BMDM (b). In contrast Nlrp4 deficiency has no effect on IL-1β production by BMDM (c) or BMDC (d). Data are representative of 3 independent experiments and are expressed as mean values ± SD.

2ème partie: L'adénosine, métabolite de l'ATP, et son rôle essentiel dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Article 2)

Adenosine is an essential danger signal in nanoparticle-induced NLRP3 inflammasome triggering

Ludivine Baron, Aurélie Gombault, Nicolas Riteau, Noëlline Guillou, Bérengère Villeret, Florence Savigny, Anthony Guillemain, Marc Le Bert, Bernhard Ryffel, Fabio Martinon, Vincent Lagente, François Rassendren and Isabelle Couillin

Une étude réalisée en collaboration au laboratoire a permis de montrer que certaines nanoparticules peuvent activer l'inflammasome NLRP3 *in vitro* et *in vivo* (Yazdi et al., 2010). Les nanoparticules de dioxyde de silice (SiO_2) et de dioxyde de titane (TiO_2), mais pas celles d'oxyde de zinc (ZnO), activent l'inflammasome NLRP3 *in vitro* dans les cellules myéloïdes. *In vivo*, les nanoparticules de TiO_2 administrées en intranasal chez la souris induisent une inflammation, avec un recrutement de cellules inflammatoires, les neutrophiles, ainsi qu'une sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1α, IL-1β et IL-6 dans les voies respiratoires. Comme il a été montré avec des souris knock-out, cette inflammation est dépendante du récepteur IL-1R, de la protéine adaptatrice ASC, de la protéine effectrice caspase-1, de la cytokine inflammatoire IL-1α mais pas du récepteur NLRP3. Pour expliquer pourquoi le récepteur NLRP3 ne semble pas être impliqué *in vivo*, il a été suggéré que l'IL-1α pourrait compenser les effets inflammatoires de l'IL-1β (Yazdi et al., 2010).

Nous nous sommes focalisés sur les mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse aux nanoparticules en nous basant sur les travaux précédents, d'une part sur ce qui avait été publié par l'équipe de Tschopp et d'autre part sur ce que nous avions précédemment mis en évidence pour les microparticules (article 1). Pour les cristaux de MSU, de silice et d'Alum, nous avions mis en évidence que l'ATP extracellulaire (ATPe) libérée par les cellules stimulées avec des activateurs de l'inflammasome NLRP3 serait, via la signalisation purinergique P2, un nouveau mécanisme d'activation de l'inflammasome.

Dans cette étude, nous montrons que l'ATP et l'ADP sont des signaux essentiels pour l'activation de l'inflammasome NLRP3 mais également que l'adénosine, un des produits du catabolisme de l'ATP, a un rôle non négligeable dans ce mécanisme.

Nous montrons grâce à des inhibiteurs d'hémicanaux de pannexines et de connexines et par l'ajout d'ATP et d'ADP que ces nucléotides sont bien impliqués dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 *in vitro*. En étudiant l'expression des ARN_m de plusieurs récepteurs purinergiques et par l'utilisation

d'inhibiteurs spécifiques et d'enzymes qui dégradent spécifiquement des nucléotides, nous mettons pour la première fois en évidence que la signalisation purinergique en réponse aux nanoparticules se fait par les axes ADP/P2Y1, ATP/P2Y2 et adénosine/P1.

L'adénosine, dont l'importance essentielle dans la régulation de l'inflammation est bien documentée (Haskó and Cronstein, 2013), est le ligand de quatre récepteurs P1 : A_1, A_{2A}, A_{2B} et A_3. Ces récepteurs sont ubiquitaires mais ils sont plus ou moins exprimés suivant les types cellulaires et les tissus. En réponse aux nanoparticules, nous observons, pour les BMDM, que l'expression des récepteurs A_{2A} et A_{2B} est fortement augmentée, celle de A_3 légèrement augmentée tandis que l'expression de A_1 n'est pas affectée. Nous confirmons ces résultats avec l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques.

Nous mettons ainsi en évidence l'action de l'adénosine et nous proposons deux hypothèses :

- l'adénosine comme activateur direct de l'inflammasome NLRP3 via principalement les récepteurs A_{2A} et A_{2B}. Des lignées de THP1 déficientes en composants de l'inflammasome nous permettent de montrer que l'IL-1β produite en réponse à de l'adénosine est dépendante de l'inflammasome NLRP3.
- l'adénosine comme activateur indirect. En effet, des transporteurs d'équilibration et de concentration de nucléosides (ENT et CNT, respectivement) peuvent réintégrer l'adénosine dans la cellule où elle est métabolisée en ATP. L'ATP ainsi synthétisée peut participer à la signalisation purinergique via les axes ATP/P2Y2 et ADP/P2Y1.

Enfin, nous montrons *in vivo* que l'inflammation pulmonaire induite chez les souris par l'instillation de nanoparticules de silice est partiellement réduite par l'ADA, l'enzyme qui dégrade l'adénosine. L'ensemble de nos données nous permet d'impliquer pour la première fois l'adénosine dans l'endommagement et l'inflammation cellulaires en réponse aux nanoparticules.

Les résultats présentés ci-dessous n'ont pas encore été publiés.

ATP, ADP and Adenosine are essential danger signals in nanoparticle-induced NLRP3 inflammasome triggering

Ludivine Baron[1], Aurélie Gombault[1], Nicolas Riteau[1], Noëlline Guillou[1], Bérengère Villeret[1], Florence Savigny[1], Anthony Guillemain[1], Marc Le Bert[1], Fabio Martinon[2], Vincent Lagente[3], François Rassendren[4] and Isabelle Couillin[1]

[1]INEM, CNRS, UMR7355, University of Orleans, France; [2]Department of Biochemistry, University of Lausanne, Switzerland; [3]INSERM U991, University of Rennes, France; [4]IGF, CNRS, UMR 5203 and INSERM U661, University of Montpellier, France.

Keywords: ATP, Danger signal, Inflammasome, P2R, P1R, NLR.

Running Title: Adenosine induces inflammasome activation

Address of correspondence to Isabelle Couillin, Molecular and Experimental Immunology and Neurogenetics, UMR 7355, 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: ADA, adenosine deaminase; ADP, adenosine diphosphate; AK, adenosine kinase; AMP, adenosine monophosphate; AMPK, AMP kinase; AR, adenosine receptor/P1 receptor; ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain; ATP, adenosine triphosphate; BAL, bronchoalveolar lavage; BALF, BAL fluid; BMDM, bone-marrow derived macrophages; cAMP, cyclic AMP; Cbx, carbenoxolone; CNT, concentrative nucleotide transporter; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; eATP, extracellular ATP; ENPPs, ecto-nucleotidase pyrophosphatases/phosphodiesterases; ENT, equilibrative nucleotide transporter; FFA, flufenamic acid; G_i, inhibitory G protein; GPCR, G protein-coupled receptor; G_s, stimulatory G protein; IL-1β, interleukin-1 beta; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; LPS, lipopolysaccharide; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MSU, monosodium urate; NLR, nod-like receptor; Nano-SiO_2 and -TiO_2, silica dioxide and titanium dioxide nanoparticles; NLRP3, NLR pyrin domain containing 3; oATP, periodate oxidized ATP; PLC-β, phospholipase C-beta; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; ROS, reactive oxygen species; sh RNA, short hairpin ribonucleic acid.

Abstract

The NLR pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome is a major component of the innate immune system. However, its mechanism of activation remains largely unknown. Inorganic metal oxides such as silica dioxide (Nano-SiO_2) and titanium dioxide (Nano-TiO_2) nanoparticles activate NLRP3 in macrophages similarly than silica or asbestos. Investigated towards the molecular mechanisms of inflammasome activation, we show active adenosine triphosphate (ATP) release and subsequent ATP, adenosine diphosphate (ADP) and adenosine receptor signaling are required for NLRP3 activation. Nano-SiO_2 and Nano-TiO_2 caused significant increase in P2Y1, P2Y2, $A2_A$ and $A2_B$ receptor expression whereas P2X7 receptor was down-regulated. Hydrolysis of ATP and ADP increased interleukin-1 beta (IL-1β) secretion whereas hydrolysis of adenosine impaired IL-1β secretion while selective $A2_A$ or $A2_B$ receptor blockers decreased IL-1β secretion upon nanoparticles. Moreover adenosine alone is shown for the first time to be an efficient activator of the NLRP3 inflammasome in macrophages. Importantly, modulation of airway adenosine in mice allowed to damper experimental pulmonary inflammation caused by nanoparticle exposure. These data provide new molecular mechanisms to explain how NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through nucleotide, nucleoside and degradation product signaling pathways leading to chronic inflammatory diseases.

Introduction

A major signaling pathway of the innate immune system is the inflammasome, a multiprotein platform that activates caspase-1. We showed recently that TiO_2 (Nano-TiO_2) and SiO_2 (Nano-SiO_2) nanoparticles are sensed by the NLRP3 inflammasome and induce the regulated release of IL-1β (Yazdi et al., 2010b) as shown before with the environmental irritants asbestos or silica (Dostert et al., 2008). Nevertheless, despite the identification and characterization of numerous sterile or microbial activators, the precise mechanism mediating the NLRP3 inflammasome activation remains to be determined. Similarly to asbestos and silica, Nano-TiO_2 induces the production of reactive oxygen species (ROS) (Onuma et al., 2009) followed by an induction of inflammation-related genes such as IL-1, IL-6 and CXCL-2 (Park et al., 2008). Nano-TiO_2-dependent inflammasome activation has been also suggested to depend on intracellular potassium (Yazdi et al., 2010b). We previously demonstrated that NLRP3 inflammasome particulate activators, uric acid, silica and aluminum salt crystals, trigger the extracellular delivery of endogenous ATP which just precedes the secretion of mature IL-1β by macrophages, both events depending on purinergic signaling and connexin/pannexin channels (Riteau et al., 2012). Here, we investigated whether ATP release and purinergic signaling through ATP but also ADP and adenosine receptors may be involved in inflammasome activation by nanoparticles.

Extracellular nucleotides have emerged as key immunomodulators. Intracellular ATP is released after stress and/or cellular activation and purinergic signaling has been shown to modulate inflammation and immunity (Antonioli et al., 2013; Eltzschig et al., 2012). In the extracellular space, ATP is rapidly hydrolyzed in a stepwise manner to ADP, AMP (adenosine monophosphate) and adenosine by ectoenzymes. First, ATP and ADP are both converted to AMP through the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39), or ATP directly to AMP by ecto-nucleotidase pyrophosphatases/phosphodiesterases (ENPPs). Secondly,

CD73 ecto-5′-nucleotidases or ecto-alkaline phosphatases convert extracellular AMP to adenosine (Eltzschig et al., 2012). Then adenosine is irreversibly hydrolyzed to inosine by adenosine deaminase (ADA). Extracellular ATP (eATP) signals through both ATP-gated ion channels P2X and G protein-coupled receptors (GPCR) P2Y membrane receptors whereas ADP signals through P2Y receptors and adenosine through P1 receptors (Jacobson et al., 2012). There are eight P2Y receptors subtypes, G_q-coupled P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 and P2Y11 receptors which activate phospholipase C-beta (PLC-β) and G_i (inhibitory G proteins)-coupled P2Y12, P2Y13 and P2Y14 receptors. Adenosine signals through four adenosine receptors subtypes (ARs, or alternately P1 receptors). A2 subtypes, $A2_A$ and $A2_B$, are coupled to stimulatory G (G_s) proteins to stimulate adenylate cyclase and to increase cyclic AMP (cAMP), and conversely, A1 and A3 subtypes inhibit adenylate cyclase and cAMP increase through G_i protein. In some cells, the $A2_A$ and $A2_B$ subtype are dually coupled to G_s and G_q proteins and the A3 subtype to G_i and G_q proteins. The G_q coupling leads to elevation of phosphoinositides, mobilizes several types of K^+ or Ca^{2+} channels and activates PLC-β and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (Cronstein, 2011; Polosa and Blackburn, 2009). Whereas adenosine is the main agonist for A1, $A2_A$ and $A2_B$ receptors and the major and full agonist ligand for the A3 receptor, inosine may also able to signal through $A2_A$ and A3 receptors (Gomez and Sitkovsky, 2003). Adenosine concentration in the extracellular compartment is the consequence of its extracellular production and transport, as well as its formation from intracellular sources and metabolism to inosine. Both ATP and adenosine can be transported outside the cell via diffusion or active transport, whereas only adenosine may enter the cells through adenosine transporters (Mediero and Cronstein, 2013). Indeed, most cells possess equilibrative and concentrative adenosine transporters (respectively ENTs and CNTs), which allow adenosine to quickly cross the cell membrane (Young et al., 2013). Minor changes in steady-state ATP levels in the cell (normally ~5 mM) will translate into

major changes in intracellular adenosine concentrations (around 100,000 times higher). Intracellular adenosine is converted to ATP via phosphorylation steps mediated by adenosine kinase (AK) and AMP kinase (AMPK). A variety of selective adenosine receptor agonists and antagonists have been identified, based on structural similarities to agonists such as adenosine, or antagonists such as xanthine, caffeine or theophylline (Jacobson and Gao, 2006). The basal physiological level of extracellular adenosine has been estimated to be in the range of 30–200 nM (Ballarin et al., 1991).

Adenosine is ubiquitously present, P1 receptors are widely distributed throughout the body and adenosine binding at these receptors exerts a broad spectrum of physiological and pathological functions (Chen et al., 2013). ATP-dependent adenosine signaling occurs typically during conditions that are associated with the release of ATP from intracellular stores, and can occur during injurious conditions such as ischemia and reperfusion (Eltzschig and Eckle, 2011), hypoxia (Faigle et al., 2008) or acute inflammation (Eltzschig et al., 2012). Production of adenosine, and its subsequent signaling through P1 receptors, plays beneficial roles in acute disease states, in particular in ischemic acute injury in the lung (Karmouty-Quintana et al., 2013). However, during acute tissue injury, elevated adenosine levels have been implicated in the progression of chronic diseases where adenosine promotes aberrant wound healing leading to fibrosis in different organs including lungs, liver, skin and kidney and in these conditions blockade of adenosine signaling appears to be beneficial (Karmouty-Quintana et al., 2013). Elevated adenosine levels were observed in patients with asthma (Huszar et al., 2002), chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (Esther et al., 2011; Goodarzi et al., 2010), and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (Schroder et al., 2010) associated with reduced levels of ADA activity, increased levels of CD73 (the major enzyme of extracellular adenosine production) and elevated levels of $A2_B$ receptor. ADA knockout mice present high persistent adenosine levels which lead to airspace enlargement and fibrosis,

cardinal sighs of COPD and IPF (Aldrich et al., 2000; Chunn et al., 2005; Sun et al., 2006). This indicates that signaling through adenosine is very finely tuned and may be involved in both pro-inflammatory and anti-inflammatory processes.

Here we go deeper into the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation induced by nanoparticles through purinergic signaling and pointing out the role of ATP, ADP as well as adenosine and its receptors. We propose a role for ATP-derived adenosine in NLRP3 inflammasome activation *in vitro* in macrophages and *in vivo* in acute lung inflammation induced by airway exposure to nanoparticles.

Results

Nano-TiO_2 or Nano-SiO_2 particles trigger active ATP release and IL-1β secretion through purinergic signaling and pannexin/connexin hemichannel activity

We showed recently that Nano-SiO_2 and Nano-TiO_2, but not Nano-ZnO, activate the NLRP3 inflammasome in human and murine macrophages, leading to IL-1β release similarly than MSU, silica and alum salt microparticles (Yazdi et al., 2010b). We further reported that these particulate crystals activate the inflammasome through active ATP release and dependently of purinergic signaling and connexin/pannexin activity (Riteau et al., 2012). Here we investigated whether nanoparticles share the same mechanisms of activation. Using the ecto-ATPase inhibitor ARL67156 to limit ATP catabolism (Joseph et al., 2003), we co-analyzed ATP release and mature IL-1β secretion in the same human monocyte/macrophage culture supernatant at different times. We observed that Nano-SiO_2 (Figure 1A) or Nano-TiO_2 (Figure 1B) causes an active release of endogenous ATP by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) -primed THP1 macrophages, which peaks at 3-4 hours and just precedes mature IL-1β secretion. Interestingly, Nano-ZnO, known to fail to activate the NLRP3 inflammasome (Yazdi et al., 2010b), neither induced ATP release nor IL-1 β secretion (Figure 1C). Importantly, cell death assessed by MTT was minimal suggesting that ATP release is not a consequence of major macrophage death (Figure 1D). These data suggest that IL-1β secretion is a consequence of active ATP release induced by particulate NLRP3 inflammasome activators. Moreover we confirm that IL-1β secretion is attenuated in THP1 cells stably expressing short hairpin ribonucleic acid (shRNA) directed against apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain (ASC) or NLRP3 receptor, which are components of NLRP3 inflammasome (Figure 1E).

Investigating the mechanisms of nanoparticle-induced ATP release leading to IL-1β secretion, we observed that specific inhibition of P2X7 receptor (P2X7R) by A740003 (King, 2007) at

10µM led to partial inhibition of ATP release and IL-1β secretion by Nano-SiO2 and Nano-TiO2 (Figures 1F and 1G). Among different potential mechanisms for regulated nucleotide release after cell stimulation, we focused on the role of channel(s) and especially the connexin and pannexin family hemichannels (Harris, 2007; Orellana et al., 2011). Connexin/pannexin channel blocker carbenoxolone (Cbx) and the connexin channel blocker flufenamic acid (FFA) reduced significantly both ATP and IL-1β releases indicating that connexin and/or pannexin hemichannels are involved in ATP release and IL-1β production (Figures 1F and 1G). Mitochondrial activity measurement was minimal (Figure 1H). Addition of nucleotides such as ATP or ADP, or their stable derivatives ATPγS or ADPβS, greatly increase IL-1β production by THP1 in response to nanoparticles whereas these nucleotides have not effect alone (Figure 1I). These data suggest that ATP but also ADP are involved in nanoparticle-mediated NLRP3 inflammasome activation.

Conversely to THP1 human monocyte/macrophage cell line, we were unable to measure significant ATP increase in the supernatant of stimulated murine bone-marrow derived macrophages (BMDM) even adding the ecto-ATPase inhibitor ARL67156 probably due to fastest ATP degradation by these cells and/or to limitation of our measurement (data not shown). The P2R antagonist suramin and oATP strikingly decreased IL-1β production induced by Nano-SiO_2 or Nano-TiO_2, in a dose dependent manner (Figure 2A). Cbx and FFA reduced significantly IL-1β release indicating that connexin and/or pannexin hemichannels are involved in IL-1β production by murine macrophages (Figure 2B). Western blotting analysis confirmed that Nano-SiO_2 or Nano-TiO_2, but not Nano-ZnO, triggers the cleavage of pro-IL-1β into the mature 17kD IL-1β form and its secretion in lipopolysaccharide (LPS) -primed BMDM and that periodate oxidized ATP (oATP) a broad P2R inhibitor, A740003, Cbx or FFA, strongly reduced the secretion of mature IL-1β (Figures 2C). Moreover the cleavage of the pro-caspase-1 into the secreted mature p10 subunit was reduced in presence of

oATP, Cbx or FFA (Figures 2D) confirming that NLRP3 inflammasome activation depends on purinergic signaling and connexin/pannexin channels.

Nanoparticles induce IL-1β secretion through metabotropic purinergic receptors P2YR signaling

In order to identify the ATP purinergic receptors involved, we used macrophages from P2X7R, P2X4R or P2Y2R deficient mice. As expected, P2X7R, but not P2X4R or P2Y2R, was fully required for NLRP3 activation in response to high ATP concentrations (not shown). Nevertheless, deficiency in the ATP ionotropic P2X7R or P2X4R did not lead to significant impairment in IL-1β production by BMDM upon nanoparticles stimulation (not shown). Using macrophages deficient for ATP/UTP metabotropic P2Y2R involved in cell chemotaxis in response to ATP leakage (Chen et al., 2006), we observed a slight decrease of IL-1β production (not shown). Quantitative analysis of P2 purinergic receptor mRNA expression showed that P2Y2R (activated by ATP/UTP) mRNA level was increased after Nano-SiO_2 or Nano-TiO_2 nanoparticles stimulation whereas P2Y1R (ADP) mRNA level was increased after Nano-SiO_2 stimulation. In contrast, mRNA levels of P2Y7R (ATP), P2Y4R (UTP), P2Y6R (UDP) and P2Y12R (ADP) were slightly reduced after Nano-SiO_2 stimulation (Figure 3A) and P2Y12R also after Nano-TiO_2 stimulation. Expression of mRNA P2Y13R (ADP) was not significantly reduced after both nanoparticles. P2Y1R antagonist MRS2500 (Figure 3B) decreased Nano-SiO_2- but not Nano-TiO_2-induced mature IL-1β secretion whereas P2Y6R antagonist MRS2578 (Figure 3C) and P2Y12R antagonist MRS2395 (Figure 3D) had no effect on both Nano-TiO_2 and Nano-SiO_2-induced IL-1β secretion. Since P2Y1R and P2Y2R are coupled to the heterotrimeric G-proteins of the G_q family that activate PLC-β isozymes, we analyzed the effect of the PLC-β inhibitor U73122. Figure 3E shows that U73122 decreased Nano-TiO_2 or Nano-SiO_2-induced IL-1β secretion by murine BMDM indicating

that signaling through PLC-β is involved. These results suggest that P2Y1R (ADP) and P2Y2R (ATP/UTP) are involved in activation of the NLRP3 inflammasome by nanoparticles through PLC-β signaling.

Nanoparticles induce mature IL-1β secretion through adenosine and P1 receptors signaling

To go more in detail into the potential role of ATP, we stimulated murine macrophages in presence of ATP consuming enzyme apyrase grade VII, hydrolyzing ATP and ADP into AMP, with a low ATPase/ADPase ratio. Apyrase VII inhibited very efficiently ATP 5mM-induced IL-1β secretion (not shown) but did not abrogated IL-1β secretion and on the contrary, slightly increased Nano-TiO_2 or Nano-SiO_2-induced IL-1β production (Figure 4A). Apyrase VII alone had no effect on IL-1β secretion and cell viability (not shown). This suggests ATP and ADP are not the only nucleotides involved in IL-1β secretion upon nanoparticles stimulation. Hydrolyze ATP and ADP result in providing a large amount of substrate for the ecto-5'-nucleotidase CD39, which may generate adenosine. We hypothesized that accumulation of extracellular adenosine may be an essential IL-1β secretion-promoting factor in response to nanoparticles. Therefore, we tested the effect of the adenosine deaminase (ADA) on nanoparticle-induced IL-1β secretion. In the presence of ADA, IL-1β secretion upon Nano-SiO_2 or Nano-TiO_2 was greatly reduced (Figure 4B). Data obtained in presence of apyrase or ADA strongly suggest adenosine as a major ATP catabolism product promoting IL-1β secretion in response to nanoparticles. Similarly, we stimulated THP1 cells with Nano-SiO_2, in presence of apyrase VII or ADA (Figure S1). Measurement of eATP levels shows that even if ATP is degraded by apyrase VII, IL-1β secretion by nanoparticles is still observed, and even slightly increased (Figure S1A). If ADA is added, we noted a decrease of ATP levels probably due to the fact that degradation of adenosine by ADA causes a shift in

the balance of the ATP/ADP to adenosine (Figure S1B). When extracellular ATP, ADP and adenosine levels were reduced in presence of ADA, IL-1β secretion was greatly impaired (Figure S1B).

$A2_A$, $A2_B$ and A_3 receptors are involved in NLRP3 inflammasome activation

Analysis of P1 purinergic receptor expression showed that both $A2_A$ and $A2_B$ mRNA are increased in presence of Nano-SiO_2 or Nano-TiO_2 whereas A3 mRNA tended to increase with Nano-TiO_2 and A1 expression remained steady 4 hours after both nanoparticles stimulation (Figure 5A). Moreover, using P1 receptor antagonists, we show that the specific $A2_A$ (SCH58261), $A2_B$ (MRS1754) and A3 (MRS1523) inhibitors decreased IL-1β secretion upon Nano-SiO_2 or Nano-TiO_2 (Figures 5B, 5C and 5D). Specific antagonist of A1 (DPCPX) presented no effects on IL-1β secretion (Figure 5E). Inhibitors alone did not induce IL-1β production (Figures 5B-5E) or cellular toxicity (not shown). These results identified adenosine as a crucial mediator of IL-1β secretion through the high affinity $A2_A$ receptor and the low affinity $A2_B$ and A3 receptors in response to nanoparticles activation in murine macrophages and suggest a role for adenosine in inflammasome activation.

Adenosine induces IL-1β secretion and ATP release depending on NLRP3 inflammasome activation in THP1 human macrophages

Stimulating THP1 macrophages with nanoparticles in presence or not of adenosine (100µM or 5mM) increased eATP release and IL-1β□secretion (Figure 6A and 6B). Surprisingly, even if 100µM adenosine was unable to induce ATP and IL-1β□releases, we observed that high dose of adenosine alone (5mM) caused an increase in extracellular ATP and secreted IL-1β□□Figure 6A and 6B). We observed dose-dependent induction of IL-1β secretion by high concentrations of adenosine (3 or 5mM) but not with small ones (0.3-1mM) as shown in

Figure 6C. High concentrations of adenosine (3 or 5mM) did not present cytotoxic effect (not shown). In order to verify the role of the NLRP3 inflammasome, we used the specific inhibitor of the caspase-1 Z-YVAD-fmk. IL-1β secretion induced by nanoparticles plus adenosine (5mM) or adenosine alone was greatly reduced in presence of Z-YVAD-fmk (Figure 6D). As previously described in Figure 1F, IL-1β secretion induced by Nano-SiO_2 and Nano-TiO_2 was reduced in THP1 expressing shNLRP3 or shASC. Importantly, dose-dependent IL-1β secretion induced by adenosine was reduced in THP1 expressing shNLRP3 or shASC but not in unmodified THP1 or expressing scramble shRNA (Figure 6E). These results demonstrate that adenosine-induced IL-1β secretion depends on the NLRP3 inflammasome.

Early nanoparticle-induced pulmonary inflammation depends on adenosine

Airway exposure to ultrafine particles is associated with strong infiltration of neutrophils in the lungs and the bronchoalveolar space in humans (Nordenhall et al., 2000). This marked neutrophil influx can be reproduced experimentally in mice by intranasal instillations of nanoparticles. We used this well-established model to investigate the *in vivo* role of adenosine in nanoparticle-induced inflammation. SiO_2 nanoparticles were instillated and the airway neutrophil recruitment was analyzed 6h later. As we have shown for TiO_2 nanoparticles (Yazdi et al., 2010a), SiO_2 nanoparticles elicited a considerable increase in the total cell and neutrophil recruitment, KC and IL-6 releases in bronchoalveolar space and IL-1β secretion in lung compared with saline C57BL/6 mice (Figure 7). Since we observed that Nano-SiO_2 instillation induced a transient increase of ATP content locally (not shown) and that ATP is known to be rapidly degraded in ADP, AMP and adenosine, we hypothesized that adenosine is a danger signal involved in lung inflammation and we performed local adenosine depletion experiments in mice. We observed that systemic treatment with ADA reduced SiO_2

nanoparticles-induced acute inflammation, resulting in markedly reduced total cell (Figure 7A) and neutrophil (Figure 7B) recruitments, KC (Figure 7C) and IL-6 (Figure 7D) productions into the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and slightly attenuated secretion of lung IL-1β production (Figure 7E). These results indicate an early pivotal proinflammatory role for adenosine *in vivo* in response to airway exposure SiO_2 nanoparticles.

DISCUSSION

Even if the NLRP3 inflammasome is extensively studied, the exact mechanisms of its activation are not elucidated. We propose that similarly to activation of macrophages by MSU, silica, or aluminium particles, SiO_2 and TiO_2 nanoparticles promote the secretion of mature IL-1β through the active release of ATP in the extracellular space suggesting that it is a general process for particles to activate the NLRP3 inflammasome. Moreover, we demonstrated that after its release, ATP and its degrading products ADP and adenosine are important signaling molecules allowing NLRP3 inflammasome activation and mature IL-1β secretion in macrophages.

We first show that Nano-SiO_2 and Nano-TiO_2, but not Nano-ZnO, induced the active release of ATP through connexin and/or pannexin hemichannels leading to IL-1β secretion by macrophages. Addition of nucleotides such as ATP or ADP or their stable derivatives ATPγS or ADPβS, greatly increased IL-1β production by macrophages indicating that ATP but also ADP are involved in nanoparticle-mediated NLRP3 inflammasome activation. Importantly, we show that Nano-SiO_2 and/or Nano-TiO_2 increased the mRNA expression of P2Y1R and P2Y2R whereas P2Y4R, P2Y6R, P2Y12R, PY13R, P2X4R and P2X7R mRNA were downregulated in primed murine macrophages. Inhibition of phospholipase C-beta (PLC-β) which is activated downstream of P2Y1R and P2Y2R, was able to decrease IL-1β secretion suggesting a role for ATP via P2Y2R and ADP via P2Y1R through recruitment of G_q protein and PLC-β activation. When CD39, which degrades extracellular ATP into ADP and AMP, was inhibited using ARL67156 inhibitor, this allows to better measure eATP levels and we also observed increased production of IL-1β in response to nanoparticles. In these conditions, we probably promote IL-1β secretion through the ATP specific P2Y2 receptor. On the contrary, in presence of adenosine deaminase (ADA), IL-1β was greatly but not totally reduced pointing out an additional important role for adenosine as a major ATP-derived

signaling nucleoside promoting IL-1β secretion induced after Nano-SiO_2 or Nano-SiO_2 macrophage activation. Importantly, we show that Nano-SiO_2 and Nano-TiO_2 increased mRNA expression of $A2_A$, $A2_B$ and slightly of A3 but not of A1 receptors. In addition, specific $A2_A$ and $A2_B$ inhibitors decreased IL-1β secretion whereas a small effect or no effect were observed which the specific A3 and A1 receptor antagonists respectively, confirming that adenosine is a crucial mediator of IL-1β secretion essentially through the high affinity $A2_A$ and the low affinity $A2_B$ adenosine receptors in response to nanoparticle activation in macrophages. Indeed, when adenosine was degraded by ADA, we observed a decrease of eATP levels probably due to a shift in the balance of the ATP/ADP to adenosine towards adenosine degradation and this reduction in ATP, ADP and adenosine, allowed to greatly reducing IL-1β secretion probably through signaling by P2Y2, P2Y1, $A2_A$ and $A2_B$ receptors. Total inhibition of IL-1β secretion was however not observed. In fact, the decrease in extracellular adenosine levels may be rapidly compensated by intracellular adenosine release through equilibrium nucleoside transporters (ENTs) or concentrative adenosine transporters (CNTs), which allow rapid restoration of the balance between intracellular and extracellular adenosine.

In addition, we observed that exogenous adenosine potentiates IL-1β secretion induced by nanoparticles, strengthening the role of adenosine as an essential signal in NLRP3 inflammasome triggering. We also report that high doses of adenosine (1-5 mM) were able to directly promote the secretion of IL-1β by human macrophages. The use of THP1 macrophages stably expressing short hairpin RNA (shRNA) specific for NLRP3 or ASC, showed that IL-1β secretion induced by high dose of adenosine is dependent on the NLRP3 inflammasome. Since eATP levels were also increased, this suggests that high dose adenosine may lead to adenosine intracellular uptake through ENTs or CNTs leading to an increase in intracellular ATP and to a subsequent release of ATP which may be responsible for the

increase in IL-1β secretion. Nevertheless, high dose adenosine may also act directly through activation of the low affinity adenosine receptors leading to direct effect on NLRP3 inflammasome activation. These data show for the first time that adenosine is a direct activator of the NLRP3 inflammasome through purinergic adenosine receptors.

In order to evaluate the role of adenosine in pulmonary inflammation we exposed mice to Nano-SiO_2. Our *in vivo* results indicate that adenosine produced rapidly after nanoparticle exposure has proinflammatory effect and that irreversible degradation of adenosine to inosine by ADA treatment reduced early inflammation. Our data suggest that adenosine produced locally may be detrimental in this model. Indeed it was shown that a surge in extracellular adenosine in response to pathological conditions may be accompanied by increased levels of inflammatory cytokines such as IL-1β and TNF (Schingnitz et al., 2010). Several studies have indicated that extracellular adenosine levels can rise from the baseline (20–300nM) to the low micromolar range in conditions of extreme physiology (Chen et al., 2013). In ischemic areas or after massive tissue trauma leading to cell death by necrosis, extracellular adenosine levels can even increase to ~30μM (Chen et al., 2013). Adenosine receptor signaling in pathological conditions depends largely on increased levels of adenosine.

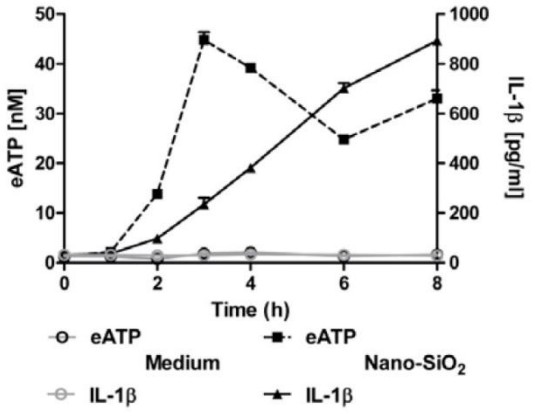
Nanoparticles are known to exacerbate respiratory diseases such as asthma and COPD (Hussain et al., 2010). Their toxicity or inflammatory effects depend on nanoparticle shape and size and amount of metal ion released (Raghunathan et al., 2013). Cobalt-chromium nanoparticles were shown to induce human fibroblast damages across an intact cellular barrier without crossing the barrier, through transmission of ATP via hemichannels and pannexin channels and intercellular signaling (Bhabra et al., 2009). Nevertheless, until now adenosine was not described in nanoparticle-mediated damage or inflammation.

In conclusion, we report a role for ATP-derived adenosine in NLRP3 inflammasome activation *in vitro* in macrophages and *in vivo* in acute lung inflammation induced by airway

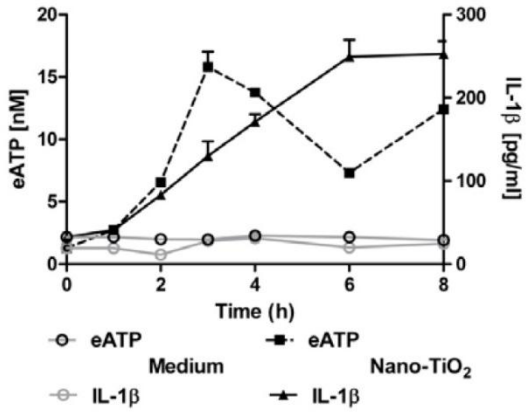
exposure to nanoparticles. In attempt to summarize our data, we propose the model presented in Figure 8.

Figure 1

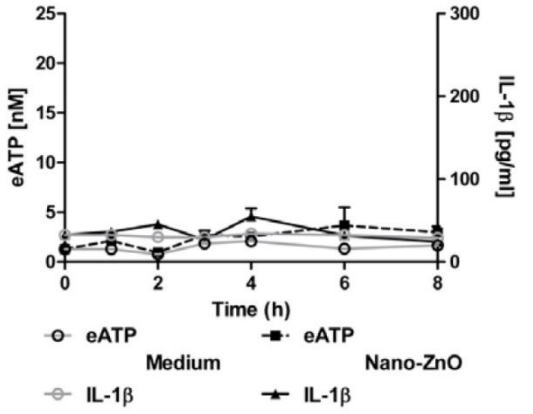
A THP1



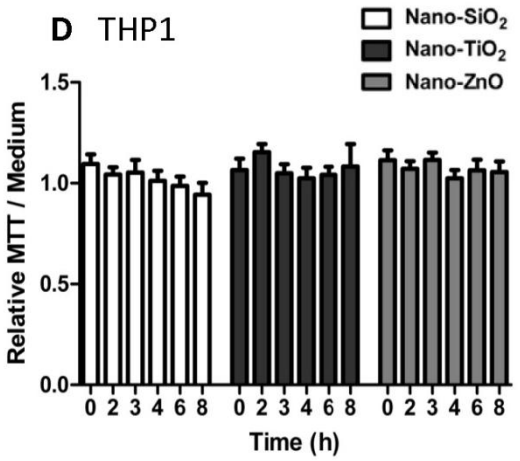
B THP1



C THP1



D THP1



E THP1

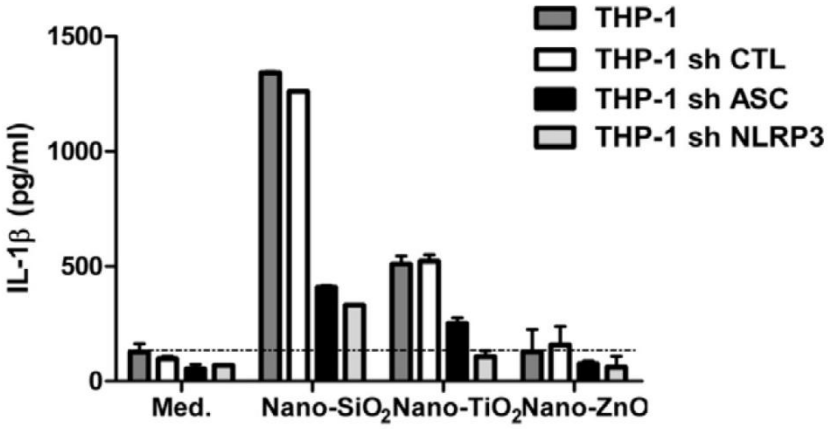


Figure 1

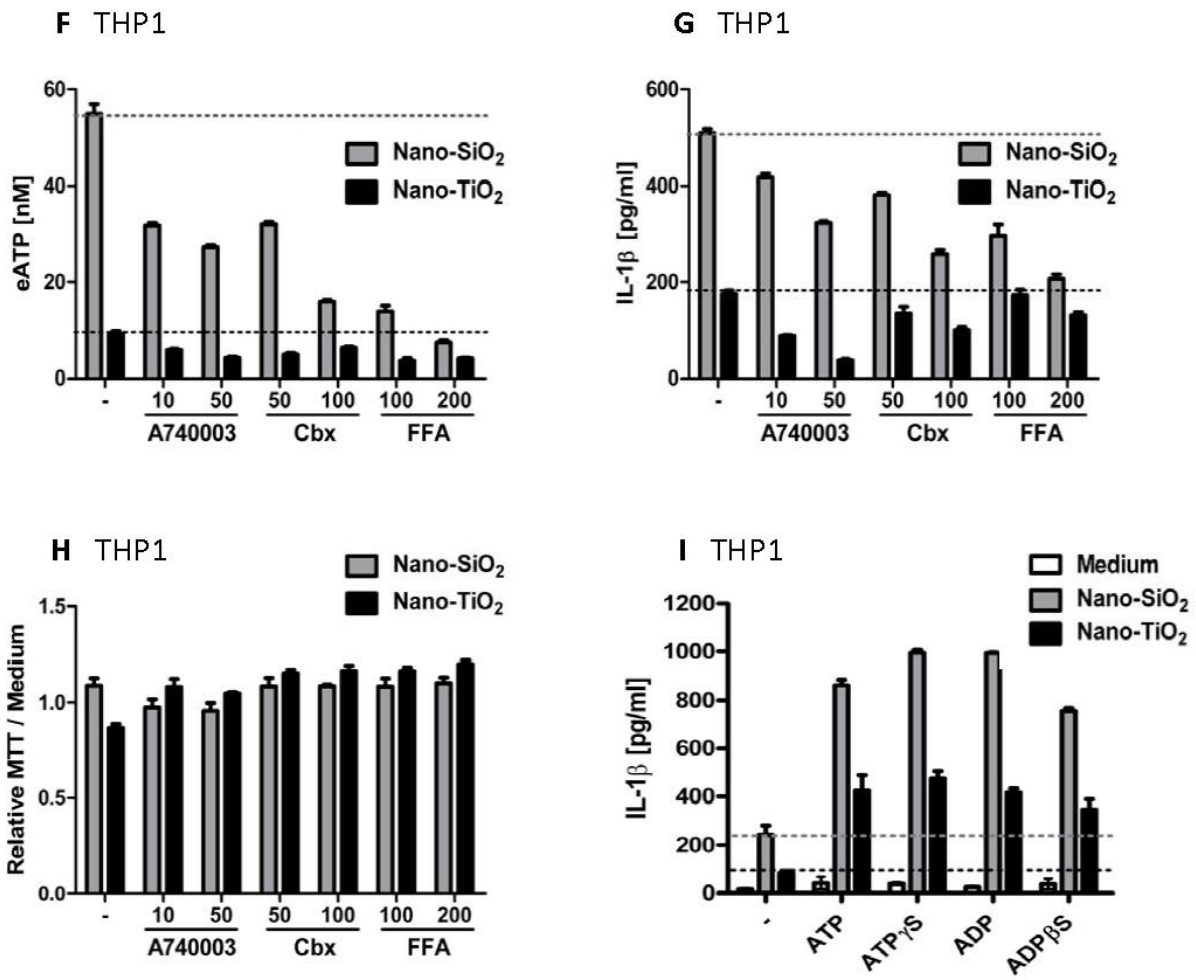


Figure 1. **Nano-TiO_2 or Nano-SiO_2 particles trigger active ATP release and IL-1β secretion through purinergic signaling and pannexin/connexin hemichannel activity**
Nano-SiO_2 (**A**) or Nano-TiO_2 (**B**) triggered active release of ATP in the supernatant by PMA-primed THP1 that peaks between 3-4 h. This ATP release was correlated with a secretion of IL-1β (**A-B**). Nano-ZnO did not induce ATP release or IL-1β secretion (**C**). MTT assay revealed no significant change in cell viability at studied time points (**D**). ARL67156 (50 µM) was adding to supernatant during stimulation to limit ATP catabolism (**A-D**). IL-1β secretion upon Nano-SiO_2 or Nano-TiO_2 was attenuated in THP1 cells stably expressing shRNA directed against ASC (sh ASC) or NLRP3 (sh NLRP3) in comparison to THP1 transfected with lamin-specific shRNA (sh CTL) (**E**). Nano-ZnO did not induce IL-1β secretion after 4 h of stimulation (**E**). Specific inhibition of P2X7R by A740003 partially decreased ATP release and IL-1β secretion by PMA-primed THP1 upon 4 h nanoparticles stimulation (**F** and **G**). Connexin/pannexin channel blocker carbenoxolone (Cbx) and connexin channel blocker flufenamic acid (FFA) reduced both ATP release and IL-1β secretion upon Nano-SiO_2 or Nano-TiO_2 (**F** and **G**). MTT assay revealed no difference between conditions (**H**). PMA-primed THP1 stimulated 4 h with 200µM of ATP, ADP, or their stable derivatives ATPγS or ADPβS, greatly increased IL-1β production in response to nanoparticles, whereas these nucleotides had not effect alone (**I**). Nanoparticles are at the concentration of 250µg/ml (**A-H**) or 125µg/ml (**I**). Data are representative of 2-4 independent experiments.

Figure 2

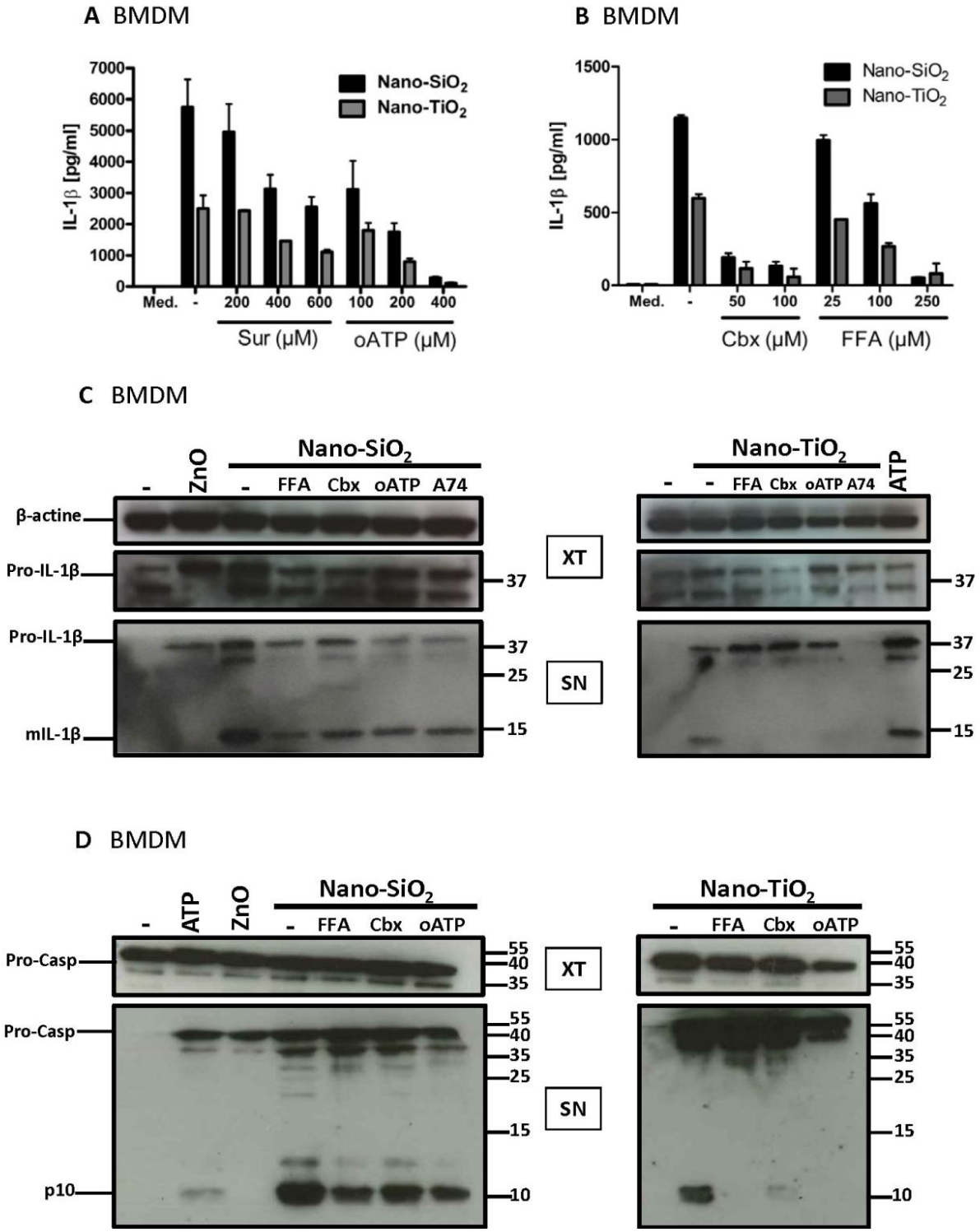


Figure 2. Nano-TiO_2 or Nano-SiO_2 induced IL-1β in mouse macrophages is dependent on purinergic signaling
IL-1β production by LPS-primed BMDM stimulated for 6 h with Nano-SiO_2 or Nano-TiO_2 was dose dependently decreased by P2R antagonists suramin (200, 400 or 600µM) and oATP (100, 200 or 400µM) (**A**). Cbx (50 or 100µM) and FFA (25, 100 or 250µM) reduced significantly IL-1β release by murine macrophages (**B**). Western blotting analysis of 30µl LPS-primed BMDM supernatant (SN) confirmed that FFA (100µM), Cbx (50µM) oATP (200µM) or A740003 (100µM) strongly reduced the secretion of mature 17kD IL-1β form in response to Nano-SiO_2 or Nano-TiO_2 (**C**). As the same way, FFA, Cbx or oATP significantly reduced autoproteolytic cleavage of the pro-caspase-1 into the secreted p10subunit (**D**). Stimulation of BMDM with ATP (5mM, 45 min) induced mature IL-1β (**C**) and caspase-1 (**D**) releases in supernatant whereas Nano-ZnO did not induce these maturations (**C-D**). BMDM extracts (XT) prepared from the same experiments were blotted with anti-β-actin, anti-pro-IL-1β and anti-pro-caspase-1 for control (**C-D**). Molecular weight markers are shown at the right (**C-D**). BMDM were stimulated with 250µg/ml nanoparticles during 6 h. Data are representative of 3 independent experiments.

Figure 3

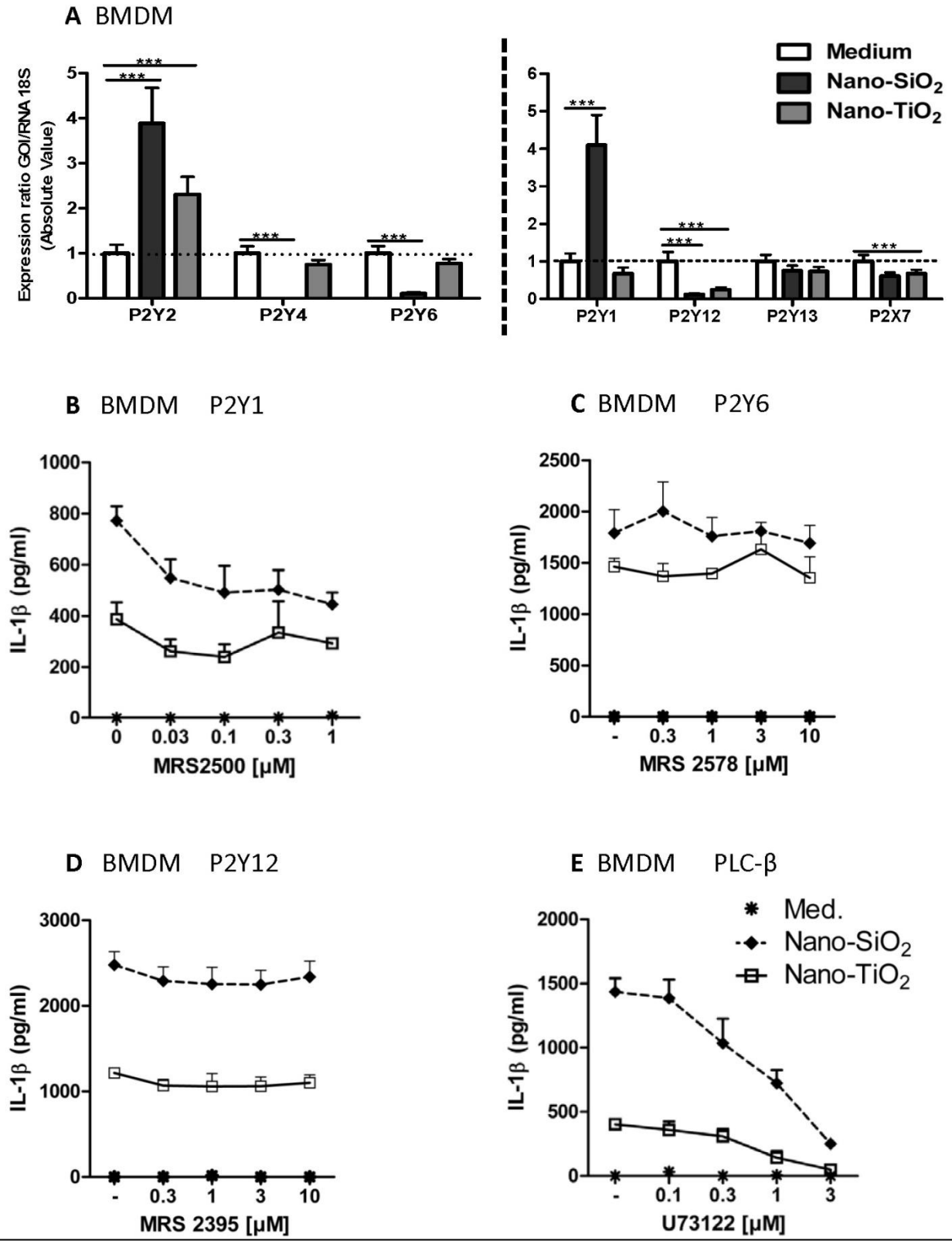


Figure 3. Nanoparticles induce IL-1β secretion through metabotropic purinergic receptors P2YR signaling by murine macrophages

Quantitative PCR analysis of P2X7, P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y12 and P2Y13 receptor mRNA in LPS-primed BMDM, stimulated 4 h with Nano-SiO_2 or Nano-TiO_2 (250µg/ml) (**A**). P2Y1R (for Nano-SiO_2 only) and P2Y2R mRNA were increased whereas P2X7R, P2Y4R, P2Y6R, P2Y12R and PY13R mRNA were slightly reduced 4 hours after Nano-SiO_2 or Nano-TiO_2 stimulation (**A**). IL-1β production by LPS-primed BMDM was slightly decreased with P2Y1 inhibitor MRS2500 (**B**) whereas no effects were observed with P2Y6 inhibitor MRS2578 (**C**) and P2Y12 inhibitor MRS2395 (**D**) upon nanoparticles (250µg/ml) stimulation. Using PLC-β inhibitor U73122, IL-1β release by BMDM was dose-dependently decreased (**E**). Data are representative of 2-3 independent experiments.

Figure 4

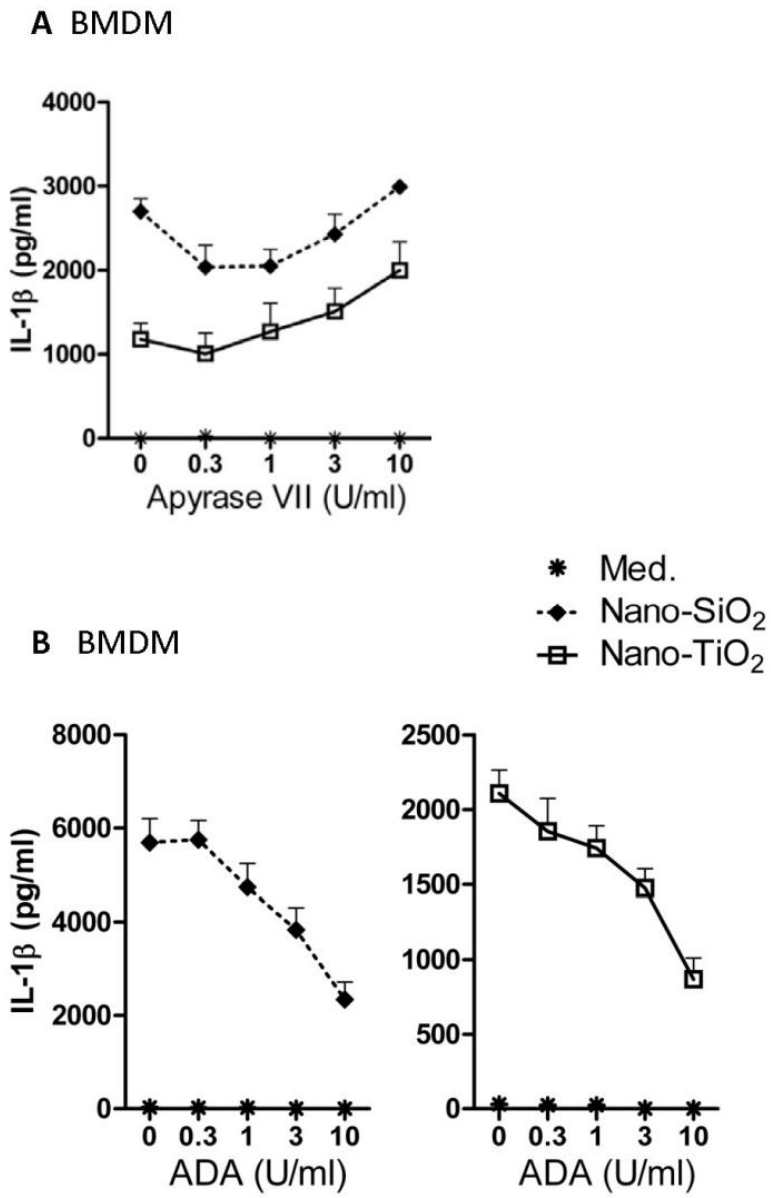


Figure 4. Nanoparticles induce mature IL-1β secretion through adenosine and P1 receptor signaling
LPS-primed murine BMDM were stimulated for 6 h with Nano-SiO_2 or Nano-TiO_2 in presence of increasing concentration of apyrase grade VII (0.3, 1, 3 or 10 U/ml) **(A)**. Nano-SiO_2- and Nano-TiO_2-induced IL-1β was first slightly decreased and then rapidly increased (**A**). LPS-primed BMDM were also stimulated 6 h with Nano-SiO_2 or Nano-TiO_2 and with increasing doses of ADA (0.3, 1, 3 and 10 U/ml) (**B**). (ADA was able to go down IL-1β production by 50% dose dependently (**B**). Apyrase grade VII or ADA alone had no effect on IL-1β secretion by murine macrophages (**A-B**). Data are representatives of 3 independent experiments.

Figure 5

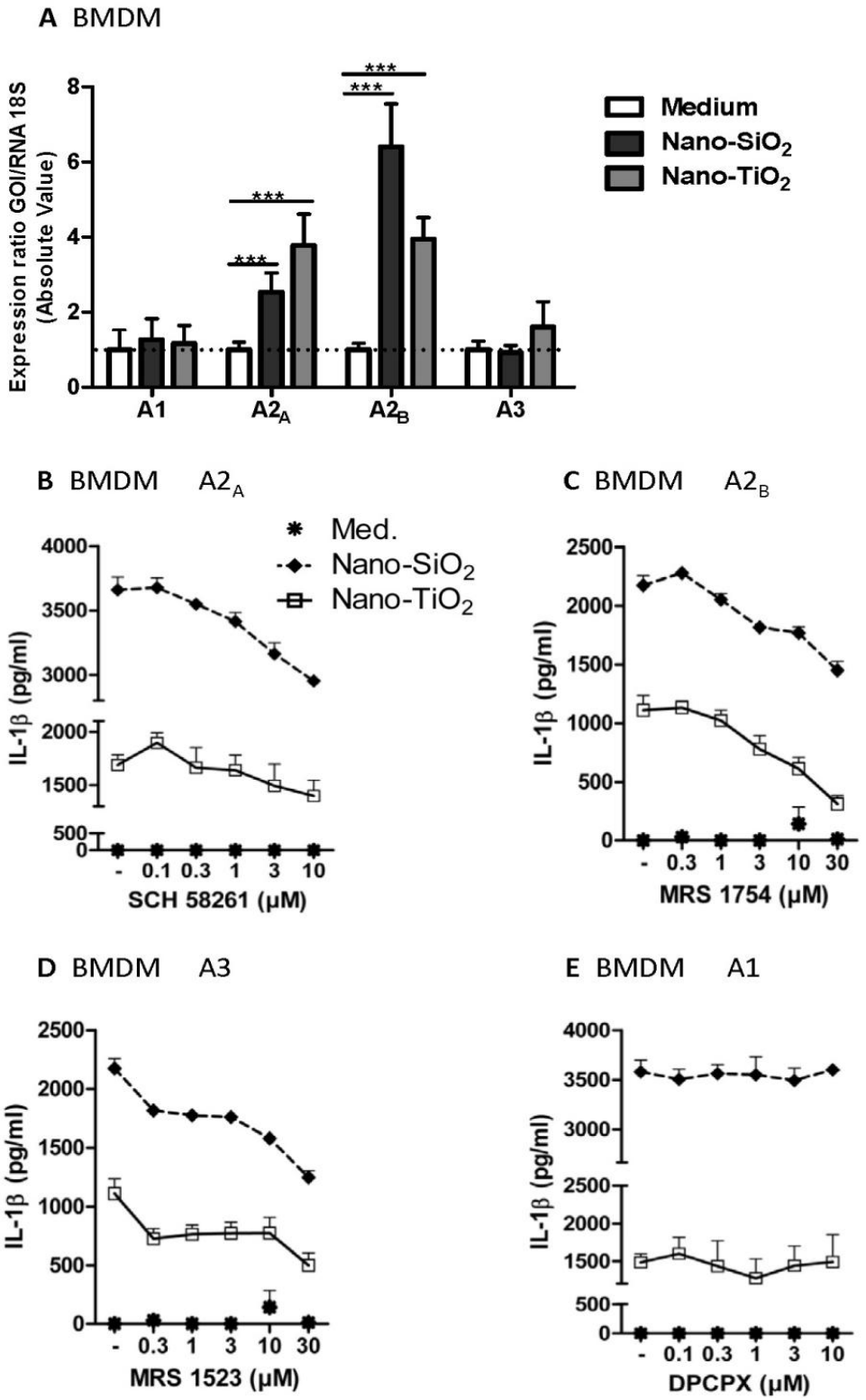


Figure 5. $A2_A$, $A2_B$ and A_3 receptors were involved in NLRP3 inflammasome activation
Quantitative PCR analysis of P1 receptor expression in LPS-primed BMDM stimulated 4 h with Nano-SiO_2 or Nano-TiO_2. $A2_A$ and $A2_B$ mRNA were greatly increased by nanoparticles whereas A3 mRNA was slightly increased only by Nano-TiO_2 and A1 expression remained unchanged (**A**). The specific $A2_A$ (SCH58261), $A2_B$ (MRS1754) and A3 (MRS1523) inhibitors decreased dose dependently IL-1β production by LPS-primed BMDM whereas specific A1 inhibitor (DPCPX) presented no inhibitory effect on IL-1β secretion (**B-E**). Inhibitor concentrations were 0.1, 0.3, 1, 3 and 10 µM for DPCPX and SCH58261 and 0.3, 1, 3, 10 and 30 µM for MRS1754 and MRS1523; inhibitors alone did not induce IL-1β production after 6 h (**B-E**). Nanoparticles are used at 250µg/ml or 200µg/ml and 300µg/ml for Nano-SiO_2 and Nano-TiO_2 respectively. Data are representatives of 2-4 independent experiments.

Figure 6

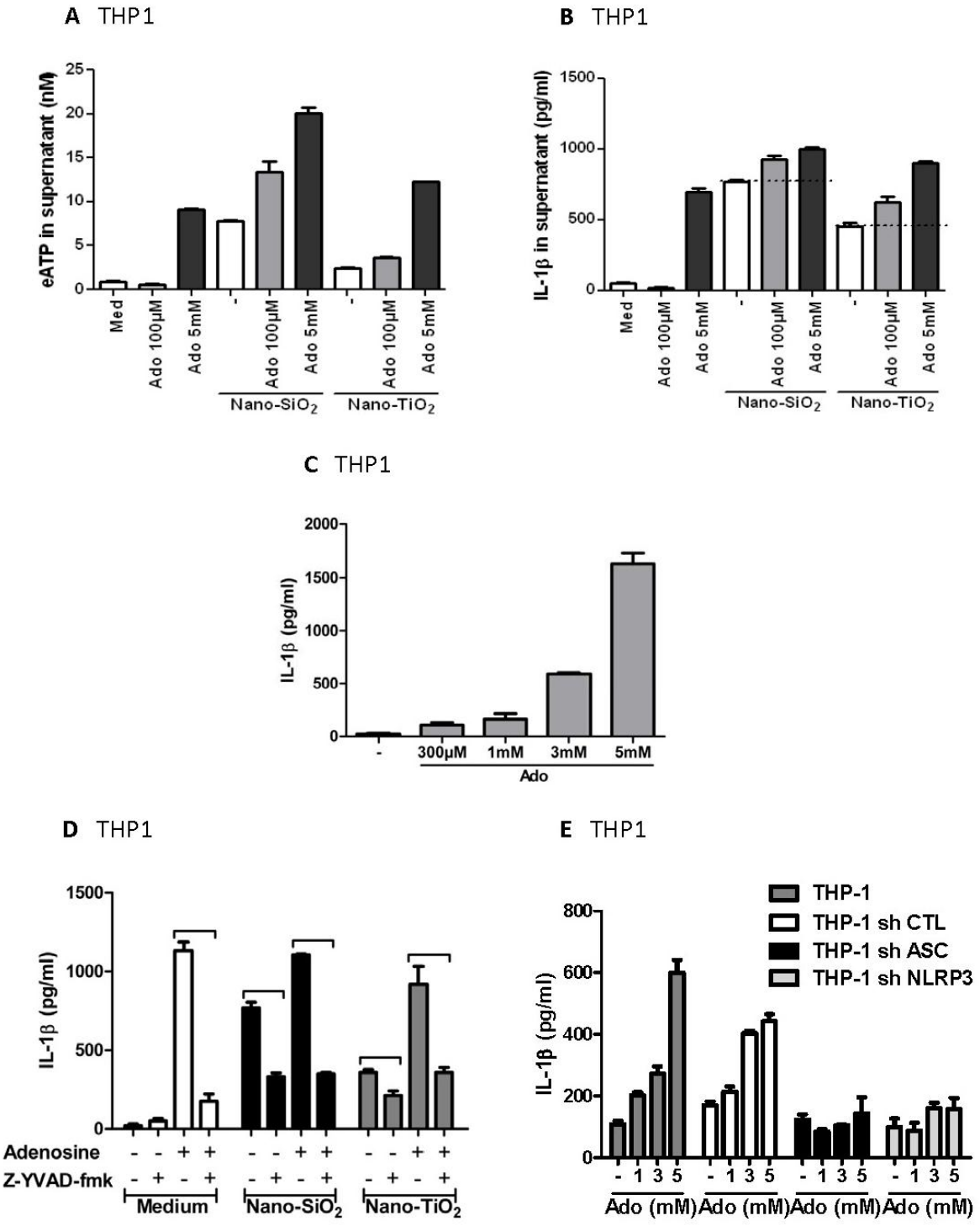


Figure 6. IL-1β secretion and ATP release adenosine-induced depend on NLRP3 inflammasome activation in THP1 human macrophages

Adenosine potentiated eATP release (**A**) and IL-1β secretion (**B**) upon nanoparticles stimulation. Adenosine alone was sufficient to induce IL-1β secretion by PMA-primed THP1 in a dose dependent manner (**C**). Caspase-1 specific inhibitor, Z-YVAD-fmk (5 µM), remarkably reduced adenosine and/or nanoparticles-induced IL-1β secretion; Z-YVAD-fmk had no effect alone (**D**). IL-1β secretion induced by Nano-SiO_2 or Nano-TiO_2 was reduced in THP1 sh NLRP3 or THP1 sh ASC in comparison to THP1 sh CTL (**E**) Adenosine-dose-dependent induction of IL-1β secretion was reduced in THP1 sh NLRP3 or THP1 sh ASC but not in unmodified THP1 or THP1 sh CTL (**E**). PMA-primed THP1 cells are stimulated during 6 h with 250µg/ml Nano-SiO_2 and 500µg/ml Nano-TiO_2. Data are representative of 2-3 independent experiments.

Figure 7

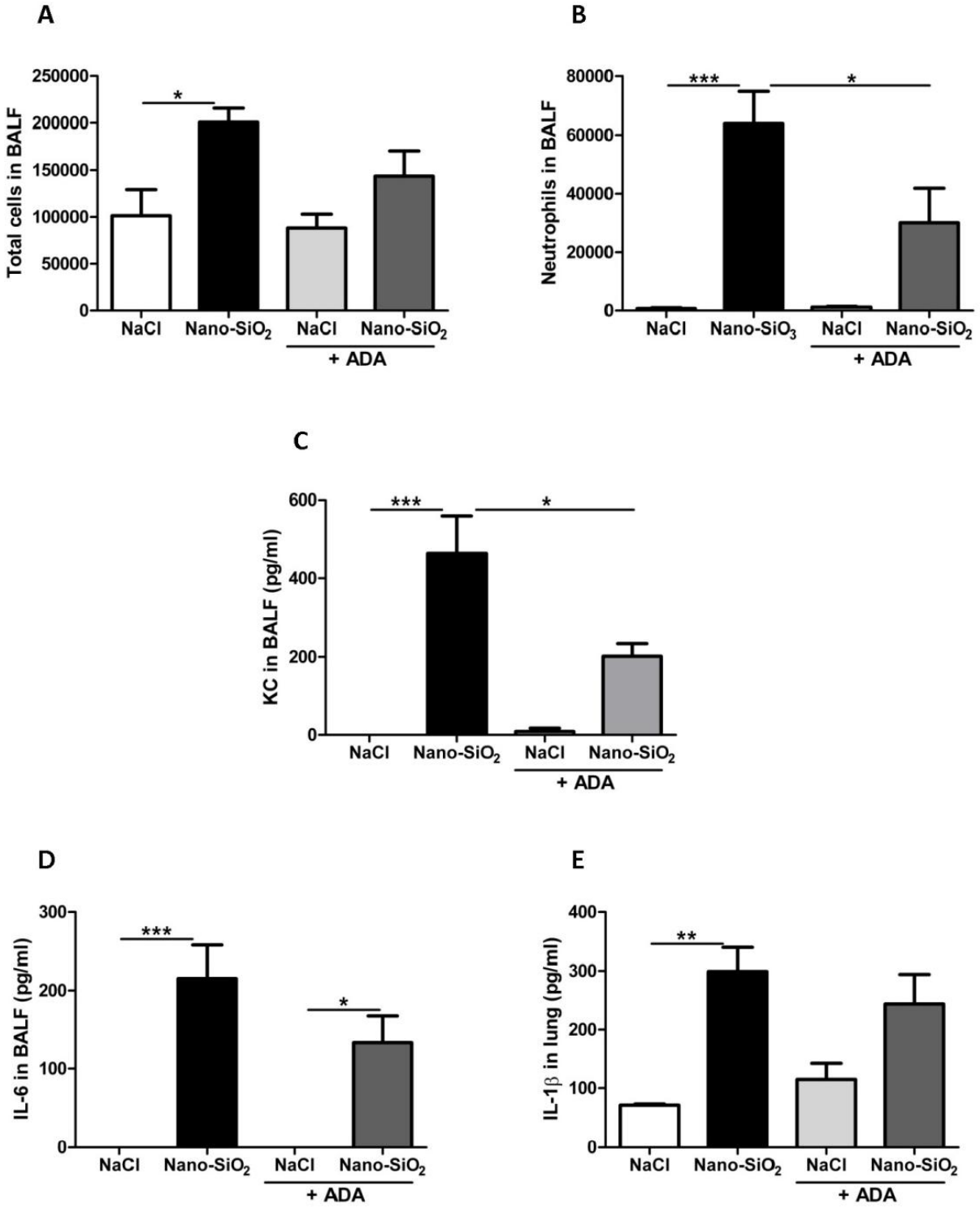


Figure 7. Pumonary inflammation upon instillation of Nano-SiO_2 is partially dependent on adenosine production
Total cell (**A**) and neutrophil counts (**B**) in BALF from C57BL/6 mice instilled with saline solution or Nano-SiO_2 (5mg/kg), treated or not intraperitoneally with adenosine deaminase (ADA, 5U/mouse). ADA alone was not sufficient to reduce cell recruitment but decreased Nano-SiO_2-induced neutrophil recruitment (**A-B**). Nano-SiO_2-induced KC (**C**) and IL-6 (**D**) in BALF and IL-1β (**E**) in lung homogenates were reduced with ADA. Data are representative of 2 independent experiments.

Figure 8

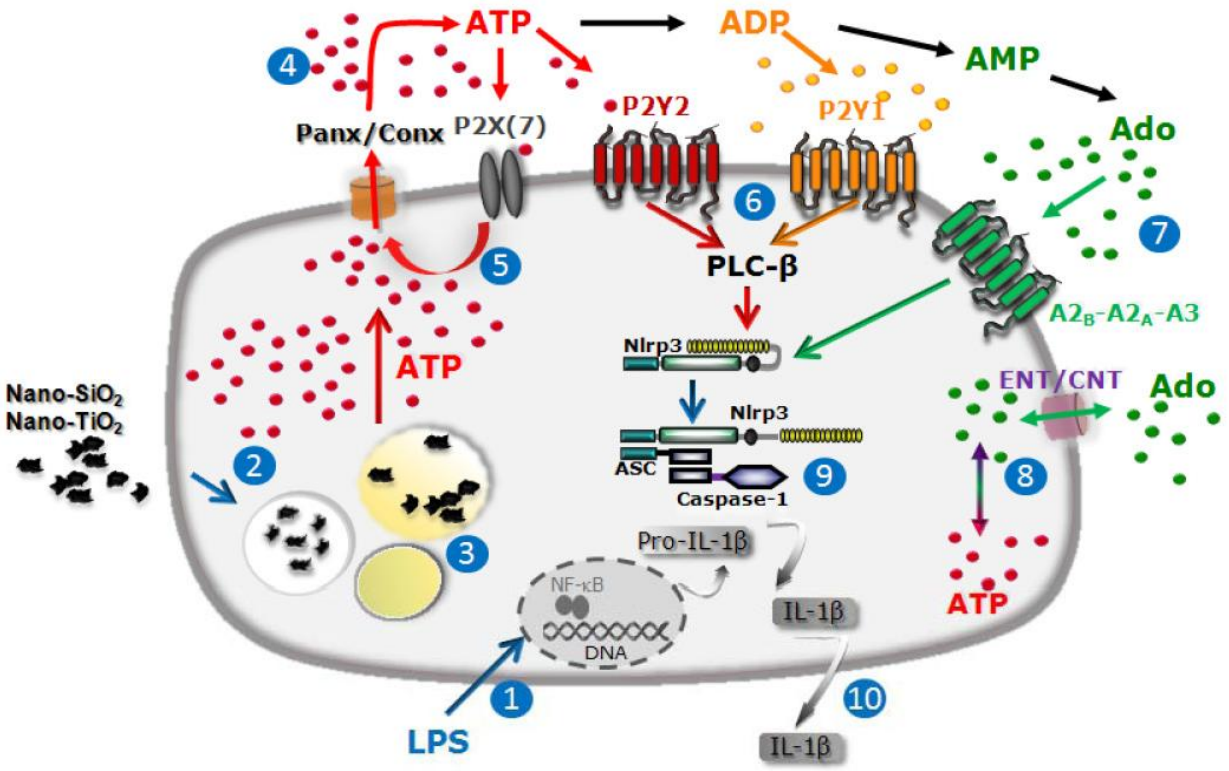


Figure 8. Schematic diagram illustrating the specific cascade and signaling pathway in LPS- primed macrophages stimulated with nanoparticles

LPS priming induces transcription of pro-IL-1β gene upon activation of the transcription factor NF-κB (1). Nanoparticle uptake (2), fusion to lysosomes and phagolysosomes (3) lead, via an unknown mechanism, to release of ATP through pannexin/connexin hemichannels (4). This extracellular ATP (eATP) may activate ATP-gated P2X7 receptor (P2X7R) to amplify ATP release in a P2X7R dependent way (5). ATP or its derived catabolism products act through on other P1 or P2 (P2X and P2Y) purinergic receptors. In particular, ATP via P2Y2 and ADP through P2Y1 activate PLC-β which can lead to NLRP3 inflammasome via modulation of cellular Ca^{2+} and K^{+} flux (6). Adenosine (Ado), another hydrolyzed product of ATP, activates P1 receptors and precisely $A2_A$, $A2_B$ and A3 receptors which can modulate NLRP3 inflammasome activation (7). Accumulation of extracellular adenosine is regulated by equilibrative and concentrative nucleotide transporters (ENTs and CNTs) and inside the cell, Ado can be metabolized into ATP to renewal ATP stock or amplify the signal (8). After NLRP3 receptor activation, NLRP3 inflammasome builds up and mature pro-IL-1β (9) into IL-1β which is secreted by macrophage (10).

Figure S1

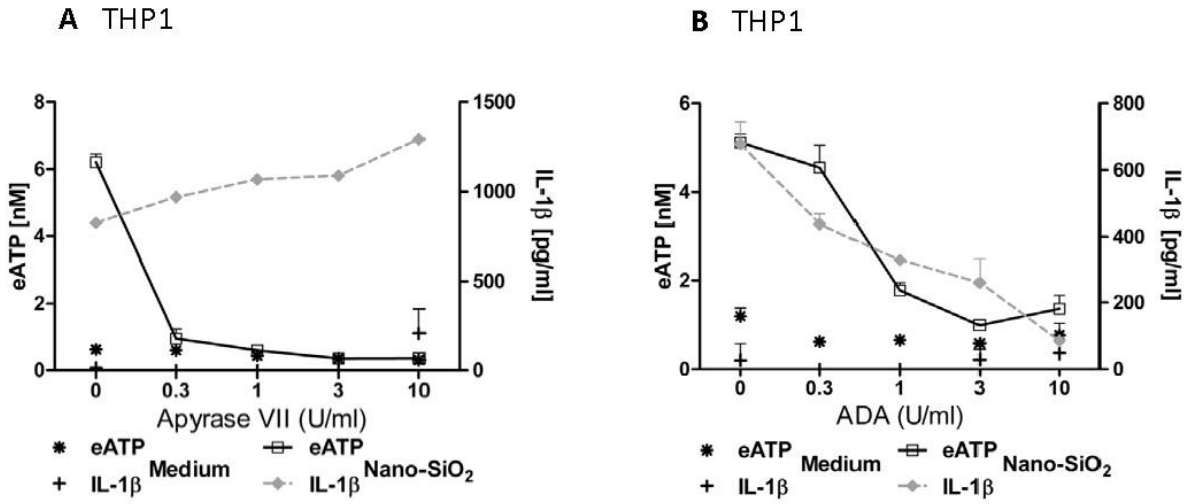


Figure supplementary S1. A role for adenosine in ATP release and IL-1β secretion induced by nanoparticles in human macrophages
PMA-primed THP1 were stimulated for 6 h with Nano-SiO_2 in presence of increasing concentration of apyrase VII (**A**) or ADA (**B**). Nano-SiO_2-induced eATP decreased by increasing apyrase VII whereas IL-1β remained constant (**A**). Both nano-SiO_2-induced IL-1β and eATP secretions were ADA dose-dependently decreased (**B**). Apyrase VII or ADA alone had no effect on IL-1β and eATP secretions by human macrophages (**A-B**). Nano-SiO_2 was used at 250µg/ml. Data are representative of 3 independent experiments.

METHODS

Reagents

Nano-SiO_2 (10-20 nm) and Nano-TiO_2 (20 nm, anatase) are purchased from IoLiTec (Heilbronn, Germany) and Nano-ZnO (20 nm) is a gift from Dr. Amir Yazdi (Lausanne, Switzerland). Nanoparticles were sonicated 30 min before each use and were used at 125-500µg/ml *in vitro* or at 5mg/kg *in vivo* as mentioned. A740003 is a gift from Dr. F. Rassendren (Montpellier, France). ADA (A5168), ADP, ADPβS, apyrase grade VII (A6535), ARL67156, ATP, ATPγS, Cbx (carbenoxolon), DPCPX, FFA (flufanemic acid), MRS1523, MRS1754, MRS2500, oATP (periodate oxidized ATP), PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), SCH58261 and U73122 were from Sigma (St. Quentin Fallavier, France), suramin (574625) from VWR (Fontenay-sous-bois, France), LPS (lippopolysaccharide from *Escherichia coli*, serotype 055:B5) from Invivogen and Z-YVAD-fmk from Tocris (Bristol, United Kingdom).

Mice

C57BL/6 wild-type mice were used. Mice were bred in our animal facility (CNRS, Orleans). Eight to ten weeks used animals were kept in sterile isolated ventilated cages. All animal experiments complied with the French Government's ethical and animal experiment regulations.

Lung inflammation model

Nano-SiO_2 in saline (5mg/kg) or vehicle alone were administered by intranasal instillation under light ketamine (Imalgène 1000) – xylasine (Rompun 2%), and bronchoalveolar lavage (BAL) and lung tissue were assayed after 6 hours as precised for markers of inflammation, including cell recruitment and in particular neutrophil influx, chemokine and cytokine levels,

such as KC and IL-6. The lungs were homogenized within 10 mM potassium phosphate buffer containing 0.1 mM EDTA (Sigma). The homogenates were centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes and the supernatants were stored at -20°C for further analysis. IL-1β level in supernatants was determined using ELISA assay kits (Mouse DuoSet, R&D system, Minneapolis, USA) according to manufacturer's instructions.

BAL, cell count and determination

BAL was performed as previously described (Gasse et al., 2009). Total cell count was determined in BAL fluid (BALF) after dilution with Turk's solution (Merck, Darmstadt, Germany) on Malassez's. Differential cell counts were performed on cytospin preparations (Shandon CytoSpin 3, Thermo Scientific, Illkirch, France) after staining with May-Grünwald-Giemsa stain (Diff Quick, Medion Diagnostics, Düdingen, Switzerland) according to manufacturer's instructions. Differential cell counts were made on 250 cells using standard morphologic criteria.

THP1 culture and stimulation

Monocyte/macrophage THP1 cells are a gift from Dr. Amir Yazdi (Lausanne, Switzerland). THP1 cells were cultured in RMPI Medium 1640 (Gibco, Illkirch, France) with 10% fetal calf serum (Hyclone, Cramlington, UK) and penicilin (100U/ml, Invitrogen). For experiments, THP1 were differentiated 3 hours with 0.5 mM PMA, washed and overnight plated (2.10^5cells/well) in microtest plates (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA). Cells were stimulated for indicated times, supernatant collected for immediately ATP measurement and/or IL-1β quantification.

Cell death was monitored by MTT using standard protocol. Thiazollyl blue tetrazolium bromide (Sigma) solution was added onto the cells after supernatant collection and incubated

for 2 h at 37°C. 10% SDS acetic acid solution is then added. MTT reduction to formazan was quantified by absorbance microplate reader (EL800, BioTek, Colmar, France) at 610 nm (KC4 software).

Sh RNA THP1

THP1 stably expressing sh (short hairpin) RNA against lamin ("sh CTL"), ASC and NLRP3 are kind gifts of Dr. Fabio Martinon (Lausanne, Switzerland) and were obtained as previously described (Pétrilli et al., 2007). sh RNA THP1 cells were cultured in RMPI Medium 1640 (Gibco) with 10% fetal calf serum (Hyclone) and 4µg/ml puromycin (Gibco). Cell priming and stimulation are the same as that described for THP1 cells.

ATP measurement

Extracellular ATP in medium supernatant was quantified using ATP Lite one step kit (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). To avoid cellular debris, supernatants were briefly centrifugated. Luminescence produced was measured by a luminometer (Mithras, Mikrowin 2000 software, Berthold Technologies, Thoiry, France).

BMDM culture and stimulation

Primary bone marrow-derived macrophages (BMDM) were obtained from femoral bone marrow as described (Muller et al., 1996). In brief, cells from the femur of C57BL/6 mice were isolated and cultured at 10^6 cells/ml for seven days in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM, Sigma) supplemented with 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 (Müller et al., 1996). The BMDM were plated in 96-well microculture plates (at 2.10^5 cells/well) and stimulated with 100 ng/ml LPS during 3 hours to induce pro-IL-1β

production. Cell supernatants were collected after 6 hours of particle stimulation and analyzed immediately for cytokine content or stored at -80°C. Absence of cytotoxicity of the different stimuli used was verified by MTT using standard protocol.

Quantitative RT-PCR

BMDM cells were plated in 6-well microculture plates (at 5.10^6 cells/well), stimulated with LPS during 3 h, washed and stimulated with particles during 4 h. Cell supernantants were removed for further cytokine content analyses. RNA was extracted from BMDM cells using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and particles removed (10,000 g, 10 min, 4°C). All murine primers were synthetized by Qiagen. Expression of A1, $A2_A$, $A2_B$, A3, NLRP3, P2X7, P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y12 and P2Y13 receptor mRNA, relative to housekeeping 18S mRNA, was analyzed using Quantitect gene expression assays (Qiagen). Reverse transcription was performed by SuperScript III Reverse Transcriptase (Fisher Invitrogen). Amplification conditions were as follows: 10 min at 95°C and 40 cycles of 30 s at 95°C, 1 min at 55°C and 1 min at 72°C. RT-PCR was performed starting from 500 ng total RNA using a Stratagene Mx3005P real-time PCR system (Agilent Technologies, Massy, France). For all experiments, biological quadricate and technical triplicate were performed.

Immunoblotting

BMDM cells were plated in 12-well microculture plates (at 3.10^6 cells/well), stimulated with LPS during 3 h, washed and stimulated with particles during 6 h. Supernatants were collected and stored at -20°C for further analysis. BMDM were washed with cold PBS and scraped in lysis buffer solution (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA, 0.2% SDS and 1% Nonidet P-40) supplemented with a protease inhibitor cocktail (1%) and pefabloc (0.1 mg/ml) (Roche Applied Science, Meylan, France). Lysis extracts were sonicated and

after centrifugation, supernatants were collected and protein content measured (DC protein assay, Bio-Rad, Munich, Germany). Proteins were denatured by boiling (95°C, 5 min), separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were immunoblotted with primary goat anti-IL-1β antibody (Sigma Aldrich) or rabbit anti-caspase-1 p10 (Santa Cruz Biotechnology) and proteins detected with appropriate secondary antibody followed by enhanced chemiluminescence (ECL, Fisher, Illkirch, France).

Statistical Analysis

Statistical evaluation of differences between the experimental groups was determined by ANOVA followed by Bonferroni test using Prism 5.0 software (GraphPad). P values <0.05 were considered statistically significant.

Acknowledgments

We thank François Rassendren for the gift of A740003 inhibitor and we are grateful to Amir Yazdi and Fabio Martinon for kind gifts of cell lines. Grant support by the «Fonds de Dotation pour la Recherche en Santé Respiratoire», the «Agence Nationale de la Recherche» and «Conseil Général du Loiret ».

REFERENCES

Aldrich, M.B., Blackburn, M.R., Datta, S.K., and Kellems, R.E. (2000). Adenosine deaminase-deficient mice: models for the study of lymphocyte development and adenosine signaling. Adv Exp Med Biol *486*, 57-63.
Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E.S., and Hasko, G. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. Trends Mol Med *19*, 355-367.
Ballarin, M., Fredholm, B.B., Ambrosio, S., and Mahy, N. (1991). Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism. Acta Physiol Scand *142*, 97-103.
Chen, J.F., Eltzschig, H.K., and Fredholm, B.B. (2013). Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? Nat Rev Drug Discov *12*, 265-286.
Chen, Y., Corriden, R., Inoue, Y., Yip, L., Hashiguchi, N., Zinkernagel, A., Nizet, V., Insel, P.A., and Junger, W.G. (2006). ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. Science *314*, 1792-1795.
Chunn, J.L., Molina, J.G., Mi, T., Xia, Y., Kellems, R.E., and Blackburn, M.R. (2005). Adenosine-dependent pulmonary fibrosis in adenosine deaminase-deficient mice. J Immunol *175*, 1937-1946.
Cronstein, B.N. (2011). Adenosine receptors and fibrosis: a translational review. F1000 Biol Rep *3*, 21.
Dostert, C., Meylan, E., and Tschopp, J. (2008). Intracellular pattern-recognition receptors. Adv Drug Deliv Rev *60*, 830-840.
Eltzschig, H.K., and Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. Nat Med *17*, 1391-1401.
Eltzschig, H.K., Sitkovsky, M.V., and Robson, S.C. (2012). Purinergic signaling during inflammation. N Engl J Med *367*, 2322-2333.
Esther, C.R., Jr., Lazaar, A.L., Bordonali, E., Qaqish, B., and Boucher, R.C. (2011). Elevated airway purines in COPD. Chest *140*, 954-960.
Faigle, M., Seessle, J., Zug, S., El Kasmi, K.C., and Eltzschig, H.K. (2008). ATP release from vascular endothelia occurs across Cx43 hemichannels and is attenuated during hypoxia. PLoS One *3*, e2801.
Gasse, P., Riteau, N., Charron, S., Girre, S., Fick, L., Petrilli, V., Tschopp, J., Lagente, V., Quesniaux, V.F., Ryffel, B., *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.
Gomez, G., and Sitkovsky, M.V. (2003). Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. Blood *102*, 4472-4478.
Goodarzi, M.T., Abdi, M., Tavilani, H., Nadi, E., and Rashidi, M. (2010). Adenosine deaminase activity in COPD patients and healthy subjects. Iran J Allergy Asthma Immunol *9*, 7-12.
Harris, A.L. (2007). Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. Prog Biophys Mol Biol *94*, 120-143.
Huszar, E., Vass, G., Vizi, E., Csoma, Z., Barat, E., Molnar Vilagos, G., Herjavecz, I., and Horvath, I. (2002). Adenosine in exhaled breath condensate in healthy volunteers and in patients with asthma. Eur Respir J *20*, 1393-1398.

Jacobson, K.A., Balasubramanian, R., Deflorian, F., and Gao, Z.G. (2012). G protein-coupled adenosine (P1) and P2Y receptors: ligand design and receptor interactions. Purinergic Signal *8*, 419-436.

Jacobson, K.A., and Gao, Z.G. (2006). Adenosine receptors as therapeutic targets. Nat Rev Drug Discov *5*, 247-264.

Joseph, S.M., Buchakjian, M.R., and Dubyak, G.R. (2003). Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. J Biol Chem *278*, 23331-23342.

Karmouty-Quintana, H., Xia, Y., and Blackburn, M.R. (2013). Adenosine signaling during acute and chronic disease states. J Mol Med (Berl) *91*, 173-181.

King, B.F. (2007). Novel P2X7 receptor antagonists ease the pain. Br J Pharmacol *151*, 565-567.

Mediero, A., and Cronstein, B.N. (2013). Adenosine and bone metabolism. Trends Endocrinol Metab *24*, 290-300.

Muller, M., Eugster, H.P., Le Hir, M., Shakhov, A., Di Padova, F., Maurer, C., Quesniaux, V.F., and Ryffel, B. (1996). Correction or transfer of immunodeficiency due to TNF-LT alpha deletion by bone marrow transplantation. Mol Med *2*, 247-255.

Onuma, K., Sato, Y., Ogawara, S., Shirasawa, N., Kobayashi, M., Yoshitake, J., Yoshimura, T., Iigo, M., Fujii, J., and Okada, F. (2009). Nano-scaled particles of titanium dioxide convert benign mouse fibrosarcoma cells into aggressive tumor cells. Am J Pathol *175*, 2171-2183.

Orellana, J.A., Froger, N., Ezan, P., Jiang, J.X., Bennett, M.V., Naus, C.C., Giaume, C., and Saez, J.C. (2011). ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. J Neurochem *118*, 826-840.

Polosa, R., and Blackburn, M.R. (2009). Adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Trends Pharmacol Sci *30*, 528-535.

Riteau, N., Baron, L., Villeret, B., Guillou, N., Savigny, F., Ryffel, B., Rassendren, F., Le Bert, M., Gombault, A., and Couillin, I. (2012). ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. Cell Death Dis *3*, e403.

Schingnitz, U., Hartmann, K., Macmanus, C.F., Eckle, T., Zug, S., Colgan, S.P., and Eltzschig, H.K. (2010). Signaling through the A2B adenosine receptor dampens endotoxin-induced acute lung injury. J Immunol *184*, 5271-5279.

Schroder, K., Zhou, R., and Tschopp, J. (2010). The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? Science *327*, 296-300.

Sun, C.X., Zhong, H., Mohsenin, A., Morschl, E., Chunn, J.L., Molina, J.G., Belardinelli, L., Zeng, D., and Blackburn, M.R. (2006). Role of A2B adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury. J Clin Invest *116*, 2173-2182.

Yazdi, A.S., Drexler, S.K., and Tschopp, J. (2010a). The role of the inflammasome in nonmyeloid cells. J Clin Immunol *30*, 623-627.

Yazdi, A.S., Guarda, G., Riteau, N., Drexler, S.K., Tardivel, A., Couillin, I., and Tschopp, J. (2010b). Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 19449-19454.

Young, J.D., Yao, S.Y., Baldwin, J.M., Cass, C.E., and Baldwin, S.A. (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. Mol Aspects Med *34*, 529-547.

3ème partie: L'IL-33 et son récepteur ST2 modulent l'inflammation pulmonaire induite par les nanoparticules (Article 3)

L'inflammation pulmonaire suite à l'exposition de souris aux nanoparticules d'oxydes de métaux est régulée par l'axe IL-33/ST2

Ludivine Baron, Noëlline Guillou, Aurélie Gombault, Bérengère Villeret, Bernhard Ryffel et Isabelle Couillin

Comme nous l'avions précédemment établi, l'exposition pulmonaire aux nanoparticules de silice et de titane induit chez la souris une inflammation de type Th1 avec recrutement de neutrophiles et production d'IL-1α et d'IL-1β dans les voies aériennes. Dans les résultats ci-dessous, nous montrons que ces nanoparticules permettent également la production d'une autre cytokine de la famille de l'IL-1, l'IL-33. Comme pour le recrutement cellulaire et les IL-1, la production d'IL-33 est dépendante de la concentration des nanoparticules instillées. L'IL-33 peut jouer le rôle d'alarmine et de cytokine pro-inflammatoire. Elle est généralement étudiée dans des maladies de type Th2 comme l'asthme allergique (Oshikawa et al., 2001), même si une littérature sur son rôle dans les réponses de type Th1 commence à émerger. L'IL-33, produite sous forme Full-Length (FL), est biologiquement active, et son clivage par des protéases de neutrophiles augmente son activité (Lefrançais and Cayrol, 2012). Nos résultats montrent qu'en réponse aux nanoparticules de silice, l'IL-33 est dosée dans les poumons, à la fois sous forme FL et sous des formes clivées. Il reste à déterminer si l'élastase et la cathepsine G, qui sont toutes deux des protéases de neutrophiles, sont responsables de ces clivages.

Nous avons également étudié la réponse inflammatoire aux nanoparticules des souris déficientes pour la chaine ST2 ou IL-1RL1 du récepteur ST2 à l'IL-33. Nos données indiquent que ces souris $ST2^{-/-}$ présentent une inflammation exacerbée. Au contraire, si nous administrons de l'IL-33 exogène à des souris sauvages, nous montrons une diminution des paramètres inflammatoires induits par les nanoparticules de silice. Cependant, l'IL-33 exogène est également responsable d'un recrutement d'éosinophiles dans les voies aériennes.

Nos résultats suggèrent que l'IL-33, produite en réponse aux nanoparticules, pourrait moduler la réponse inflammatoire et plus précisément l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Ces données n'ont pas encore été publiées.

L'inflammation pulmonaire suite à l'exposition de souris aux nanoparticules d'oxydes de métaux est régulée par l'axe IL-33/ST2

Ludivine Baron, Noëlline Guillou, Aurélie Gombault, Bérengère Villeret, Bernhard Ryffel et Isabelle Couillin

Laboratoire d'Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires, UMR7355, Université d'Orléans et CNRS, Orléans, France.

Ce projet a été financé par le Conseil Général du Loiret, la Fondation de la Recherche Médicale, le Fond de Dotation pour la Recherche en Santé Respiratoire et l'Agence Nationale de la Recherche.

Mots-clés : Nanoparticules, inflammation pulmonaire, ST2, IL-33

Adresse de correspondance : Isabelle Couillin, INEM, UMR7355, 3b rue de la Férollerie,
45071 Orléans, France.
Téléphone : 02 38 25 54 43 ; Fax : 02 38 25 79 79 ; e-mail : couillin@cnrs-orleans.fr

Abréviations : FL : Full-Length ; FPI : Fibrose Pulmonaire Idiopathique ; IL : Interleukine ; IL-1R1 : IL-1 Receptor 1 ; IL-1RAcP : IL-1 Receptor Accessory Protein ; ILC : Innate Lymphoid Cell ; KO : knock-out ; LBA : lavage bronchoalvéolaire ; NaCl : chlorure de sodium ; NLR : Nod-Like Receptor ; NLRP3 : NLR pyrin domain containing 3 ; nano-TiO_2 : nanoparticules de dioxyde de titane ; nano-SiO_2 : nanoparticules de dioxyde de silice ; NF-HEV : Nuclear Factor from High Endothelial Venules ; NF-κB : Nuclear Factor Kappa B ; NK : Natural Killer ; NKT : Natural Killer T ; sST2 : ST2 soluble ; ST2 : Suppression of Tumorigenicity 2 ; Th : T helper.

RESUME

L'exposition aux nanoparticules de SiO_2 et de TiO_2 induit une inflammation aiguë caractérisée par un afflux de cellules inflammatoires, comme les neutrophiles, et la production de cytokines pro-inflammatoires : interleukines-1 alpha (IL-1α) et beta (IL-1β). Nous avons précédemment montré le rôle essentiel de la chaine IL-1R1 du récepteur à l'IL-1 (Yazdi et al, PNAS 2010). L'IL-33, une cytokine pro-inflammatoire de la famille de l'IL-1, a été impliquée dans les maladies inflammatoires de type Th2 comme l'asthme allergique caractérisée par un recrutement d'éosinophiles. De façon similaire à l'IL-1α, et contrairement à l'IL-1β, la pro-forme produite (« Full-Length », FL) de l'IL-33 est active, mais son clivage par des enzymes comme l'élastase de neutrophiles augmente fortement son activité biologique. La libération de la pro-forme de l'IL-33 par des cellules endommagées (épithéliales et endothéliales) constitue un signal de danger pour le système immunitaire. Dans cet article, nous étudions le rôle de l'IL-33 lors de l'inflammation pulmonaire induite suite à une exposition de souris aux nanoparticules et en particulier aux nanoparticules de dioxyde de silice (nano-SiO_2). Cette inflammation se caractérise par une réponse aiguë de type Th1 (T helper type 1) avec la production d'IL-1α et d'IL-1β, ainsi que le recrutement de neutrophiles. Nous montrons que la réponse inflammatoire aux nano-SiO_2 est exacerbée chez les souris déficientes pour la chaine ST2 du récepteur de l'IL-33. Nous mettons en évidence la présence de la pro-forme et de différentes formes clivées d'IL-33 dans les poumons en réponse aux nanoparticules. De plus, l'administration d'IL-33 exogène permet de moduler la production de cytokines pro-inflammatoires induite par les nanoparticules. Elle est également à l'origine du recrutement d'éosinophiles. Nos résultats indiquent donc que l'exposition aux nanoparticules provoque la production d'IL-33, celle-ci étant maturée et capable de réguler l'inflammation pulmonaire aiguë caractérisée par l'influx de neutrophiles et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β, via l'activation de son récepteur ST2. Cet effet anti-inflammatoire de l'IL-33 pourrait permettre d'envisager des pistes pour diminuer l'inflammation induite par les nanoparticules ou par tout autre activateur de l'inflammasome NLRP3.

INTRODUCTION

L'Interleukine-33 (IL-33) est une cytokine de la famille de l'IL-1 pour laquelle un rôle d' « alarmine » vis-à-vis du système de défense immunitaire lors de dommages cellulaires a récemment été attribué (Cayrol and Girard, 2009). L'IL-33, également nommée IL-1F11 et initialement appelée NF-HEV (Nuclear Factor from High Endothelial Venules) (Baekkevold et al., 2003), est libérée par des cellules épithéliales et endothéliales et des macrophages lors d'infections (Humphreys et al., 2008), d'inflammations (Kurowska-Stolarska et al., 2009) ou de lésions tissulaires (Lüthi et al., 2009). Pour plusieurs organes, l'IL-33 apparaît être à l'origine de la production de cytokines pro-inflammatoires de type Th2 (T helper type 2) (Schmitz et al., 2005) suggérant son implication dans des maladies comme l'allergie (Préfontaine et al., 2009), les atopies (Pushparaj et al., 2009) et la fibrose (Rankin et al., 2010; Wynn, 2004). L'IL-33 est reconnue par la chaine ST2 du récepteur (Suppression of Tumorigenicity 2), aussi connue sous le nom d'IL-33Rα ou d'IL-1RL1, de différentes populations cellulaires : mastocytes, basophiles, éosinophiles, lymphocytes Th2, NK (Natural Killers), NKT (Natural Killers T) (Smith, 2010) ainsi que les ILC (Innate Lymphoid Cells) (Monticelli, Laurel A. et al., 2011), récemment découverts chez la souris et l'Homme. Le récepteur ST2 est soit exprimé à la surface cellulaire (le ST2L, lié à la membrane), soit libre dans les compartiments extracellulaires (le sST2 ou ST2 soluble) où il agit comme un leurre pour se fixer à l'IL-33 et inhiber efficacement son activité (Hayakawa et al., 2007). L'augmentation de sST2 dans le sérum est un bio-marqueur de maladies telles que l'asthme allergique (Oshikawa et al., 2001) et la FPI (Fibrose Pulmonaire Idiopathique) (Tajima et al., 2003). Une fois l'IL-33 reconnue par la chaine ST2, celle-ci se lie à la chaine accessoire du récepteur de l'IL-1 (IL-1RAcP) activant la voie de signalisation NF-κB (Nuclear Factor Kappa B) (Schmitz et al., 2005). Plusieurs études ont rapporté l'effet inhibiteur du sST2 dans des maladies inflammatoires ce qui permet de proposer l'axe IL-33/ST2 comme ayant potentiellement des effets pro- et anti- inflammatoires (Hayakawa et al., 2007; Yin et al., 2011).

Contrairement à l'IL-1β de la même famille, la forme complète de l'IL-33 est biologiquement active et est inhibée lors de son clivage par les caspases (Cayrol and Girard, 2009; Lüthi et al., 2009) ce qui

permet de rendre l'IL-33 immunologiquement « silencieuse » pendant l'apoptose cellulaire. Cependant, les rôles physiologiques de l'IL-33 dans les lésions pulmonaires sont encore peu étudiés. Une étude a récemment démontré dans un modèle murin d'atteinte pulmonaire aiguë associée à une infiltration tissulaire de neutrophiles, que l'élastase et la cathepsine G, deux protéases produites par les neutrophiles, clivent l'IL-33, ces formes clivées étant retrouvées dans les lavages bronchoalvéolaires (LBA) (Lefrançais et al., 2012). Nous avons précédemment décrit l'activation de l'inflammasome NLRP3 (NLR (Nod-Like Receptor) pyrin domain containing 3) par des nanoparticules de dioxyde de titane (nano-TiO_2) et l'inflammation pulmonaire sous-jacente via la sécrétion d'IL-1β et l'influx de neutrophiles (Yazdi et al., 2010). Ces particules sont, au même titre que les nanoparticules de dioxyde de silice (nano-SiO_2), des oxydes métalliques inorganiques fréquemment utilisés et synthétisés dans l'industrie. Les nanoparticules, définies par une taille comprise entre 1 et 100 nm (Auffan et al., 2009), se caractérisent par des propriétés innovantes, attractives pour l'économie et la recherche, mais qui peuvent aboutir à de nouveaux effets biologiques et donc à des effets indésirables pour la santé et l'environnement (Oberdörster et al., 2005).

Au cours de cette étude, nous étendons notre recherche au rôle potentiel de l'IL-33 libérée lors de dommages des cellules épithéliales et à son éventuel clivage par des protéases de neutrophiles dans l'inflammation pulmonaire induite par les nanoparticules.

RESULTATS

Les nano-SiO_2 provoquent une inflammation pulmonaire associée à une production d'IL-33 sous formes longue et clivées

Comme nous l'avons précédemment décrit pour les nanoparticules de TiO_2 (Yazdi et al., 2010), l'administration intranasale de nanoparticules de SiO_2 induit une réponse inflammatoire (Figure 1). La chimiokine responsable du chimiotactisme des neutrophiles, KC ou CXCL10 (Fig. 1C), ainsi que les cytokines pro-inflammatoires IL-1α (données non incluses), IL-1β (Fig. 1D), IL-6 (données non incluses) et IL-33 (Fig. 1E) sont sécrétées dans les LBA (données non incluses) et dans le tissu pulmonaire après une instillation de nanoparticules. L'inflammation induite par l'administration de nano-SiO_2 est dose-dépendante (Figure 1). Le recrutement dans les voies respiratoires des cellules inflammatoires dont les neutrophiles est optimal à 24 h dès la dose 5 mg de nano-SiO_2 par kg (Fig. 1A-B). La production de cytokines et de chimiokines dans les poumons en réponse aux nanoparticules est la plus efficace pour 10 mg/kg (Fig. 1C-E). L'augmentation de ces paramètres inflammatoires est reflétée par une élévation de la quantité de protéines dans les poumons (Fig. 1F). Nous avons déterminé les différentes formes d'IL-33 présentes dans les surnageants de poumons de souris contrôles et de souris instillées avec 5 ou 15 mg/kg de nanoparticules (Fig. 1G) par Western Blot. La première observation est que, de façon surprenante, les formes clivées sont également produites chez les souris contrôles mais de façon moindre que chez les souris traitées. Cependant, la pro-forme (Full-Length) IL-33 de 33 kDa constitue la forme majoritaire pour les souris contrôles. L'IL-33 FL et les différentes formes clivées d'environ 15-25 kDa sont particulièrement exprimées chez les souris instillées avec les nanoparticules et de façon dépendante de la dose de nano-SiO_2. L'IL-33 étant produite dans les poumons de souris après administration intranasale de nanoparticules, nous nous sommes intéressés à son rôle dans la mise en place et / ou la régulation de cette inflammation pulmonaire.

Les souris déficientes en ST2 présentent une inflammation pulmonaire exacerbée en réponse aux nanoparticules

L'utilisation de souris déficientes pour le récepteur ST2 ($ST2^{-/-}$) montre que l'afflux de cellules totales (Fig. 2A) et de neutrophiles dans l'espace bronchoalvéolaire (Fig. 2B) et les productions de chimiokine KC (Fig. 2C), des cytokines pro-inflammatoires IL-1α (Fig. 2D), IL-1β (Fig. 2E) et IL-33 (Fig. 2F) dans les poumons, sont fortement augmentés chez ces souris, en comparaison aux souris sauvage (C57BL/6). Des résultats similaires sont obtenus après instillation de nanoparticules de titane (nano-TiO_2) (Fig. supplémentaire 1). Le recrutement d'éosinophiles est négligeable, même après instillation de nanoparticules, et n'est pas exacerbé chez les souris $ST2^{-/-}$ (Fig. supplémentaire 2A). De même, la chimiokine TARC, qui est un chimioattractant des lymphocytes T, est produite en quantité similaire entre les groupes de souris sauvages et déficientes (Fig. supplémentaire 2B). Le taux de cytokine IL-5, caractéristique d'une réponse Th2 et connue pour induire le recrutement des éosinophiles, reste inchangé dans les poumons pour les différents groupes de souris indiquant que celle-ci ne joue pas de rôle dans l'inflammation aux nanoparticules (Fig. supplémentaire 2 C).

L'IL-33 exogène diminue partiellement la réponse inflammatoire pulmonaire induite par l'exposition aux nanoparticules

En parallèle aux groupes de souris contrôles et à ceux instillés avec 5mg/kg de nano-SiO_2, nous avons ajouté 0,5 µg d'IL-33 recombinante murine (forme 109-266 acides aminés) dans la solution d'instillation puis sacrifié les animaux à 24 heures (Figure 3). L'IL-33 exogène n'a pas d'impact sur le recrutement de cellules totales (Fig. 3A) et de neutrophiles (Fig. 3B) alors que la production de la chimiokine KC est nettement diminuée dans les poumons (Fig. 3C). De même, la cytokine IL-1α (Fig. 3D) n'est pas affectée alors que la production d'IL-1β (Fig. 3E) est significativement diminuée dans les poumons pour les souris traitées avec de l'IL-33 en plus des nanoparticules. L'IL-33 exogène induit partiellement une réponse de type Th2 avec l'augmentation du recrutement des éosinophiles, surtout pour le groupe traité avec les nanoparticules (Fig. 3F). En conditions physiologiques, les éosinophiles sont quasiment absents de l'espace broncho-alvéolaire et les nanoparticules de silice

induisent une augmentation négligeable de cette population cellulaire (Fig. 3F). Le recrutement d'éosinophiles peut être corrélé avec la présence de cytokines comme l'IL-4 et l'IL-5 et des chimiokines dont TARC et l'éotaxine. Le dosage de TARC montre d'ailleurs une induction de cette chimiokine par les nano-SiO_2 mais aussi suite à l'administration d'IL-33 avec ou sans nanoparticules (Fig. 3G). A l'inverse, la cytokine de type Th2, IL-5, reste à un taux basal même après l'instillation de nanoparticules et / ou d'IL-33.

DISCUSSION

L'instillation de nanoparticules qui permet de mimer une exposition pulmonaire a pour conséquence une inflammation des voies aériennes. Nous avons montré que les nanoparticules sont des activateurs de l'inflammasome NLRP3 et que l'exposition des voies respiratoires de souris aux nanoparticules de TiO_2 provoque une inflammation aiguë dépendante de l'IL-1 et de son récepteur IL-1R (Yazdi et al., 2010). Nous montrons que l'exposition des souris aux nanoparticules de SiO_2 conduit également à la production de cytokines pro-inflammatoires mais aussi à celle de chimiokines qui permettent le recrutement des neutrophiles inflammatoires. Nous observons une forte corrélation entre l'intensité de la réponse inflammatoire et la concentration de nanoparticules. Alors que les nanoparticules induisent la production de cytokines pro-inflammatoires telles que les IL-1α et IL-1β, de l'IL-33 est également produite dans les voies respiratoires. L'IL-33 est constitutivement présente dans le noyau cellulaire comme facteur de transcription. Elle peut être libérée lors de l'endommagement cellulaire comme signal de danger ou alarmine. L'IL-33 joue un rôle clé dans des pathologies ou des réponses immunitaires de type Th2 comme l'asthme allergique ou la défense de l'organisme contre les vers. Cependant, l'IL-33, initialement considérée comme une cytokine pro-allergique impliquée dans les réponses de type Th2, aurait également un rôle crucial dans l'amplification des réponses mucosales et systémiques innées (Oboki et al., 2010b). Tout comme les membres de la famille de l'IL-1 cités précédemment, nous montrons qu'elle est produite de façon dose-dépendante par rapport à la quantité de nanoparticules administrée. L'analyse protéique dans les poumons révèle que la pro-forme ainsi que les formes clivées de l'IL-33 peuvent être détectées chez les souris instillées avec du sérum physiologique, avec comme forme majoritaire l'IL-33 FL. L'IL-33 mesurée dans les broyats de poumons correspond à la pro-forme présente dans les noyaux, les cytoplasmes et l'espace extracellulaire et aux différentes formes clivées présentes uniquement dans l'espace extracellulaire. Nous observons une augmentation à la fois des formes FL et clivées de l'IL-33 suite à l'exposition aux nanoparticules, en corrélation avec la concentration administrée. Nous montrons donc que les nanoparticules induisent une production d'IL-33 *in vivo* ce qui a été observé dans un autre modèle

d'inflammation pulmonaire aiguë chez la souris, suite à l'administration d'acide oléique (Lefrançais et al., 2012).

L'IL-33 se lie sur le récepteur ST2 (encore appelé IL-1RL1) qui est retrouvé sous deux formes : membranaire ou libre. Les souris déficientes en ST2 ($ST2^{-/-}$) ont une mutation dans le gène de la chaine IL-1RL1 ce qui invalide les deux formes de ce récepteur (Townsend et al., 2000). En utilisant ces souris, nous montrons que, même si la réponse basale est comparable à celle des C57BL/6, les nanoparticules de silice induisent une inflammation pulmonaire exacerbée.

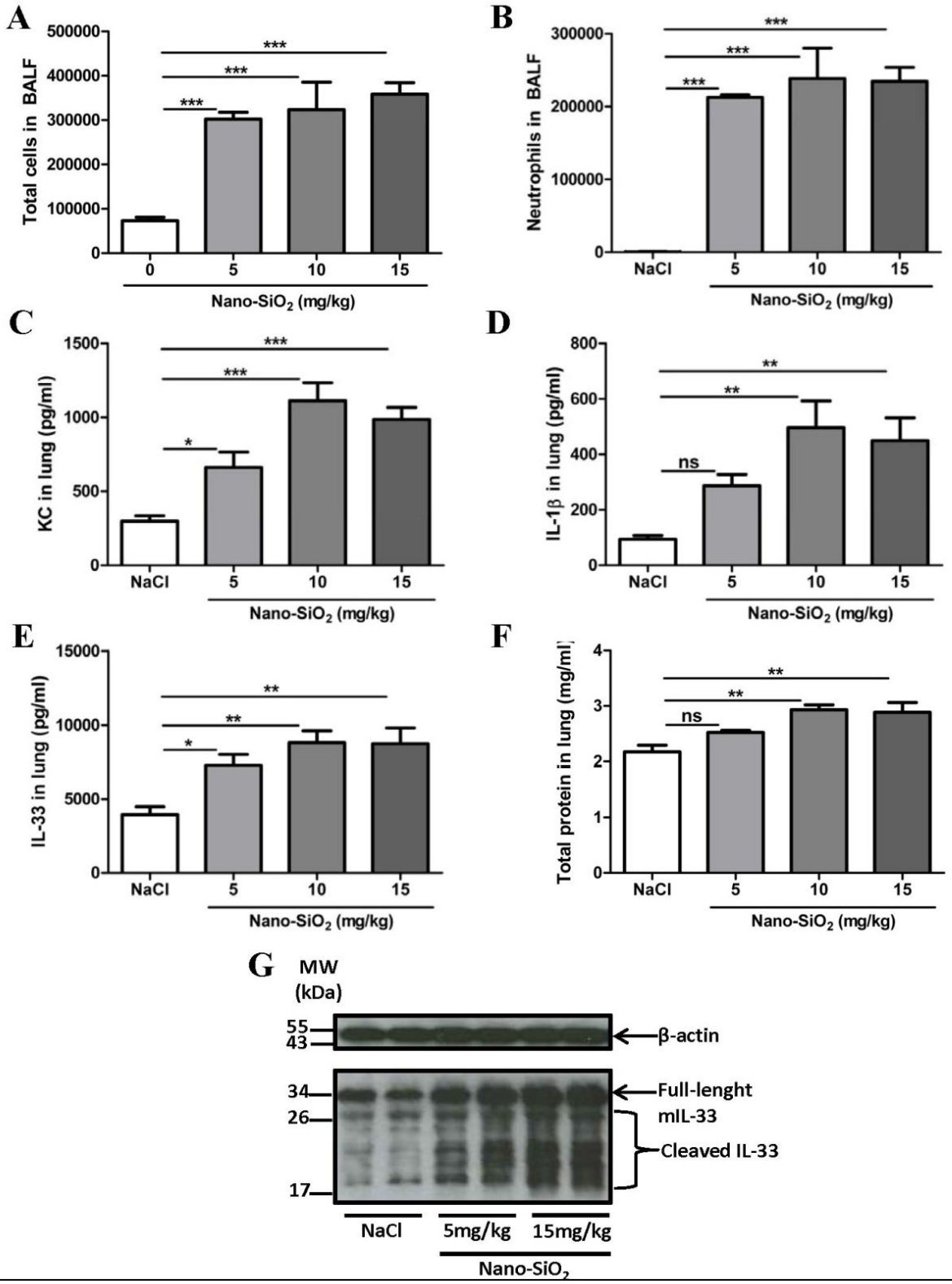
Afin de mieux cerner le rôle de l'IL-33 produite et / ou libérée, nous avons étudié la réponse inflammatoire induite par nano-SiO_2, en présence ou non d'IL-33 recombinante murine. Nous montrons que l'ajout de cette forme clivée (109-266) a pour conséquence une diminution significative des productions de KC et d'IL-1β dans les poumons mais pas du recrutement des neutrophiles. Cependant, l'IL-33 clivée (109-266) provoque un recrutement d'éosinophiles lequel est exacerbé quand elle est combinée aux nanoparticules. Comme le recrutement de ce type cellulaire dépend de certaines cytokines et chimiokines précises nous avons procédé aux dosages de l'IL-5 et de TARC. La cytokine de type Th2 IL-5, à l'inverse de la chimiokine TARC, n'est induite dans les poumons ni par les nanoparticules, ni par l'IL-33 recombinante. Pour TARC, l'IL-33 seule est suffisante pour induire une libération supérieure à celle induite par les nanoparticules. Cependant, il n'y a pas d'effet cumulatif à l'ajout simultané de l'IL-33 et de nano-SiO_2 ce qui peut s'expliquer par l'atteinte d'un palier dans la sécrétion de cette chimiokine. A l'inverse de plusieurs études où le recrutement d'éosinophiles est médié par l'IL-33 et nécessite de l'IL-5 (Ikutani et al., 2012), l'éosinophilie induite par l'IL-33 exogène ne dépend pas de l'IL-5 (Schmitz et al., 2005).

La forme soluble du récepteur ST2, qui fonctionne comme un leurre et un inhibiteur naturel de l'IL-33, est aussi connue pour être un bio-marqueur de pathologies comme l'asthme allergique et la FPI (Oshikawa et al., 2001; Tajima et al., 2003). Dans notre modèle, le sST2 n'est pas détectable dans le LBA et n'est pas augmenté dans le plasma ni le tissu pulmonaire en réponse aux nanoparticules de silice. Il ne semble donc pas jouer de rôle dans l'inflammation pulmonaire aux nanoparticules.

Notre hypothèse de travail est donc que l'axe IL-33/ST2 joue un rôle régulateur dans l'inflammation pulmonaire induite par les nanoparticules. La déficience en récepteur ST2 entraîne une exacerbation des paramètres inflammatoires tandis que l'ajout exogène de l'IL-33 module la réponse inflammatoire. Il serait intéressant d'identifier ultérieurement les différentes formes clivées d'IL-33 retrouvées dans les poumons pour établir si elles sont le produit de clivages d'IL-33 FL par de l'élastase ou de la cathepsine G de neutrophiles, ou par d'autres protéases. Tester chacune de ces formes *in vivo* permettrait aussi d'étudier leur potentiel pro- ou anti- inflammatoire d'abord dans notre modèle puis dans des modèles de réponse adaptative de type Th1. Il serait également judicieux d'étudier la présence d'autres cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF-β mais aussi de rechercher les cellules productrices d'IL-33 au niveau des voies respiratoires.

Cet effet anti-inflammatoire de l'IL-33 pourrait permettre d'envisager de nouvelles voies pour le traitement des maladies inflammatoires.

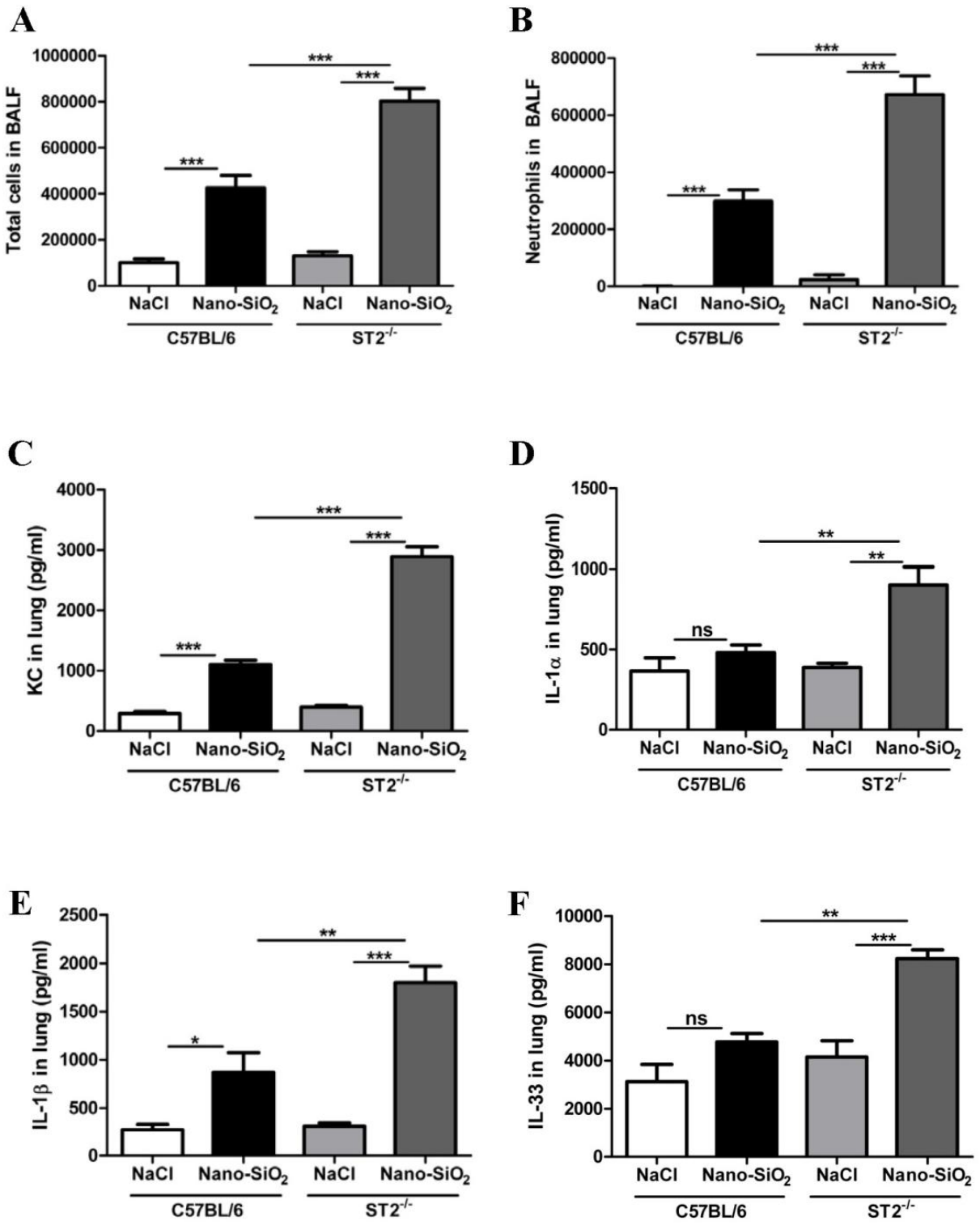
Figure 1:



<u>Figure 1 :</u> Les formes matures et clivées de l'IL-33 sont détectées dans les poumons en réponse à des doses croissantes de nano-SiO_2

Des souris C57BL/6 sont instillées avec du sérum physiologique seul ou des doses croissantes de nanoparticules de dioxyde de silice (nano-SiO_2 ; 5, 10 et 15 mg/kg) puis sacrifiées 24 h après administration. Les cellules totales (**A**) et les neutrophiles (**B**) sont quantifiés dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) et les médiateurs pro-inflammatoires, la chimiokine KC ou CXCL10 (**C**) et les cytokines IL-1β (**D**) et IL-33 (**E**) dans les surnageants de poumons, par ELISA (**C-E**). La concentration de protéines totales dans les surnageants de poumons est quantifiée par la méthode Bradford (**F**). Les protéines (30 µg) de surnageant de poumons de souris contrôle et de souris instillées avec respectivement 5 et 15 mg/kg de nano-SiO_2 (deux souris par groupe) sont co-migrées sur membrane et révélées par Western Blot avec un anticorps anti-IL-33 murin ; le marqueur de taille étant indiqué à gauche (**G**). Les graphiques et le Western Blot sont représentatifs de deux expériences indépendantes ; les résultats sont exprimés en moyennes et SEM. (*, $P<0.05$; ns, non significatif).

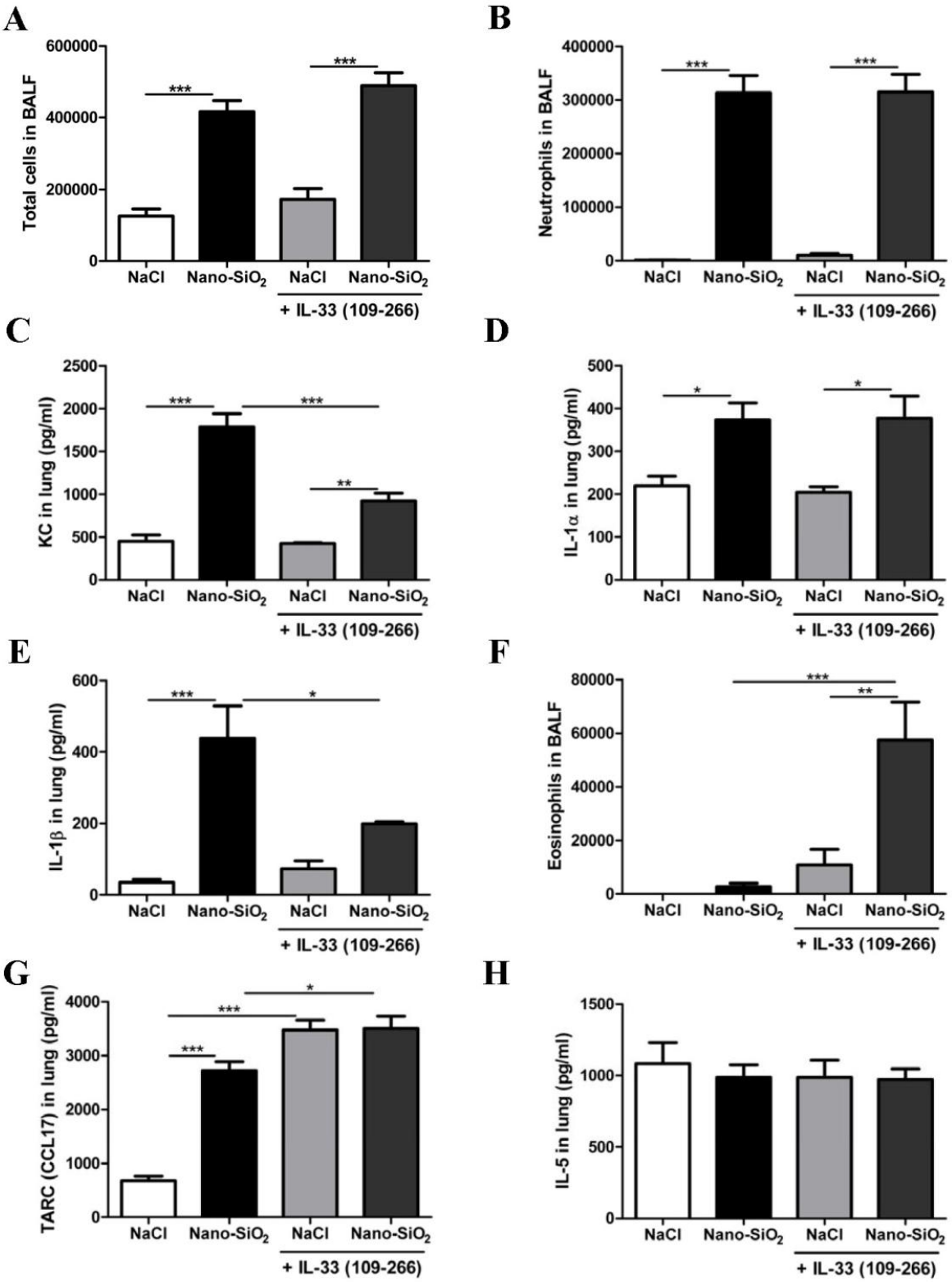
Figure 2:



<u>Figure 2 :</u> Les souris déficientes en ST2 présentent une inflammation pulmonaire exacerbée en réponse aux nanoparticules de silice

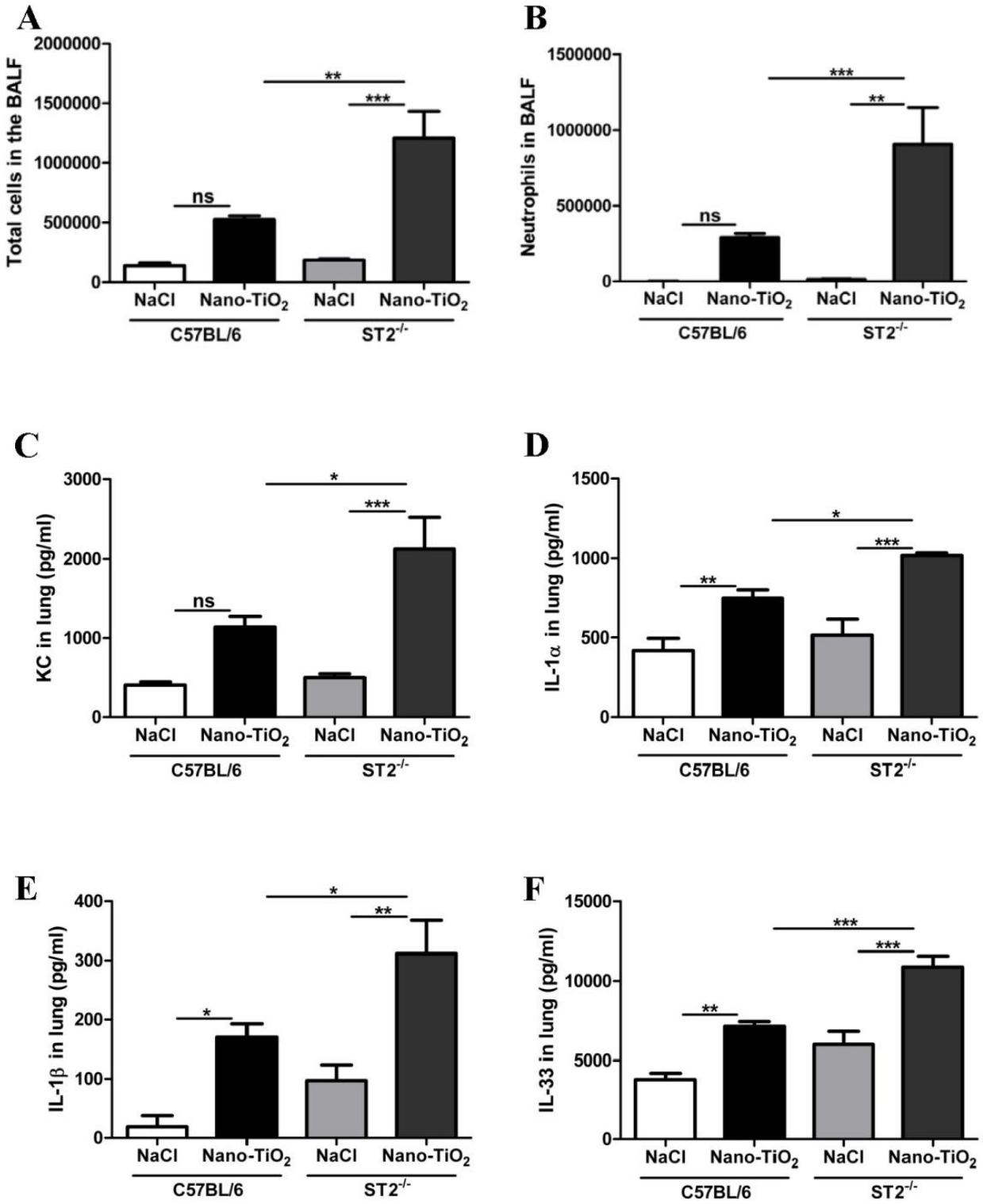
Des nano-SiO_2 sont administrées à des souris C57BL/6 ou $ST2^{-/-}$ à la concentration de 5 mg/kg. Les cellules totales (**A**) et les neutrophiles (**B**) ainsi que la chimiokine KC (**C**) et les cytokines IL-1α (**D**), IL-1β (**E**) et IL-33 (**F**) sont quantifiés dans les voies respiratoires des souris 24 h après instillation. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes et sont exprimés en moyennes et SEM. (*, P<0,05 ; ns, non significatif).

Figure 3:



<u>Figure 3 :</u> L'IL-33 exogène diminue partiellement la réponse inflammatoire pulmonaire induite par l'exposition à nano-SiO_2
Des souris C57BL/6 sont instillées avec de la nano-SiO_2 (5 mg/kg) ou du sérum physiologique seul puis sacrifiées 24 h après administration. En parallèle, des souris sont traitées avec de l'IL-$33_{109-266}$ recombinante murine (0,5 µg/souris ; en intranasal). Les cellules totales (**A**) dont les neutrophiles (**B**) et les éosinophiles (**F**) sont quantifiés dans le LBA et les cytokines et chimiokines dans les surnageants de poumons, par ELISA (**C-E ; G-H**). Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes et sont exprimés en moyennes et SEM. (*, P<0,05 ; ns, non significatif).

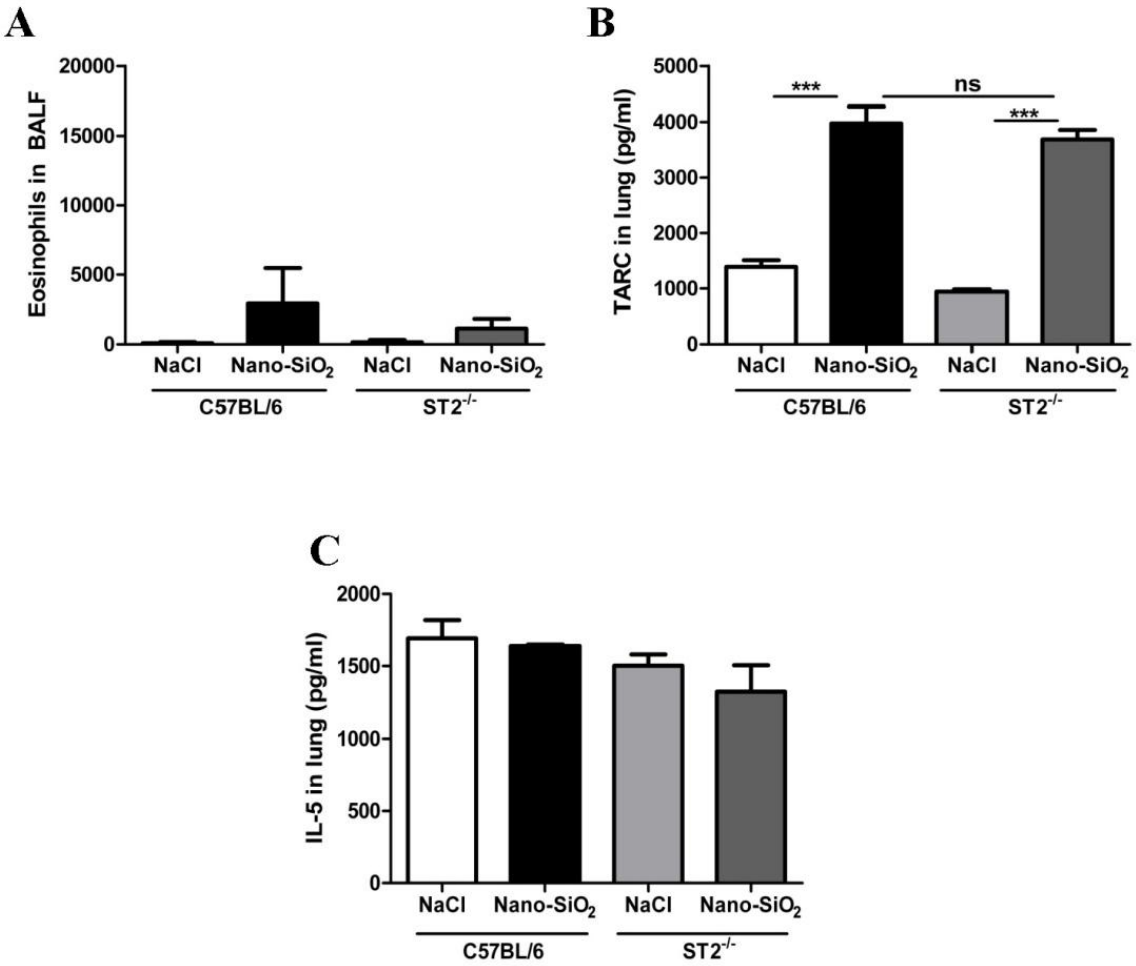
Figure supplémentaire 1:



<u>Figure supplémentaire 1 :</u> Les souris déficientes en ST2 présentent une inflammation pulmonaire exacerbée en réponse aux nanoparticules de titane

Des nanoparticules de dioxyde de titane (nano-TiO_2) sont administrées en intranasal à la concentration de 7,5 mg/kg aux souris C57BL/6 ou $ST2^{-/-}$. Les groupes contrôles sont constitués de souris ayant reçu la solution de sérum physiologique. Les cellules totales (**A**), et en particulier les neutrophiles (**B**), sont quantifiées dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) des souris effectués 24 h après administration de nanoparticules ou de sérum physiologique. Les médiateurs pro-inflammatoires, la chimiokine KC (**C**) et les cytokines IL-1α (**D**), IL-1β (**E**) et IL-33 (**F**), sont quantifiés par ELISA dans les surnageants de poumons. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes et sont exprimés en moyennes et SEM. (*, P<0,05 ; ns, non significatif).

Figure supplémentaire 2:



<u>Figure supplémentaire 2 :</u> Les souris déficientes en ST2 ne présentent pas d'éosinophilie ou d'augmentation de TARC en réponse aux nanoparticules de silice

24h après instillation de NaCl ou nano-SiO_2 (5mg/kg) à des souris C57BL/6 ou $ST2^{-/-}$. Les éosinophiles sont quantifiés dans les LBA et la chimiokine TARC (**B**) et la cytokine IL-5 (**C**) par ELISA dans les poumons. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes et sont exprimés en moyennes et SEM. (*, P<0,05 ; ns, non significatif).

PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

Produits

Les nanoparticules de silice (10-20 nm) et de titane (20 nm, forme anatase) ont été acquises auprès de la société IoLiTec (Heilbron, Allemagne). Les nanoparticules sont soniquées pendant trente minutes avant leur utilisation. Elles sont ensuite administrées à 5, 10 ou 15 mg/kg comme indiqué. L'IL-33 recombinante murine dérivée d'*Escherichia coli* (R&D system, Minneapolis, USA) est utilisée à la dose de 0,5µg par souris directement dans les solutions d'instillation.

Souris

Des souris C57BL/6 et des souris $ST2^{-/-}$ sur fond C57BL/6 (obtenues auprès du Dr McKenzie de Cambridge, UK) ont été utilisées. Elles sont âgées de huit à dix semaines pour les expériences (mâles de 10 semaines pour l'administration d'IL-33, avec un poids moyen de 24,5 g +/-1 g) et gardées dans des cages ventilées stériles. Toutes les expériences menées sont en accord avec l'éthique animale de la loi Française. Pour chaque expérience indépendante, les groupes contrôles (instillés avec du NaCl) sont composés de quatre animaux et les groupes traités avec des nanoparticules de cinq à six animaux.

Modèle d'inflammation pulmonaire

Les nanoparticules de silice reprises dans une solution saline, ou le sérum physiologique pour les animaux contrôles, sont administrées par instillation intranasale après une anesthésie légère avec un mélange kétamine (Imalgène 1000) - xylasine (Rompun 2%). Les animaux sont sacrifiés 24 heures après par asphyxie au CO_2. Les cellules de l'espace bronchoalvéolaire et les poumons sont alors récupérés pour déterminer les marqueurs de l'inflammation : recrutement cellulaire et niveaux de cytokines et chimiokines.

LBA, comptes et déterminations cellulaires

Le lavage bronchoalvéolaire (LBA) est réalisé comme ce qui a déjà été décrit (Gasse et al., 2009). Le nombre de cellules totales est déterminé dans le LBA après dilution avec une solution de Turk's

(Merck, Darmstadt, Allemagne) sur cellule de Malassez's. Les comptes différentiels des populations cellulaires sont réalisés sur des préparations de cytospins (Shandon CytoSpin 3, Thermo Scientific, Illkirch, France) après coloration May-Grünwald-Giemsa (Diff Quick, Medion Diagnostics, Düdingen, Suisse) selon les instructions du fabricant. Les comptes différentiels sont effectués sur un minimum de 250 cellules d'après les critères morphologiques standards.

Mesures des médiateurs inflammatoires : cytokines et chimiokines

Les poumons sont broyés dans 1 ml de tampon de phosphate de potassium à 10 mM contenant 0,1 mM d'EDTA (Sigma). Les broyats sont ensuite centrifugés 10 minutes à 10 000 rpm et les surnageants stockés à -20°C. Les niveaux d'IL-1α, d'IL-1β, d'IL-33, d'IL-5, de KC et de TARC des surnageants sont déterminés par méthode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) avec des kits (Mouse DuoSet, R&D system) selon les instructions du fabricant.

Immunotransfert / Western Blot

La quantité de protéines totales est déterminée dans les surnageants de broyats de poumons par la méthode Bradford (DC Protein Assay, Bio-Rad, Hercules, USA). Les protéines (30µg) sont dénaturées 5 minutes à 95 °C, séparées par SDS-PAGE puis transférées sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps de chèvre anti-IL-33 (R&D system). Les protéines sont détectées par l'anticorps secondaire (anti-IgG) puis par la méthode de détection améliorée de la chimiluminescence (Clarity ECL, Bio-Rad).

Analyses statistiques

Les analyses statistiques des différences entre les groupes expérimentaux sont déterminées par ANOVA suivi du test Bonferroni sous le logiciel GraphPad Prism 5.0. Les valeurs de *P* strictement inférieures à 0,05 sont considérés comme statistiquement significatives.

REFERENCES

Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., Lowry, G.V., Jolivet, J.-P., and Wiesner, M.R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. Nat. Nanotechnol. *4*, 634–641.

Baekkevold, E.S., Roussigné, M., Yamanaka, T., Johansen, F.-E., Jahnsen, F.L., Amalric, F., Brandtzaeg, P., Erard, M., Haraldsen, G., and Girard, J.-P. (2003). Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. Am. J. Pathol. *163*, 69–79.

Cayrol, C., and Girard, J.-P. (2009). The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. Proc. Natl. Acad. Sci. *106*, 9021–9026.

Hayakawa, H., Hayakawa, M., Kume, A., and Tominaga, S. (2007). Soluble ST2 Blocks Interleukin-33 Signaling in Allergic Airway Inflammation. J. Biol. Chem. *282*, 26369–26380.

Humphreys, N.E., Xu, D., Hepworth, M.R., Liew, F.Y., and Grencis, R.K. (2008). IL-33, a Potent Inducer of Adaptive Immunity to Intestinal Nematodes. J. Immunol. *180*, 2443–2449.

Ikutani, M., Yanagibashi, T., Ogasawara, M., Tsuneyama, K., Yamamoto, S., Hattori, Y., Kouro, T., Itakura, A., Nagai, Y., Takaki, S., et al. (2012). Identification of Innate IL-5–Producing Cells and Their Role in Lung Eosinophil Regulation and Antitumor Immunity. J. Immunol. *188*, 703–713.

Kurowska-Stolarska, M., Stolarski, B., Kewin, P., Murphy, G., Corrigan, C.J., Ying, S., Pitman, N., Mirchandani, A., Rana, B., van Rooijen, N., et al. (2009). IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *183*, 6469–6477.

Lefrançais, E., Roga, S., Gautier, V., Gonzalez-de-Peredo, A., Monsarrat, B., Girard, J.-P., and Cayrol, C. (2012). IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. Proc. Natl. Acad. Sci. *109*, 1673–1678.

Lüthi, A.U., Cullen, S.P., McNeela, E.A., Duriez, P.J., Afonina, I.S., Sheridan, C., Brumatti, G., Taylor, R.C., Kersse, K., Vandenabeele, P., et al. (2009). Suppression of Interleukin-33 Bioactivity through Proteolysis by Apoptotic Caspases. Immunity *31*, 84–98.

Monticelli, Laurel A., Sonnenberg, Gregory F., Abt, Michael C., Alenghat, Theresa, Ziegler, Carly G. K., Doering, Travis A., Angelosanto, Jill M., Laidlaw, Brian J., Yang, Cliff Y., Sathaliyawala, Taheri, et al. (2011). Innate lymphoid cells promote lung tissue homeostasis following acute influenza virus infection. Nat. Immunol. 1045–1054.

Oberdörster, G., Oberdörster, E., and Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ. Health Perspect. *113*, 823–839.

Oboki, K., Ohno, T., Kajiwara, N., Arae, K., Morita, H., Ishii, A., Nambu, A., Abe, T., Kiyonari, H., Matsumoto, K., et al. (2010). IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. *107*, 18581–18586.

Oshikawa, K., Kuroiwa, K., Tago, K., Iwahana, H., Yanagisawa, K., Ohno, S., Tominaga, S.I., and Sugiyama, Y. (2001). Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *164*, 277–281.

Préfontaine, D., Lajoie-Kadoch, S., Foley, S., Audusseau, S., Olivenstein, R., Halayko, A.J., Lemière, C., Martin, J.G., and Hamid, Q. (2009). Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *183*, 5094–5103.

Pushparaj, P.N., Tay, H.K., H' ng, S.C., Pitman, N., Xu, D., McKenzie, A., Liew, F.Y., and Melendez, A.J. (2009). The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock. Proc. Natl. Acad. Sci. *106*, 9773–9778.

Rankin, A.L., Mumm, J.B., Murphy, E., Turner, S., Yu, N., McClanahan, T.K., Bourne, P.A., Pierce, R.H., Kastelein, R., and Pflanz, S. (2010). IL-33 induces IL-13-dependent cutaneous fibrosis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *184*, 1526–1535.

Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., et al. (2005). IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. Immunity *23*, 479–490.

Smith, D.E. (2010). IL-33: a tissue derived cytokine pathway involved in allergic inflammation and asthma. Clin. Exp. Allergy *40*, 200–208.

Tajima, S., Oshikawa, K., Tominaga, S., and Sugiyama, Y. (2003). The increase in serum soluble ST2 protein upon acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. Chest *124*, 1206–1214.

Townsend, M.J., Fallon, P.G., Matthews, D.J., Jolin, H.E., and McKenzie, A.N.J. (2000). T1/St2-Deficient Mice Demonstrate the Importance of T1/St2 in Developing Primary T Helper Cell Type 2 Responses. J. Exp. Med. *191*, 1069–1076.

Wynn, T.A. (2004). Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. Nat. Rev. Immunol. *4*, 583–594.

Yazdi, A.S., Guarda, G., Riteau, N., Drexler, S.K., Tardivel, A., Couillin, I., and Tschopp, J. (2010). Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 and IL-1. Proc. Natl. Acad. Sci. *107*, 19449–19454.

Yin, H., Li, X.Y., Yuan, B.H., Zhang, B.B., Hu, S.L., Gu, H.B., Jin, X.B., and Zhu, J.Y. (2011). Adenovirus-mediated overexpression of soluble ST2 provides a protective effect on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. Clin. Exp. Immunol. *164*, 248–255.

DISCUSSION

Depuis la découverte des inflammasomes il y a un peu plus de dix ans, ces complexes multiprotéiques sont de plus en plus mis en avant dans les mécanismes de régulation de l'Immunité. Leur rôle a été démontré dans l'élimination de pathogènes ainsi que dans la mise en place des réponses inflammatoires stériles provoquées par des molécules de l'organisme en excès. L'inflammasome NLRP3 est le plus étudié. Il est particulièrement intéressant pour son implication dans la détection d'activateurs / stimuli chimiquement et structurellement très différents. Il peut s'agir de motifs spécifiques aux pathogènes (PAMP) ou de toxines bactériennes, de molécules du soi confinées dans des compartiments cellulaires et qui, en situation de stress ou d'endommagement cellulaires, sont libérées dans le milieu extracellulaire en tant que signaux de danger (DAMP) ainsi que des particules exogènes ou des molécules irritantes chimiques (souvent des polluants environnementaux) ou encore des ultraviolets. En réponse à tous ces activateurs, l'inflammasome NLRP3 s'assemble, permettant la maturation des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18.

Le contrôle de la mise en place de ce complexe est très strict. Tout d'abord le récepteur NLRP3 et la forme immature de l'IL-1β, la pro-IL-1β, ne sont que faiblement exprimés par la cellule en conditions physiologiques. Leur transcription nécessite un premier signal, appelé « priming » passant par la voie de signalisation NF-κB. *In vitro*, nous fournissons ce premier signal par le priming des macrophages murins dérivés de la moelle osseuse (BMDM) avec du LPS (voie TLR4) et dans le cas de la lignée de monocytes/macrophages humains THP1 avec du PMA (Phorbol-1 2 –Myristate 13-Acétate), qui active des kinases. Une fois produites, les protéines NLRP3 et pro-IL-1β ne sont pas encore fonctionnelles: la conformation tridimensionnelle du récepteur NLRP3 ne lui permet pas de recruter ASC et la pro-IL-1β reste confinée dans le cytosol et n'est pas inflammatoire. De même, la caspase-1 doit être recrutée par ASC puis s'autocliver pour être active. Ma thèse s'est focalisée sur les mécanismes qui permettent l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans un contexte d'inflammation par des particules « stériles » dont nous allons débattre.

Les cristaux d'acide urique, de silice et d'Alum et les nanoparticules de SiO_2 et de TiO_2 activent l'inflammasome NLRP3 *in vitro* :

Dès l'identification de l'inflammasome NLRP3 en 2004, de nombreuses études ont été menées pour déterminer ses activateurs. Il a ainsi été prouvé que des signaux de danger associés à une inflammation stérile peuvent activer cet inflammasome ce qui est à l'origine de la production d'IL-1β. C'est le cas des dépôts de cristaux d'acide urique dans le fluide synovial qui sont à l'origine d'une

inflammation des articulations, communément appelée goutte. D'autres structures cristallines, comme la silice et les cristaux de sels d'aluminium (Alum), ont été identifiées comme activant l'inflammasome NLRP3, et plus récemment les nanoparticules. La silice, polluant environnemental, peut être à l'origine d'une silicose, et l'Alum est un adjuvant de vaccin utilisé depuis les années 1920 mais dont les mécanismes d'activation de l'Immunité restaient inconnus. La silicose est provoquée par l'inhalation chronique de poussières de silice et entraîne une inflammation chronique puis une fibrose pulmonaire progressive. L'ensemble des maladies pulmonaires causées par l'inhalation et la fixation de particules solides dans le poumon sont regroupées sous le terme de pneumoconioses. C'est le cas de l'asbestose provoquée par l'amiante ou de l'aluminose induite par des poussières d'aluminium métallique. Comme les nanoparticules peuvent être inhalées par des travailleurs exposés (si certaines précautions ne sont pas prises comme le port de masques), il n'est pas anodin de les étudier dans un modèle d'inflammation pulmonaire.

L'activation de l'inflammasome NLRP3 par la déstabilisation lysosomale et la libération de cathepsine B qui en résulte a été particulièrement décrite dans le cas de particules comme la silice et l'Alum (Hornung et al., 2008; Sharp et al., 2009). L'inhibiteur des protéases à cystéines ainsi que l'inhibiteur spécifique de la cathepsine B induisent une diminution de la production d'IL-1β par les macrophages humains stimulés avec les cristaux de MSU, de silice et d'Alum. De même, pour les macrophages issus de souris déficientes en cathepsine B et stimulés avec des microparticules, nous observons une diminution de la sécrétion d'IL-1β par rapport aux macrophages de souris wild-type dans les mêmes conditions. Nous confirmons donc un rôle partiel de la cathepsine B dans l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Lorsqu'il a été montré que certaines nanoparticules activent l'inflammasome NLRP3, le mécanisme mis en avant a été le même que celui proposé en réponse aux toxines bactériennes, c'est-à-dire l'activation du récepteur P2X7 (P2X7R) suivi de l'efflux de potassium; la diminution de K^+ intracellulaire activant l'inflammasome. Nos résultats montrent que les cellules THP1 pour lesquelles l'expression des gènes codants pour les protéines ASC ou NLRP3 sont réprimés, grâce à la transfection d'ARN sh (« short-hairpin », pour leur structure en forme de tige-boucle), produisent peu d'IL-1β en réponse aux nanoparticules.

La cytochalasine D inhibe la polymérisation des filaments d'actine nécessaire à la phagocytose. Nous confirmons que la phagocytose des microparticules est indispensable à l'activation de l'inflammasome NLRP3. Contrairement à ce qui avait été précédemment affirmé pour le nano-TiO_2 (Yazdi et al., 2010) nous montrons que les nanoparticules de SiO_2 et de TiO_2 nécessitent aussi d'être phagocytées pour activer l'inflammasome NLRP3 (données non publiées). Il n'est cependant pas à

exclure qu'il existe d'autres moyens d'internaliser ces particules pour les cellules (phagocytes ou non). En effet, une étude a démontré que des particules de titane dites ultrafines ou fines avec des diamètres moyens respectifs de 69,1 et 194,9 nm font intervenir différents mécanismes d'internalisation active par des macrophages alvéolaires (Scherbart et al., 2011). Les particules ultrafines sont internalisées par phagocytose ou endocytose clathrine-dépendante tandis que les particules fines sont plutôt internalisées par endocytose ou par des mécanismes actine-dépendants dont la macropinocytose (Scherbart et al., 2011). Il est à noter que, même si nous soniquons nos particules (micro- et nano-) avant stimulation de cellules *in vitro*, une partie des nanoparticules s'agrège. Les nanoparticules de titane d'une taille primaire de 15-30 nm peuvent former par exemple des agrégats de 285 nm (Hackenberg et al., 2010). Bien que nous n'ayons pas caractérisé la taille des particules, l'observation au microscope de lavages bronchoalvéolaires de souris instillées avec des nanoparticules de titane nous permet effectivement d'observer des agrégats dans les lavages mais aussi dans les macrophages alvéolaires.

Nous démontrons une forte corrélation, entre la sécrétion d'IL-1β et une libération d'ATP dans le milieu extracellulaire (ATPe) par les THP1, suite à un stimulus (micro- ou nano- particules). La sécrétion d'ATP est connue pour constituer un signal de danger suite à un stress cellulaire. Nous confirmons qu'il s'agit d'un mécanisme actif et non pas passif, comme la libération de ce nucléotide suite à la mort de cellules, par la vérification de la viabilité cellulaire. Comme la sécrétion d'IL-1β est la conséquence de la libération d'ATPe induite par l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les particules, nous nous sommes d'abord intéressés à l'activation potentielle du récepteur purinergique ionotropique P2X7.

Second signal d'activation de l'inflammasome NLRP3 : ATP et signalisation purinergique :

La stimulation de macrophages avec de fortes concentrations d'ATP (5mM), après un premier signal LPS, constitue un modèle *in vitro* de perméabilisation membranaire qui amène à long terme à la mort des cellules. Ce modèle réflète des conditions pathologiques où de fortes quantités d'ATP sont libérées, conduisant à l'activation du seul récepteur P2X7 puis à une mort cellulaire massive. Nous montrons que des doses beaucoup plus modérées d'ATP (de l'ordre du micromolaire), et donc plus spécifiques de conditions inflammatoires physiologiques, mais également d'autres nucléotides comme de l'ADP et de l'UTP, augmentent la sécrétion d'IL-1β par les macrophages en réponse aux microparticules. Contrairement aux 5mM d'ATP, les nucléotides que nous utilisons à ces concentrations n'induisent pas de libération d'IL-1β à eux seuls. A l'inverse, la dégradation extracellulaire de l'ATP et de l'ADP par l'enzyme apyrase de grade VII induit, pour les BMDM stimulés

par des microparticules et de l'ATP 5mM, une décroissance dose-dépendante de la production d'IL-1β. Les nucléotides libérés dans le milieu extracellulaire sont donc impliqués dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 induite par les microparticules. Comme l'ADP et l'UTP sont des agonistes des récepteurs P2Y, nos résultats montrent que ceux-ci sont impliqués. Or, l'ATP n'est pas le seul nucléotide libéré par les cellules stressées, c'est également le cas de l'ADP, de l'UTP et de l'UDP (Lazarowski et al., 2003). Nous pensons donc que la complexité des récepteurs purinergiques et des nucléotides impliqués module la réponse inflammatoire.

a) Le récepteur P2X7 est impliqué dans la libération d'ATP mais pas dans la sécrétion d'IL-1β

Dans notre modèle, les BMDM déficients en P2X7R sécrètent autant d'IL-1β en réponse aux micro- et aux nano- particules que les BMDM sauvages. L'inhibiteur A740003 ne diminue pas la sécrétion de l'IL-1β à la dose de 10µM où il est spécifique du récepteur P2X7. De plus, nous observons que l'expression des ARN_m du récepteur P2X7 diminue lorsque des BMDM sont stimulés avec des nanoparticules. Nos résultats indiquent que le récepteur P2X7 n'est pas impliqué dans la sécrétion d'IL-1β. En ce sens, plusieurs études démontrent que bloquer ou supprimer le récepteur P2X7 n'a pas d'incidence sur la production d'IL-1β par les macrophages en réponse aux cristaux de MSU (Martinon et al., 2006), de silice (Iyer et al., 2009) ou d'Alum (Eisenbarth et al., 2008).

L'activation du récepteur P2X7 par de l'ATP a été associée au recrutement de la pannexine-1 puis à l'ouverture d'un pore par cet hémicanal (Pelegrin and Surprenant, 2006). Cependant, ces données sont à l'heure actuelle contestées. En effet, une étude a récemment montré que la déficience en pannexine-1 n'impacte pas la production d'IL-1β, et donc la stimulation de l'inflammasome NLRP3, par des BMDM stimulés avec de l'ATP, de la nigéricine (qui est un ionophore), du MSU ou de l'Alum (Qu et al., 2011). Nous confirmons que la pannexine-1 n'est pas essentielle puisque des BMDM déficients, stimulés avec du MSU, de la silice, de l'Alum ou des nanoparticules de SiO_2 et de TiO_2 ne sont pas affectés dans leur sécrétion d'IL-1β. La capacité de la pannexine-1 à former des pores qui laissent sortir de l'ATP n'est pas contestée mais elle est rapportée dans un contexte de cellules en apoptose et ne nécessite pas l'activation de P2X7R (Qu et al., 2011). La sortie active d'ATP des cellules inflammatoires peut s'effectuer via des homologues fonctionnels des pannexines, les connexines (Eltzschig et al., 2006, 2012). En utilisant des inhibiteurs des pannexines/connexines ainsi que l'inhibiteur spécifique de P2X7R (à 10µM), nous montrons que la libération d'ATP par des macrophages humains dépend du récepteur P2X7 et des pannexines ou des connexines, ou de ces deux types de canaux de façon redondante. Par contre, ce récepteur n'est pas indispensable à la production d'IL-1β contrairement à d'autres études. En particulier dans le modèle murin de la

maladie d'Alzheimer où le récepteur P2X7 est indispensable à l'augmentation du calcium intracellulaire, à la libération d'ATP et à la production d'IL-1β par les cellules de la microglie, en réponse aux agrégats d'amyloïde β (Sanz et al., 2009). De plus, le complément C3a a été montré comme régulateur de la sortie d'ATP des monocytes humains, par un canal non identifié mais qui impliquerait P2X7R pour la modulation de la sécrétion d'IL-1β (Asgari et al., 2013). Il a également été montré que le récepteur P2X7 est impliqué dans la réponse inflammatoire des neurones en réponse au LPS, mais que la perte de fonction de ce récepteur peut être compensée par une phosphorylation différentielle de NF-κB (Kim et al., 2013). Il a été mis en évidence qu'une augmentation de l'ATP extracellulaire (ATPe) et l'activation sous-jacente de P2X7R constituent des facteurs de prédisposition au développement de la goutte (Tao et al., 2013). Le récepteur P2X7 semble donc bien être impliqué dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 mais dans d'autres modèles que celui de l'ATP à la concentration de 5mM.

b) D'autres récepteurs purinergiques sont impliqués dans la signalisation

Comme abordé dans le point précédent, P2X7R n'est pas le seul récepteur impliqué dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les particules que nous étudions. L'augmentation de la sécrétion d'IL-1β par des macrophages stimulés avec des microparticules, en présence de nucléotides autres que l'ATP tels que l'ADP, l'UTP ou l'UDP, nous permet d'impliquer dans l'activation de l'inflammasome NLRP3, en plus des récepteurs P2X, les récepteurs P2Y. Nos résultats sont confortés par la diminution de la sécrétion d'IL-1β par les BMDM stimulés avec les micro- et les nano-particules en utilisant un inhibiteur de la phospholipase C (PLC). La PLC est impliquée en aval de la signalisation des récepteurs P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 et P2Y11 couplés à la protéine G_q. P2Y2 constitue une piste particulièrement intéressante car ce récepteur est impliqué *in vivo* dans le chimiotactisme des neutrophiles en réponse à la libération d'ATP et d'UTP (Chen et al., 2006), et l'activation des récepteurs P2Y2 des cellules épithéliales pulmonaires humaines par des nucléotides permet la libération de cytokines comme l'IL-6 (Douillet et al., 2006). Nous avons quantifié l'expression de gènes de différents récepteurs P2Y chez les BMDM. Il est intéressant de noter qu'en réponse aux nanoparticules, l'expression de P2Y2 (ATP / UTP) est significativement augmentée ce qui renforce son implication dans la signalisation purinergique. A l'inverse, les ARN_m des récepteurs P2Y12 et P2Y13 (tous les deux spécifiques de l'ADP) sont nettement diminués. Les nanoparticules de SiO_2 sont à l'origine d'une surexpression de P2Y1 (ADP) ainsi que de la diminution de l'expression des ARN_m de P2Y4 (UTP) et P2Y6 (UDP). Pour chacun de ces trois récepteurs, l'expression des ARN_m tend à diminuer en réponse aux nanoparticules de TiO_2 sans qu'il y ait de significativité. Suivant leur nature, les nanoparticules induisent un profil d'expression différent mais il ressort que le récepteur P2Y2 est

particulièrement exprimé en réponse aux nanoparticules de SiO_2 et de TiO_2. Des résultats non publiés du laboratoire montrent que les cristaux de MSU, silice et Alum induisent également une surexpression de P2Y2. Nous suggérons que l'absence de diminution de la sécrétion d'IL-1β par des BMDM déficients en récepteur P2Y2 stimulés avec des cristaux, puisse être expliquée par la redondance de la signalisation purinergique qui permet de compenser cette déficience.

c) Modèle proposé

Toutes ces données nous permettent de proposer un modèle *in vitro* d'activation de l'inflammasome NLRP3 des macrophages par les nucléotides. La production de pro-IL-1β par la voie NF-κB est induite par le priming LPS pour les BMDM (**1**). Les particules sont internalisées par phagocytose dans des phagosomes qui fusionnent à des lysosomes pour former des phagolysosomes (**2**). La présence de ces particules déstabilise la membrane des phagolysosomes qui libèrent dans le cytoplasme des ROS et des cathepsines (**3**). Par un mécanisme inconnu, l'internalisation des particules est à l'origine d'une libération d'ATP extracellulaire (ATPe) probablement dépendante du récepteur P2X7 (**4**). L'ATPe, très vite dégradée en ADP, peut se fixer à des récepteurs purinergiques P2X (**5**). Cette sortie d'ATP, via le recrutement d'hémicanaux pannexine-1 et / ou connexines, amplifie le signal par une boucle autocrine. Le recrutement de la pannexine-1 par P2X7R est connu pour être à l'origine d'un efflux de K^+ qui pourrait activer l'inflammasome NLRP3 (**6**). L'ATP, directement ou indirectement via l'ADP, peut aussi activer d'autres récepteurs purinergiques P2Y, potentiellement impliqués dans l'activation de l'inflammasome NLRP3. L'ADP est ensuite dégradée en AMP puis en adénosine qui possède ses propres récepteurs P1 (**7**). Le récepteur NLRP3 est activé suite à l'activation des P2X ou des P2Y par l'ATP, l'ADP ou l'UTP, probablement via l'efflux de K^+ (**8**). L'inflammasome NLRP3 une fois assemblé permet la maturation de la pro-IL-1β disponible en IL-1β (**9**). L'IL-1β, cytokine pro-inflammatoire, est ensuite libérée dans le milieu extracellulaire (voir figure 35).

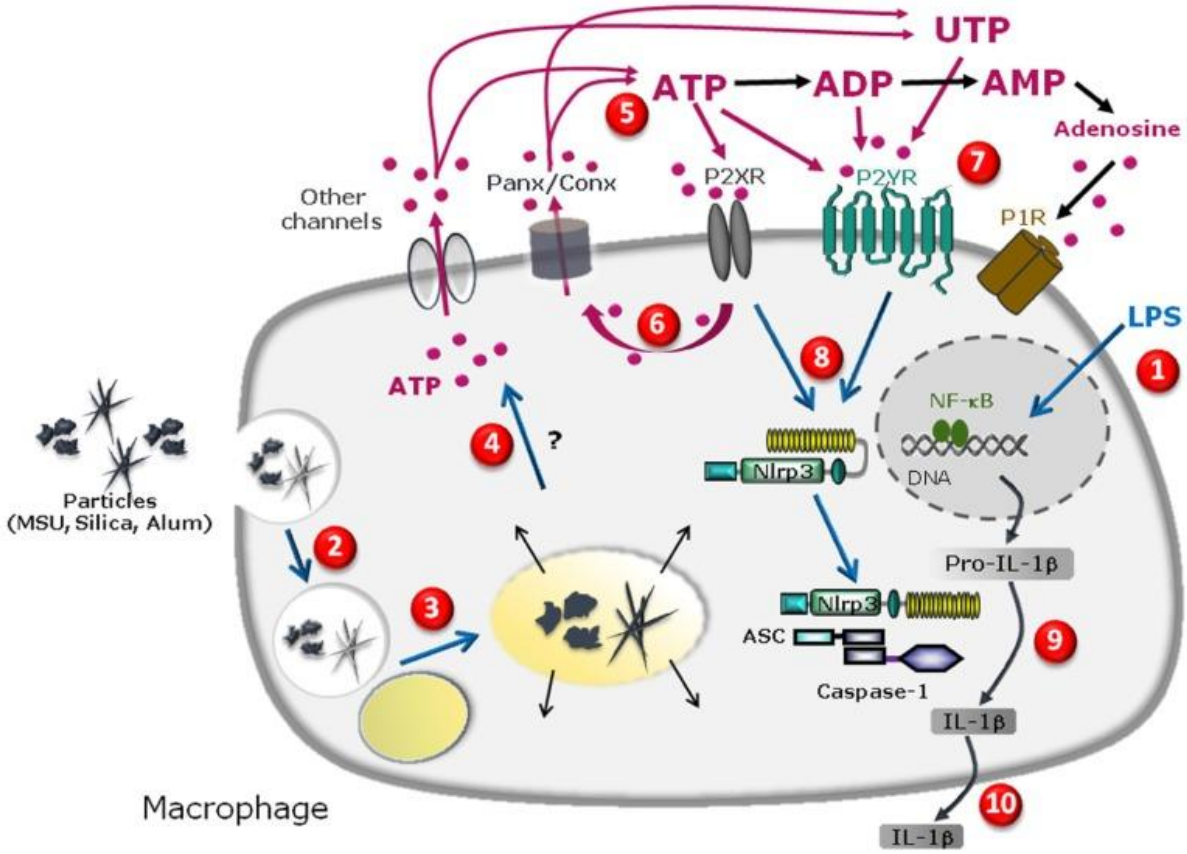


Figure 35 : Activation de l'inflammasome NLRP3 par l'ATPe et la signalisation purinergique (Gombault et al., 2013)
Schéma que nous proposons des voies d'activation de l'inflammasome NLRP3 des macrophages en réponse à des cristaux.

Historiquement, plusieurs mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 ont été proposés. Les toutes premières hypothèses étaient que chaque ligand pouvait se lier directement au récepteur NLRP3 ou induire un stress cellulaire qui activerait une protéine intermédiaire elle-même ligand du récepteur NLRP3. Confortée par le fait que plusieurs activateurs de NLRP3 activent également des canaux potassiques (la toxine microbienne nigéricine ou l'ATP), une étude a proposé que tous les activateurs de ce récepteur induisent un efflux de potassium et que la faible concentration de K^+ intracellulaire active l'inflammasome par un mécanisme inconnu (Pétrilli et al., 2007). Lors de cette étude il a été montré que tous les activateurs connus sont bloqués par l'inhibition de l'efflux de K^+ et que les ROS semblent jouer un rôle crucial dans l'activation de l'inflammasome NLRP3. L'efflux de potassium se ferait via des pores dans la membrane cellulaire formés par des toxines bactériennes (Mariathasan et al., 2006), via la pannexine-1 recrutée par P2X7R ou directement via P2X7R dans le cas de particules non cristallines (Tschopp and Schroder, 2010). Dans le cas des cristaux, l'hypothèse d'une « frustration » des lysosomes lors de l'internalisation des particules suivie de la production de ROS par la NADPH oxydase a ensuite été proposée (Dostert et al., 2008). Une autre théorie, qui n'exclue pas la première, a avancé que les cristaux entraînent une rupture de la membrane des lysosomes et une libération de protéases dont la cathepsine B dans le cytosol

(Hornung et al., 2008). La source de production de ROS a ensuite été attribuée aux mitochondries endommagées par l'ATP et par la cathepsine B suite à la rupture des lysosomes (McGuire et al., 2011; Zhou et al., 2010a). Les ROS sont davantage considérés comme des inducteurs de l'augmentation de l'expression du récepteur NLRP3 que comme des activateurs (Bauernfeind et al., 2011b) et un rôle de soutien d'assemblage de l'inflammasome a été attribué aux mitochondries (Misawa et al., 2013). D'autres hypothèses ont été ajoutées comme le changement de volume cellulaire qui active l'inflammasome (Compan et al., 2012). Une étude récente propose que les toxines bactériennes, la nigéricine, l'ATP et les particules provoquent un endommagement des mitochondries, la génération de ROS, l'ouverture de pores membranaires ou des variations de volume cellulaire mais que tous ces mécanismes ne seraient pas indispensables à l'activation de l'inflammasome NLRP3, le seul signal essentiel serait, comme le proposait déjà Pétrilli en 2007, la diminution de concentration de potassium intracellulaire (Muñoz-Planillo et al., 2013).

Lors de notre étude, nous proposons une implication partielle de la cathepsine B libérée dans le cytosol après l'internalisation des particules dans des lysosomes. Nous n'avons pas étudié les ROS mais nous ne négligeons pas leur rôle. Nous mettons surtout en évidence l'implication essentielle des nucléotides, en particulier l'ATP, via la signalisation purinergique P2 dans l'activation de l'inflammasome NLRP3. Nous proposons que P2X7R et des hémicanaux de type connexines soient impliqués dans la libération de l'ATPe, qui sous cette forme ou métabolisée en ADP, signale via les P2, dont le récepteur P2Y2 semble être particulièrement intéressant. Nos données sont appuyées par l'étude de la modulation de l'activation de l'inflammasome NLRP3 et donc de la sécrétion d'IL-1β par l'efflux d'ATP en réponse au complément C3a (Asgari et al., 2013). L'étude de Muñoz-Planillo confirme que les particules induisent un efflux de K^+ et que la phagocytose, ainsi que la pinocytose, sont nécessaires pour l'activation de l'inflammasome NLRP3 (et en particulier, la silice et l'Alum). Dans cette étude, Ca074Me inhibe bien cet efflux de potassium, mais à l'inverse des résultats que nous observons, la sécrétion d'IL-1β n'est pas diminuée pour les BMDM déficients en cathepsine B. L'explication fournie par Muñoz-Planillo est que l'inhibiteur Ca074Me ne serait pas spécifique de la cathepsine B. Pour notre part, bien que les conditions de culture et de stimulation des macrophages diffèrent quelque peu, nous n'avons pas d'explication pour ce point. Muñoz-Planillo suggère également que la production de ROS observée suite à l'endommagement des mitochondries par la nigéricine et l'ATP (Shimada et al., 2012) serait un effet cytotoxique conséquent des stimuli et non pas un activateur de l'inflammasome NLRP3. Il reste que, même si l'efflux de K^+ est un activateur commun des particules étudiées, les autres mécanismes ne sont pas à rejeter mais peuvent constituer des modulateurs de l'activation de l'inflammasome NLRP3. Bien qu'une limite de nos travaux soit que la libération d'ATPe ne soit pas mesurable pour les BMDM, étudier les données

mises en avant par l'étude de Muñoz-Planillo constitue d'excellentes pistes de perspectives. Toujours dans cette étude, l'ATP est utilisée comme stimulus mais la sortie d'ATP à travers des hémicanaux recrutés par des récepteurs purinergiques P2 n'est pas abordée.

Implication d'un métabolite de l'ATP, l'adénosine, dans la modulation de l'activation de l'inflammasome NLRP3 :

Lors de l'étude de l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les nanoparticules nous avons approfondi les résultats que nous avions obtenus pour les microparticules. L'analyse de l'expression des ARN_m en réponse aux nanoparticules fait ressortir les récepteurs P2Y1 (plus spécifique de l'ADP) et P2Y2 (ATP) comme récepteurs d'intérêt. L'utilisation de l'inhibiteur de la PLC-β, activée par P2Y1 et P2Y2, diminue la sécrétion de l'IL-1β en réponse aux nanoparticules. Nous avons également utilisé des enzymes apyrases ainsi que l'inhibiteur de CD39 (ARL67156) lors de la stimulation de macrophages avec des nanoparticules. L'apyrase de grade VI qui dégrade préférentiellement l'ATP n'affecte pas la sécrétion de l'IL-1β ce qui suggère un rôle de ADP/P2Y1 en plus de l'axe ATP/P2Y2 (données non montrées). L'ARL67156, en inhibant CD39 (une enzyme qui dégrade l'ATPe en ADP et AMP), potentialise fortement la production d'IL-1β par les THP1 ce qui confirme le rôle de l'axe ATP/P2Y2. Nous avions montré que pour la silice, l'apyrase VII (dégradation de l'ATP et de l'ADP) diminue la sécrétion d'IL-1β chez les BMDM ce qui implique l'ATP, l'ADP et l'UTP dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 via les récepteurs P2Y. Au contraire, nos résultats montrent que pour les BMDM et les THP1 stimulés avec les nanoparticules, la sécrétion d'IL-1β est augmentée quand l'ATP et l'ADP sont dégradées. Ces données nous permettent d'avancer deux théories. La première est que, de façon non surprenante, il y a bien une différence mécanistique entre les micro- et les nano-particules. La seconde, plus innovante, est que pour les nanoparticules, les nucléosides tri- et di-phosphates ne sont pas les seuls impliqués dans l'activation de l'inflammasome NLRP3. Comme l'AMP ne semble pas signaler par des récepteurs purinergiques, nous nous sommes intéressés en particulier à l'adénosine dont les rôles pro- inflammatoires sont assez connus dans des pathologies comme les COPD et la fibrose pulmonaire (Cronstein, 2011). Nos données obtenues avec l'apyrase VII indiquent que l'adénosine joue potentiellement un rôle pro-inflammatoire dans le cas des nanoparticules. Au contraire, si nous dégradons l'adénosine par l'enzyme adénosine déaminase (ADA), la sécrétion d'IL-1β est diminuée de façon dose-dépendante, à la fois pour les BMDM et les THP1. L'ADA, en dégradant l'adénosine, provoque probablement un déplacement d'équilibre responsable de la dégradation de l'ATP et de l'ADP. Ceci est confirmé par la diminution de l'ATPe mesurée dans les surnageants de culture de THP1 stimulées avec des nanoparticules et de l'ADA. Nous posons donc l'hypothèse que l'accumulation d'adénosine extracellulaire est un facteur

favorisant la sécrétion d'IL-1β en plus des nanoparticules. De plus, nous observons que l'adénosine à de fortes concentrations (dès 1 mM) est suffisante à elle seule pour induire la libération d'IL-1β par les THP1. La stimulation des BMDM par des nanoparticules induit une augmentation de l'expression des ARN_m de certains récepteurs à l'adénosine, en particulier A_{2A}, A_{2B} et, dans une moindre mesure, A_3. Nous confirmons l'implication de ces récepteurs par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques. Si la caspase-1, un des éléments essentiels de l'inflammasome NLRP3, est inhibée, la sécrétion de l'IL-1β induite par l'adénosine chez les THP1 est également abrogée ce qui relie effectivement l'adénosine à l'activation de l'inflammasome NLRP3. De même, les THP1 sh ASC ou NLRP3 sécrètent nettement moins d'IL-1β en réponse à de fortes doses d'adénosine que les THP1 classiques. Nos données nous permettent d'avancer que les nanoparticules induisent une sortie d'ATP qui est ensuite dégradée en ses différents métabolites et que les axes ATP/P2Y2, ADP/P2Y1 et adénosine/P1 sont des éléments cruciaux pour l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Hypothèses des mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 par l'adénosine :

Nous proposons deux pistes complémentaires pour expliquer les mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 par l'adénosine. L'adénosine possède quatre récepteurs P1 : A_1, A_{2A}, A_{2B} et A_3, qui, tout comme les récepteurs P2Y, sont couplés à des protéines G. Les récepteurs A_1 et A_3 sont couplés à des protéines G_i qui inhibent l'adénylate cyclase (AC) et les sous-types A_2, à des protéines G_s qui l'activent. Cette AC est capable de dégrader l'ATP intracellulaire en AMP_c. Or, plusieurs études montrent que l'AMP_c a un rôle direct ou indirect dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (voir figure 36). L'AMP_C a été décrite comme un inhibiteur du récepteur NLRP3 par une liaison directe (Lee et al., 2012b) mais également comme un inducteur de l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule via la protéine kinase A dans un contexte neurologique (Landolt et al., 2012). La protéine G_i couplée à A_3, même si elle inhibe l'AC, a aussi été reliée à l'efflux de K^+ (Landolt et al., 2012). Ces mouvements d'ions sont tous deux proposés comme des activateurs de l'inflammasome NLRP3 (Murakami et al., 2012; Pétrilli et al., 2007) et fournissent un lien entre adénosine extracellulaire et activation de l'inflammasome NLRP3. De plus, l'activation autocrine des récepteurs P1 des sous-types A_2 et la signalisation AMP_c-dépendante ont été mises en évidence dans l'activation de la caspase-1 en présence de fortes concentrations de glucose (Trueblood et al., 2011). L'ensemble de ces données nous permet de proposer des hypothèses de travail, résumées dans le schéma ci-dessous. En perspectives, il serait judicieux de tester l'ensemble de ces voies pour une activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse à l'adénosine et aux nanoparticules. Il s'agit probablement d'une vue simpliste d'un ensemble de voies de signalisation très complexes.

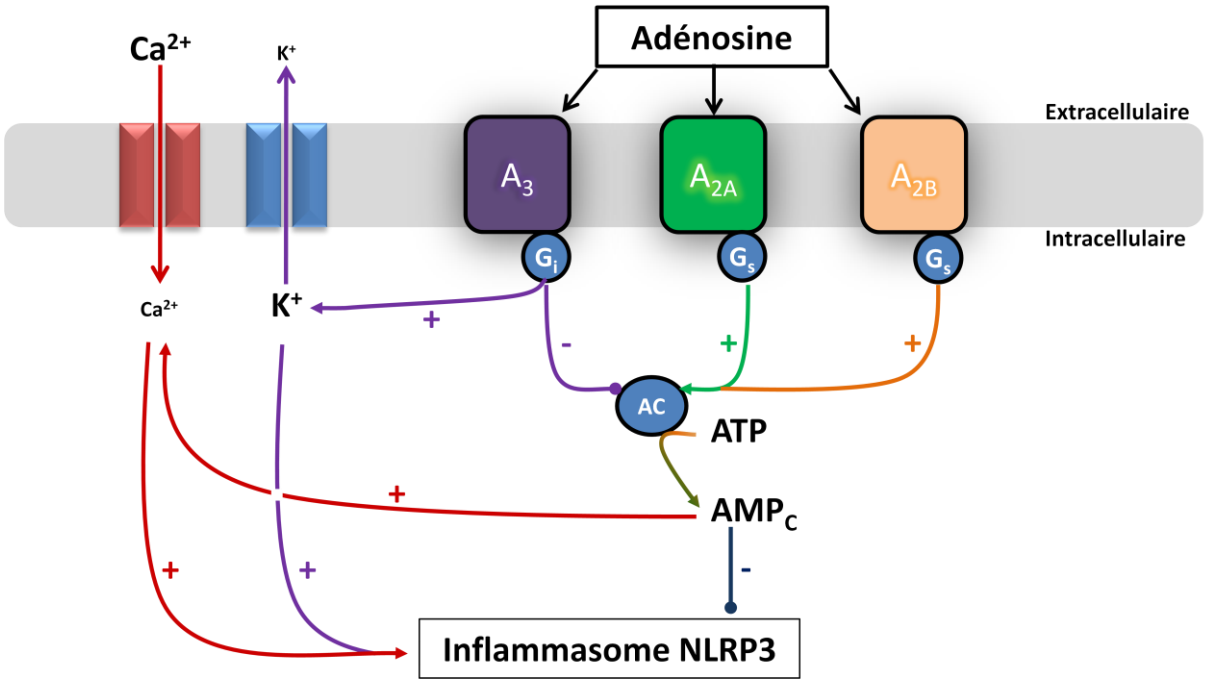


Figure 36 : Modèle hypothétique de l'activation de l'inflammasome NLRP3 par l'adénosine via l'adénylate cyclase (AC)
Modifiée à partir de (Landolt et al., 2012; Lee et al., 2012b; Murakami et al., 2012)

Suivant les profils d'expression des récepteurs P1 sur les différentes populations cellulaires, et la quantité d'adénosine extracellulaire (les récepteurs A_1 et A_{2A} sont de forte affinité et les récepteurs A_{2B} et A_3, de faible affinité), la réponse inflammatoire peut ainsi être modulée.

Dans le milieu extracellulaire, l'ATP ne peut être que dégradée et n'est pas recaptée par les cellules, ce qui n'est pas le cas de l'adénosine (voir figure 37). L'ATP est dégradée en ADP, AMP puis adénosine. Une étude a montré que dans le cas de fortes concentrations de glucoses, les récepteurs P2Y couplés à l'AC peuvent, suivant le contexte, moduler positivement ou négativement l'activité de la caspase-1 (Trueblood et al., 2011). Dans nos conditions de stimulations de macrophages par des particules, les récepteurs P2Y1 et P2Y2 impliqués sont activateurs de NLRP3. Par la suite, lorsque l'adénosine extracellulaire s'accumule, elle est prise en charge par des transporteurs ENT pour rééquilibrer les concentrations intra et extra cellulaires (Young et al., 2013). Une fois dans le cytosol, l'adénosine peut être catabolisée en AMP, ADP puis ATP par des adénosines kinases (AK). L'ATP renouvellée peut ainsi être libérée via des pannexines et / ou des connexines recrutées par le récepteur P2X7 (lui-même activé par de l'ATPe). En activant l'AC, certains récepteurs P1 activés par l'adénosine extracellulaire, peuvent fournir de l'AMP_c à partir d'ATP intracellulaire. Si cette concentration d'AMP_c augmente excessivement, l'AMP_c peut être sécrétée par la cellule via des canaux MRP (Multidrug Resistant Proteins) pour ensuite être transformée en adénosine. D'autres transporteurs, les CNT (Concentrative Nucleoside Transporters), peuvent également libérer de l'adénosine dans le milieu (Young et al., 2013).

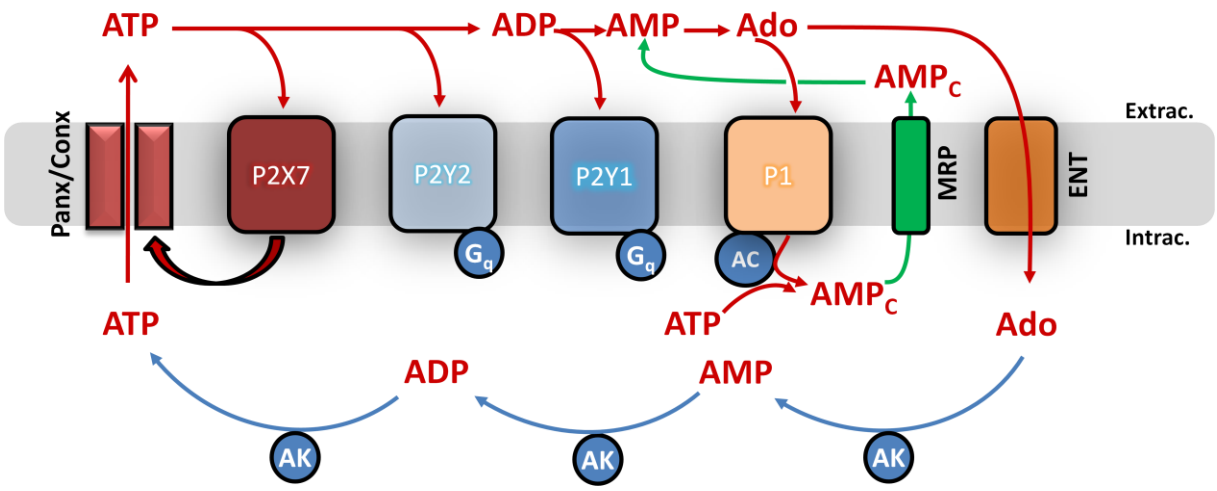


Figure 37 : Boucle autocrine ATP-adénosine
Modifiée d'après (Corriden and Insel, 2012; Harden et al., 2010; Riteau et al., 2012)

Nous proposons ainsi deux mécanismes d'action de l'adénosine extracellulaire : soit un axe adénosine/P1, soit une boucle autocrine ATP/adénosine, ces deux voies aboutissant à l'activation de l'inflammasome NLRP3 à travers l'activation de récepteurs purinergiques et des flux ioniques cellulaires.

Les nanoparticules de silice et de titane activent l'inflammasome NLRP3 *in vivo* :

Il a été montré récemment que les nanoparticules activent l'inflammasome NLRP3 *in vivo* et que les nanoparticules de TiO_2 provoquent une inflammation pulmonaire via la libération des cytokines pro-inflammatoires IL-1α et IL-1β et le recrutement de neutrophiles (Yazdi et al., 2010). Notre équipe a réalisé dans cette collaboration l'exposition pulmonaire des souris avec une administration unique de nanoparticules de TiO_2 en solution intranasale. Il a également été montré que les particules ultrafines (PUF, c'est-à-dire d'un diamètre inférieur à 0,1µm ou un diamètre aérodynamique inférieur à 100nm) issues de la pollution de l'air ambiant, et tout particulièrement les particules Diesel, peuvent se déposer, persister dans l'appareil respiratoire de l'Homme mais aussi induire un processus inflammatoire et exacerber les pathologies respiratoires (Marano, 2007). Il est donc essentiel en termes de santé publique de comprendre les risques liés à l'utilisation des nanoparticules et tout particulièrement de découvrir par quels mécanismes elles activent l'inflammasome NLRP3. Nous montrons que l'instillation de nanoparticules de silice induit également une inflammation pulmonaire chez les souris, caractérisée, comme celle induite par les nano-TiO_2, par un recrutement de neutrophiles et une production de cytokines pro-inflammatoires IL-1α et IL-1β dans les voies respiratoires. Comme nous avons pu constater que l'instillation de nanoparticules induit, à l'instar de la bléomycine (Riteau et al., 2010), une augmentation transitoire de l'ATPe détectée dans le LBA,

nous nous sommes demandé si l'adénosine constitue bien un médiateur de l'activation de l'inflammasome NLRP3 *in vivo*.

Implication de l'adénosine dans la signalisation purinergique et l'activation de l'inflammasome NLRP3 *in vivo*

L'adénosine a un rôle essentiel *in vivo*, en particulier dans l'Immunité. Elle permet par exemple d'induire la différenciation et l'activation des monocytes (Haskó and Pacher, 2012), la migration de cellules épithéliales bronchiques et le remodelage tissulaire (Musante et al., 1999). Elle est libérée par plusieurs populations cellulaires comme les cellules épithéliales alvéolaires (Tatur et al., 2008) et les neutrophiles. L'adénosine permet aussi de moduler l'activité de ces cellules inflammatoires via les récepteurs P1 (Barletta et al., 2012). Afin de compléter notre étude *in vitro* sur le rôle de l'adénosine dans l'activation de l'inflammasome NLRP3, nous avons administré à des souris C57BL/6, en plus des nanoparticules de SiO_2, de l'ADA. Cette enzyme a pour conséquence une diminution significative, mais non complète, du recrutement de neutrophiles, corrélée avec une baisse de la production de la chimiokine attractive des neutrophiles, KC. Nos résultats sont confirmés par une étude où il est montré que l'ATP via P2Y2 et l'adénosine via A3 favorisent le chimiotactisme des neutrophiles (Chen et al., 2006). Bien que nous montrions *in vitro* l'implication de l'adénosine dans l'activation de l'inflammasome NLRP3, l'ADA ne diminue pas de façon significative l'IL-1β induite par les nanoparticules dans les poumons. Nous pensons que même si l'adénosine est dégradée irréversiblement par l'ADA, l'ATP et l'ADP restent des médiateurs suffisants pour compenser et pour activer l'inflammasome NLRP3 et ainsi induire la sécrétion d'IL-1β *in vivo*.

Régulation de l'IL-1β par l'axe IL-33/ST2 *in vivo*:

Nous montrons que l'instillation de nanoparticules de SiO_2 ou de TiO_2 induit la production d'une autre cytokine de la famille de l'IL-1, l'IL-33. L'IL-33 a beaucoup été décrite comme une cytokine capable d'induire une réponse de type Th2 et est impliquée dans des pathologies comme l'asthme allergique. Tout comme l'IL-1α, l'IL-33 est une alarmine qui peut être libérée dans l'espace extracellulaire par les cellules épithéliales endommagées. A l'inverse de l'IL-1β, la forme « Full-Length » (FL) de l'IL-33 est constitutivement exprimée, stockée dans les noyaux de cellules endothéliales et épithéliales et est biologiquement active. L'IL-33 peut être clivée par la caspase-1 ce qui la rend inactive, mais aussi par d'autres protéases, et en particulier des protéases de neutrophiles, en des formes hautement actives (Lefrançais et al., 2012). Nous montrons que l'instillation de nanoparticules induit une libération dose-dépendante d'IL-33 dans les poumons.

Nous ne détectons pas cette cytokine dans le LBA, soit parce qu'elle n'est pas présente ou liée directement à son récepteur, soit parce qu'elle est sous le seuil de détection de notre kit ELISA. L'IL-33 FL est libérée dans les poumons de souris contrôles dans lesquels nous détectons également différentes formes d'IL-33 clivée, en quantités moindres. Nous proposons que la libération d'IL-33 et ses clivages soient provoqués par le stress ou l'endommagement des cellules des voies respiratoires lors de l'instillation du sérum physiologique ou lors du sacrifice de l'animal (par inhalation de CO_2). Cependant, qu'il s'agisse des formes entières ou clivées, nous observons une très nette augmentation de l'IL-33 dans les poumons lors de l'inflammation aiguë induite par les nanoparticules, et cette augmentation est directement corrélée à la dose de nanoparticules. Il a été montré que l'exposItion de cellules épithéliales pulmonaires à des allergènes environnementaux induit une sécrétion d'ATP qui active les récepteurs P2 (Kouzaki et al., 2011). Cette libération d'ATP est à l'origine d'une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire suffisante et nécessaire pour la translocation de l'IL-33 du noyau au cytoplasme puis à sa libération active (Kouzaki et al., 2011). De plus, l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire a été reliée à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Murakami et al., 2012). L'exposition de cellules pulmonaires à des nanoparticules pourrait, via la signalisation ATP/récepteurs P2 (et tout particulièrement ADP/P2Y1 et ATP/P2Y2), activer l'inflammasome NLRP3 et, en parallèle, libérer activement de l'IL-33 *in vivo*. Dans ce contexte inflammatoire, l'IL-33 serait clivée par des protéases comme les élastases de neutrophiles et des cathepsines.

Nous montrons que les souris déficientes en récepteur de l'IL-33, le récepteur ST2, ont une exacerbation de la réponse inflammatoire en réponse aux nanoparticules de SiO_2 et de TiO_2. Nous dosons plus d'IL-33 dans les poumons pour ces souris, qu'elles appartiennent au groupe contrôle ou au groupe traité avec les nanoparticules, par rapport aux souris wild-type. Nous pouvons expliquer ce résultat par l'absence de prise en charge de l'IL-33 par le ST2s (ST2 soluble). Lorsque nous administrons, en plus de la solution saline ou des nanoparticules de SiO_2, de l'IL-33 murine recombinante clivée (la forme 109-266 acides aminés), nous obtenons une diminution partielle de la réponse inflammatoire avec moins de sécrétion de KC et d'IL-1β dans les poumons. L'activation de l'inflammasome NLRP3 pourrait donc être modulée via l'axe IL-33/ST2, l'IL-33 étant libérée suite à l'instillation des nanoparticules. Cependant, la balance Th1/Th2 est finement régulée et l'administration d'IL-33 exogène est à double tranchant. En effet, l'IL-33 seule est suffisante pour induire une éosinophilie, exacerbée par les nanoparticules, mais sans affecter la sécrétion de cytokines Th2 comme l'IL-5.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La mise en évidence de l'activation de l'inflammasome NLRP3 par des signaux de danger endogènes a permis de mieux comprendre certaines pathologies inflammatoires stériles comme la goutte, la maladie d'Alzheimer, les diabètes de type 2 ou l'athérosclérose. Dans le cas de la goutte, un traitement à partir d'un antagoniste de l'IL-1R (Anakinra) a pu être mis au point. L'inflammasome NLRP3 peut également être activé, toujours stérilement, par des particules exogènes comme la silice et les nanoparticules. La silice est un polluant environnemental qui, au même titre que l'amiante, peut induire des maladies pulmonaires graves. Il a été montré que, tandis que le titane de la taille du micron ou du millimètre est amorphe, les nanoparticules de titane sont biologiquement actives et constituent potentiellement un danger pour la santé humaine. L'étude de la toxicologie des nanoparticules (la nanotoxicologie) est donc primordiale pour comprendre les risques liés à ces particules si réactives.

Les mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 sont toujours à l'heure actuelle peu connus et à l'origine de débats et de controverses dans la communauté scientifique. Les travaux présentés dans cette thèse proposent un nouveau mécanisme d'activation de l'inflammasome NLRP3 via la libération de nucléotides par les cellules et la signalisation purinergique qui s'ensuit. Nos résultats montrent en particulier le rôle essentiel des axes ADP/P2Y1, ATP/P2Y2 et adénosine/A_{2A}-A_{2B} *in vitro*. *In vivo*, l'inflammation pulmonaire induite par l'exposition aux nanoparticules, dépendante de l'IL-1α, de l'IL-1β et de leur récepteur commun IL-1R1, serait également modulée par l'IL-33 et son récepteur ST2.

Nous avons mis en évidence le rôle de la signalisation purinergique comme activateur de l'inflammasome NLRP3 mais les mécanismes doivent encore être approfondis. Nous pensons que les flux ioniques jouent un rôle important mais le débat reste d'actualité.

De nombreuses questions restent à élucider parmi lesquelles les voies de signalisation sous-jacentes à l'activation des récepteurs purinergiques, à l'activation de la PLC-β et le rôle de l'adénylate cyclase et de l'AMP_c. Il reste également à approfondir le rôle de l'IL-33, ses modalités de libération (par nécrose cellulaire ou via des mécanismes ATP/calcium dépendants ?), et à identifier les protéases impliquées dans son clivage, les produits de ses clivages et leurs rôles (pro et / ou anti-inflammatoires ?). Notre étude *in vivo* s'est focalisée sur les macrophages et neutrophiles mais il serait important d'étudier d'autres populations cellulaires, en particulier les cellules dendritiques qui jouent un rôle essentiel dans l'Immunité innée et les ILC, productrices d'IL-33. La taille initiale des nanoparticules utilisées nous est connue mais pas celle des agrégats qui se forment

immanquablement *in vitro* et *in vivo*. La formation de ces agrégats peut être limitée par l'adjonction d'agents dispersants comme le polyéthylène glycol et leur taille pourrait être estimée par microscopie électronique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aachoui, Y., Leaf, I.A., Hagar, J.A., Fontana, M.F., Campos, C.G., Zak, D.E., Tan, M.H., Cotter, P.A., Vance, R.E., Aderem, A., et al. (2013a). Caspase-11 Protects Against Bacteria That Escape the Vacuole. Science *339*, 975–978.

Aachoui, Y., Sagulenko, V., Miao, E.A., and Stacey, K.J. (2013b). Inflammasome-mediated pyroptotic and apoptotic cell death, and defense against infection. Curr. Opin. Microbiol.

Adamson, I.Y., and Bowden, D.H. (1975). Derivation of type 1 epithelium from type 2 cells in the developing rat lung. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. *32*, 736–745.

Adriouch, S., Haag, F., Boyer, O., Seman, M., and Koch-Nolte, F. (2012). Extracellular NAD+: a danger signal hindering regulatory T cells. Microbes Infect. *14*, 1284–1292.

Akira, S. (2000). The role of IL-18 in innate immunity. Curr. Opin. Immunol. *12*, 59–63.

Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. Nat. Rev. Immunol. *4*, 499–511.

Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-κB by Toll-like receptor 3. Nature *413*, 732–738.

Ali, S., Huber, M., Kollewe, C., Bischoff, S.C., Falk, W., and Martin, M.U. (2007). IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 18660–18665.

Allen, I.C., Scull, M.A., Moore, C.B., Holl, E.K., McElvania-TeKippe, E., Taxman, D.J., Guthrie, E.H., Pickles, R.J., and Ting, J.P.-Y. (2009). The NLRP3 Inflammasome Mediates In Vivo Innate Immunity to Influenza A Virus through Recognition of Viral RNA. Immunity *30*, 556–565.

Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. Cell *87*, 171.

Amer, A., Franchi, L., Kanneganti, T.-D., Body-Malapel, M., Özören, N., Brady, G., Meshinchi, S., Jagirdar, R., Gewirtz, A., Akira, S., et al. (2006). Regulation of Legionella Phagosome Maturation and Infection through Flagellin and Host Ipaf. J. Biol. Chem. *281*, 35217–35223.

Anand, P.K., Malireddi, R.K.S., Lukens, J.R., Vogel, P., Bertin, J., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2012). NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens. Nature *488*, 389–393.

Angosto, D., López-Castejón, G., López-Muñoz, A., Sepulcre, M.P., Arizcun, M., Meseguer, J., and Mulero, V. (2012). Evolution of inflammasome functions in vertebrates: Inflammasome and caspase-1 trigger fish macrophage cell death but are dispensable for the processing of IL-1β. Innate Immun. *18*, 815–824.

Apasov, S., Chen, J.F., Smith, P., and Sitkovsky, M. (2000). A(2A) receptor dependent and A(2A) receptor independent effects of extracellular adenosine on murine thymocytes in conditions of adenosine deaminase deficiency. Blood *95*, 3859–3867.

Arend, W.P., Palmer, G., and Gabay, C. (2008). IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. Immunol. Rev. *223*, 20–38.

Asgari, E., Friec, G.L., Yamamoto, H., Perucha, E., Sacks, S.S., Köhl, J., Cook, H.T., and Kemper, C. (2013). C3a modulates IL-1β secretion in human monocytes by regulating ATP efflux and subsequent NLRP3 inflammasome activation. Blood.

Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., Lowry, G.V., Jolivet, J.-P., and Wiesner, M.R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. Nat. Nanotechnol. *4*, 634–641.

Augusto, L., Blay, K.L., Auger, G., Blanot, D., and Chaby, R. (2001). Interaction of bacterial lipopolysaccharide with mouse surfactant protein C inserted into lipid vesicles. Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. *281*, L776–L785.

Baekkevold, E.S., Roussigné, M., Yamanaka, T., Johansen, F.-E., Jahnsen, F.L., Amalric, F., Brandtzaeg, P., Erard, M., Haraldsen, G., and Girard, J.-P. (2003). Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. Am. J. Pathol. *163*, 69–79.

Baeuerle, P.A., and Henkel, T. (1994). Function and Activation of NF-kappaB in the Immune System. Annu. Rev. Immunol. *12*, 141–179.

Baldwin, S.A., Beal, P.R., Yao, S.Y.M., King, A.E., Cass, C.E., and Young, J.D. (2004). The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. *447*, 735–743.

Barletta, K.E., Ley, K., and Mehrad, B. (2012). Regulation of Neutrophil Function by Adenosine. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *32*, 856–864.

Bauernfeind, F., Ablasser, A., Bartok, E., Kim, S., Schmid-Burgk, J., Cavlar, T., and Hornung, V. (2011a). Inflammasomes: current understanding and open questions. Cell. Mol. Life Sci. *68*, 765–783.

Bauernfeind, F., Bartok, E., Rieger, A., Franchi, L., Núñez, G., and Hornung, V. (2011b). Cutting Edge: Reactive Oxygen Species Inhibitors Block Priming, but Not Activation, of the NLRP3 Inflammasome. J. Immunol. *187*, 613–617.

Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., et al. (2009). Cutting Edge: NF-κB Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. J. Immunol. *183*, 787–791.

Beers, M.F., and Morrisey, E.E. (2011). The three R's of lung health and disease: repair, remodeling, and regeneration. J. Clin. Invest. *121*, 2065–2073.

Bhabra, G., Sood, A., Fisher, B., Cartwright, L., Saunders, M., Evans, W.H., Surprenant, A., Lopez-Castejon, G., Mann, S., Davis, S.A., et al. (2009). Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier. Nat. Nanotechnol. *4*, 876–883.

Black, R.A., Kronheim, S.R., Cantrell, M., Deeley, M.C., March, C.J., Prickett, K.S., Wignall, J., Conlon, P.J., Cosman, D., and Hopp, T.P. (1988). Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor. J. Biol. Chem. *263*, 9437–9442.

Blackburn, M.R., Vance, C.O., Morschl, E., and Wilson, C.N. (2009). Adenosine receptors and inflammation. Handb. Exp. Pharmacol. 215–269.

Boraschi, D., Lucchesi, D., Hainzl, S., Leitner, M., Maier, E., Mangelberger, D., Oostingh, G.J., Pfaller, T., Pixner, C., and Posselt, G. (2011). IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. Eur Cytokine Netw *22*, 127–147.

Boyden, E.D., and Dietrich, W.F. (2006). Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. Nat. Genet. *38*, 240–244.

Bretscher, P., and Cohn, M. (1970). A theory of self-nonself discrimination. Science *169*, 1042–1049.

Broz, P., von Moltke, J., Jones, J.W., Vance, R.E., and Monack, D.M. (2010). Differential Requirement for Caspase-1 Autoproteolysis in Pathogen-Induced Cell Death and Cytokine Processing. Cell Host Microbe *8*, 471–483.

Broz, P., Ruby, T., Belhocine, K., Bouley, D.M., Kayagaki, N., Dixit, V.M., and Monack, D.M. (2012). Caspase-11 increases susceptibility to Salmonella infection in the absence of caspase-1. Nature *490*, 288–291.

Bruggen, R. van, Köker, M.Y., Jansen, M., Houdt, M. van, Roos, D., Kuijpers, T.W., and Berg, T.K. van den (2010). Human NLRP3 inflammasome activation is Nox1-4 independent. Blood *115*, 5398–5400.

Bufler, P., Azam, T., Gamboni-Robertson, F., Reznikov, L.L., Kumar, S., Dinarello, C.A., and Kim, S.-H. (2002). A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 13723–13728.

Bulek, K., Swaidani, S., Qin, J., Lu, Y., Gulen, M.F., Herjan, T., Min, B., Kastelein, R.A., Aronica, M., Kosz-Vnenchak, M., et al. (2009). The Essential Role of Single Ig IL-1 Receptor-Related Molecule/Toll IL-1R8 in Regulation of Th2 Immune Response. J. Immunol. *182*, 2601–2609.

Burnet, F.M. (Frank M. (1959). The clonal selection theory of acquired immunity (Nashville, Vanderbilt University Press).

Buzea, C. (2007). Pathways of exposure to nanoparticles and associated diseases as suggested by epidemiological, in vivo and in vitro studies.

Cadieux, J.-S., Leclerc, P., St-Onge, M., Dussault, A.-A., Laflamme, C., Picard, S., Ledent, C., Borgeat, P., and Pouliot, M. (2005). Potentiation of neutrophil cyclooxygenase-2 by adenosine: an early anti-inflammatory signal. J. Cell Sci. *118*, 1437–1447.

Cagnina, R.E., Ramos, S.I., Marshall, M.A., Wang, G., Frazier, C.R., and Linden, J. (2009). Adenosine A2B receptors are highly expressed on murine type II alveolar epithelial cells. AJP Lung Cell. Mol. Physiol. *297*, L467–L474.

Cardoso, W.V., and Whitsett, J.A. (2012). Resident Cellular Components of the Lung.

Carta, S., Lavieri, R., and Rubartelli, A. (2013). Different Members of the IL-1 Family Come Out in Different Ways: DAMPs vs. Cytokines? Front. Immunol. *4*.

Cayrol, C., and Girard, J.-P. (2009). The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. Proc. Natl. Acad. Sci. *106*, 9021–9026.

Chang, W., Lin, J., Dong, J., and Li, D. (2013). Pyroptosis: An inflammatory cell death implicates in atherosclerosis. Med. Hypotheses.

Chen, J., Dong, X., Zhao, J., and Tang, G. (2009). In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitioneal injection. J. Appl. Toxicol. JAT *29*, 330–337.

Chen, Y., Corriden, R., Inoue, Y., Yip, L., Hashiguchi, N., Zinkernagel, A., Nizet, V., Insel, P.A., and Junger, W.G. (2006). ATP Release Guides Neutrophil Chemotaxis via P2Y2 and A3 Receptors. Science *314*, 1792–1795.

Chustz, R.T., Nagarkar, D.R., Poposki, J.A., Favoreto, S., Jr, Avila, P.C., Schleimer, R.P., and Kato, A. (2011). Regulation and function of the IL-1 family cytokine IL-1F9 in human bronchial epithelial cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *45*, 145–153.

Compan, V., Baroja-Mazo, A., López-Castejón, G., Gomez, A.I., Martínez, C.M., Angosto, D., Montero, M.T., Herranz, A.S., Bazán, E., Reimers, D., et al. (2012). Cell volume regulation modulates NLRP3 inflammasome activation. Immunity *37*, 487–500.

Conus, S., Perozzo, R., Reinheckel, T., Peters, C., Scapozza, L., Yousefi, S., and Simon, H.-U. (2008). Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. J. Exp. Med. *205*, 685–698.

Cooke, A. (2006). Th17 Cells in Inflammatory Conditions. Rev. Diabet. Stud. *3*, 72–72.

Cornelis, G.R. (2002). The Yersinia Ysc–Yop "Type III" weaponry. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *3*, 742–754.

Corriden, R., and Insel, P.A. (2012). New insights regarding the regulation of chemotaxis by nucleotides, adenosine, and their receptors. Purinergic Signal. *8*, 587–598.

Costelloe, C., Watson, M., Murphy, A., McQuillan, K., Loscher, C., Armstrong, M.E., Garlanda, C., Mantovani, A., O'Neill, L.A.J., Mills, K.H.G., et al. (2008). IL-1F5 mediates anti-inflammatory activity in the brain through induction of IL-4 following interaction with SIGIRR/TIR8. J. Neurochem. *105*, 1960–1969.

Cristalli, G., Costanzi, S., Lambertucci, C., Lupidi, G., Vittori, S., Volpini, R., and Camaioni, E. (2001). Adenosine deaminase: Functional implications and different classes of inhibitors. Med. Res. Rev. *21*, 105–128.

Cronstein, B.N. (2011). Adenosine receptors and fibrosis: a translational review. F1000 Biol. Reports *3*, 21.

Cronstein, B.N., Daguma, L., Nichols, D., Hutchison, A.J., and Williams, M. (1990). The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O2 generation, respectively. J. Clin. Invest. *85*, 1150–1157.

Crouch, E., and Wright, J.R. (2001). Surfactant Proteins a and D and Pulmonary Host Defense. Annu. Rev. Physiol. *63*, 521–554.

Cruz, C.M., Rinna, A., Forman, H.J., Ventura, A.L.M., Persechini, P.M., and Ojcius, D.M. (2007). ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. J. Biol. Chem. *282*, 2871–2879.

Curtin, J.F., Liu, N., Candolfi, M., Xiong, W., Assi, H., Yagiz, K., Edwards, M.R., Michelsen, K.S., Kroeger, K.M., Liu, C., et al. (2009). HMGB1 mediates endogenous TLR2 activation and brain tumor regression. PLoS Med. *6*, e10.

Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell Death: Critical Control Points. Cell *116*, 205–219.

Dinarello, C.A. (1998a). Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. Ann. N. Y. Acad. Sci. *856*, 1–11.

Dinarello, C.A. (1998b). Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. Int. Rev. Immunol. *16*, 457–499.

Dinarello, C.A. (2004). Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. Curr. Opin. Pharmacol. *4*, 378–385.

Dinarello, C.A. (2009). Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. Annu. Rev. Immunol. *27*, 519–550.

Donaldson, S.H., Picher, M., and Boucher, R.C. (2002). 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*, 209–215.

Dostert, C., Pétrilli, V., Bruggen, R.V., Steele, C., Mossman, B.T., and Tschopp, J. (2008). Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica. Science *320*, 674–677.

Douillet, C.D., Robinson, W.P., 3rd, Milano, P.M., Boucher, R.C., and Rich, P.B. (2006). Nucleotides induce IL-6 release from human airway epithelia via P2Y2 and p38 MAPK-dependent pathways. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. *291*, L734–746.

Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nuñez, G., Schnurr, M., et al. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. Nature *464*, 1357–1361.

Ehlers, M.R.W. (2000). CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. Microbes Infect. *2*, 289–294.

Eisenbarth, S.C., Colegio, O.R., O'Connor, W., Sutterwala, F.S., and Flavell, R.A. (2008). Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. Nature *453*, 1122–1126.

Elinav, E., Strowig, T., Kau, A.L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C.A., Booth, C.J., Peaper, D.R., Bertin, J., Eisenbarth, S.C., Gordon, J.I., et al. (2011). NLRP6 Inflammasome Regulates Colonic Microbial Ecology and Risk for Colitis. Cell *145*, 745–757.

Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Ostankovich, M., Sharma, P., et al. (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. Nature *461*, 282–286.

Eltzschig, H.K., Eckle, T., Mager, A., Küper, N., Karcher, C., Weissmüller, T., Boengler, K., Schulz, R., Robson, S.C., and Colgan, S.P. (2006). ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. Circ. Res. *99*, 1100–1108.

Eltzschig, H.K., MacManus, C.F., and Colgan, S.P. (2008). Neutrophils as Sources of Extracellular Nucleotides: Functional Consequences at the Vascular Interface. Trends Cardiovasc. Med. *18*, 103–107.

Eltzschig, H.K., Sitkovsky, M.V., and Robson, S.C. (2012). Purinergic Signaling during Inflammation. N. Engl. J. Med. *367*, 2322–2333.

Erjefält, J.S., Erjefält, I., Sundler, F., and Persson, C.G. (1995). In vivo restitution of airway epithelium. Cell Tissue Res. *281*, 305–316.

Erjefält, J.S., Korsgren, M., Nilsson, M.C., Sundler, F., and Persson, C.G. (1997). Prompt epithelial damage and restitution processes in allergen challenged guinea-pig trachea in vivo. Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol. *27*, 1458–1470.

Esser, A.F. (1991). Big MAC attack: complement proteins cause leaky patches. Immunol. Today *12*, 316–318.

Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.-W., Juliana, C., Solorzano, L., Kang, S., Wu, J., Datta, P., McCormick, M., Huang, L., McDermott, E., et al. (2010). The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to Francisella tularensis. Nat. Immunol. *11*, 385–393.

Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R.M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., and Virgilio, F.D. (2006). The P2X7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release. J. Immunol. *176*, 3877–3883.

Ferreira, A.J., Cemlyn-Jones, J., and Robalo Cordeiro, C. (2013). Nanoparticles, nanotechnology and pulmonary nanotoxicology. Rev. Port. Pneumol. *19*, 28–37.

Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2006). Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. Cell. Microbiol. *8*, 1812–1825.

Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T.-D., Ozören, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., et al. (2006). Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. Nat. Immunol. *7*, 576–582.

Franzke, C.-W., Cobzaru, C., Triantafyllopoulou, A., Löffek, S., Horiuchi, K., Threadgill, D.W., Kurz, T., van Rooijen, N., Bruckner-Tuderman, L., and Blobel, C.P. (2012). Epidermal ADAM17 maintains the skin barrier by regulating EGFR ligand-dependent terminal keratinocyte differentiation. J. Exp. Med. *209*, 1105–1119.

Fraser, I.P., Koziel, H., and Ezekowitz, R.A. (1998). The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. Semin. Immunol. *10*, 363–372.

Fredholm, B.B. (1997). Purines and neutrophil leukocytes. Gen. Pharmacol. Vasc. Syst. *28*, 345–350.

Fredholm, B.B., Zhang, Y., and van der Ploeg, I. (1996). Adenosine A2A receptors mediate the inhibitory effect of adenosine on formyl-Met-Leu-Phe-stimulated respiratory burst in neutrophil leucocytes. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *354*, 262–267.

Fukuno, N., Matsui, H., Kanda, Y., Suzuki, O., Matsumoto, K., Sasaki, K., Kobayashi, T., and Tamura, S. (2011). TGF-β-activated kinase 1 mediates mechanical stress-induced IL-6 expression in osteoblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. *408*, 202–207.

Gadjeva, M., Takahashi, K., and Thiel, S. (2004). Mannan-binding lectin—a soluble pattern recognition molecule. Mol. Immunol. *41*, 113–121.

Galli, S.J., Borregaard, N., and Wynn, T.A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. Nat. Immunol. *12*, 1035–1044.

Gangloff, M. (2012). Different dimerisation mode for TLR4 upon endosomal acidification? Trends Biochem. Sci. *37*, 92–98.

Garabrant, D.H., Fine, L.J., Oliver, C., Bernstein, L., and Peters, J.M. (1987). Abnormalities of pulmonary function and pleural disease among titanium metal production workers. Scand. J. Work. Environ. Health *13*, 47–51.

Gasse, P., Mary, C., Guenon, I., Noulin, N., Charron, S., Schnyder-Candrian, S., Schnyder, B., Akira, S., Quesniaux, V.F.J., Lagente, V., et al. (2007). IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. J. Clin. Invest.

Gerard, C., and Gerard, N.P. (1994). C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. Annu. Rev. Immunol. *12*, 775–808.

Gessi, S., Varani, K., Merighi, S., Cattabriga, E., Iannotta, V., Leung, E., Baraldi, P.G., and Borea, P.A. (2002). A(3) adenosine receptors in human neutrophils and promyelocytic HL60 cells: a pharmacological and biochemical study. Mol. Pharmacol. *61*, 415–424.

Ghayur, T., Banerjee, S., Hugunin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., Quintal, L., Sekut, L., Talanian, R., Paskind, M., et al. (1997). Caspase-1 processes IFN-γ-inducing factor and regulates LPS-induced IFN- γ production. Publ. Online 10 April 1997 Doi101038386619a0 *386*, 619–623.

Gilmour, M.I., Daniels, M., McCrillis, R.C., Winsett, D., and Selgrade, M.K. (2001). Air pollutant-enhanced respiratory disease in experimental animals. Environ. Health Perspect. *109 Suppl 4*, 619–622.

Gollwitzer, E.S., and Marsland, B.J. (2013). Microbiota abnormalities in inflammatory airway diseases — Potential for therapy. Pharmacol. Ther.

Gombault, A., Baron, L., and Couillin, I. (2013). ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. Front. Immunol. *3*.

Gong, Y.-N., Wang, X., Wang, J., Yang, Z., Li, S., Yang, J., Liu, L., Lei, X., and Shao, F. (2010). Chemical probing reveals insights into the signaling mechanism of inflammasome activation. Cell Res. *20*, 1289–1305.

Gordon, S., and Martinez, F.O. (2010). Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. Immunity *32*, 593–604.

Gray, J.H., Owen, R.P., and Giacomini, K.M. (2004). The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. *447*, 728–734.

Green, D.R. (2005). Apoptotic Pathways: Ten Minutes to Dead. Cell *121*, 671–674.

Gross, O., Poeck, H., Bscheider, M., Dostert, C., Hannesschläger, N., Endres, S., Hartmann, G., Tardivel, A., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., et al. (2009). Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. Nature *459*, 433–436.

Gudbjartsson, D.F., Bjornsdottir, U.S., Halapi, E., Helgadottir, A., Sulem, P., Jonsdottir, G.M., Thorleifsson, G., Helgadottir, H., Steinthorsdottir, V., Stefansson, H., et al. (2009). Sequence variants

affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. Nat. Genet. *41*, 342–347.

Hackenberg, S., Friehs, G., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Scherzed, A., Burghartz, M., Hagen, R., and Kleinsasser, N. (2010). Intracellular distribution, geno- and cytotoxic effects of nanosized titanium dioxide particles in the anatase crystal phase on human nasal mucosa cells. Toxicol. Lett. *195*, 9–14.

Halim, T.Y.F., Krauss, R.H., Sun, A.C., and Takei, F. (2012). Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. Immunity *36*, 451–463.

Halle, A., Hornung, V., Petzold, G.C., Stewart, C.R., Monks, B.G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Moore, K.J., and Golenbock, D.T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-β. Nat. Immunol. *9*, 857–865.

Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2011). Dendritic cells and airway epithelial cells at the interface between innate and adaptive immune responses. Allergy *66*, 579–587.

Haneklaus, M., O'Neill, L.A., and Coll, R.C. (2013). Modulatory mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome in inflammation: recent developments. Curr. Opin. Immunol. *25*, 40–45.

Hansen, M., Boitano, S., Dirksen, E.R., and Sanderson, M.J. (1993). Intercellular calcium signaling induced by extracellular adenosine 5'-triphosphate and mechanical stimulation in airway epithelial cells. J. Cell Sci. *106 (Pt 4)*, 995–1004.

Harden, T.K., Sesma, J.I., Fricks, I.P., and Lazarowski, E.R. (2010). Signalling and pharmacological properties of the P2Y14 receptor: The P2Y14 receptor. Acta Physiol. *199*, 149–160.

Harris, J., Hartman, M., Roche, C., Zeng, S.G., O'Shea, A., Sharp, F.A., Lambe, E.M., Creagh, E.M., Golenbock, D.T., Tschopp, J., et al. (2011). Autophagy Controls IL-1 Secretion by Targeting Pro-IL-1 for Degradation. J. Biol. Chem. *286*, 9587–9597.

Hasan, U., Chaffois, C., Gaillard, C., Saulnier, V., Merck, E., Tancredi, S., Guiet, C., Brière, F., Vlach, J., Lebecque, S., et al. (2005). Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *174*, 2942–2950.

Haskó, G., and Cronstein, B. (2013). Regulation of inflammation by adenosine. Front. Immunol. *4*, 85.

Haskó, G., and Pacher, P. (2012). Regulation of Macrophage Function by Adenosine. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *32*, 865–869.

Hayakawa, H., Hayakawa, M., Kume, A., and Tominaga, S. (2007). Soluble ST2 Blocks Interleukin-33 Signaling in Allergic Airway Inflammation. J. Biol. Chem. *282*, 26369–26380.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. Science *303*, 1526–1529.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature *408*, 740–745.

Henao-Mejia, J., Elinav, E., Jin, C., Hao, L., Mehal, W.Z., Strowig, T., Thaiss, C.A., Kau, A.L., Eisenbarth, S.C., Jurczak, M.J., et al. (2012). Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. Nature.

Hernández-Ortiz, M., Acosta-Torres, L.S., Hernández-Padrón, G., Mendieta, A.I., Bernal, R., Cruz-Vázquez, C., and Castaño, V.M. (2012). Biocompatibility of crystalline opal nanoparticles. Biomed. Eng. OnLine *11*, 78.

Hise, A.G., Tomalka, J., Ganesan, S., Patel, K., Hall, B.A., Brown, G.D., and Fitzgerald, K.A. (2009). An Essential Role for the NLRP3 Inflammasome in Host Defense against the Human Fungal Pathogen Candida albicans. Cell Host Microbe *5*, 487–497.

Van der Hoeven, D., Wan, T.C., Gizewski, E.T., Kreckler, L.M., Maas, J.E., Van Orman, J., Ravid, K., and Auchampach, J.A. (2011). A Role for the Low-Affinity A2B Adenosine Receptor in Regulating Superoxide Generation by Murine Neutrophils. J. Pharmacol. Exp. Ther. *338*, 1004–1012.

Homolya, L., Steinberg, T.H., and Boucher, R.C. (2000). Cell to cell communication in response to mechanical stress via bilateral release of ATP and UTP in polarized epithelia. J. Cell Biol. *150*, 1349–1360.

Honda, K., Takaoka, A., and Taniguchi, T. (2006). Type I Inteferon Gene Induction by the Interferon Regulatory Factor Family of Transcription Factors. Immunity *25*, 349–360.

Hong, K.U., Reynolds, S.D., Watkins, S., Fuchs, E., and Stripp, B.R. (2004). In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. *286*, L643–649.

Hook, V., Funkelstein, L., Wegrzyn, J., Bark, S., Kindy, M., and Hook, G. (2012). Cysteine Cathepsins in the secretory vesicle produce active peptides: Cathepsin L generates peptide neurotransmitters and cathepsin B produces beta-amyloid of Alzheimer's disease. Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics *1824*, 89–104.

Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A., and Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. Nat. Immunol. *9*, 847–856.

Hsu, L.-C., Ali, S.R., McGillivray, S., Tseng, P.-H., Mariathasan, S., Humke, E.W., Eckmann, L., Powell, J.J., Nizet, V., Dixit, V.M., et al. (2008). A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to Bacillus anthracis infection and muramyl dipeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 7803–7808.

Huaux, F. (2007). New developments in the understanding of immunology in silicosis. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. *7*, 168–173.

Humphreys, N.E., Xu, D., Hepworth, M.R., Liew, F.Y., and Grencis, R.K. (2008). IL-33, a Potent Inducer of Adaptive Immunity to Intestinal Nematodes. J. Immunol. *180*, 2443–2449.

Hussain, S., Thomassen, L.C.J., Ferecatu, I., Borot, M.-C., Andreau, K., Martens, J.A., Fleury, J., Baeza-Squiban, A., Marano, F., and Boland, S. (2010). Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. Part. Fibre Toxicol. *7*, 10.

Hvid, M., Vestergaard, C., Kemp, K., Christensen, G. B., Deleuran, B., and Deleuran, M. (2011). IL-25 in atopic dermatitis: A possible link between inflammation and skin barrier dysfunction. J. Invest. Dermatol. *131*, 150–157.

Ichinohe, T., Lee, H.K., Ogura, Y., Flavell, R., and Iwasaki, A. (2009). Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. J. Exp. Med. *206*, 79–87.

Idzko, M., Hammad, H., van Nimwegen, M., Kool, M., Willart, M.A.M., Muskens, F., Hoogsteden, H.C., Luttmann, W., Ferrari, D., Di Virgilio, F., et al. (2007). Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. Nat. Med. *13*, 913–919.

Ikutani, M., Yanagibashi, T., Ogasawara, M., Tsuneyama, K., Yamamoto, S., Hattori, Y., Kouro, T., Itakura, A., Nagai, Y., Takaki, S., et al. (2012). Identification of Innate IL-5–Producing Cells and Their Role in Lung Eosinophil Regulation and Antitumor Immunity. J. Immunol. *188*, 703–713.

Iyer, S.S., Pulskens, W.P., Sadler, J.J., Butter, L.M., Teske, G.J., Ulland, T.K., Eisenbarth, S.C., Florquin, S., Flavell, R.A., Leemans, J.C., et al. (2009). Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 20388–20393.

Jandl, J.H. (1987). Blood: Textbook of Hematology (Little, Brown).

Janeway, C.A. (1989). Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *54*, 1–13.

Janeway, C.A., Jr, and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. Annu. Rev. Immunol. *20*, 197–216.

Janeway Jr., C.A. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. Immunol. Today *13*, 11–16.

Jarvis, M.F., and Khakh, B.S. (2009). ATP-gated P2X cation-channels. Neuropharmacology *56*, 208–215.

Jin, T., Perry, A., Jiang, J., Smith, P., Curry, J.A., Unterholzner, L., Jiang, Z., Horvath, G., Rathinam, V.A., Johnstone, R.W., et al. (2012). Structures of the HIN Domain:DNA Complexes Reveal Ligand Binding and Activation Mechanisms of the AIM2 Inflammasome and IFI16 Receptor. Immunity *36*, 561–571.

Juliana, C., Fernandes-Alnemri, T., Kang, S., Farias, A., Qin, F., and Alnemri, E.S. (2012). Non-transcriptional Priming and Deubiquitination Regulate NLRP3 Inflammasome Activation. J. Biol. Chem. *287*, 36617–36622.

Junger, W.G. (2011). Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. Nat. Rev. Immunol. *11*, 201–212.

Kanneganti, T.-D., Özören, N., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J.-H., Franchi, L., Whitfield, J., Barchet, W., Colonna, M., Vandenabeele, P., et al. (2006). Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. Nature *440*, 233–236.

Kanneganti, T.-D., Lamkanfi, M., and Núñez, G. (2007). Intracellular NOD-like Receptors in Host Defense and Disease. Immunity *27*, 549–559.

Kao, C.-Y., Chen, Y., Thai, P., Wachi, S., Huang, F., Kim, C., Harper, R.W., and Wu, R. (2004). IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *173*, 3482–3491.

Kato, Z., Jee, J., Shikano, H., Mishima, M., Ohki, I., Ohnishi, H., Li, A., Hashimoto, K., Matsukuma, E., Omoya, K., et al. (2003). The structure and binding mode of interleukin-18. Nat. Struct. Mol. Biol. *10*, 966–971.

Kawai, T., and Akira, S. (2006). Innate immune recognition of viral infection. Nat. Immunol. *7*, 131–137.

Kearley, J., Buckland, K.F., Mathie, S.A., and Lloyd, C.M. (2009). Resolution of Allergic Inflammation and Airway Hyperreactivity Is Dependent upon Disruption of the T1/ST2–IL-33 Pathway. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *179*, 772–781.

Khakh, B.S., and North, R.A. (2006). P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. Nature *442*, 527–532.

Kim, S., Bauernfeind, F., Ablasser, A., Hartmann, G., Fitzgerald, K.A., Latz, E., and Hornung, V. (2010). Listeria monocytogenes is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome. Eur. J. Immunol. *40*, 1545–1551.

Kim, W.I., Ryu, H.J., Kim, J.-E., Seo, C.H., Lee, B.C., Choi, I.-G., and Kang, T.-C. (2013). Differential nuclear factor-kappa B phosphorylation induced by lipopolysaccharide in the hippocampus of P2X7 receptor knockout mouse. Neurol. Res. *35*, 369–381.

Kindt, T.J., Goldsby, Osborne, B.A., and Kuby, J. (2008). Immunologie: le cours de Janis Kuby : avec questions de révision (Paris: Dunod).

Kishimoto, T., Akira, S., and Taga, T. (1992). Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. Science *258*, 593–597.

Klein Wolterink, R.G.J., Kleinjan, A., van Nimwegen, M., Bergen, I., de Bruijn, M., Levani, Y., and Hendriks, R.W. (2012). Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. Eur. J. Immunol. *42*, 1106–1116.

Kofoed, E.M., and Vance, R.E. (2011). Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. Nature *477*, 592–595.

Köhl, J. (2006). The role of complement in danger sensing and transmission. Immunol. Res. *34*, 157–176.

Kojima, H., Takeuchi, M., Ohta, T., Nishida, Y., Arai, N., Ikeda, M., Ikegami, H., and Kurimoto, M. (1998). Interleukin-18 Activates the IRAK-TRAF6 Pathway in Mouse EL-4 Cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *244*, 183–186.

Kouzaki, H., Iijima, K., Kobayashi, T., O'Grady, S.M., and Kita, H. (2011). The Danger Signal, Extracellular ATP, Is a Sensor for an Airborne Allergen and Triggers IL-33 Release and Innate Th2-Type Responses. J. Immunol. *186*, 4375–4387.

Kroemer, G., and Jäättelä, M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. Nat. Rev. Cancer *5*, 886–897.

Kumar, S., Hanning, C.R., Brigham-Burke, M.R., Rieman, D.J., Lehr, R., Khandekar, S., Kirkpatrick, R.B., Scott, G.F., Lee, J.C., Lynch, F.J., et al. (2002). Interleukin-1F7B (IL-1H4/IL-1F7) is processed by caspase-1 and mature IL-1F7B binds to the IL-18 receptor but does not induce IFN-gamma production. Cytokine *18*, 61–71.

Kurowska-Stolarska, M., Stolarski, B., Kewin, P., Murphy, G., Corrigan, C.J., Ying, S., Pitman, N., Mirchandani, A., Rana, B., van Rooijen, N., et al. (2009). IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *183*, 6469–6477.

Lafferty, K.J., and Cunningham, A.J. (1975). A new analysis of allogeneic interactions. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. *53*, 27–42.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2009). Biology of Lung Dendritic Cells at the Origin of Asthma. Immunity *31*, 412–424.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2012). The airway epithelium in asthma. Nat. Med. *18*, 684–692.

Lamkanfi, M., and Dixit, V.M. (2012). Inflammasomes and Their Roles in Health and Disease. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *28*, 137–161.

Landolt, H.-P., Rétey, J.V., and Adam, M. (2012). Reduced Neurobehavioral Impairment from Sleep Deprivation in Older Adults: Contribution of Adenosinergic Mechanisms. Front. Neurol. *3*.

Lanier, L.L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. Nat. Immunol. *9*, 495–502.

Lazarowski, E.R., Boucher, R.C., and Harden, T.K. (2003). Mechanisms of Release of Nucleotides and Integration of Their Action as P2X- and P2Y-Receptor Activating Molecules. Mol. Pharmacol. *64*, 785–795.

Lee, C.C., Avalos, A.M., and Ploegh, H.L. (2012a). Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. Nat. Rev. Immunol.

Lee, G.-S., Subramanian, N., Kim, A.I., Aksentijevich, I., Goldbach-Mansky, R., Sacks, D.B., Germain, R.N., Kastner, D.L., and Chae, J.J. (2012b). The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca2+ and cAMP. Nature *492*, 123–127.

Lefrançais, E., and Cayrol, C. (2012). Mechanisms of IL-33 processing and secretion: differences and similarities between IL-1 family members. Eur. Cytokine Netw. *23*, 120–127.

Lefrançais, E., Roga, S., Gautier, V., Gonzalez-de-Peredo, A., Monsarrat, B., Girard, J.-P., and Cayrol, C. (2012). IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. Proc. Natl. Acad. Sci. *109*, 1673–1678.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell *86*, 973–983.

Levine, B., and Deretic, V. (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. Nat. Rev. Immunol. *7*, 767–777.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. Cell *91*, 479–489.

Liew, F. Y., Pitman, N. I., and McInnes, I. B. (2010). Disease-associated functions of IL-33: The new kid in the IL-1 family. Nat. Rewiews Immunol. *10*, 103–110.

Los, M., Mozoluk, M., Ferrari, D., Stepczynska, A., Stroh, C., Renz, A., Herceg, Z., Wang, Z.-Q., and Schulze-Osthoff, K. (2002). Activation and Caspase-mediated Inhibition of PARP: A Molecular Switch between Fibroblast Necrosis and Apoptosis in Death Receptor Signaling. Mol. Biol. Cell *13*, 978–988.

Lotze, M.T., and Tracey, K.J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. Nat. Rev. Immunol. *5*, 331–342.

Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A., and Flavell, R.A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 5598–5603.

Lüthi, A.U., Cullen, S.P., McNeela, E.A., Duriez, P.J., Afonina, I.S., Sheridan, C., Brumatti, G., Taylor, R.C., Kersse, K., Vandenabeele, P., et al. (2009). Suppression of Interleukin-33 Bioactivity through Proteolysis by Apoptotic Caspases. Immunity *31*, 84–98.

Magombedze, G., Reddy, P.B.J., Eda, S., and Ganusov, V.V. (2013). Cellular and population plasticity of helper CD4+ T cell responses. Front. Physiol. *4*.

Marano (2007). A-t-on raison de considérer que les particules atmosphériques fines et ultrafines sont dangereuses pour la santé? In Pollution atmosphérique: particules ultrafines et santé, (Institut de veille sanitaire), pp. 4–7.

Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D.M., Vucic, D., French, D.M., Lee, W.P., Roose-Girma, M., Erickson, S., and Dixit, V.M. (2004). Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. Nature *430*, 213–218.

Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W.P., Weinrauch, Y., Monack, D.M., and Dixit, V.M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. Nature *440*, 228–232.

Marsland, B.J. (2013). The Airway Microbiome and Disease. CHEST J. *144*, 632.

Martinez, F.O., Helming, L., and Gordon, S. (2009). Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. Annu. Rev. Immunol. *27*, 451–483.

Martinon, F. (2012). Dangerous Liaisons: Mitochondrial DNA Meets the NLRP3 Inflammasome. Immunity *36*, 313–315.

Martinon, F., and Tschopp, J. (2005). NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. Trends Immunol. *26*, 447–454.

Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. Mol. Cell *10*, 417–426.

Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., and Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. Nature *440*, 237–241.

Masters, S.L., Dunne, A., Subramanian, S.L., Hull, R.L., Tannahill, G.M., Sharp, F.A., Becker, C., Franchi, L., Yoshihara, E., Chen, Z., et al. (2010). Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1β in type 2 diabetes. Nat. Immunol. *11*, 897–904.

Matsushita, M., and Fujita, T. (1992). Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. J. Exp. Med. *176*, 1497–1502.

Matzinger, P. (1994). Tolerance, Danger, and the Extended Family. Annu. Rev. Immunol. *12*, 991–1045.

Matzinger, P. (2002). The Danger Model: A Renewed Sense of Self. Science *296*, 301–305.

McGuire, K.A., Barlan, A.U., Griffin, T.M., and Wiethoff, C.M. (2011). Adenovirus Type 5 Rupture of Lysosomes Leads to Cathepsin B-Dependent Mitochondrial Stress and Production of Reactive Oxygen Species. J. Virol. *85*, 10806–10813.

McMahon, G.A., Garfinkel, S., Prudovsky, I., Hu, X., and Maciag, T. (1997). Intracellular Precursor Interleukin (IL)-1α, but Not Mature IL-1α, Is Able to Regulate Human Endothelial Cell Migration in Vitro. J. Biol. Chem. *272*, 28202–28205.

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. Nature *454*, 428–435.

Medzhitov, R., and Janeway Jr, C.A. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. Curr. Opin. Immunol. *9*, 4–9.

Meng, X., Leman, M., and Xiang, Y. (2007). Variola virus IL-18 binding protein interacts with three human IL-18 residues that are part of a binding site for human IL-18 receptor alpha subunit. Virology *358*, 211–220.

Meylan, E., Tschopp, J., and Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. Nature *442*, 39–44.

Miao, E.A., Alpuche-Aranda, C.M., Dors, M., Clark, A.E., Bader, M.W., Miller, S.I., and Aderem, A. (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1β via Ipaf. Nat. Immunol. *7*, 569–575.

Miao, E.A., Mao, D.P., Yudkovsky, N., Bonneau, R., Lorang, C.G., Warren, S.E., Leaf, I.A., and Aderem, A. (2010a). Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. Proc. Natl. Acad. Sci. *107*, 3076–3080.

Miao, E.A., Leaf, I.A., Treuting, P.M., Mao, D.P., Dors, M., Sarkar, A., Warren, S.E., Wewers, M.D., and Aderem, A. (2010b). Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. Nat. Immunol. *11*, 1136–1142.

Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Lee, H., Zou, J., Saitoh, T., and Akira, S. (2013). Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. Nat. Immunol. *14*, 454–460.

Mishra, A., Chintagari, N.R., Guo, Y., Weng, T., Su, L., and Liu, L. (2011). Purinergic P2X7 receptor regulates lung surfactant secretion in a paracrine manner. J. Cell Sci. *124*, 657–668.

Mizumoto, N., Kumamoto, T., Robson, S.C., Sévigny, J., Matsue, H., Enjyoji, K., and Takashima, A. (2002). CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. Nat. Med. *8*, 358–365.

Moltke, J. von, Trinidad, N.J., Moayeri, M., Kintzer, A.F., Wang, S.B., Rooijen, N. van, Brown, C.R., Krantz, B.A., Leppla, S.H., Gronert, K., et al. (2012). Rapid induction of inflammatory lipid mediators by the inflammasome in vivo. Nature *490*, 107–111.

Von Moltke, J., Ayres, J.S., Kofoed, E.M., Chavarría-Smith, J., and Vance, R.E. (2013). Recognition of Bacteria by Inflammasomes. Annu. Rev. Immunol. *31*, 73–106.

Monticelli, Laurel A., Sonnenberg, Gregory F., Abt, Michael C., Alenghat, Theresa, Ziegler, Carly G. K., Doering, Travis A., Angelosanto, Jill M., Laidlaw, Brian J., Yang, Cliff Y., Sathaliyawala, Taheri, et al. (2011). Innate lymphoid cells promote lung tissue homeostasis following acute influenza virus infection. Nat. Immunol. 1045–1054.

Montminy, S.W., Khan, N., McGrath, S., Walkowicz, M.J., Sharp, F., Conlon, J.E., Fukase, K., Kusumoto, S., Sweet, C., Miyake, K., et al. (2006). Virulence factors of Yersinia pestis are overcome by a strong lipopolysaccharide response. Nat. Immunol. *7*, 1066–1073.

Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J., Ohtani, M., Fujii, H., and Koyasu, S. (2009). Innate production of TH2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit+Sca-1+ lymphoid cells. Nature *463*, 540–544.

Moser, G.H., Schrader, J., and Deussen, A. (1989). Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. Am. J. Physiol. - Cell Physiol. *256*, C799–C806.

Moussion, C., Ortega, N., and Girard, J.-P. (2008). The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel “alarmin”? PloS One *3*, e3331.

Muller, J., Huaux, F., Moreau, N., Misson, P., Heilier, J.-F., Delos, M., Arras, M., Fonseca, A., Nagy, J.B., and Lison, D. (2005). Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. Toxicol. Appl. Pharmacol. *207*, 221–231.

Müller, M., Eugster, H.P., Le Hir, M., Shakhov, A., Di Padova, F., Maurer, C., Quesniaux, V.F., and Ryffel, B. (1996). Correction or transfer of immunodeficiency due to TNF-LT alpha deletion by bone marrow transplantation. Mol. Med. Camb. Mass *2*, 247–255.

Muñoz-Planillo, R., Franchi, L., Miller, L.S., and Núñez, G. (2009). A Critical Role for Hemolysins and Bacterial Lipoproteins in Staphylococcus aureus-Induced Activation of the Nlrp3 Inflammasome. J. Immunol. *183*, 3942–3948.

Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B.L., Rajendiran, T.M., and Núñez, G. (2013). K+ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. Immunity *38*, 1142–1153.

Murakami, T., Ockinger, J., Yu, J., Byles, V., McColl, A., Hofer, A.M., and Horng, T. (2012). Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 11282–11287.

Murphy, K.M., Travers, P., and Walport, M. (2008). Janeway’s Immunobiology (USA: Garland Science).

Muruve, D.A., Pétrilli, V., Zaiss, A.K., White, L.R., Clark, S.A., Ross, P.J., Parks, R.J., and Tschopp, J. (2008). The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. Nature *452*, 103–107.

Musante, L., Zegarra-Moran, O., Montaldo, P.G., Ponzoni, M., and Galietta, L.J. (1999). Autocrine regulation of volume-sensitive anion channels in airway epithelial cells by adenosine. J. Biol. Chem. *274*, 11701–11707.

Nakahira, K., Haspel, J.A., Rathinam, V.A.K., Lee, S.-J., Dolinay, T., Lam, H.C., Englert, J.A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H.P., et al. (2010). Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. Nat. Immunol. *12*, 222–230.

Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. Nature *420*, 846–852.

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

Nicklin, M.J.., Barton, J.L., Nguyen, M., FitzGerald, M.G., Duff, G.W., and Kornman, K. (2002). A Sequence-Based Map of the Nine Genes of the Human Interleukin-1 Cluster. Genomics *79*, 718–725.

Nogee, L.M. (2004). Alterations in SP-B and SP-C Expression in Neonatal Lung Disease. Annu. Rev. Physiol. *66*, 601–623.

Nold, M.F., Nold-Petry, C.A., Zepp, J.A., Palmer, B.E., Bufler, P., and Dinarello, C.A. (2010). IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. Nat. Immunol. *11*, 1014–1022.

Nordenhall, C., Pourazar, J., Blomberg, A., Levin, J.O., Sandstrom, T., and Adelroth, E. (2000). Airway inflammation following exposure to diesel exhaust: a study of time kinetics using induced sputum. Eur. Respir. J. *15*, 1046–1051.

Oberdörster, G., Oberdörster, E., and Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ. Health Perspect. *113*, 823–839.

Oboki, K., Ohno, T., Kajiwara, N., Saito, H., and Nakae, S. (2010a). IL-33 and IL-33 Receptors in Host Defense and Diseases. Allergol. Int. *59*, 143–160.

Oboki, K., Ohno, T., Kajiwara, N., Arae, K., Morita, H., Ishii, A., Nambu, A., Abe, T., Kiyonari, H., Matsumoto, K., et al. (2010b). IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. *107*, 18581–18586.

Okada, S.F., Nicholas, R.A., Kreda, S.M., Lazarowski, E.R., and Boucher, R.C. (2006). Physiological regulation of ATP release at the apical surface of human airway epithelia. J. Biol. Chem. *281*, 22992–23002.

Oliveira-Nascimento, L., Massari, P., and Wetzler, L.M. (2012). The Role of TLR2 in Infection and Immunity. Front. Immunol. *3*, 79.

Oshikawa, K., Kuroiwa, K., Tago, K., Iwahana, H., Yanagisawa, K., Ohno, S., Tominaga, S.I., and Sugiyama, Y. (2001). Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *164*, 277–281.

Park, E.-J., Yi, J., Chung, K.-H., Ryu, D.-Y., Choi, J., and Park, K. (2008). Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. Toxicol. Lett. *180*, 222–229.

Patel, A.S., Reigada, D., Mitchell, C.H., Bates, S.R., Margulies, S.S., and Koval, M. (2005). Paracrine stimulation of surfactant secretion by extracellular ATP in response to mechanical deformation. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. *289*, L489–496.

Paul-Clark, M.J., McMaster, S.K., Sorrentino, R., Sriskandan, S., Bailey, L.K., Moreno, L., Ryffel, B., Quesniaux, V.F., and Mitchell, J.A. (2009). Toll-like Receptor 2 Is Essential for the Sensing of Oxidants during Inflammation. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *179*, 299–306.

Pelegrin, P., and Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1β release by the ATP-gated P2X7 receptor. EMBO J. *25*, 5071–5082.

Perregaux, D., and Gabel, C.A. (1994). 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*, 15195–15203.

Pétrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., and Tschopp, J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. Cell Death Differ. *14*, 1583–1589.

Piccini, A., Carta, S., Tassi, S., Lasiglié, D., Fossati, G., and Rubartelli, A. (2008). ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 8067–8072.

Pober, J.S., and Sessa, W.C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. Nat. Rev. Immunol. *7*, 803–815.

Pouliot, M., Fiset, M.-É., Massé, M., Naccache, P.H., and Borgeat, P. (2002). Adenosine Up-Regulates Cyclooxygenase-2 in Human Granulocytes: Impact on the Balance of Eicosanoid Generation. J. Immunol. *169*, 5279–5286.

Préfontaine, D., Lajoie-Kadoch, S., Foley, S., Audusseau, S., Olivenstein, R., Halayko, A.J., Lemière, C., Martin, J.G., and Hamid, Q. (2009). Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *183*, 5094–5103.

Price, A.E., Liang, H.-E., Sullivan, B.M., Reinhardt, R.L., Eisley, C.J., Erle, D.J., and Locksley, R.M. (2010). Systemically dispersed innate IL-13–expressing cells in type 2 immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. *107*, 11489–11494.

Proost, I.D., Pintelon, I., Wilkinson, W.J., Goethals, S., Brouns, I., Nassauw, L.V., Riccardi, D., Timmermans, J.-P., Kemp, P.J., and Adriaensen, D. (2009). Purinergic signaling in the pulmonary neuroepithelial body microenvironment unraveled by live cell imaging. FASEB J. *23*, 1153–1160.

Proud, D., and Leigh, R. (2011). Epithelial cells and airway diseases. Immunol. Rev. *242*, 186–204.

Proud, D., Sanders, S.P., and Wiehler, S. (2004). Human rhinovirus infection induces airway epithelial cell production of human beta-defensin 2 both in vitro and in vivo. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *172*, 4637–4645.

Pushparaj, P.N., Tay, H.K., H'ng, S.C., Pitman, N., Xu, D., McKenzie, A., Liew, F.Y., and Melendez, A.J. (2009). The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock. Proc. Natl. Acad. Sci. *106*, 9773–9778.

Qu, Y., Misaghi, S., Newton, K., Gilmour, L.L., Louie, S., Cupp, J.E., Dubyak, G.R., Hackos, D., and Dixit, V.M. (2011). Pannexin-1 Is Required for ATP Release during Apoptosis but Not for Inflammasome Activation. J. Immunol. *186*, 6553–6561.

Rabolli, V., Thomassen, L.C.J., Princen, C., Napierska, D., Gonzalez, L., Kirsch-Volders, M., Hoet, P.H., Huaux, F., Kirschhock, C.E.A., Martens, J.A., et al. (2010). Influence of size, surface area and microporosity on the in vitro cytotoxic activity of amorphous silica nanoparticles in different cell types. Nanotoxicology *4*, 307–318.

Raghunathan, V.K., Devey, M., Hawkins, S., Hails, L., Davis, S.A., Mann, S., Chang, I.T., Ingham, E., Malhas, A., Vaux, D.J., et al. (2013). Influence of particle size and reactive oxygen species on cobalt chrome nanoparticle-mediated genotoxicity. Biomaterials *34*, 3559–3570.

Ramadas, R.A., Ewart, S.L., Iwakura, Y., Medoff, B.D., and LeVine, A.M. (2012). IL-36α exerts pro-inflammatory effects in the lungs of mice. PloS One *7*, e45784.

Ramsingh, R., Grygorczyk, A., Solecki, A., Cherkaoui, L.S., Berthiaume, Y., and Grygorczyk, R. (2011). Cell deformation at the air-liquid interface induces Ca2+-dependent ATP release from lung epithelial cells. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. *300*, L587–595.

Rankin, A.L., Mumm, J.B., Murphy, E., Turner, S., Yu, N., McClanahan, T.K., Bourne, P.A., Pierce, R.H., Kastelein, R., and Pflanz, S. (2010). IL-33 induces IL-13-dependent cutaneous fibrosis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *184*, 1526–1535.

Ransford, G.A., Fregien, N., Qiu, F., Dahl, G., Conner, G.E., and Salathe, M. (2009). Pannexin 1 contributes to ATP release in airway epithelia. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *41*, 525–534.

Ratner, A.J., Bryan, R., Weber, A., Nguyen, S., Barnes, D., Pitt, A., Gelber, S., Cheung, A., and Prince, A. (2001). Cystic fibrosis pathogens activate Ca2+-dependent mitogen-activated protein kinase signaling pathways in airway epithelial cells. J. Biol. Chem. *276*, 19267–19275.

Ravichandran, K.S. (2011). Beginnings of a Good Apoptotic Meal: The Find-Me and Eat-Me Signaling Pathways. Immunity *35*, 445–455.

Rawlins, E.L. (2011). The building blocks of mammalian lung development. Dev. Dyn. *240*, 463–476.

Rawlins, E.L., Okubo, T., Xue, Y., Brass, D.M., Auten, R.L., Hasegawa, H., Wang, F., and Hogan, B.L.M. (2009). The Role of Scgb1a1+ Clara Cells in the Long-Term Maintenance and Repair of Lung Airway, but Not Alveolar, Epithelium. Cell Stem Cell *4*, 525–534.

Reisetter, A.C., Stebounova, L.V., Baltrusaitis, J., Powers, L., Gupta, A., Grassian, V.H., and Monick, M.M. (2011). Induction of Inflammasome-dependent Pyroptosis by Carbon Black Nanoparticles. J. Biol. Chem. *286*, 21844–21852.

Reynolds, S.D., Hong, K.U., Giangreco, A., Mango, G.W., Guron, C., Morimoto, Y., and Stripp, B.R. (2000). Conditional Clara cell ablation reveals a self-renewing progenitor function of pulmonary neuroendocrine cells. Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. *278*, L1256–L1263.

Rincón, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E., and Flavell, R.A. (1997). Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. J. Exp. Med. *185*, 461–469.

Riteau, N., Gasse, P., Fauconnier, L., Gombault, A., Couegnat, M., Fick, L., Kanellopoulos, J., Quesniaux, V.F.J., Marchand-Adam, S., Crestani, B., et al. (2010). Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *182*, 774–783.

Riteau, N., Baron, L., Villeret, B., Guillou, N., Savigny, F., Ryffel, B., Rassendren, F., Le Bert, M., Gombault, A., and Couillin, I. (2012). ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. Cell Death Dis. *3*, e403.

Roberts, T.L., Idris, A., Dunn, J.A., Kelly, G.M., Burnton, C.M., Hodgson, S., Hardy, L.L., Garceau, V., Sweet, M.J., Ross, I.L., et al. (2009). HIN-200 Proteins Regulate Caspase Activation in Response to Foreign Cytoplasmic DNA. Science *323*, 1057–1060.

Rock, J.R., and Hogan, B.L.M. (2011). Epithelial Progenitor Cells in Lung Development, Maintenance, Repair, and Disease. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *27*, 493–512.

Rock, J.R., Onaitis, M.W., Rawlins, E.L., Lu, Y., Clark, C.P., Xue, Y., Randell, S.H., and Hogan, B.L.M. (2009). Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 12771–12775.

Rogers, D.F. (2003). The airway goblet cell. Int. J. Biochem. Cell Biol. *35*, 1–6.

Roth, H.M., Wadsworth, S.J., Kahn, M., and Knight, D.A. (2012). The airway epithelium in asthma: Developmental issues that scar the airways for life? Pulm. Pharmacol. Ther. *25*, 420–426.

Sager, G., and Ravna, A.W. (2009). Cellular efflux of cAMP and cGMP - a question about selectivity. Mini Rev. Med. Chem. *9*, 1009–1013.

Sahl, H.-G., Pag, U., Bonness, S., Wagner, S., Antcheva, N., and Tossi, A. (2005). Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. J. Leukoc. Biol. *77*, 466–475.

Salmena, L., Lemmers, B., Hakem, A., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Au, P.Y.B., Berry, D.M., Tamblyn, L., Shehabeldin, A., Migon, E., et al. (2003). Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. Genes Dev. *17*, 883–895.

Salmon, J. E., and Cronstein, B. N. (1990). Fc gamma receptor-mediated functions in neutrophils are modulated by adenosine receptor occupancy. A1 receptors are stimulatory and A2 receptors are Inhibitory. J. Immunol. *145*, 2235–2240.

Sancho, D., Joffre, O.P., Keller, A.M., Rogers, N.C., Martínez, D., Hernanz-Falcón, P., Rosewell, I., and Sousa, C.R. e (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. Nature *458*, 899–903.

Sansonetti, P.J., Phalipon, A., Arondel, J., Thirumalai, K., Banerjee, S., Akira, S., Takeda, K., and Zychlinsky, A. (2000). Caspase-1 Activation of IL-1β and IL-18 Are Essential for Shigella flexneri–Induced Inflammation. Immunity *12*, 581–590.

Santos, G. dos, Kutuzov, M.A., and Ridge, K.M. (2012). The inflammasome in lung diseases. Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. *303*, L627–L633.

Sanz, J.M., Chiozzi, P., Ferrari, D., Colaianna, M., Idzko, M., Falzoni, S., Fellin, R., Trabace, L., and Virgilio, F.D. (2009). Activation of Microglia by Amyloid β Requires P2X7 Receptor Expression. J. Immunol. *182*, 4378–4385.

Satoh, T., Kambe, N., and Matsue, H. (2013). NLRP3 activation induces ASC-dependent programmed necrotic cell death, which leads to neutrophilic inflammation. Cell Death Dis. *4*, e644.

Sauer, J.-D., Witte, C.E., Zemansky, J., Hanson, B., Lauer, P., and Portnoy, D.A. (2010). Listeria monocytogenes triggers AIM2-mediated pyroptosis upon infrequent bacteriolysis in the macrophage cytosol. Cell Host Microbe *7*, 412–419.

Scheibner, K.A., Lutz, M.A., Boodoo, S., Fenton, M.J., Powell, J.D., and Horton, M.R. (2006). Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *177*, 1272–1281.

Scherbart, A.M., Langer, J., Bushmelev, A., van Berlo, D., Haberzettl, P., van Schooten, F.-J., Schmidt, A.M., Rose, C.R., Schins, R.P.F., and Albrecht, C. (2011). Contrasting macrophage activation by fine and ultrafine titanium dioxide particles is associated with different uptake mechanisms. Part. Fibre Toxicol. *8*, 31.

Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., et al. (2005). IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. Immunity *23*, 479–490.

Schorn, C., Frey, B., Lauber, K., Janko, C., Strysio, M., Keppeler, H., Gaipl, U.S., Voll, R.E., Springer, E., Munoz, L.E., et al. (2010). Sodium Overload and Water Influx Activate the NALP3 Inflammasome. J. Biol. Chem. *286*, 35–41.

Schroder, K., Zhou, R., and Tschopp, J. (2010). The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? Science *327*, 296–300.

Schwiebert, E.M., and Zsembery, A. (2003). Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. Biochim. Biophys. Acta *1615*, 7–32.

Sharma, S., Kulk, N., Nold, M.F., Gräf, R., Kim, S.-H., Reinhardt, D., Dinarello, C.A., and Bufler, P. (2008). The IL-1 family member 7b translocates to the nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *180*, 5477–5482.

Sharp, F.A., Ruane, D., Claass, B., Creagh, E., Harris, J., Malyala, P., Singh, M., O'Hagan, D.T., Petrilli, V., Tschopp, J., et al. (2009). Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. Proc. Natl. Acad. Sci. *106*, 870–875.

Shepherd, V.L. (2002). Pulmonary surfactant protein D: a novel link between innate and adaptive immunity. Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. *282*, L516–L517.

Shi, C.-S., Shenderov, K., Huang, N.-N., Kabat, J., Abu-Asab, M., Fitzgerald, K.A., Sher, A., and Kehrl, J.H. (2012). Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. Nat. Immunol. *13*, 255–263.

Shimada, K., Crother, T.R., Karlin, J., Dagvadorj, J., Chiba, N., Chen, S., Ramanujan, V.K., Wolf, A.J., Vergnes, L., Ojcius, D.M., et al. (2012). Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. Immunity *36*, 401–414.

Smith, D.E. (2010). IL-33: a tissue derived cytokine pathway involved in allergic inflammation and asthma. Clin. Exp. Allergy *40*, 200–208.

Sohaebuddin, S.K., Thevenot, P.T., Baker, D., Eaton, J.W., and Tang, L. (2010). Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. Part. Fibre Toxicol. *7*, 22.

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2013). Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. Nat. Rev. Immunol. *13*, 145–149.

Steinhoff, M., Vergnolle, N., Young, S.H., Tognetto, M., Amadesi, S., Ennes, H.S., Trevisani, M., Hollenberg, M.D., Wallace, J.L., Caughey, G.H., et al. (2000). Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. Nat. Med. *6*, 151–158.

Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. Nat. Rev. Immunol. *5*, 189–200.

Suadicani, S.O., Brosnan, C.F., and Scemes, E. (2006). P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca2+ signaling. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 1378–1385.

Subauste, M.C., Jacoby, D.B., Richards, S.M., and Proud, D. (1995). Infection of a human respiratory epithelial cell line with rhinovirus. Induction of cytokine release and modulation of susceptibility to infection by cytokine exposure. J. Clin. Invest. *96*, 549–557.

Suzuki, T., Franchi, L., Toma, C., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., Inohara, N., Sasakawa, C., and Nuñez, G. (2007). Differential Regulation of Caspase-1 Activation, Pyroptosis, and Autophagy via Ipaf and ASC in Shigella-Infected Macrophages. PLoS Pathog *3*, e111.

Taguchi, T., Mitcham, J.L., Dower, S.K., Sims, J.E., and Testa, J.R. (1996). Chromosomal Localization of TIL, a Gene Encoding a Protein Related to the Drosophila Transmembrane Receptor Toll, to Human Chromosome 4p14. Genomics *32*, 486–488.

Tajima, S., Oshikawa, K., Tominaga, S., and Sugiyama, Y. (2003). The increase in serum soluble ST2 protein upon acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. Chest *124*, 1206–1214.

Tao, J.-H., Zhang, Y., and Li, X.-P. (2013). P2X7R: A potential key regulator of acute gouty arthritis. Semin. Arthritis Rheum.

Tatur, S., Kreda, S., Lazarowski, E., and Grygorczyk, R. (2008). Calcium-dependent release of adenosine and uridine nucleotides from A549 cells. Purinergic Signal. *4*, 139–146.

Taylor, S.R.J., Gonzalez-Begne, M., Dewhurst, S., Chimini, G., Higgins, C.F., Melvin, J.E., and Elliott, J.I. (2008). Sequential Shrinkage and Swelling Underlie P2X7-Stimulated Lymphocyte Phosphatidylserine Exposure and Death. J. Immunol. *180*, 300–308.

Thompson, C.B. (1995). New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. Immunity *3*, 531–539.

Thoren, K.L., and Krantz, B.A. (2011). The unfolding story of anthrax toxin translocation. Mol. Microbiol. *80*, 588–595.

Ting, J.P.-Y., Lovering, R.C., Alnemri, E.S., Bertin, J., Boss, J.M., Davis, B.K., Flavell, R.A., Girardin, S.E., Godzik, A., Harton, J.A., et al. (2008). The NLR Gene Family: A Standard Nomenclature. Immunity *28*, 285–287.

Tomee, J.F., Wierenga, A.T., Hiemstra, P.S., and Kauffman, H.K. (1997). Proteases from Aspergillus fumigatus induce release of proinflammatory cytokines and cell detachment in airway epithelial cell lines. J. Infect. Dis. *176*, 300–303.

Torigoe, K., Ushio, S., Okura, T., Kobayashi, S., Taniai, M., Kunikata, T., Murakami, T., Sanou, O., Kojima, H., Fujii, M., et al. (1997). Purification and Characterization of the Human Interleukin-18 Receptor. J. Biol. Chem. *272*, 25737–25742.

Townsend, M.J., Fallon, P.G., Matthews, D.J., Jolin, H.E., and McKenzie, A.N.J. (2000). T1/St2-Deficient Mice Demonstrate the Importance of T1/St2 in Developing Primary T Helper Cell Type 2 Responses. J. Exp. Med. *191*, 1069–1076.

Trueblood, K.E., Mohr, S., and Dubyak, G.R. (2011). Purinergic regulation of high-glucose-induced caspase-1 activation in the rat retinal Muller cell line rMC-1. AJP Cell Physiol. *301*, C1213–C1223.

Tschopp, J., and Schroder, K. (2010). NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? Nat. Rev. Immunol. *10*, 210–215.

Tschopp, J., Martinon, F., and Burns, K. (2003). NALPs: a novel protein family involved in inflammation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *4*, 95–104.

VanWinkle, B., de Mesy Bentley, K., Malecki, J., Gunter, K., Evans, I., Elder, A., Finkelstein, J., Oberdorster, G., and Gunter, T. (2009). Nanoparticle (NP) uptake by type I alveolar epithelial cells and their oxidant stress response. Nanotoxicology 1–12.

Venge, J., Lampinen, M., Håkansson, L., Rak, S., and Venge, P. (1996). Identification of IL-5 and RANTES as the major eosinophil chemoattractants in the asthmatic lung. J. Allergy Clin. Immunol. *97*, 1110–1115.

Vladimer, G.I., Weng, D., Paquette, S.W.M., Vanaja, S.K., Rathinam, V.A.K., Aune, M.H., Conlon, J.E., Burbage, J.J., Proulx, M.K., Liu, Q., et al. (2012). The NLRP12 Inflammasome Recognizes Yersinia pestis. Immunity *37*, 96–107.

Vogel, F.R. (1995). Immunologic adjuvants for modern vaccine formulations. Ann. N. Y. Acad. Sci. *754*, 153–160.

Volanakis, J.E. (1990). Participation of C3 and its ligands in complement activation. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *153*, 1–21.

Vranic, S., Garcia-Verdugo, I., Darnis, C., Sallenave, J.-M., Boggetto, N., Marano, F., Boland, S., and Baeza-Squiban, A. (2013). Internalization of SiO_2 nanoparticles by alveolar macrophages and lung epithelial cells and its modulation by the lung surfactant substitute Curosurf. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. *20*, 2761–2770.

Warburton, D., Schwarz, M., Tefft, D., Flores-Delgado, G., Anderson, K.D., and Cardoso, W.V. (2000). The molecular basis of lung morphogenesis. Mech. Dev. *92*, 55–81.

Weiss, T., Gheber, L., Shoshan-Barmatz, V., and Priel, Z. (1992). Possible mechanism of ciliary stimulation by extracellular ATP: involvement of calcium-dependent potassium channels and exogenous Ca2+. J. Membr. Biol. *127*, 185–193.

Welkos, S.L., Trotter, R.W., Becker, D.M., and Nelson, G.O. (1989). Resistance to the Sterne strain of B. anthracis: phagocytic cell responses of resistant and susceptible mice. Microb. Pathog. *7*, 15–35.

Werman, A., Werman-Venkert, R., White, R., Lee, J.-K., Werman, B., Krelin, Y., Voronov, E., Dinarello, C.A., and Apte, R.N. (2004). The precursor form of IL-1α is an intracrine proinflammatory activator of transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 2434–2439.

Wessendorf, J.H., Garfinkel, S., Zhan, X., Brown, S., and Maciag, T. (1993). Identification of a nuclear localization sequence within the structure of the human interleukin-1 alpha precursor. J. Biol. Chem. *268*, 22100–22104.

Wright, J.R. (2005). Immunoregulatory functions of surfactant proteins. Nat. Rev. Immunol. *5*, 58–68.

Wynn, T.A. (2004). Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. Nat. Rev. Immunol. *4*, 583–594.

Xing, Y., Li, C., Li, A., Sridurongrit, S., Tiozzo, C., Bellusci, S., Borok, Z., Kaartinen, V., and Minoo, P. (2010). Signaling via Alk5 controls the ontogeny of lung Clara cells. Development *137*, 825–833.

Yang, C.-S., Shin, D.-M., and Jo, E.-K. (2012). The Role of NLR-related Protein 3 Inflammasome in Host Defense and Inflammatory Diseases. Int. Neurourol. J. *16*, 2.

Yang, J., Meyer, M., Müller, A.-K., Böhm, F., Grose, R., Dauwalder, T., Verrey, F., Kopf, M., Partanen, J., Bloch, W., et al. (2010). Fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in keratinocytes control the epidermal barrier and cutaneous homeostasis. J. Cell Biol. *188*, 935–952.

Yazdi, A.S., Guarda, G., Riteau, N., Drexler, S.K., Tardivel, A., Couillin, I., and Tschopp, J. (2010). Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 and IL-1. Proc. Natl. Acad. Sci. *107*, 19449–19454.

Yegutkin, G.G. (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. Biochim. Biophys. Acta *1783*, 673–694.

Yin, H., Li, X.Y., Yuan, B.H., Zhang, B.B., Hu, S.L., Gu, H.B., Jin, X.B., and Zhu, J.Y. (2011). Adenovirus-mediated overexpression of soluble ST2 provides a protective effect on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. Clin. Exp. Immunol. *164*, 248–255.

Yorimitsu, T., and Klionsky, D.J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. Cell Death Differ. *12*, 1542–1552.

Young, J.D., Yao, S.Y.M., Baldwin, J.M., Cass, C.E., and Baldwin, S.A. (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. Mol. Aspects Med. *34*, 529–547.

Zamboni, D.S., Kobayashi, K.S., Kohlsdorf, T., Ogura, Y., Long, E.M., Vance, R.E., Kuida, K., Mariathasan, S., Dixit, V.M., Flavell, R.A., et al. (2006). The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of Legionella pneumophila infection. Nat. Immunol. *7*, 318–325.

Zernecke, A., Bidzhekov, K., Ozüyaman, B., Fraemohs, L., Liehn, E.A., Lüscher-Firzlaff, J.M., Lüscher, B., Schrader, J., and Weber, C. (2006). CD73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. Circulation *113*, 2120–2127.

Zhao, Y., Usatyuk, P.V., Gorshkova, I.A., He, D., Wang, T., Moreno-Vinasco, L., Geyh, A.S., Breysse, P.N., Samet, J.M., Spannhake, E.W., et al. (2009). Regulation of COX-2 expression and IL-6 release by particulate matter in airway epithelial cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *40*, 19–30.

Zhao, Y., Yang, J., Shi, J., Gong, Y.-N., Lu, Q., Xu, H., Liu, L., and Shao, F. (2011). The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. Nature *477*, 596–600.

Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., and Tschopp, J. (2010a). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. Nature *469*, 221–225.

Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I., and Tschopp, J. (2010b). Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. Nat. Immunol. *11*, 136–140.

ANNEXES

ANNEXE 1: Libération d'ATP et activation de l'inflammasome NLRP3 (Revue 1)

ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation

Aurélie Gombault, **Ludivine Baron** and Isabelle Couillin

Cell Death and Disease, 2012, 3, e403.

Il s'agit d'une mini-revue qui se focalise sur le lien entre la libération active d'ATP par des cellules en réponses à différents stimuli, la signalisation purinergique et l'activation de l'inflammasome NLRP3. C'est, en quelque sorte, le pendant de l'article 1. Les données qui figurent dans l'article 2 et qui sont dans la continuité de l'article 1 en se focalisant sur les nanoparticules comme activateurs de l'inflammasome NLRP3 sont postérieures à cette revue et n'y figurent donc pas.

frontiers in
IMMUNOLOGY

MINI REVIEW ARTICLE
published: 08 January 2013
doi: 10.3389/fimmu.2012.00414

ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation

Aurélie Gombault, Ludivine Baron and Isabelle Couillin*

Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, CNRS UMR 7355, University of Orleans, Orleans, France

Edited by:
Anna Rubartelli, National Cancer Research Institute, Italy

Reviewed by:
David Brough, University of Manchester, UK
Francesco Di Virgilio, University of Ferrara, Italy

****Correspondence:***
Isabelle Couillin, Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, CNRS UMR 7355, University of Orleans, 3B rue de la Férollerie, 45071 Orleans, France.
e-mail: couillin@cnrs-orleans.fr

The NLRP3 inflammasome is a protein complex involved in IL-1β and IL-18 processing that senses pathogen- and danger-associated molecular patterns (PAMPs and DAMPs). One step- or two step-models have been proposed to explain the tight regulation of IL-1β production during inflammation. Moreover, cellular stimulation triggers adenosine triphosphate (ATP) release and subsequent activation of purinergic receptors at the cell surface. Importantly some studies have reported roles for extracellular ATP, in NLRP3 inflammasome activation in response to PAMPs and DAMPs. In this mini review, we will discuss the link between active ATP release, purinergic signaling and NLRP3 inflammasome activation. We will focus on the role of autocrine or paracrine ATP export in particle-induced NLRP3 inflammasome activation and discuss how particle activators are competent to induce maturation and secretion of IL-1β through a process that involves, as a first event, extracellular release of endogenous ATP through hemichannel opening, and as a second event, signaling through purinergic receptors that trigger NLRP3 inflammasome activation. Finally, we will review the evidence for ATP as a key pro-inflammatory mediator released by dying cells. In particular we will discuss how cancer cells dying via autophagy trigger ATP-dependent NLRP3 inflammasome activation in the macrophages engulfing them, eliciting an immunogenic response against tumors.

Keywords: ATP, danger signal, inflammasome, P2R, NLRP3, purinergic signaling, autophagic cell death

THE NLRP3 INFLAMMASOME

Innate immunity is triggered by endogenous or environmental danger events through assembly of the NLRP3 inflammasome. The NLRP3 inflammasome is a cytosolic multiprotein platform which is activated in response to a variety of signals including infection, tissue damage, and metabolic dysregulation. Activation of the NLRP3 inflammasome results in the assembly of scaffold components: the cytoplasmic receptor NLRP3, the adaptor protein ASC and the effector protein caspase-1 (Agostini et al., 2004; Martinon et al., 2004, 2009; Martinon and Tschopp, 2004; Kanneganti et al., 2006; Mariathasan et al., 2006). This association leads to the activation of caspase-1, allowing the processing of pro-IL-1β and pro-IL-18 to their mature and secreted forms which are biologically active. IL-1β production is a tightly controlled process playing a pivotal role in inflammation and in recruitment of neutrophils into tissues. A two-signal model has been proposed to explain the regulation of IL-1β production. First the synthesis of pro-IL-1β and NLRP3 is triggered by transcriptional induction via ligands for Toll-like receptors (TLRs), whereas a second stimulus leads to inflammasome oligomerization, caspase-1 autoactivation, caspase-1-dependent cleavage of pro-IL-1β and then release of the biologically active, mature IL-1β. This second signal may be induced by a broad variety of chemically and biologically unrelated molecules classified as either pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or danger-associated molecular patterns (DAMPs). DAMPs originate from environmental pollutants including silica and asbestos (Dostert et al., 2008; Halle et al., 2008), from vaccines such as aluminum salt (alum) adjuvant (Eisenbarth et al., 2008) or from endogenous metabolic stresses such as high concentration of glucose (Schroder et al., 2010), cholesterol (Duewell et al., 2010), amyloid-β protein (Halle et al., 2008), biglycan (Babelova et al., 2009), adenosine triphosphate (ATP; Mariathasan et al., 2006), or monosodium urate (MSU) crystals (Aganna et al., 2002; Eisenbarth et al., 2008). Two major upstream mechanisms are currently proposed for NLRP3 inflammasome activation: plasma membrane disruption (for bacterial toxins and ATP) or internalization of particulate activators by phagocytosis (Cassel et al., 2009). Extracellular ATP (eATP) or bacterial toxins lead to K^+ efflux and pore formation (Pelegrin and Surprenant, 2007). Phagocytosis of particles including silica, alum, fibrillar amyloid-β protein, or MSU was shown to result in lysosomal destabilization/permeabilization with release of the endosomal–lysosomal protease cathepsin B into the cytoplasm (Halle et al., 2008) and/or to mediate K^+ efflux and reactive oxygen species (ROS) driven activation. Recently, we and others have described mechanistic links between ATP- and particle-mediated inflammasome activation pathways (Riteau et al., 2012). Here we review the role of active ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation.

ATP AND PURINERGIC SIGNALING

Adenosine triphosphate signaling is emerging as an important mechanism to control various cell functions (Burnstock, 2006; Praetorius and Leipziger, 2009). Cellular stimulation triggers ATP release and subsequently activation of purinergic receptors at the cell surface (autocrine activation) and/or on adjacent cells

(paracrine activation), thereby regulating or modulating cellular functions in immunity. Although essentially all cells are able to release nucleotides, the mechanisms underlying nucleotides release by epithelial, endothelial, or other non-excitable cells are poorly understood (Lazarowski et al., 2003; Praetorius and Leipziger, 2009). After release, eATP interacts with specific purinergic receptors or is degraded via different ecto-ATPases to ADP and AMP and then to adenosine. ATP or its metabolites are able to signal through different purinergic receptors (P2X, P2Y, or adenosine P1 receptors; Yegutkin, 2008). In pathological conditions, high levels of ATP are passively released from necrotic cells and act as a pro-inflammatory danger signal, activating the NLRP3 inflammasome through binding to the ionotropic P2X7 receptor (P2X7R; Iyer et al., 2009).

NLRP3 INFLAMMASOME ACTIVATION: ONE OR TWO STEP SIGNAL?

During NLRP3 inflammasome activation, a two-signal model has been proposed to explain the regulation of IL-1β production by macrophages, dendritic cells, or microglial cells. After a first signal induced by LPS triggers accumulation of pro-IL-1β, exposure to high concentrations of eATP (5 mM) acts as a powerful second signal to elicit the processing of pro-IL-1β into mature IL-1β in murine (Perregaux and Gabel, 1994) and human macrophages (Ataman-Onal et al., 2006) via P2X7R signaling (Di Virgilio, 2007). In contrast, primary human monocytes were shown to require only one signal because LPS alone was sufficient to induce secretion of mature IL-1β, with exogenous ATP acting to further accelerate the LPS-triggered IL-1β processing and secretion (Ferrari et al., 2006; Netea et al., 2009). In addition, primary stimulation of human monocytes with several other PAMPs and one DAMP was sufficient to provide both the first and the second signals via a mechanism involving active release of endogenous ATP to the extracellular environment with consequent activation of the P2X7R in an autocrine loop; this allows the triggering of mature IL-1β secretion in a one step model of inflammasome activation (Piccini et al., 2008). In these studies, eATP and mature IL-1β were measured in the absence/presence of either, P2X7R pharmacologic inhibitors, or apyrase, an ATP/ADP degrading enzyme, to demonstrate the roles of ATP release and purinergic signaling in secretion of mature IL-1β. Moreover, an inhibitor of ATP degradation ARL67156 greatly increased both eATP and IL-1β contents, further supporting the role of endogenously released ATP in secretion of mature IL-1β. These studies demonstrated that LPS or MSU can trigger ATP release from stimulated cells, pointing to fundamental roles for ATP and/or its metabolites as important molecules that mediate the NLRP3 inflammasome activation responses to PAMPs or DAMPS.

Surprisingly, two other recent studies have implicated purinergic signaling but not ATP release in NLRP3 inflammasome activation by suggesting that certain non-nucleotide inflammasome activators may interact directly with purinergic receptors. First, it was shown that soluble biglycan, an ubiquitous leucine-rich repeat proteoglycan of the extracellular matrix, acts as an endogenous danger signal that activates the NLRP3 inflammasome and the release of IL-1β without additional co-stimulatory factors (e.g., exogenous ATP) in murine primary peritoneal macrophages (Babelova et al., 2009). By signaling through TLR2/4, biglycan stimulated the expression of NLRP3 and pro-IL-1β mRNA. Biglycan-induced inflammasome activation was completely inhibited by oxidized-ATP (oATP), which broadly inhibits several P2X and P2Y receptors, and partially inhibited by KN-62, a selective inhibitor of P2X7R, demonstrating the involvement of the P2 purinergic receptors. Moreover, co-stimulation of the biglycan-treated cells with ATP further increased IL-1β secretion. Nevertheless, the authors claimed direct activation of the NLRP3 inflammasome by biglycan and excluded an autocrine role for ATP because biglycan did not affect the secretion of ATP. They proposed that the interaction of biglycan with both TLR2/4 and purinergic P2X4/P2X7Rs induces receptor cooperativity and NLRP3 inflammasome activation (Babelova et al., 2009).

Another study characterized inflammasome responses to serum amyloid A (SAA), an acute-phase protein which undergoes up to a 1000-fold increase in serum levels during inflammation, and which has a pathogenic role in amyloid A-type amyloidosis. SAA provides a signal for both the induction of pro-IL-1β expression and NLRP3 inflammasome activation, resulting in secretion of IL-1β without fibril formation and lysosomal destabilization in human and mouse macrophages (Niemi et al., 2011). Blocking TLR2 and TLR4 attenuated SAA-induced expression of IL-1β, whereas inhibition of caspase-1 or P2X7R by oATP or KN-62 abrogated the release of mature IL-1β. However apyrase treatment did not diminish SAA-mediated IL-1β release and no increase in ATP levels was observed in response to SAA. Thus, the authors proposed that SAA-induced inflammasome activation is mediated by a direct interaction between SAA and P2X7R and that it is not associated with the release of ATP or ADP (Niemi et al., 2011). In conclusion, whether a one- or two-step model of inflammasome activation is involved, ATP and/or purinergic signaling seem to play key roles in NLRP3 inflammasome activation by PAMPs or DAMPs.

A ROLE FOR ATP IN PARTICLE-INDUCED NLRP3 INFLAMMASOME ACTIVATION

In a recent study, we showed that uric acid, silica, or alum particles induce the active release of intracellular ATP from human macrophage to extracellular compartments via mechanisms that depend on purinergic signaling and connexin/pannexin channels (Riteau et al., 2012). We observed a strong correlation between ATP release and secretion of mature IL-1β after stimulation of phorbol myristate acetate (PMA)-primed THP1 human macrophages. In presence of the first signal (PMA), MSU, silica, or alum salt crystals acted as second signal triggers leading to mature IL-1β production by these human myeloid cells via ATP release and subsequent purinergic signaling. Importantly, allopurinol crystals, which do not elicit NLRP3 inflammasome activation (Ataman-Onal et al., 2006) were also unable to trigger ATP release. In addition, exposure of LPS-primed murine macrophages to the different crystalline stimuli also lead to maturation of IL-1β via pathways dependent on autocrine purinergic signaling loops involving multiple purinergic receptor subtypes (Riteau et al., 2012). Moreover, crystal-induced secretion of IL-1β was abrogated by apyrase to

further confirm the role of ATP and autocrine purinergic signaling in inflammasome activation. Nevertheless, P2X7R deficiency in murine macrophages did not change the ability of these cells to secrete IL-1β even though high and non-specific concentrations of the P2X7R inhibitor A740003 severely impaired cytokine production. This suggested the involvement of P2 receptor subtypes in addition to P2X7R. Indeed, several other studies have reported that blocking or deleting P2X7R did not affect MSU- (Ataman-Onal et al., 2006), silica- (Iyer et al., 2009), or alum- (Eisenbarth et al., 2008) induced IL-1β production, thereby implicating roles for other purinergic receptors in non-pathologic conditions. Previous reports have indicated that not only ATP but other nucleotides such as ADP, UTP, or UDP are released into the extracellular space of mechanically stressed cells, in particular endothelial and epithelial cells (Di Virgilio et al., 2001; Lazarowski et al., 2003). These compounds may act on different purinergic receptors to generate a finely tuned response. Our data strongly suggest that members of the two major purinergic receptor families – P2X and P2Y – are involved because ADP and UTP act only on P2Y-family receptors. Thus, our study provides a novel link between the particle internalization- and membrane permeabilization-models of NLRP3 inflammasome activation. Indeed, prior to this analysis, particulate molecules and eATP were considered as two completely independent stimuli for NLRP3 inflammasome activation. The model presented in **Figure 1** summarizes these results and our model.

In another recent report, the P2Y6 receptor was identified as an essential mediator for MSU-induced inflammation in the human THP1 monocyte/macrophage cell line because the specific P2Y6 antagonist MRS2578 completely inhibited MSU-induced IL-1β production (Uratsuji et al., 2012). Because P2Y6 receptors are known to be coupled to the activation of phospholipase C (PLC; Abbracchio et al., 2006), a PLC inhibitor, U-73122, was also tested and shown to suppress the MSU-induced IL-1β production by THP1 cells. These results demonstrate that the P2Y6–PLC signaling pathway mediates MSU-induced inflammatory responses in human monocytes (Uratsuji et al., 2012) and thus point to the involvement of P2Y receptors in particle-induced NLRP3 inflammasome activation.

Interestingly, ATP is a potential mediator of neuroinflammation and an extracellular signaling molecule between neurons and glial cells (Abbracchio et al., 2006). Multiple P2X and P2Y receptor subtypes are expressed by astrocytes, oligodendrocytes, and microglia (James and Butt, 2002). Thus, microglial cells are a good model to investigate physiological functions of purinergic receptors in the immune system. First, eATP was shown to cause a large release of IL-1β from microglial cell lines and from freshly isolated microglial cells by activating the P2X7R (Di Virgilio et al.,

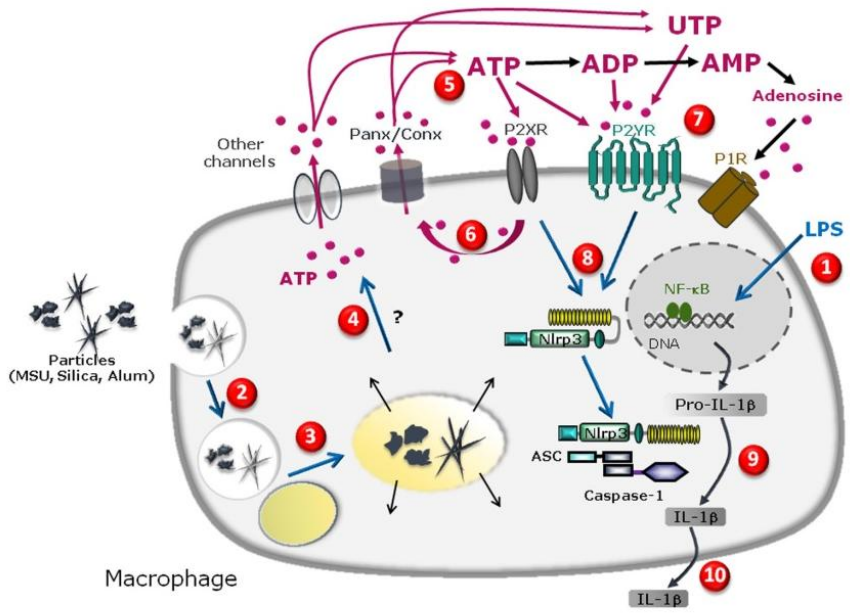


FIGURE 1 | Schematic diagram illustrating the specific cascade and signaling pathway in LPS-primed macrophages stimulated with MSU, silica, or alum salt crystals. LPS priming induces transcription of pro-IL-1β gene and other genes in the nucleus upon activation of the transcription factor NFkB and subsequent production of pro-IL-1β protein in the cytosol **(1)**. Particle internalization **(2)**, fusion to lysosome **(3)** and further phagolysosome destabilization may lead to cathepsin leakage **(4)** which precedes pannexin/connexin (Panx/Conx) hemichannel and purinergic signaling-dependent intracellular ATP release **(5)**. Extracellular ATP may act through P2X7 receptor to amplify ATP release in a P2X7 receptor-dependent way **(6)**. ATP, UTP, or their derived degradation products such as ADP, UDP, and adenosine, generated by ecto-endonucleases, may act through an autocrine loop on other purinergic receptor P2X, P2Y, and/or P1 receptors **(7)** leading to NLRP3 receptor activation **(8)**. This allows inflammasome complex formation and maturation of pro-IL-1β to IL-1β production **(9)** and IL-1β secretion **(10)**.

1996). Second, stimulation of microglia cells through TLRs has been proposed to induce the release of endogenous ATP acting in an autocrine manner to activate the ion channel P2X7 (Ferrari et al., 1997). Release of ATP and other nucleotides seems to modulate microglial responses via P2Y and P2X receptors, with the P2X7 subtype standing out for its known pro-inflammatory activity and for its up-regulation in both a transgenic mouse model of Alzheimer's disease and in the brains from Alzheimer's disease patients (Parvathenani et al., 2003; McLarnon et al., 2006). Moreover, another particulate NLRP3 activator, amyloid-β protein aggregates was shown to promote IL-1β release through P2X7R-mediated ATP release and therefore to activate the NLRP3 inflammasome in microglia (Sanz et al., 2009).

In summary, four different particulate activators, MSU, silica, alum crystals, and amyloid-β protein aggregates have been shown to activate the NLRP3 inflammasome through mechanisms involving ATP release and autocrine purinergic signaling. Based on the use of pharmacological inhibitors, a role for P2X7R has often been reported. However, the uncertain selectivity of P2X7R antagonists (which can vary with concentration and cell type) may yield questionable or equivocal conclusions. Our recent study used pharmacological agonists, antagonists, and P2R subtype-deficient mice to suggest that multiple purinergic signaling pathways are involved in NLRP3 inflammasome regulation through activation by ATP, ADP, UTP, UDP, and/or adenosine.

A ROLE FOR ATP RELEASE IN CELL DEATH-INDUCED INFLAMMASOME ACTIVATION

Cells which die in response to non-developmentally programmed cues, such as the necrosis produced by pressure disruption, hypoxic injury, or complement-mediated damage, are potent activators of the innate immune system and can promote sterile inflammation through sensing by the NLRP3 inflammasome that results in the subsequent release of the pro-inflammatory cytokine IL-1β. This activation may be triggered in part by ATP produced by mitochondria and released from damaged cells (Iyer et al., 2009). Cells which die as part of physiological responses, such as apoptotic or autophagic cells, are removed from tissues to prevent immune reactions and maintain tissue homeostasis. Although apoptotic cells have anti-inflammatory properties due to their surface exposure of anti-inflammatory molecules (Fadok et al., 1998; Cvetanovic et al., 2006), cells dying via autophagy can trigger pro-inflammatory responses through the release of danger signals that drive NLRP3 inflammasome activation (Petrovski et al., 2007b; Ghiringhelli et al., 2009; Michaud et al., 2011). Since the first description of autophagy in 1966 (De Duve and Wattiaux, 1966), numerous studies have described autophagy as a survival mechanism response to poor nutritional conditions (Gozuacik and Kimchi, 2007; Maiuri et al., 2007). However, it is now clear that autophagy has a dual role (Codogno and Meijer, 2005): under certain circumstances, autophagy constitutes a stress adaptation that avoids cell death (and suppresses apoptosis) by degradation of long-lived proteins and damaged organelles through the autophago-lysosomal pathway, whereas in other cellular settings, it constitutes an alternative cell-death pathway (Petrovski et al., 2007a). Cell dying through autophagy were shown recently to induce a pro-inflammatory response in human macrophages (Petrovski et al., 2007b). Moreover, phagocytosis of human cancer cells dying through autophagy was shown to trigger NLRP3 inflammasome activation and maturation of IL-1β in human macrophages via an ATP-dependent mechanism (Petrovski et al., 2011). Indeed, multiple manipulations including blockade of K^+ efflux during phagocytosis, incubation in the presence of apyrase, addition of P2X7R antagonist, or silencing NLRP3 protein expression, all acted to inhibit this IL-1β secretion response (Petrovski et al., 2011). Moreover, phagocytosis of murine cells, dying via autophagy by mouse macrophages was found to activate the NLRP3 inflammasome in the engulfing macrophages (Ayna et al., 2012). Studying the mechanism of inflammation illuminated roles for ATP release via pannexin-1 channels in the autophagic dying cells, phagocytosis of autophagic dying cells, P2X7R activation and subsequent K^+ efflux in macrophages as obligatory steps for NLRP3 inflammasome activation in this model (Ayna et al., 2012). Together, these studies have demonstrated that ATP release is required for NLRP3 inflammasome activation in both human and murine macrophages. Some mechanistic details may differ in these models; during phagocytosis of human autophagic dying cells, ATP is released by macrophages and acts on macrophage purinergic receptors in an autocrine loop (Petrovski et al., 2007b), whereas during engulfment of murine autophagic dying cells, ATP is released by autophagic dying cells and acts on macrophages in an paracrine loop (Ayna et al., 2012). Importantly, autophagic death was reported to contribute to making apoptotic cancer cells immunogenic (Michaud et al., 2011; Petrovski et al., 2011) and thereby capable of activating the inflammasome in dendritic cells (Ghiringhelli et al., 2009). These authors first showed in a murine model that treatment of cancer cells with anticancer chemicals (such as oxaliplatin and mitoxantrone) causes immunogenic cancer cell death (Ghiringhelli et al., 2009). ATP released from dying tumor cells was shown to activate P2X7R signaling in dendritic cells, leading to inflammasome activation and further IL-1β secretion (Ghiringhelli et al., 2009). These authors also demonstrated that oxaliplatin- or mitoxantrone-treated tumor cells die via autophagy which induces an immunogenic response *in vivo* by recruiting dendritic cells and T cells into the tumor through the release of ATP into the extracellular fluid (Michaud et al., 2011). They subsequently reported that autophagy is essential for the immunogenic release of ATP from dying cells (Michaud et al., 2011). Furthermore, such an immunogenic anti-tumor response could also be elicited when autophagy and cell death was induced by cytokine depletion. The mechanisms for the NLRP3 activation triggered through murine cells dying via autophagy are summarized in **Figure 2**.

In conclusion, an increasing body of evidence suggests that ATP and/or purinergic signaling are cornerstone regulators of NLRP3 inflammasome activation in many, but not all, biological contexts wherein the purinergic pathways do not exclude the existence of other mechanisms. First, a high amount of passive ATP release from necrotic cells activates the inflammasome through the P2X7R. Second, PAMP recognition and signaling through their receptors trigger active ATP release in some cell types such as human monocytes. Third, phagocytosis of several inflammasome activators following by ATP release appears to be common

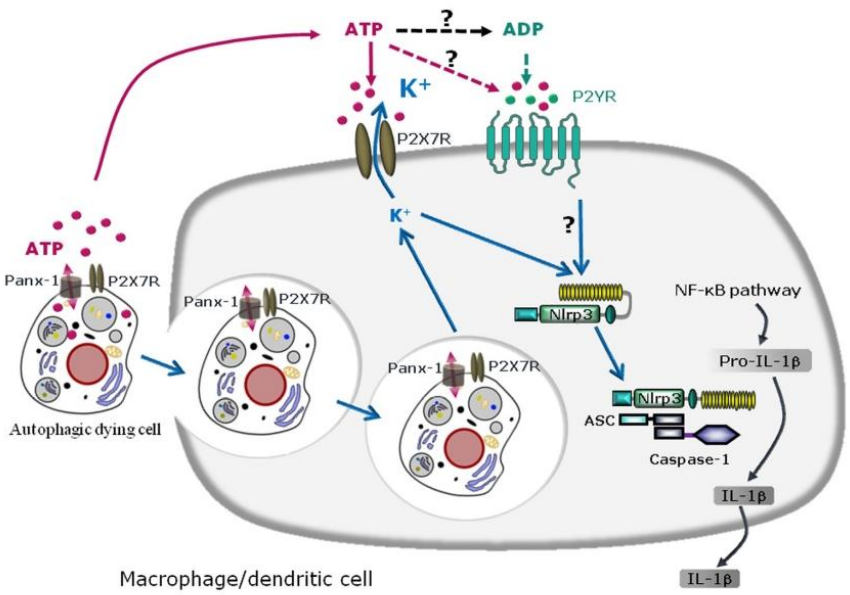


FIGURE 2 | Schematic diagram illustrating the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation by autophagic dying cells through ATP leakage and purinergic signaling in murine macrophages or dendritic cells. Autophagic dying cells release ATP through pannexin-1 (Panx-1) hemichannel resulting in activation of the purinergic receptor P2X7R on macrophages or dendritic cells. Phagocytosis of autophagic dying cells and K^+ efflux are required for NLRP3 inflammasome activation in macrophages or dendritic cells. Since extracellular ATP is rapidly degraded in ADP, AMP, and adenosine, ATP metabolites could also act through other purinergic receptors and in particular, ATP and ADP could signal through P2YR. Purinergic signaling and K^+ efflux result in inflammasome assembly and caspase-1 activation leading to maturation of pro-IL-1β in IL-1β and IL-1β secretion.

pathway for activating the NLRP3 inflammasome. Fourth, ATP leakage from autophagic dying cells and the engulfment of these cells by macrophages trigger immunity through NLRP3 inflammasome activation. It will be important to identify the events linking, on the one hand, phagocytosis of particles or autophagic dying cells to ATP release by macrophages, and on the other hand, ATP leakage and engulfment of autophagic dying cells to NLRP3 activation. Finally, the events triggering NLRP3 inflammasome assembly and activation downstream of purinergic signaling are unknown. Another important issue is that ATP and P2X7R are not the only purinergic "players" in this response because different nucleotide metabolites such as ADP, UTP, UDP, and adenosine, and other members of the purinergic receptor family, i.e., the P2X, P2Y, and P1 receptors may contribute through complex purinergic signaling networks. Better understanding of these mechanisms will facilitate identification of new targets for inflammatory diseases and improve our understanding of the immune response to cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the support of the "Agence National de Recherche" (France), the "Conseil Général du Loiret" (France), the "Fonds de Dotation pour la Recherche en Santé Respiratoire" (France), and the "Région Centre" (France). The authors also thank George Dubyak (Cleveland, Ohio) for excellent review of the manuscript.

REFERENCES

Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., et al. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* 58, 281–341.

Aganna, E., Martinon, F., Hawkins, P. N., Ross, J. B., Swan, D. C., Booth, D. R., et al. (2002). Association of mutations in the NALP3/CIAS1/PYPAF1 gene with a broad phenotype including recurrent fever, cold sensitivity, sensorineural deafness, and AA amyloidosis. *Arthritis Rheum.* 46, 2445–2452.

Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., Mcdermott, M. F., Hawkins, P. N., and Tschopp, J. (2004). NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle–Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20, 319–325.

Ataman-Onal, Y., Munier, S., Ganee, A., Terrat, C., Durand, P. Y., Battail, N., et al. (2006). Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. *J. Control. Release* 112, 175–185.

Ayna, G., Krysko, D. V., Kaczmarek, A., Petrovski, G., Vandenabeele, P., and Fesus, L. (2012). ATP release from dying autophagic cells and their phagocytosis are crucial for inflammasome activation in macrophages. *PLoS ONE* 7:e40069. doi: 10.1371/journal.pone.0040069

Babelova, A., Moreth, K., Tsalastra-Greul, W., Zeng-Brouwers, J., Eickelberg, O., Young, M. F., et al. (2009). Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *J. Biol. Chem.* 284, 24035–24048.

Burnstock, G. (2006). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 166–176.

Cassel, S. L., Joly, S., and Sutterwala, F. S. (2009). The NLRP3 inflammasome: a sensor of immune danger signals. *Semin. Immunol.* 21, 194–198.

Codogno, P., and Meijer, A. J. (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ.* 12(Suppl. 2), 1509–1518.

Cvetanovic, M., Mitchell, J. E., Patel, V., Avner, B. S., Su, Y., Van Der Saag, P. T., et al. (2006). Specific recognition of apoptotic cells reveals a ubiquitous and unconventional innate immunity. *J. Biol. Chem.* 281, 20055–20067.

De Duve, C., and Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* 28, 435–492.

Di Virgilio, F. (2007). Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 465–472.

Di Virgilio, F., Borea, P. A., and Illes, P. (2001). P2 receptors meet the immune system. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 5–7.

Di Virgilio, F., Ferrari, D., Falzoni, S., Chiozzi, P., Munerati, M., Steinberg, T. H., et al. (1996). P2 purinoceptors in the immune system. *Ciba Found. Symp.* 198, 290–302; discussion 302–305.

Dostert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B. T., and Tschopp, J. (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320, 674–677.

Duewell, P., Kono, H., Rayner, K. J., Sirois, C. M., Vladimer, G., Bauernfeind, F. G., et al. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464, 1357–1361.

Eisenbarth, S. C., Colegio, O. R., O'Connor, W., Sutterwala, F. S., and Flavell, R. A. (2008). Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453, 1122–1126.

Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., and Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.* 101, 890–898.

Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Hanau, S., and Di Virgilio, F. (1997). Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J. Exp. Med.* 185, 579–582.

Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R. M., Curti, A., Idzko, M., et al. (2006). The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J. Immunol.* 176, 3877–3883.

Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., et al. (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* 15, 1170–1178.

Gozuacik, D., and Kimchi, A. (2007). Autophagy and cell death. *Curr. Top. Dev. Biol.* 78, 217–245.

Halle, A., Hornung, V., Petzold, G. C., Stewart, C. R., Monks, B. G., Reinheckel, T., et al. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat. Immunol.* 9, 857–865.

Iyer, S. S., Pulskens, W. P., Sadler, J. J., Butter, L. M., Teske, G. J., Ulland, T. K., et al. (2009). Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 20388–20393.

James, G., and Butt, A. M. (2002). P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca2+ signalling in glial cell pathology in the central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* 447, 247–260.

Kanneganti, T. D., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J. H., Whitfield, J., Franchi, L., et al. (2006). Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J. Biol. Chem.* 281, 36560–36568.

Lazarowski, E. R., Boucher, R. C., and Harden, T. K. (2003). Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol. Pharmacol.* 64, 785–795.

Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 741–752.

Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., Mcbride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., et al. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440, 228–232.

Martinon, F., Agostini, L., Meylan, E., and Tschopp, J. (2004). Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr. Biol.* 14, 1929–1934.

Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 229–265.

Martinon, F., and Tschopp, J. (2004). Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 117, 561–574.

McLarnon, J. G., Ryu, J. K., Walker, D. G., and Choi, H. B. (2006). Upregulated expression of purinergic P2X(7) receptor in Alzheimer disease and amyloid-beta peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 1090–1097.

Michaud, M., Martins, I., Sukkurwala, A. Q., Adjemian, S., Ma, Y., Pellegatti, P., et al. (2011). Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 334, 1573–1577.

Netea, M. G., Nold-Petry, C. A., Nold, M. F., Joosten, L. A., Opitz, B., Van Der Meer, J. H., et al. (2009). Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* 113, 2324–2335.

Niemi, K., Teirila, L., Lappalainen, J., Rajamaki, K., Baumann, M. H., Oorni, K., et al. (2011). Serum amyloid A activates the NLRP3 inflammasome via P2X7 receptor and a cathepsin B-sensitive pathway. *J. Immunol.* 186, 6119–6128.

Parvathenani, L. K., Tertyshnikova, S., Greco, C. R., Roberts, S. B., Robertson, B., and Posmantur, R. (2003). P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 278, 13309–13317.

Pelegrin, P., and Surprenant, A. (2007). Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1beta release through a dye uptake-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 282, 2386–2394.

Perregaux, D., and Gabel, C. A. (1994). 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, 15195–15203.

Petrovski, G., Ayna, G., Majai, G., Hodrea, J., Benko, S., Madi, A., et al. (2011). Phagocytosis of cells dying through autophagy induces inflammasome activation and IL-1beta release in human macrophages. *Autophagy* 7, 321–330.

Petrovski, G., Zahuczky, G., Katona, K., Vereb, G., Martinet, W., Nemes, Z., et al. (2007a). Clearance of dying autophagic cells of different origin by professional and non-professional phagocytes. *Cell Death Differ.* 14, 1117–1128.

Petrovski, G., Zahuczky, G., Majai, G., and Fesus, L. (2007b). Phagocytosis of cells dying through autophagy evokes a pro-inflammatory response in macrophages. *Autophagy* 3, 509–511.

Piccini, A., Carta, S., Tassi, S., Lasiglie, D., Fossati, G., and Rubartelli, A. (2008). ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 8067–8072.

Praetorius, H. A., and Leipziger, J. (2009). ATP release from non-excitable cells. *Purinergic Signal.* 5, 433–446.

Riteau, N., Baron, L., Villeret, B., Guillou, N., Savigny, F., Ryffel, B., et al. (2012). ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell Death Dis.* 3, e403.

Sanz, J. M., Chiozzi, P., Ferrari, D., Colaianna, M., Idzko, M., Falzoni, S., et al. (2009). Activation of microglia by amyloid {beta} requires P2X7 receptor expression. *J. Immunol.* 182, 4378–4385.

Schroder, K., Zhou, R., and Tschopp, J. (2010). The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science* 327, 296–300.

Uratsuji, H., Tada, Y., Kawashima, T., Kamata, M., Hau, C. S., Asano, Y., et al. (2012). P2Y6 receptor signaling pathway mediates inflammatory responses induced by monosodium urate crystals. *J. Immunol.* 188, 436–444.

Yegutkin, G. G. (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 673–694.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 02 October 2012; accepted: 19 December 2012; published online: 08 January 2013.

Citation: Gombault A, Baron L and Couillin I (2013) ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. Front. Immun. 3:414. doi: 10.3389/fimmu.2012.00414

This article was submitted to Frontiers in Inflammation, a specialty of Frontiers in Immunology.

Copyright © 2013 Gombault, Baron and Couillin. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

Ludivine BARON

Mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 par les micro- et les nano- particules dans un modèle d'inflammation pulmonaire chez la souris

Les mécanismes de défense de l'organisme contre des pathogènes ou des particules toxiques sont regroupés sous le terme d'Immunité. L'Immunité a développé plusieurs familles de récepteurs dont les NLR (Nod Like Receptors) spécialisés dans la reconnaissance de motifs de pathogènes (PAMP), de signaux de danger endogènes (DAMP) et de désordres métaboliques et capables d'engager une réponse inflammatoire. L'inflammation est dite stérile si elle n'est pas déclenchée par des agents infectieux mais par des molécules endogènes en excès comme l'acide urique et l'ATP ou par des polluants environnementaux tels que la silice et les nanoparticules.

Nous nous sommes d'une part intéressés aux mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 qui permet la maturation d'une cytokine pro-inflammatoire, l'Interleukine (IL)-1β. Nous montrons que les cristaux d'acide urique, de silice et d'Alum ainsi que les nanoparticules de titane et de silice induisent une libération active d'ATP dépendante d'hémicanaux par les cellules. Nous mettons en évidence un nouveau mécanisme d'activation de l'inflammasome NLRP3 qui fait intervenir l'ATP et ses différents métabolites, en particulier l'adénosine, via des familles de récepteurs purinergiques.

Nous nous sommes d'autre part focalisés sur l'inflammation pulmonaire induite par l'administration de nanoparticules dans un modèle murin. Nous avions montré dans une étude précédente que cette inflammation est dépendante des IL-1α et IL-1β et de leur récepteur IL-1R1. Nos résultats montrent que l'adénosine est impliquée *in vivo* dans la réponse inflammatoire aux nanoparticules et que l'inflammation des voies respiratoires est modulée par l'IL-33 et son récepteur ST2.

Mots-clés : Adénosine, ATP, inflammasome, Interleukines (IL), cristaux, nanoparticules.

Mechanisms of activation of the NLRP3 inflammasome by micro- and nano- particles in a murine model of lung inflammation

The mechanisms of defense of the organism against pathogens or oxious particles are termed Immunity. The Immunity developed several receptors' families among which the NLR (Nod-Like Receptors), specialized in the recognition of pathogen patterns (PAMPs), of endogenous danger signals (DAMPs) and of metabolic disorders, and capable of triggering an inflammatory response. The inflammation is named "sterile" if it is not activated by infectious agents but by endogenous molecules in excess, as uric acid and ATP, or by environmental pollutants, such as silica and nanoparticles.

We first became interested in the mechanisms of activation of the NLRP3 inflammasome which allows the maturation of a pro-inflammatory cytokine, the Interleukine (IL) -1β. We show that uric acid, silica or Alum crystals but also titanium and silica nanoparticles induce an active release of ATP by cells, dependent of hemichannels. We highlight an innovative mechanism of activation of the NLRP3 inflammasome which involves ATP and its metabolites, in particular adenosine, through purinergic receptor families.

We then focused on the nanoparticle-induced lung inflammation in a murine model. We had shown in a previous study that this inflammation is dependent on IL-1α, IL-1β and their common receptor IL-1R1. Our *in vivo* results show that adenosine is involved in nanoparticle-induced inflammatory response and that airway inflammation is modulated by IL-33 and its receptor ST2.

Keywords: Adenosine, ATP, inflammasome, Interleukines (IL), crystals, nanoparticles.

Laboratoire d'Immunologie et de Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires
INEM, UMR7355
3B, rue de la Férollerie, 45071 Orléans cedex 2