



**HAL**  
open science

# Implication des récepteurs purinergiques dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages

Thomas Gicquel

► **To cite this version:**

Thomas Gicquel. Implication des récepteurs purinergiques dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2014. Français. NNT : 2014REN1B012 . tel-01165086

**HAL Id: tel-01165086**

**<https://theses.hal.science/tel-01165086v1>**

Submitted on 4 Jan 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*Sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

Pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*Mention : Biologie et Science de la Santé*  
**Ecole doctorale Vie Agro Santé (VAS)**

présentée par

**Thomas GICQUEL**

Préparée à l'unité de recherche Inserm UMR 991  
« Foie, Métabolismes et Cancer »  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Rennes

---

**Implication des  
récepteurs  
purinergiques dans  
l'activation de  
l'inflammasome  
NLRP3 dans les  
macrophages**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 1<sup>er</sup> décembre 2014**

devant le jury composé de :

**Michel CHIGNARD**

Directeur de recherche, UMR 874, Paris  
Rapporteur

**Philippe DEVILLIER**

Professeur à UPRES EA220 – Hôpital Foch, Suresnes  
Rapporteur

**Isabelle MOREL**

Professeur à l'université de Rennes 1  
Examineur

**Isabelle COUILLIN**

Chargé de recherche, UMR-INEM 7355, Orléans  
Examineur

**David GILOT**

Maitre de conférences à l'université de Rennes 1  
Examineur

**Vincent LAGENTE**

Professeur à l'université de Rennes 1  
Directeur de thèse



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*Sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

Pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*Mention : Biologie et Science de la Santé*  
**Ecole doctorale Vie Agro Santé (VAS)**

présentée par

**Thomas GICQUEL**

Préparée à l'unité de recherche Inserm UMR 991  
« Foie, Métabolismes et Cancer »  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Rennes

---

**Implication des  
récepteurs  
purinergiques dans  
l'activation de  
l'inflammasome  
NLRP3 dans les  
macrophages**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 1<sup>er</sup> décembre 2014**

devant le jury composé de :

**Michel CHIGNARD**

Directeur de recherche, UMR 874, Paris  
Rapporteur

**Philippe DEVILLIER**

Professeur à UPRES EA220 – Hôpital Foch, Suresnes  
Rapporteur

**Isabelle MOREL**

Professeur à l'université de Rennes 1  
Examineur

**Isabelle COUILLIN**

Chargé de recherche, UMR-INEM 7355, Orléans  
Examineur

**David GILOT**

Maitre de conférences à l'université de Rennes 1  
Examineur

**Vincent LAGENTE**

Professeur à l'université de Rennes 1  
Directeur de thèse



*« La recherche doit avant tout être un jeu et un plaisir »*

**Pierre Joliot**

## **REMERCIEMENTS**

### **A Monsieur le Professeur Vincent Lagente**

Qui m'a fait l'honneur de diriger cette thèse. Merci pour ton encadrement, ta disponibilité et la confiance que tu m'as donné depuis le début. Si ma thèse s'est aussi bien déroulée, c'est beaucoup grâce à toi !

### **A Madame le Professeur Isabelle Morel**

Qui me fait le plaisir d'être président du jury.

Merci pour ton soutien et ta gentillesse, je suis ravi de travailler à tes côtés.

### **A Monsieur le Professeur Philippe Devillier**

Qui me fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail.

Recevez mes sincères remerciements.

### **A Monsieur le Docteur Michel Chignard**

Merci pour l'intérêt que vous avez manifesté pour mon travail en vous engageant à être rapporteur.

### **A Madame le Docteur Isabelle Couillin**

Qui me fait le plaisir d'examiner cette thèse.

### **A Monsieur le docteur David Gilot**

Qui m'a fait faire mes premiers pas dans la recherche et me fait l'amitié d'évaluer mon travail.

Un grand merci à Tatiana, Florence, Elisabeth, Aude, Thomas et Sacha. La petite équipe 4 du bâtiment 8.

Merci au laboratoire de biologie cellulaire : Véronique, Pascale, Cécile, Vincent, Benoit et Florian, aux cotés de qui j'ai débuté sur ce sujet.

Merci également à toute l'unité UMR991 et particulièrement Pascal Loyer et Alain Fautrel avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer.

Merci à mes collègues du laboratoire de toxicologie qui m'ont accompagné durant cette thèse. Merci aussi aux différents stagiaires qui m'ont aidé sur ce projet.

A mes collègues de la faculté de pharmacie de Rennes qui m'ont permis de passer facilement de l'étudiant à l'enseignant pour mon plus grand plaisir.

A ma famille : Stéphanie, Nicolas, Marianne, Gwen, Jeanne, Lila, Rose, Mathieu, Nathan et bien sûr à mes parents.

A tous mes amis, de la FFJJPYT à aujourd'hui. Je sais bien que vous n'en avez rien à secouer de mes travaux de recherche, mais je vous aime bien quand même.

Après mon bac obtenu difficilement, je ne pensais pas continuer les études aussi longtemps, comme quoi, il n'y a pas que les aigles qui arrivent au sommet, les escargots aussi, même si ils en bavent.

Je ne dédie cette thèse à personne.

# TABLE DES MATIERES

## ABBREVIATIONS

## TABLE DES FIGURES

## TABLE DES TABLEAUX

<b>I) INTRODUCTION</b> .....	1
<b>1. Immunité innée et inflammation</b> .....	2
1.1. Cellules impliquées.....	3
1.1.1. Monocytes .....	3
1.1.2. Macrophages.....	5
1.1.2.1. Macrophages de type M1 .....	7
1.1.2.2. Macrophages de type M2 .....	7
<b>1.2. Récepteurs de l'immunité</b> .....	9
1.2.1. TLRs .....	9
1.2.2. NLRs.....	14
1.2.3. Inflammasome NLRP3 .....	16
1.2.3.1. Pré-activation de l'inflammasome NLRP3 .....	18
1.2.3.2. Activation de l'inflammasome NLRP3 .....	20
1.2.3.3. Pathologies associées à l'inflammasome NLRP3 .....	27
<b>1.3. Cytokines de l'inflammation</b> .....	29
1.3.1. Cytokines de la famille de l'IL-1.....	30
1.3.1.1. IL-1 $\beta$ .....	30
1.3.1.2. IL-1 $\alpha$ .....	34
1.3.1.3. IL-18 .....	35
1.3.1.4. IL-1Ra.....	36
1.3.1.5. IL-33 .....	37
1.3.2. IL-6 .....	38
1.3.3. TNF- $\alpha$ .....	38

1.3.4. Chimiokines.....	39
<b>2. ATP et récepteurs purinergiques .....</b>	<b>40</b>
<b>2.1. Adénosine-5'-triphosphate.....</b>	<b>40</b>
2.1.1. L'ATP.....	40
2.1.2. Libération d'ATP.....	42
2.1.3. Pannexine-1 .....	43
<b>2.2. Récepteurs purinergiques .....</b>	<b>46</b>
2.2.1. Récepteurs P1 .....	46
2.2.2. Récepteurs P2 .....	47
2.2.2.1. Récepteurs P2Y .....	48
2.2.2.2. Récepteurs P2X .....	49
<b>3. Lien entre les récepteurs purinergiques et l'inflammasome .....</b>	<b>55</b>
<b>II) OBJECTIFS .....</b>	<b>58</b>
<b>III) RESULTATS .....</b>	<b>62</b>
<b>Chapitre 1 : Implication du récepteur P2X7 dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 des macrophages traités par des analogues de l'ATP .....</b>	<b>63</b>
1. Contexte scientifique .....	64
Article 1 : "Involvement of purinergic receptors and NLRP3-inflammasome pathway in the ATP-induced cytokine release from macrophages"	
2. Résumé des principaux résultats.....	65
3. Résultats complémentaires .....	66
4. Conclusion.....	68
<b>Chapitre 2 : Implication des récepteurs purinergiques dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 des macrophages en réponse aux cristaux d'acide urique .....</b>	<b>69</b>
1. Contexte scientifique .....	70
Article 2 : "IL-1 $\beta$ production is dependent of the activation of purinergic receptors and NLRP3-inflammasome pathway in human macrophages" .....	71
2. Résumé des principaux résultats.....	101
3. Résultats complémentaires .....	102
4. Conclusion.....	108

<b>IV) DISCUSSION</b> .....	109
<b>V) CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	129
<b>IV) RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	134
<b>IV) ANNEXES</b> .....	157
Article 3 : “Role of matrix metalloproteinases and inflammasome pathway in the development of airway inflammation and fibrosis” .....	158

## ABBREVIATIONS

<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Alpha smooth muscle actin
<b>ADAM</b>	A disintegrin and metalloproteinase
<b>ADN</b>	Acide desoxyribonucléique
<b>ADNmt</b>	ADN mitochondrial
<b>ADP</b>	Adenosine diphosphate
<b>AIM2</b>	Absent in melanoma 2
<b>ALR</b>	AIM-like receptor
<b>AMM</b>	Autorisation de mise sur le marché
<b>AMPc</b>	Adenosine monophosphate cyclique
<b>AP-1</b>	Activator protein 1
<b>AR</b>	Adenosine receptor
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ASC</b>	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain
<b>ATD</b>	Acidic transactivation domain
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BIR</b>	Baculoviral inhibition of apoptosis repeat
<b>BMDM</b>	Bone Marrow-derived Macrophages
<b>BRCC3</b>	Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36
<b>CIITA</b>	Class II Transactivator
<b>CAPS</b>	Cryopyrin-associated periodic syndrome
<b>CARD</b>	Caspase recruitment domain
<b>CD</b>	Cluster of differenciation
<b>CINCA</b>	Chronic infantile neurological cutaneous articular syndrome
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>COX-2</b>	Cyclo-oxygenase de type 2
<b>CPA</b>	Cellule présentatrice d'antigène
<b>CpG</b>	Cytidine-phosphate-guanosine
<b>CREB</b>	cAMP response element-binding protein
<b>CRP</b>	Protéine C réactive
<b>DAMP</b>	Danger associated molecular pattern
<b>dsRNA</b>	double stranded RNA
<b>E-NPP</b>	Ecto-nucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase
<b>E-NTDPase</b>	Ecto-nucleoside triphosphate diphosphhydrolase
<b>EFS</b>	Etablissement français du sang
<b>FCAS</b>	Familial cold autoinflammatory syndrome
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
<b>HSC70</b>	Heat shock cognate 70
<b>HSP90</b>	Heat shock protein 90
<b>ICE</b>	Interleukine-1 $\beta$ converting enzyme
<b>IFI16</b>	Interferon $\gamma$ -inducible protein 16
<b>IFN</b>	Interféron
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IL-1F</b>	Interleukine 1 Family
<b>IL-1Ra</b>	Interleukine 1 Receptor antagonist
<b>IRAK</b>	IL-1 receptor-associated kinase

<b>IRF</b>	Interferon regulatory factor
<b>KO</b>	Knock-out
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>LRR</b>	Leucine rich repeat
<b>M-CSF</b>	Macrophages-colony stimulating factor
<b>Mal</b>	MyD88-adaptor-like
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MAVS</b>	Mitochondrial antiviral signaling protein
<b>miR</b>	Micro ARN
<b>MMP</b>	Matrix metalloproteinase
<b>MVB</b>	Corps multivésiculaire
<b>MWS</b>	Muckle–Wells syndrom
<b>MyD88</b>	Myeloid differentiation primary response gene 88
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
<b>NAIP</b>	NLR family apoptosis inhibitory protein
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor $\kappa$ B
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NLR</b>	NOD-like receptor
<b>NLRC</b>	NOD-, LRR-, and CARD domain-containing
<b>NLRP</b>	NOD-, LRR-, and pyrin domain-containing
<b>NO</b>	Nitric oxyde
<b>NOMID</b>	Neonatal onset multi-systemic inflammatory disease
<b>P2XR</b>	Purinergic 2 X receptor
<b>PAMP</b>	Pathogen associated molecular pattern
<b>PBMC</b>	Peripheral blood monocellular cell
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)
<b>PGE2</b>	Prostaglandine E2
<b>PMA</b>	Phorbol 12-myristate 13-acetate
<b>PRR</b>	Pattern Recognition Receptors
<b>PYD</b>	Pyrin domain
<b>RIG-I</b>	Retinoic acid-inducible gene I
<b>RLR</b>	RIG-I like Receptor
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>SGT1</b>	Suppressor of G2 allele of skp1
<b>ssARN</b>	Simple stranded RNA
<b>TGF</b>	Transforming growth factor
<b>Th</b>	T helper
<b>THP-1</b>	Human acute monocytic leukemia cell line
<b>TIR</b>	Toll-Interleukin-1 receptor
<b>TIMP</b>	Tissue inhibitors of metalloproteinase
<b>TIRAP</b>	TIR domain-containing adaptor protein
<b>TLR</b>	Toll Like Receptor
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
<b>TRAM</b>	TRIF-related adaptor molecule
<b>TRIF</b>	TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$
<b>TXNIP</b>	Thioredoxin (TRX)-interacting protein

## TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Morphologie des monocytes et des macrophages différenciés.....	3
Figure 2 : Origine et différenciation des monocytes et des macrophages.....	4
Figure 3 : Les TLRs et leurs ligands.....	11
Figure 4 : Signalisation du LPS après interaction avec le complexe TLR4-MD2.....	12
Figure 5 : Représentation schématique des différents NLRs.....	14
Figure 6 : Structure de l'inflammasome NLRP3.....	16
Figure 7 : Signaux entraînant la pré-activation de l'inflammasome NLRP3.....	18
Figure 8 : Activation de l'inflammasome NLRP3 par différents mécanismes.....	22
Figure 9 : Activation de l'inflammasome NLRP3 par les cristaux.....	24
Figure 10 : Mécanismes proposés de libération d'IL-1 $\beta$ .....	33
Figure 11 : Molécule d'adénosine-5'-triphosphate (ATP).....	40
Figure 12 : Mécanismes non lytiques de libération d'ATP par les cellules.....	42
Figure 13 : Représentation schématique de la libération d'ATP et son devenir.....	44
Figure 14 : Récepteurs membranaires de l'adénosine et de l'ATP.....	47
Figure 15 : Expression relative des inflammasomes dans les macrophages par RT-qPCR.....	66
Figure 16 : Expression relative des TLRs de macrophages humains par RT-qPCR.....	67
Figure 17 : Expression relative des TLRs de macrophages humains par RT-qPCR par rapport aux monocytes.....	67
Figure 18 : Mesure de la production d'IL-33 par des macrophages pré-activés par du LPS (0,1 $\mu$ g/mL) + MSU par technique ELISA.....	102
Figure 19 : Expression des TLRs des macrophages humains par RT-qPCR avec ou sans traitement par le MSU (500 $\mu$ g/mL).....	103
Figure 20 : Mesure de la production d'IL-1 $\beta$ par technique ELISA dans le surnageant de macrophages transfectés par des siRNA ciblant les récepteurs purinergiques en réponse au traitement par LPS (0,1 $\mu$ g/mL) + MSU (500 $\mu$ g/mL).....	104
Figure 21 : Mesure de la production d'IL-1 $\alpha$ par technique ELISA dans le surnageant de macrophages transfectés par des siRNA ciblant les récepteurs purinergiques en réponse au traitement par LPS (0,1 $\mu$ g/mL) + MSU (500 $\mu$ g/mL).....	104

Figure 22 : Mesure de l'expression de chimiokines dans le surnageant de macrophages en réponse au traitement par LPS (0,1 µg/mL) + MSU (500 µg/mL) sur une membrane Proteome Profiler (Human Cytokine Array Panel A) .....	105
Figure 23 : Mesure de l'expression des interleukines dans le surnageant de macrophages en réponse au traitement par LPS (0,1 µg/mL) + MSU (500 µg/mL) sur une membrane Proteome Profiler (Human Cytokine Array Panel A) .....	106
Figure 24 : Mesure de la production d'IL-6 par technique ELISA dans le surnageant de macrophages prétraités ou non par un antagoniste de P2X7R, l'A74, après traitement par LPS (0,1 µg/mL) + MSU (500 µg/mL) .....	107

## **TABLE DES TABLEAUX**

Tableau I : Exemples d'activateurs de l'inflammasome NLRP3 et maladies associées .....	20
Tableau II : Syndromes périodiques associés à la cryopyrine (CAPS) .....	28
Tableau III : Récepteurs purinergiques, agonistes et signalisations intracellulaires .....	48

# I) INTRODUCTION

# 1. Immunité innée et inflammation

L'immunité innée est un système universel de défense contre les pathogènes. L'identification de structures moléculaires par les récepteurs de l'immunité permet la reconnaissance du « soi » et du « non soi ».

La réponse inflammatoire fait partie de l'immunité innée et permet de lutter contre le « non soi » comme des organismes infectieux ou des particules exogènes. Chez les mammifères, l'inflammation va dans un premier temps être initiée par l'activation des mastocytes, polynucléaires, monocytes et macrophages (Medzhitov et Janeway, 2002).

Cette réponse va se caractériser par la sécrétion locale de cytokines pro-inflammatoires, comme le Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), mais aussi de chimiokines facilitant le recrutement de cellules immunitaires au site d'infection. L'activation des récepteurs de l'immunité va permettre le déclenchement de nombreux mécanismes comme la cascade du complément, la phagocytose ou l'activation de voies de signalisation pro-inflammatoires (Medzhitov et Janeway, 2002).

Une réponse immunitaire spécifique de l'antigène va ensuite être déclenchée. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) vont relayer l'information en activant les lymphocytes B et T, déclenchant ainsi l'immunité adaptative (Fearon et Locksley, 1996).

## 1.1. Cellules immunitaires

De nombreux types cellulaires sont impliqués dans l'immunité. Ainsi, le système phagocytaire mononucléé, représenté notamment par les monocytes circulants et les macrophages tissulaires, joue un rôle primordial dans l'immunité innée.

### 1.1.1. Les monocytes

Les monocytes du sang périphérique sont des cellules mobiles de 10 à 20  $\mu\text{m}$  de diamètre à noyau réniforme (Fig. 1A). Ces cellules représentent 3 à 7 % des leucocytes du sang périphérique chez l'homme et peuvent circuler pendant 1 à 3 jours avant de migrer vers les tissus et se différencier. Au point de vue structural, leurs appareils de Golgi sont bien développés, leurs cytoplasmes présentent des contours irréguliers et sont riches en vésicules et lysosomes (Gordon et Taylor, 2005).

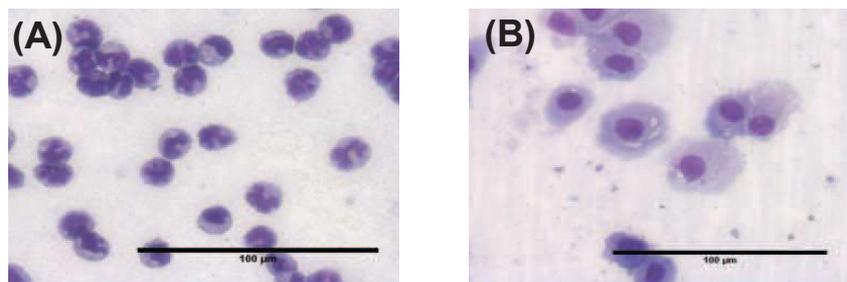


Figure 1. Morphologie des monocytes (A) et des macrophages différenciés (B)

Les monocytes représentent une population hétérogène de leucocytes circulants. Ces cellules peuvent ainsi intervenir rapidement sur le site infecté depuis la circulation périphérique. Les monocytes peuvent reconnaître les antigènes et produire des molécules effectrices permettant une défense contre les pathogènes ou les signaux de danger (Strauss-Ayali *et al.* 2007).

Les cellules du système phagocytaire mononucléé vont exprimer de nombreux récepteurs notamment CD14, le co-récepteur du lipopolysaccharide (LPS), ou des récepteurs aux chimiokines permettant leur migration vers les sites inflammatoires. Ces phagocytes peuvent également produire des ROS (Reactive oxygen species) ou des cytokines pro-inflammatoires comme le  $\text{TNF-}\alpha$  ou l' $\text{IL-1}\beta$  (Geissman *et al.* 2003).

Les phagocytes mononucléés ont tous pour origine une cellule souche hématopoïétique dans la moelle osseuse. Au cours de l'hématopoïèse, les précurseurs myéloïdes progéniteurs communs aux monocytes et aux granulocytes se différencient en réponse à des cytokines et des facteurs de croissance comme l'IL-3, le granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) ou le macrophages-colony stimulating factor (M-CSF). Les précurseurs myéloïdes se divisent et se différencient en monoblastes, en pro-monocytes avant de devenir des monocytes matures en quittant la moelle osseuse vers le sang périphérique (Mosser et Edwards, 2008).

Le passage des monocytes du flux sanguin vers les tissus se fait par adhérence à l'endothélium vasculaire grâce à des molécules d'adhérence exprimées à la surface des cellules. Les monocytes peuvent ensuite traverser l'endothélium pour sortir du flux sanguin et atteindre les tissus. Ils vont migrer vers différents tissus où ils se différencient en macrophages spécifiques (Fig. 2).

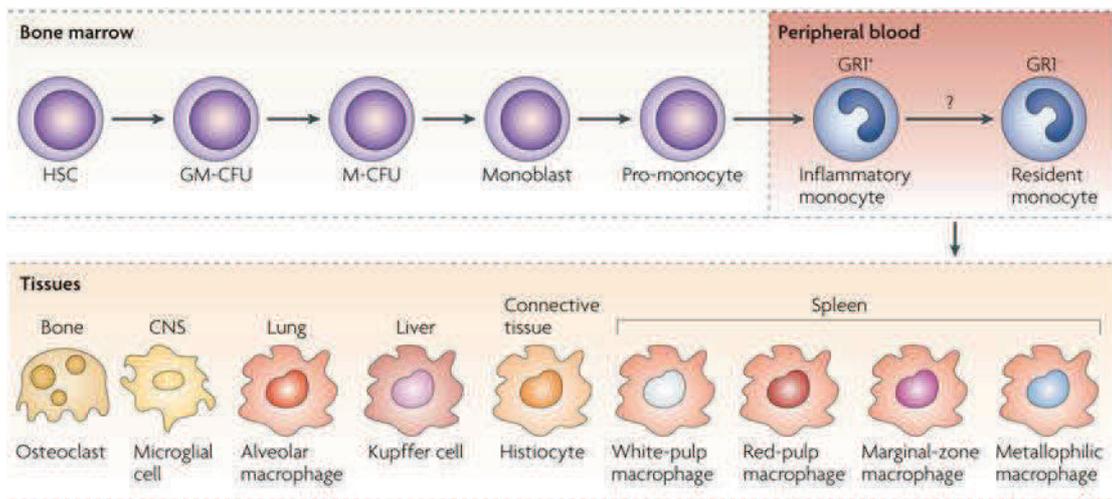


Figure 2 : Origine et différenciation des monocytes et des macrophages (Mosser et Edwards, 2008)

### 1.1.2. Les macrophages

La différenciation en macrophages entraîne une augmentation de la taille (25 à 50  $\mu\text{m}$ ) et de la granularité des cellules. Une réduction du ratio nucléo-cytoplasmique des cellules monocytaires est observée avec un noyau qui s'arrondit et un cytoplasme qui devient beaucoup plus volumineux (Fig. 1B). Le nombre d'organites intracellulaires et le taux d'enzymes lytiques devient plus important, ainsi la cellule aura une plus grande capacité de phagocytose (Sokol *et al.* 1987 ; McCullough *et al.* 1999).

Toutefois, les macrophages sont très hétérogènes au niveau de leur phénotype. Celui-ci est dicté par les stimuli que les macrophages ont reçu au cours de sa différenciation (Mosser et Edwards, 2008). Les macrophages sont ainsi généralement caractérisés par leurs marqueurs membranaires et la sécrétion de cytokines (Martinez et Gordon, 2014).

Les macrophages tissulaires dérivent des monocytes circulants, cependant une prolifération *in situ* des macrophages résidents a également été observée au niveau pulmonaire, péritonéal et du tissu adipeux (Jenkins *et al.* 2011 ; Amano *et al.* 2014).

Les macrophages font partie de la première ligne de défense contre les agents pathogènes. Au niveau tissulaire, leur nombre est régulé en fonction de la résistance à l'apoptose, le recrutement de monocytes du sang périphérique, et l'afflux en fonction du stimulus local (Landsman et Jung, 2007 ; Murphy *et al.* 2008).

En fonction de leur localisation cellulaire et la présence de médiateurs, les macrophages acquièrent des caractères particuliers de différenciations. Ils se différencient par exemple en cellules de Kupffer dans le foie, en ostéoclastes dans les os ou en macrophages alvéolaires dans les poumons (Fig. 2). Ces cellules à longue durée de vie vont développer des fonctions spécialisées et souvent être capables de survivre à la phagocytose.

Les macrophages sont les garants de l'homéostasie, la lutte contre les pathogènes et de l'intégrité des tissus. Ces cellules ont également un rôle essentiel dans la réparation tissulaire, la résolution de l'inflammation et l'angiogénèse (David Dong *et al.* 2009).

Cependant, les macrophages sont tout d'abord des phagocytes capables de migrer par chimiotactisme par des mouvements amiboïdes au niveau des foyers infectieux (Murray et Wynn, 2011a).

L'activation des macrophages entraîne une réponse immunitaire innée par augmentation de l'activité phagocytaire permettant de digérer les micro-organismes, des débris cellulaires ou des particules inertes aux côtés des polynucléaires neutrophiles (Murray et Wynn, 2011b). Lorsque les macrophages arrivent au contact de particules à phagocyter, ils vont créer des interactions avec celles-ci. La membrane plasmique des macrophages va s'invaginer autour de la particule qui va former un phagosome à l'intérieur de la cellule. Après fermeture, le phagosome subit une maturation en acidifiant son contenu et ce qui va favoriser la formation de ROS. En fusionnant avec des organites intracellulaires comme les endosomes et les lysosomes, il va y avoir formation d'un phagolysosome qui va libérer des hydrolases acides, des cathepsines et des défensines permettant la destruction des micro-organismes. (Underhill et Goodridge, 2012).

L'intervention des macrophages dans la défense face aux micro-organismes est le point de départ de l'élaboration de la réponse immunitaire adaptative. Suite à la phagocytose, les macrophages vont être impliqués dans la réaction immunitaire adaptative en jouant le rôle de cellule présentatrice d'antigènes (CPA) aux lymphocytes T et B (Murray et Wynn, 2011a). Enfin les macrophages vont libérer des médiateurs de l'inflammation permettant l'activation des cellules NK (Natural killer), des lymphocytes, ou des macrophages eux même, influençant ainsi le développement des réponses inflammatoires et immunitaires. Les médiateurs inflammatoires sécrétés sont des métabolites lipidiques, des ROS ou des cytokines comme l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  ou l'IL-6 (Mosser et Edwards, 2008).

L'environnement tissulaire va influencer la polarisation des macrophages qui acquièrent une spécificité fonctionnelle au sein du tissu. La polarisation des cellules a été mise en évidence sur les lymphocytes T helper, en réponse de type Th1 ou Th2 (Mosmann *et al.* 1989). De la même façon, les macrophages peuvent être activés de manière classique ou alternative, respectivement en phénotypes M1 ou M2 (Martinez et Gordon, 2014).

### ***1.1.2.1. Macrophages de type M1***

L'activation des macrophages en phénotype M1 lui confère des propriétés immunitaires de type Th1 et pro-inflammatoires. Ce phénotype va être particulièrement impliqué dans l'inflammation et la lutte contre les micro-organismes et les cellules tumorales (Martinez *et al.* 2008).

Plusieurs stimuli vont permettre la différenciation des macrophages en phénotype M1. L'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) sécrété par les lymphocytes, ou par les macrophages eux même, va induire cette polarisation (Mosser et Edwards, 2008). De même le GM-CSF ou le LPS sont des agents inducteurs de la polarisation M1 des macrophages (Mantovani *et al.* 2004 ; Benoit *et al.* 2008 ; Martinez *et al.* 2008 ; Mosser et Edwards, 2008).

Les macrophages M1 expriment de nombreux récepteurs de l'immunité et vont sécréter des cytokines comme l'IL-12, le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 ou CXCL-10. Cette production va permettre d'amplifier la polarisation de type M1 de façon autocrine (Schroder *et al.* 2004).

### ***1.1.2.2. Macrophages de type M2***

Les macrophages de type M2 sont qualifiés d'immunorégulateurs, ils vont sécréter peu d'IL-12, promouvoir la réponse immunitaire de type 2, l'angiogénèse et la réparation tissulaire (Gordon et Taylor, 2005). Ces cellules sont classées en trois sous catégories. Les macrophages M2a sont dits « réparateurs » et les macrophages M2b et M2c qui sont « régulateurs et anti-inflammatoires » (Mosser et Edwards, 2008 ; Martinez *et al.* 2008).

Les macrophages de type M2a, ou macrophages activés de façon alternative, sont induits par les cytokines IL-4 et IL-13 (Mantovani *et al.* 2004). Ces cytokines produites lors d'une réaction immunitaire de type Th2 par les lymphocytes Th2, les mastocytes, les basophiles ou les éosinophiles vont inhiber la polarisation de type M1 et induire une polarisation de type M2a (Martinez *et al.* 2009 ; Gordon et Martinez, 2010).

La polarisation en macrophages M2b nécessite une activation par des agonistes de Toll like receptors (TLRs), du récepteur à l'IL-1 et par des complexes immuns (Mantovani *et al.* 2004). Les macrophages M2b sont considérés comme des macrophages impliqués dans des processus de régulation de l'inflammation (Mosser et Edwards, 2008).

Les macrophages M2c sont principalement induits par les glucocorticoïdes, l'IL-10 et le Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Gordon et Martinez, 2010 ; Benoit *et al.* 2008). Les macrophages anti-inflammatoires de type M2c interviennent dans la dernière phase du processus d'inflammation et la restauration de l'homéostasie tissulaire. Ces cellules sont impliquées dans la phagocytose des cellules en apoptose et la résolution de l'inflammation (Martinez *et al.* 2008).

La polarisation des macrophages est induite par le microenvironnement, ceci va modifier leur production de médiateurs de l'inflammation, leurs activités enzymatiques et phagocytaires (Martinez *et al.* 2008).

## 1.2. Récepteurs impliqués dans l'immunité

Une étape clé de l'immunité innée et de la réponse inflammatoire est la reconnaissance des composés d'origine pathogène, appelés Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) ou des molécules de dangers, les Danger-associated molecular patterns (DAMPs) par les récepteurs de l'immunité innée, les Pattern recognition receptors (PRRs).

Ces récepteurs des cellules de l'immunité innée sont répartis selon leur localisation, membranaire ou intracytoplasmique. Les TLRs et les C-type lectine receptors (CLRs) sont des PRRs transmembranaires. Les PRRs cytoplasmiques sont composés des RIG-I like Receptors (RLRs) reconnaissant essentiellement des composants viraux, des AIM-2 like receptors (ALRs) et des NOD-like receptors (NLRs) (Takeuchi et Akira, 2010).

### 1.2.1. Les TLRs

Les récepteurs Toll ont été mis en évidence chez la mouche drosophile (*Drosophila melanogaster*) comme des récepteurs de l'immunité permettant de lutter contre les infections fongiques (Imler et Hoffman, 2001). Ce même type de récepteur a également été trouvé chez les mammifères. Etant très conservés au cours de l'évolution, ils présentent les mêmes spécificités structurales que la molécule Toll de la drosophile.

Le premier homologue de ces récepteurs a été décrit par Medzhitov et a été mis en évidence comme étant impliqué dans l'induction des gènes entraînant une réponse inflammatoire et correspondait au TLR4.

Les TLRs sont des protéines situées sur la membrane plasmique ou la membrane des endosomes. Ces récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance des pathogènes et jouent un rôle primordial dans l'immunité innée. La fixation des PAMPs provenant de bactéries, champignons, virus ou de protozoaires sur les récepteurs de l'immunité innée va entraîner une réponse inflammatoire (Janeway et Medzhitov, 2002).

Chez l'homme, 10 TLRs différents (TLR1 à TLR10) ont été identifiés et sont localisés sur de nombreux types cellulaires. On trouve les TLRs dans les cellules immunitaires comme les macrophages, les cellules dendritiques, les polynucléaires ou les lymphocytes mais également sur des cellules en contact avec le milieu extérieur comme les cellules pulmonaires ou les cellules épithéliales. La fonction primaire des TLRs est la reconnaissance des pathogènes et l'activation des cellules qui les portent (Akira *et al.* 2006).

Ces protéines transmembranaires de type I sont toutes structurées en trois domaines. Un domaine extracellulaire Leucine-rich repeat (LRR), un domaine transmembranaire et un domaine intracytoplasmique Toll/IL-1 Receptor (TIR).

Le domaine TIR des TLRs, présente une grande similarité avec celui des récepteurs de la famille de l'IL-1. Cependant, les domaines extracellulaires sont différents de ceux des TLRs car ils présentent un domaine LRR permettant la reconnaissance des composés bactériens, alors que le récepteur à l'IL-1 possède un domaine immunoglobuline-like (Taketa et Akira, 2005).

Les LRR sont des motifs protéiques riches en leucine contenant entre 20 et 29 résidus, ils sont présents dans de nombreuses protéines et permettent la reconnaissance des composés microbiens par des interactions avec des protéines, des lipides ou des sucres d'origine cellulaire ou pathogène (Kobe et Kajava, 2001).

Les TLRs peuvent être localisés à la surface de la cellule comme TLR1, 2, 4, 5 et 6 ; ce qui permet la détection de composés microbiens extracellulaires, tels que les lipopeptides, la flagelline ou le lipopolysaccharide (LPS).

Ils peuvent également être localisés dans les endosomes ou lysosomes des cellules comme les TLRs 3, 7, 8 et 9 qui reconnaissent des acides nucléiques exogènes, dsRNA (double-stranded RNA), ssARN (simple-stranded RNA) ou CpG (cytidine-phosphate-guanosine) DNA (Fig. 3). Le TLR10 a été identifié chez l'homme et semble avoir des similarités avec les TLR1 et TLR6 (Takeda et Akira, 2005).

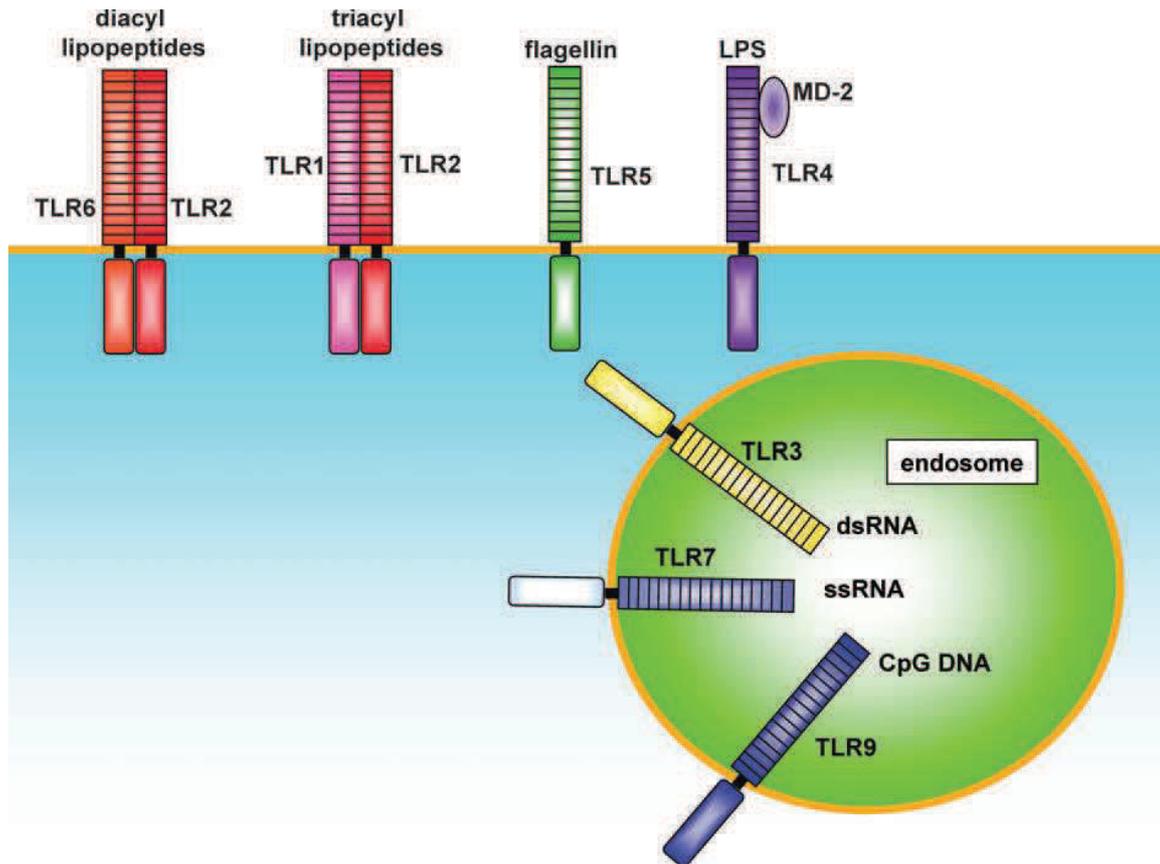


Figure 3. Les TLRs et leurs ligands (Taketa et Akira, 2005)

Ainsi chaque TLR possède ses propres ligands activateurs, par exemple le LPS est spécifiquement reconnu par le TLR4. Le LPS ou endotoxine bactérienne, est bien connu pour stimuler les réponses inflammatoires de l'organisme et peut être responsable de chocs septiques (Beutler et Rietschel, 2003).

Cette molécule est le PAMP le plus utilisé en laboratoire, elle représente un composant de la membrane cellulaire externe des bactéries Gram négatif. Le LPS est un complexe glycolipidique composé d'un domaine hydrophile polysaccharidique et d'un domaine hydrophobe, le lipide A, responsable de son immunogénicité par fixation au TLR4 (Netea *et al.* 2002). TLR4 est indispensable à la transduction du signal en réponse au LPS, comme il a été montré à l'aide de souris TLR4 *-/-* ou d'un TLR4 tronqué au niveau de son domaine C-terminal (Kim *et al.* 2007).

Pour activer TLR4, le LPS va se lier à la LPS-Binding Protein (LBP) qui initie la réponse cellulaire en formant un complexe avec le co-récepteur membranaire CD14 des cellules myéloïdes. CD14 est une molécule à structure glycosylphosphatidylinositol ancrée dans la membrane et principalement exprimée chez les monocytes et les macrophages. Cependant la présence de CD14 soluble dans le sérum permet aux cellules ne possédant pas de CD14, comme les cellules épithéliales ou endothéliales, d'être activées par le LPS (Akira *et al.* 2001).

La protéine extracellulaire Myeloid Differentiation factor 2 (MD-2) va s'associer au LRR du TLR4 et permettre la formation d'un complexe avec le LPS induisant la dimérisation du récepteur à la surface de la cellule (Fig. 4).

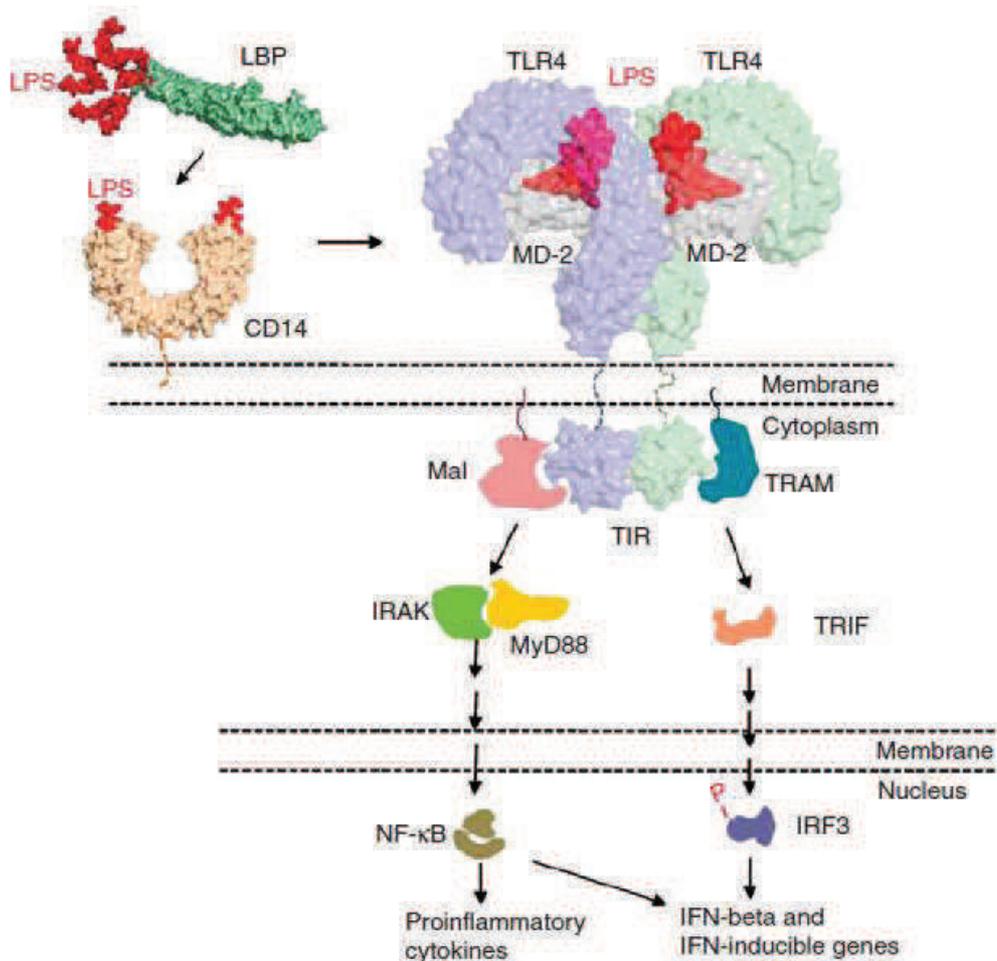


Figure 4. Signalisation du LPS après interaction avec le complexe TLR4-MD2 (Barochia *et al.* 2011)

Il existe plusieurs protéines adaptatrices au domaine TIR de TLR4 : MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88), TIRAP (TIR domain-containing adaptor protein) également appelé Mal (MyD88-adaptor-like), TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ ), TRAM (TRIF-related adaptor molecule), et IRAK (IL-1 receptor-associated kinase). Les TLRs utilisent différentes combinaisons de protéines adaptatrices pour la transduction du signal, mais seul le TLR4 peut utiliser toutes ces protéines (Lu *et al.* 2008).

Le complexe LPS-TLR4-MD-2 va entraîner l'activation du récepteur et la translocation de facteurs de transcription dans le noyau comme AP1 (Activator protein 1), Interferon regulatory factor (IRF) 3, IRF5 ou NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor  $\kappa$ B) (Lu *et al.* 2008).

Le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B joue un rôle important dans le système immunitaire (Li et Verma 2002 ; Bonizzi et Karin, 2004). L'activation de la voie NF- $\kappa$ B va induire la transcription de gènes codant pour des chimiokines et des molécules d'adhérence ce qui va permettre le recrutement de macrophages et des cellules dendritiques. Cette voie va également induire les gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, la pro-IL-1 $\beta$ , la pro-IL-18 et des protéines inflammatoires comme NLRP3 (Bauernfeind *et al.* 2009).

La protéine MyD88 semble nécessaire à la transduction du signal en réponse au LPS, car les souris déficientes en MyD88 ne produisent pas de cytokines pro-inflammatoires et ne font pas de choc septique en réponse au LPS (Kawai *et al.* 1999).

Afin d'éviter une production excessive de cytokines en réponse à l'activation de TLR4 pouvant conduire à un sepsis, une régulation négative de la voie de signalisation est possible (Kobayashi *et al.* 2002). De nombreux inhibiteurs de cette cascade de signalisation régulent la transduction du signal pro-inflammatoire. La reconnaissance des microorganismes peut également se faire de manière indépendante des TLRs, par exemple par les NLRs.

## 2.2. Les NLRs

Contrairement aux TLRs, les NLRs sont des PRRs cytoplasmiques qui ne contiennent pas de domaine TIR. Vingt-deux NLRs, anciennement appelés CATERPILLER, ont été identifiés chez l'homme par leur domaine structural et leurs relations phylogénétiques (Ting *et al.* 2008). Ceux-ci ont été subdivisés en 5 catégories : NLRA, NLRB, NLRC, NLRP, et NLRX. Ils possèdent tous un domaine NACHT central et un domaine LRR au niveau C-terminal, excepté pour NLRP10. Ce sont leurs domaines N-terminaux qui permettent leur classification (Fig. 5) (Saxena et Yeretssian, 2014).

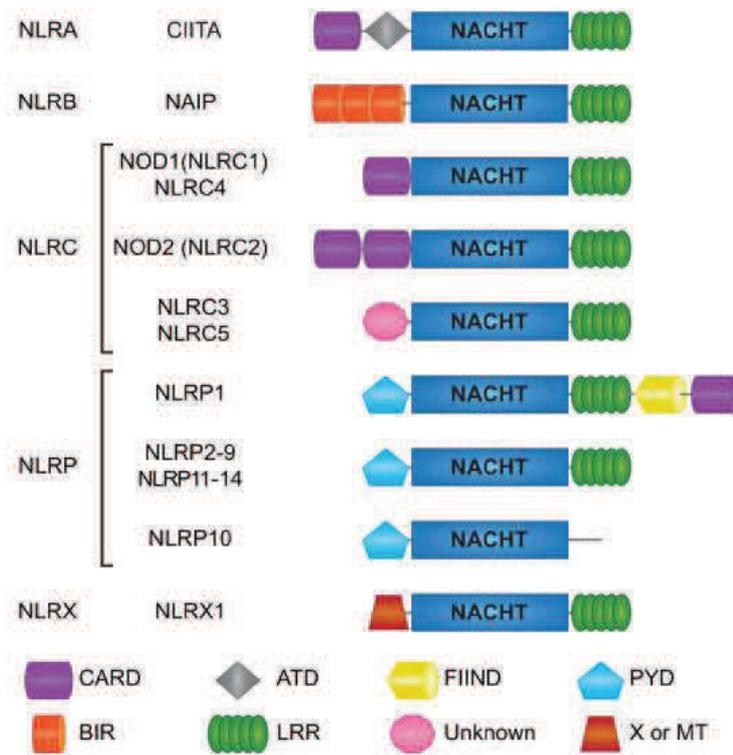


Figure 5. Représentation schématique des différents NLRs (Saxena et Yeretssian, 2014)

NLRA possède un acidic transactivation domain (ATD) et était précédemment appelé Class II Transactivator (CIITA). Cette protéine est un transactivateur du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) et représente le principal régulateur de l'expression des gènes du CMH II (Nickerson *et al.* 2001).

NLRB, ou NAIP (NLR family, apoptosis inhibitory protein), possède un domaine Baculoviral inhibition of apoptosis repeat (BIR) en position N-terminale. Cette famille de protéines joue un rôle dans la survie cellulaire et la défense contre les pathogènes (Lightfield *et al.* 2008).

NLRX1 est le seul membre de la famille NLRX. Sa séquence N-terminale permet son adressage à la membrane mitochondriale. Bien qu'il ait été mis en évidence dans la production de ROS induite par le TNF- $\alpha$  et dans la lutte contre les pathogènes, son rôle précis est encore mal connu (Moore *et al.* 2008).

Si le groupement N-terminal correspond à un domaine CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain), ces NLRs sont de la famille NLRC ; s'il correspond à un domaine PYD (Pyrin Domain), les NLRs sont de la famille NLRP.

Les NLRCs (NLRC1-5) et notamment NLRC1, ou nucleotide-binding oligomerization domain-1 (NOD1) et NLRC2 (NOD2) sont très importants dans la reconnaissance des pathogènes, comme les peptidoglycanes d'origine bactérienne et dans l'homéostasie immunitaire (Philpott *et al.* 2014).

La famille de NLRs la plus connue est celle des NLRPs (NLRP1-14), en effet certains membres de cette famille peuvent former des complexes oligomériques, les inflammasomes après activation par des perturbations cytosoliques (Schroder et Tschopp, 2010).

Certains NLRs, comme NLRC1, NLRC2, NLRC5 ou NLRX1 sont incapables de former des inflammasomes, pourtant ceux-ci jouent un rôle dans la réponse inflammatoire (Magalhaes *et al.* 2011). Cependant, NLRC1 et NLRC2 sont capables de former le NODosome, un complexe macromoléculaire permettant d'activer la voie NF- $\kappa$ B et la voie des MAPKs (Keestra et Bäumlér, 2014).

### 1.2.3. Inflammasome NLRP3

La protéine NLR la plus étudiée est NLRP3, anciennement appelée NALP3 ou Cryopyrine. Comme toutes les NLRs, exceptées NLRP1 et NLRP10, la protéine NLRP3 est constituée d'un domaine PYD en position N-terminale, un domaine NACHT et un domaine LRR en position C-terminale (Fig. 6). Cette protéine est un élément d'un complexe macromoléculaire, l'inflammasome NLRP3 (Menu et Vince, 2011).

Martinon *et al.* (2002) ont décrit l'inflammasome comme une plate-forme intracytoplasmique de haut poids moléculaire (de l'ordre de  $10^6$  Da) permettant la maturation de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ . Les inflammasomes sont des complexes protéiques intracellulaires de l'immunité innée constitués d'un NLR ou d'un ALR, d'une protéine adaptatrice et d'une cysteine protéase.

Parmi les 22 NLRs décrits chez l'homme, seuls NLRP1, NLRP3, NLRC4 et AIM2 peuvent former des inflammasomes. D'autres protéines impliquées dans l'immunité comme NLRP6, NLRP7, RIG-1, pyrin et IFI16 (Interferon  $\gamma$ -inducible protein 16) ont été mises en évidence comme pouvant former des inflammasomes, mais celles-ci sont encore mal connues (Sutterwala *et al.* 2014).

Le plus connu des inflammasomes est l'inflammasome NLRP3. Cet inflammasome est très exprimé dans les cellules myéloïdes comme les monocytes ou les macrophages (Guarda *et al.* 2011). L'inflammasome NLRP3 contient une protéine adaptatrice ASC (Adaptor protein apoptosis-associated speck like protein containing a CARD), la caspase-1 et la protéine NLRP3 (Fig. 6).

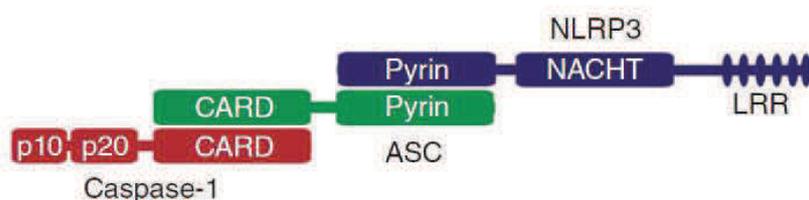


Figure 6. Structure de l'inflammasome NLRP3 (Menu et Vince, 2011)

Après activation, NLRP3 s'oligomérisé *via* des interactions homotypiques entre les domaines NACHT et présente son domaine Pyrin au domaine Pyrin de la protéine accessoire ASC, indispensable à l'activation de l'inflammasome (Dinarello, 2007). ASC interagit *via* son domaine CARD avec le domaine CARD de la pro-caspase-1. Le recrutement de la pro-caspase-1 entraîne l'oligomérisation et l'autocatalyse en caspase-1.

La caspase-1, anciennement appelée IL-1 $\beta$ -converting-enzyme (ICE), permet le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  (Cerretti *et al.* 1992 ; Thornberry *et al.* 1992). Cette enzyme va cliver le pro-peptide au niveau du résidu acide aspartique en position 116, produisant ainsi l'IL-1 $\beta$  mature, biologiquement active, qui sera libérée dans l'espace extracellulaire. Cette cystéine protéase est aussi capable de cliver d'autres cytokines pro-inflammatoires comme la pro-IL-18 et l'IL-33 (Schmitz *et al.* 2005 ; Gu *et al.* 1997).

Parmi les différentes caspases, seule la caspase-1 est capable de cliver la pro-IL-1 $\beta$ . En effet, cette enzyme est une caspase inflammatoire, contrairement aux caspases-3, -8 et -9 qui sont des caspases impliquées dans l'apoptose (Los *et al.* 1999). Toutefois, la caspase-1 joue également un rôle dans la mort cellulaire en réponse aux agents pathogènes, dans le cas de la pyroptose (Cookson et Brennan, 2001 ; Denes *et al.* 2012).

La caspase-1 est synthétisée sous forme de zymogène. La pro-caspase-1 étant inactive, elle nécessite une activation par un inflammasome pour devenir active. NLRP3 n'est pas le seul inflammasome permettant d'activer la caspase-1, en effet NLRP1, NLRP6, NLRP7, NLRC4 et AIM2 en sont également capables (Khare *et al.* 2012).

Lors de l'assemblage de l'inflammasome NLRP3, la caspase-1 est activée par formation d'un hétérotétramère  $\alpha\beta 2$  constitué de deux protéines p20, contenant le site actif, et de deux sous-unités p10 (Ogura *et al.* 2006 ; Schroder *et al.* 2010).

Il a cependant été montré que l'activation de la caspase-1 peut se faire indépendamment de l'inflammasome NLRP3 et donc entraîner une libération d'IL-1 $\beta$ , sans formation du complexe intracytoplasmique (Dinarello, 2010 ; Netea *et al.* 2009).

### 1.2.3.1. Pré-activation de l'inflammasome NLRP3

Pour être actif dans les macrophages, l'inflammasome NLRP3 a besoin de deux signaux, un premier pour le pré-activer, c'est-à-dire induire l'expression de la pro-IL-1 $\beta$  et de la protéine NLRP3 et un second pour permettre l'assemblage du complexe macromoléculaire.

La protéine NLRP3 est exprimée à un taux basal dans les cellules myéloïdes qui ne suffit pas à la formation de l'inflammasome (Guarda *et al.* 2011). Ainsi, une pré-activation, ou priming, est nécessaire à la transcription de NLRP3, alors qu'elle ne paraît pas indispensable pour la protéine accessoire ASC ou la pro-caspase-1 (Bauerfeind *et al.* 2009). Cette pré-activation va se faire par des cascades de signalisation impliquant la voie NF- $\kappa$ B *via* les récepteurs au TNF ou à l'IL-1, les TLRs ou les NLRs comme NOD2.

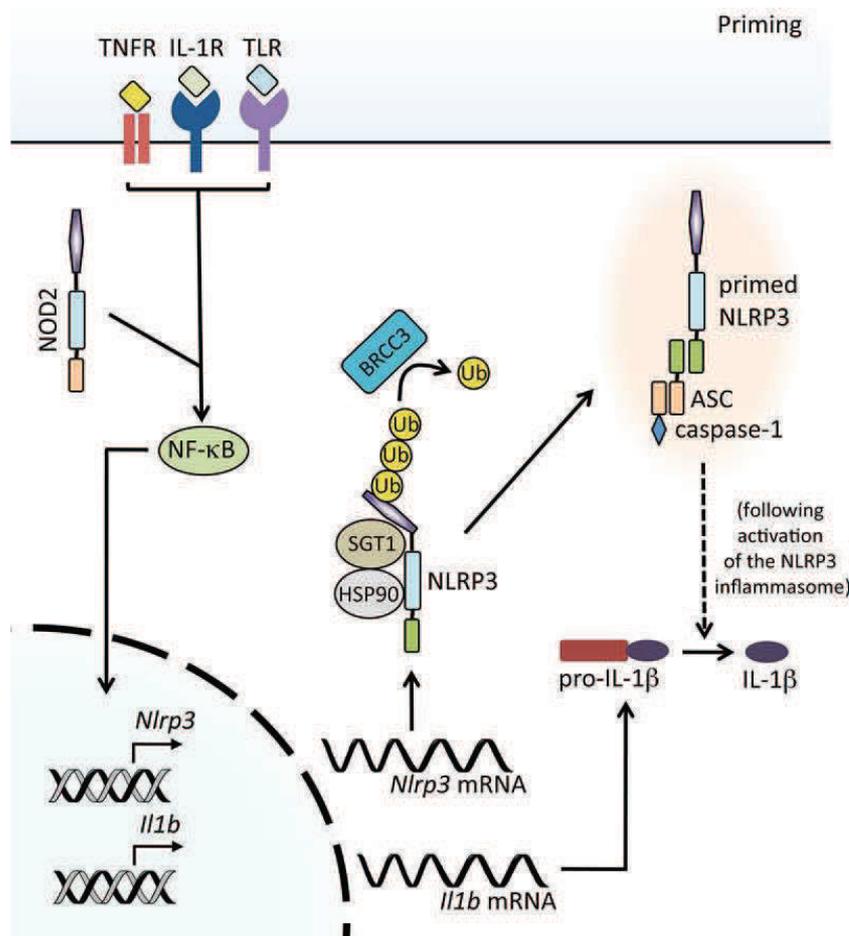


Figure 7. Signaux entraînant la pré-activation de l'inflammasome NLRP3 (Sutterwala *et al.* 2014)

NLRP3 est maintenue dans un état inactif par ubiquitination du domaine LRR au niveau cytosolique. Une pré-activation est nécessaire pour activer la désubiquitinase BRCC3 (Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36) et dissocier les protéines HSP90 (Heat shock protein 90) et SGT1 (suppressor of G2 allele of skp1) empêchant l'oligomérisation de l'inflammasome NLRP3 (Sutterwala *et al.* 2014) (Fig. 7).

La pré-activation nécessite une induction de l'expression de l'ARNm d'IL-1 $\beta$  et de NLRP3 donc un temps de plusieurs heures alors que l'activation du complexe pourra se faire en 10 minutes dans la cellule (Juliana *et al.* 2012).

### 1.2.3.2. Activation de l'inflammasome NLRP3

Les inflammasomes possèdent de nombreux activateurs, des PAMPs ou des DAMPs. Ainsi, l'inflammasome NLRP1 peut être activé par des composés bactériens comme le Muramyl dipeptide (MDP) ou la toxine de *Bacillus anthracis*. NLRC4 peut être activé par la flagelline des bactéries à Gram négatif comme *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, ou *Pseudomonas aeruginosa*. L'inflammasome AIM2 peut lui directement lier de l'ADN double brin (ADNs) pour entraîner son activation (Rathinam *et al.* 2010).

L'inflammasome NLRP3 possède quant à lui de très nombreux activateurs d'origine très variée dont certains impliqués dans des pathologies (Tableau I).

Activator class	Activator	Disease associations
Whole pathogen	<i>Candida albicans</i>	Infection
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	Infection
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Infection
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Infection
	Influenza virus	Infection
	Sendai virus	Infection
	Adenovirus	Infection
Pathogen-associated molecules	Bacterial pore-forming toxins	Infection
	Hemozoin	Cerebral malaria
Environmental insults	Silica	Silicosis
	Asbestos	Asbestosis
	Skin irritants	Contact hypersensitivity reactions
Endogenous danger signals	Ultraviolet light	Sunburn
	ATP	Injury or necrotic cell death
	Glucose	Metabolic syndrome
	MSU	Gout
	Calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD)	Pseudogout
	Amyloid $\beta$	Alzheimer's disease
	Hyaluronan	Injury
Adjuvant	Alum	

Tableau I. Exemples d'activateurs de l'inflammasome NLRP3 et maladies associées (Schröder *et al.* 2010)

Les DAMPs activateurs de l'inflammasome NLRP3 peuvent être libérés suite à une infection, un stress métabolique ou une lésion cellulaire. Par exemple, l'ATP extracellulaire libéré est connu pour activer l'inflammasome NLRP3 (Mariathasan *et al.* 2006), tout comme les cristaux d'acide urique, monosodium urate (MSU) (Martinon *et al.* 2006).

Le seuil d'activation de l'inflammasome NLRP3 va dépendre de l'agoniste et du type cellulaire. Par exemple, pour le même agoniste, le seuil d'activation de l'inflammasome NLRP3 va être plus bas pour les cellules dendritiques que pour les macrophages (Sutterwala *et al.* 2014).

Etant donné l'hétérogénéité des molécules pouvant activer l'inflammasome NLRP3, une interaction directe entre ces molécules et NLRP3 paraît très peu probable. Ainsi, de nombreux mécanismes sont proposés pour l'activation de cet inflammasome.

Trois modèles sont majoritairement exprimés dans la littérature. L'activation de l'inflammasome NLRP3 par un efflux potassique, par les ROS ou par la rupture des lysosomes (Schröder *et al.* 2010 ; Bauerfeind *et al.* 2011a ; Bauerfeind *et al.* 2011b).

De nombreuses observations confirment le rôle des flux ioniques dans l'activation de l'inflammasome car tous les activateurs de NLRP3 induisent un flux de  $K^+$  mais son mécanisme exact demeure un mystère.

La concentration intracytoplasmique en potassium dans les cellules saines est comprise entre 140 et 150 mM. In vitro, pour déclencher l'activation de l'inflammasome, la concentration en  $K^+$  doit devenir inférieure à 70 mM, comme c'est le cas après activation par de l'ATP. A l'inverse, l'activation de l'inflammasome NLRP3 peut être bloquée dans un milieu contenant une très forte concentration en potassium (Pétrilli *et al.* 2007 ; Tschopp et Schroder, 2010). La nécessité d'un efflux de potassium a été confirmée en bloquant les canaux potassiques (Lamkanfi *et al.* 2009).

Suite à la pré-activation (priming step), l'activation de l'inflammasome NLRP3 (activation step) peut se faire par efflux de potassium, par exemple suite à la stimulation par des toxines formant des pores comme la nigéricine, la maïtotoxine ou des antibiotiques (Allam *et al.* 2011).

L'efflux potassique peut également provenir de l'activation du récepteur P2X7R par de l'ATP, ce qui va entraîner l'activation de la caspase-1 (Fig. 8).

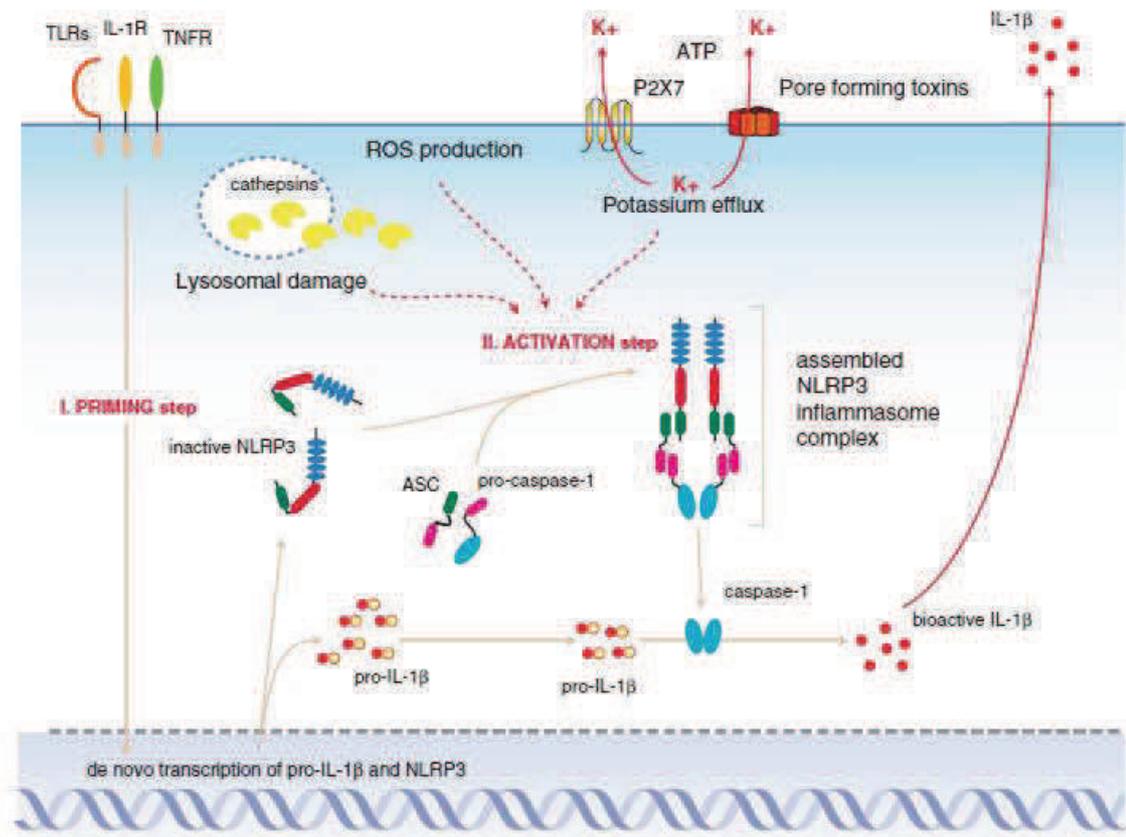


Figure 8. Activation de l'inflammasome NLRP3 par différents mécanismes (Bauerfeind *et al.* 2011a)

Le récepteur purinergique P2X7 a rapidement été mis en évidence comme un acteur de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Kahlenberg et Dubyak, 2004). Ce récepteur canal permet l'efflux rapide de potassium par la cellule, ainsi que le recrutement de l'hémicanal pannexine-1 et la formation d'un pore permettant l'entrée cytoplasmique de facteurs extracellulaires pouvant activer l'inflammasome (Pelegriin et Surprenant, 2006 ; Ferrari *et al.* 2006 ; Kanneganti *et al.* 2007).

Récemment, il a été montré que le mouvement calcique provenant du réticulum endoplasmique (RE) jouait un rôle dans l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 mais ce mécanisme reste encore mal connu (Lee *et al.* 2012).

Plusieurs études suggèrent que les flux ioniques induisent un dysfonctionnement mitochondrial nécessaire à l'activation de l'inflammasome NLRP3. Il a d'ailleurs été montré que le flux calcique associé à un stress du RE provoque des lésions mitochondriales qui vont produire des ROS d'origine mitochondriale (Murakami *et al.* 2012).

Les ROS semblent avoir un rôle crucial dans l'activation de l'inflammasome (Fig. 8). En effet, les activateurs de l'inflammasome NLRP3 induisent tous une production de ROS. Cette production est fréquemment accompagnée d'un efflux potassique, ainsi de faibles concentrations intracellulaires en  $K^+$  pourrait induire la production de ROS et vice-versa (Kowaltowski *et al.* 2009 ; Tschopp et Schroder, 2010).

Certains auteurs pensent que les ROS sont des messagers secondaires indispensables à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Cruz *et al.* 2007 ; Martinon, 2010a). De part leur courte durée de vie, elles joueraient un rôle de signal d'alarme (Tschopp et Schroder, 2010). Zhou *et al.* (2010) ont montré que les ROS produites pouvaient permettre la fixation de la thioredoxin-interacting protein (TXNIP) à la protéine NLRP3 et permettre ainsi l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse aux cristaux de MSU. D'autres auteurs montrent que les ROS sont uniquement indispensables à la pré-activation et l'induction de l'expression de NLRP3, pas pour l'activation du complexe (Bauerfeind *et al.* 2011b). En effet, la production de ROS n'est pas suffisante à cette activation, ceci signifie donc que d'autres voies sont nécessaires.

Au niveau cellulaire, la mitochondrie est la source principale de ROS, grâce aux Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxydases (NADPH oxydases) (Yang *et al.* 2011). Ainsi, le dysfonctionnement mitochondrial pourrait activer l'inflammasome NLRP3 par production de ROS, mais également *via* l'ADN mitochondrial (ADNmt) (Zhou *et al.* 2011 ; Nakahira *et al.* 2011). Shimada *et al.* (2012) pensent qu'un signal activateur de l'inflammasome induit un dysfonctionnement mitochondrial qui permettra de produire de l'ADNmt oxydé dans le cytosol et se lier directement à l'inflammasome NLRP3 pour l'activer (Shimada *et al.* 2012).

La protéine NLRP3 à l'état inactif est localisée proche du réticulum endoplasmique alors que la protéine adaptatrice ASC est associée à la mitochondrie. Lors de l'activation de l'inflammasome, les protéines NLRP3 et ASC se localisent dans l'espace périnucléaire avec la mitochondrie (Zhou *et al.* 2011 ; Misawa *et al.* 2013).

Un autre mode d'activation de l'inflammasome NLRP3 est la rupture lysosomale par les activateurs de grande taille comme les cristaux de silice, d'aluminium ou de MSU (Halle *et al.* 2008 ; Dostert *et al.* 2008, Hornung *et al.* 2008, Cassel *et al.* 2008).

Il semblait que l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les cristaux nécessitait la phagocytose, pourtant des cellules incapables de phagocyter comme les kératinocytes peuvent activer l'inflammasome NLRP3 et sécréter de l'IL-1 $\beta$  en réponse à des particules (Yazdi *et al.* 2010). Un mécanisme de « phagocytose frustrée » des particules et des cristaux de grande taille a donc été proposé (Cassel *et al.* 2008). Ce mécanisme met en jeu le cytosquelette, en effet l'inhibition des filaments du cytosquelette par des molécules comme la colchicine ou la cytochalasine D diminue la libération d'IL-1 $\beta$  (Martinon *et al.* 2006 ; Dostert *et al.* 2008).

Après internalisation des cristaux, une clairance inefficace va entraîner la production de ROS (Martinon *et al.* 2009), un efflux de potassium (Pétrilli *et al.* 2007), une déstabilisation du phagosome et une rupture du lysosome. Ceci va entraîner le relargage de son contenu dans le cytoplasme dont des protéases lysosomales comme la cathepsine B qui va entraîner l'activation de la caspase-1 (Hornung *et al.* 2008) (Fig. 9).

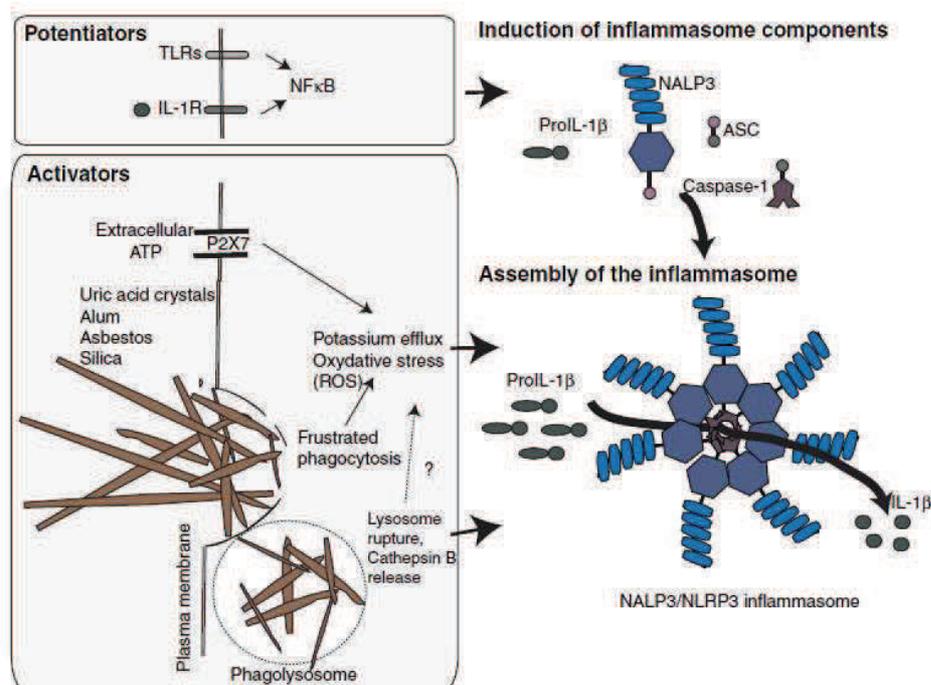


Figure 9. Activation de l'inflammasome NLRP3 par les cristaux (Martinon, 2010b)

L'acide urique est un catabolite des purines qui va précipiter sous forme de cristaux d'urate de sodium comme dans la goutte et induire ainsi une inflammation (Martinon, 2010b). L'acide urique va pouvoir être relargué par les cellules comme un signal de danger et va précipiter en présence de fortes concentrations de sodium présent dans l'environnement extracellulaire (Shi *et al.* 2003 ; Gasse *et al.* 2009 ; Martinon, 2010b).

Il a été montré que le CD14 et les TLRs, comme TLR2 et TLR4, contribuaient à la production de cytokines en réponse aux cristaux d'acide urique (Liu-Bryan *et al.* 2005 ; Scott *et al.* 2006). Cependant, les TLRs ne détectent pas directement les cristaux et ne sont pas indispensables à la libération d'IL-1 $\beta$  en réponse au MSU (Chen *et al.* 2006). En effet, le MSU peut être reconnu directement par le cholestérol de la membrane des phagocytes, sans intervention de récepteurs de surface. Ceci va être suffisant pour entraîner une cascade de signalisation intracellulaire (Ng *et al.* 2008).

De plus, il a été montré que le MSU, comme d'autres cristaux pouvait entraîner une libération d'ATP endogène (Gombault *et al.* 2013). Ceci laisse imaginer qu'une activation autocrine du récepteur purinergique P2X7 en réponse à l'ATP endogène est possible.

Ces différents mécanismes induisent l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse au MSU. L'inflammasome NLRP3 actif nécessite un assemblage sous forme de multimère (Fig. 8). Cependant, le mécanisme d'oligomérisation de l'inflammasome NLRP3 est encore mal connu (Gross *et al.* 2012).

Ces dernières années, de nombreux autres mécanismes ont été mis en évidence ce qui rend d'autant plus complexe la compréhension de cette voie d'activation.

Ainsi, une désubiquitination de NLRP3 semble indispensable pour l'activation de l'inflammasome dans les macrophages et ce mécanisme nécessite la production de ROS mitochondriale (Juliana *et al.* 2012). De même la protéine MAVS (Mitochondrial antiviral signaling proteins) a été mise en évidence comme essentielle pour une activation optimale de l'inflammasome NLRP3 en réponse à l'ATP. Cependant, cette protéine ne semble pas jouer de rôle en réponse aux substances cristallines (Subramanian *et al.* 2013).

Shenoy *et al.* (2012) ont identifié un autre partenaire permettant l'assemblage et l'activation de l'inflammasome NLRP3, la protéine guanylate binding 5 (GBP5). Cette protéine n'est pas un NLR, ni un ALR mais semble participer à l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse aux PAMPs, mais pas aux particules.

Une régulation négative de l'inflammasome NLRP3 est indispensable à la résolution de l'inflammation. Ainsi, plusieurs mécanismes concourent à l'inhibition de celui-ci. En effet il a été montré que la fixation de l'IFN- $\alpha$ , l'IFN- $\beta$  ou IL-10 sur leurs récepteurs, un microARN endogène miR-223, l'AMP cyclique (AMPc) ou le NO (Nitric Oxyde) inhiberait le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  par l'inflammasome NLRP3 (Lee *et al.* 2012 ; Sutterwala *et al.* 2014).

Par conséquent, le mode d'activation de l'inflammasome NLRP3 ne semble pas exclusif. Pour avoir une réponse inflammatoire complète, plusieurs mécanismes doivent être mis en jeu simultanément. Il est donc primordial de comprendre ce mode d'activation car cette plateforme pro-inflammatoire est impliquée dans de nombreuses pathologies.

### ***1.2.3.3. Pathologies associées à l'inflammasome NLRP3***

L'inflammasome NLRP3 est impliqué notamment dans le diabète de type 2 (Schroder *et al.* 2010), la polyarthrite rhumatoïde (Rosengren *et al.* 2005), la maladie de Crohn (Villani *et al.* 2009), la goutte (Martinon *et al.* 2006), ou encore la fibrose pulmonaire idiopathique (Gasse *et al.* 2009 ; Riteau *et al.* 2010).

Il existe également des pathologies génétiques spécifiques de la protéine NLRP3, les syndromes périodiques associés à la cryopyrine (CAPS) ou cryopyrinopathies (Agostini *et al.* 2004). Trois maladies auto-inflammatoires composent les CAPS : le FCAS (Familial cold autoinflammatory syndrome), le Muckle–Wells syndrome (MWS) et le NOMID/CINCA (Neonatal onset multi-systemic inflammatory disease / chronic infantile neurological cutaneous articular syndrom) (Aganna *et al.* 2002).

Cliniquement, ces « inflammasomopathies » sont caractérisées par des fièvres récurrentes d'origine non pathogène, des douleurs articulaires, des rashes cutanés et des symptômes oculaires (Tableau II). Dans le cas du NOMID/CINCA, la pathologie la plus sévère, de graves complications neurologiques sont observées (Masters *et al.* 2009).

	FCAS	MWS	NOMID/CINCA
Inheritance	Autosomal dominant	Usually autosomal dominant, rare sporadic cases	Mostly sporadic, rarely autosomal dominant
Onset of disease	Neonatal or infancy (< 6 months)	Variable, usually infancy, up to adolescence	Neonatal or early infancy
Flares	Cold-triggered, usually 1–2 h after exposure, episode < 24 h	No clearly identified trigger (possibly cold exposure, stress). Spectrum of continuous symptoms to recurrent flares lasting 1–3 days	Usually continuous symptoms, with aggravation during flares
Relative severity	Low	Medium	High
Cardinal symptoms	Cold-induced fever, urticarial-like skin rash, arthralgia, conjunctivitis, sweating, fatigue, extreme thirst, nausea	Recurrent low-grade fever, urticarial-like skin rash, sensorineural hearing loss, arthritis, conjunctivitis, AA amyloidosis	Inconstant mild fever, urticarial-like skin rash, chronic aseptic meningitis, sensorineural hearing loss
Skin	Maculopapular, migratory, urticarial-like, usually non-pruritic skin rash		
Joints	Arthralgia	Arthralgia, arthritis	Arthralgia, arthritis, bony overgrowth arthropathy of the knees (25–50%)
Eyes	Conjunctivitis	Conjunctivitis, uveitis	Conjunctivitis, uveitis (75%), chronic papilledema possibly progressing to blindness
Sensorineural hearing loss	Rare	Frequent (75%), onset during adolescence	Frequent (50%), onset during childhood
Central nervous system	None	None	Severe headaches, high intracranial pressure, chronic aseptic meningitis, possibly leading to mental retardation
Amyloidosis	Rare (< 2%)	Frequent (25–50%), adult-onset	Frequent (25%), adult-onset

FCAS: familial cold autoinflammatory syndrome; MWS: Muckle-Wells syndrome; NOMID/CINCA: neonatal onset multi-systemic inflammatory disease/chronic infantile neurological cutaneous articular syndrome; AA amyloidosis; amyloid AA amyloidosis.

Tableau II : Syndromes périodiques associées à la cryopyrine (CAPS) (Menu et Vince, 2011)

Des mutations ciblant le domaine NACHT de la protéine NLRP3 sont responsables d'une activation constitutive de l'inflammasome NLRP3 dans les CAPS (Masters *et al.* 2009).

Il a été montré une importante sécrétion basale d'IL-1 $\beta$  mature par les monocytes et macrophages de ces patients en l'absence de toute stimulation (Agostini *et al.* 2004). L'auto-induction de libération d'IL-1 $\beta$  est probablement le mécanisme majeur de nombreuses maladies inflammatoires (Dinarello, 2007). Ainsi, la cascade d'activation de l'inflammasome NLRP3 est très régulée pour éviter une auto-inflammation chronique comme c'est le cas dans ces pathologies.

### 1.3. Cytokines de l'inflammation

Le fonctionnement du système immunitaire repose sur la communication entre les diverses cellules par contacts membranaires ou par des médiateurs solubles. Les cytokines sont des éléments du dictionnaire universel de l'immunité.

Les cytokines sont des petites protéines, le plus souvent glycosylées et de faible poids moléculaire (<60 kDa). Ces messagers moléculaires intercellulaires peuvent être sécrétés par de nombreux types cellulaires.

Les cellules immunitaires sécrètent les cytokines de manière paracrine, autocrine ou même endocrine. Ces substances solubles vont pouvoir se fixer sur des récepteurs membranaires spécifiques et ainsi déclencher une cascade de signalisation. Les cytokines vont modifier l'expression des gènes et entraîner des activités biologiques sur les cellules environnantes. Plusieurs cytokines peuvent avoir la même activité et ainsi entraîner une redondance biologique dans le système immunitaire (Tisoncik *et al.* 2012).

Les cytokines pouvant induire une inflammation locale et systémique sont appelés cytokines pro-inflammatoires (Brouckaert *et al.* 1993). Celles-ci ont un rôle prépondérant dans la régulation des fonctions de cellules phagocytaires et sont susceptibles d'intervenir lors des différentes phases de l'inflammation. Ainsi, elles interviennent en particulier dans les phénomènes d'adhérence à l'endothélium, le chimiotactisme, la phagocytose et les différents phénomènes lytiques.

L'activation classique de macrophages de type M1 est caractérisée par une production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12, le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  et à une faible production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (Mantovani *et al.* 2004 ; Martinez *et al.* 2008).

### 1.3.1. Cytokines de la famille de l'IL-1

Les cytokines de la famille de l'IL-1 (IL-1F) sont des médiateurs importants de la réponse immunitaire et de l'inflammation. Cette famille contient 11 membres (IL-1F<sub>1-11</sub>), sept molécules à activité agoniste (IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-18, IL-33, IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  et IL-36 $\gamma$ ), trois antagonistes de récepteurs (IL-1Ra, IL-36Ra et IL-38) et une cytokine ayant des propriétés anti-inflammatoires (IL-37) (Garlanda *et al.* 2013).

#### 1.3.1.1. IL-1 $\beta$

L'IL-1 $\beta$  (ou IL-1F2) est une cytokine qui joue un rôle majeur dans la réponse inflammatoire, infectieuse, les maladies dégénératives et la réparation tissulaire (Dinarello, 2010). Cette cytokine pro-inflammatoire est principalement produite lors d'activation de cellules de l'immunité innée comme les monocytes ou les macrophages cependant les lymphocytes (Eleftheriadis *et al.* 2013) ou des cellules non immunitaires comme les kératinocytes (Feldmeyer *et al.* 2007) semblent capables de libérer de l'IL-1 $\beta$ .

Administrée par voie intraveineuse, l'IL-1 $\beta$  induit chez l'homme une hypotension, une anorexie et de la fièvre (Dinarello *et al.* 1996a). Ce puissant pyrogène d'origine endogène va initier et amplifier de nombreuses réponses immunitaires et inflammatoires (Dinarello *et al.* 1996b).

L'IL-1 $\beta$  possède deux récepteurs IL-1R1 et IL-1R2 mais seule la fixation à l'IL-1R1 membranaire entraîne une cascade de signalisation. La fixation de l'IL-1 $\beta$  sur l'IL-1R1 entraîne une réponse spécifique pour chaque type cellulaire. Cette cytokine va induire l'expression des protéines de l'inflammation par les hépatocytes, comme la protéine C réactive (CRP). L'IL-1 $\beta$  induit également la synthèse de chimiokines et de molécules d'adhérence par les cellules endothéliales entraînant ainsi le recrutement des leucocytes ou le déclenchement de la fièvre au niveau cérébral (Sims et Smith, 2010 ; Garlanda *et al.* 2013).

Ainsi, l'IL-1 $\beta$  va augmenter la survie et les fonctions effectrices des cellules immunitaires comme les lymphocytes, les monocytes et les macrophages. L'IL-1 $\beta$  va également induire l'expression de gènes pro-inflammatoires comme la Prostaglandine E2 (PGE2), la COX-2 (Cyclo-oxygénase de type 2), l'IL-6 ou le TNF- $\alpha$  déclenchant une réponse immunitaire de type Th1 (Dinarello, 2002 ; Garlanda *et al.* 2013).

La production de l'IL-1 $\beta$  est très régulée au niveau de son expression, sa transcription et sa libération (Martinon *et al.* 2009). Trois étapes sont nécessaires à sa libération dans le milieu extracellulaire. Tout d'abord la production de son précurseur inactif, la pro-IL-1 $\beta$  (31 kDa), puis le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  mature (17 kDa) biologiquement active et enfin sa libération (Eder, 2009). Ces multiples mécanismes semblent avoir été développés pour assurer une protection de l'organisme vis-à-vis des propriétés pro-inflammatoires de cette puissante cytokine (Dinarello, 2007).

La transcription de l'ARNm de la pro-IL-1 $\beta$  doit être induite par un signal pro-inflammatoire car elle n'est pas exprimée de façon constitutive par les cellules (Sutterwala *et al.* 2014). Son expression est induite dans un contexte inflammatoire comme dans les monocytes ou macrophages activés. L'induction de cette transcription peut se faire *via* les TLRs par la voie de signalisation NF- $\kappa$ B ou induite par la fixation de cytokines endogènes sur leurs récepteurs comme pour le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  elle-même (Dinarello, 2007). Toutefois le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B semble indispensable à l'induction de l'expression de la pro-IL-1 $\beta$  (Guarda *et al.* 2011).

Cependant, une induction de l'expression des gènes ou de la synthèse de la pro-IL-1 $\beta$  ne signifie pas forcément une augmentation de la production de l'IL-1 $\beta$  (Dinarello, 2007). En effet, pour être active, la pro-IL-1 $\beta$  nécessite une maturation par une cystéine protéase, la caspase-1. En absence de clivage rapide de la pro-IL-1 $\beta$  par l'inflammasome NLRP3, la libération d'IL-1 $\beta$  dans le milieu reste très modérée (Pedra *et al.* 2009).

Dans de rares cas, la pro-IL-1 $\beta$  peut aussi être clivée de façon caspase-1-indépendante. En effet, l'activation des récepteurs de mort, comme Fas peut induire la maturation de l'IL-1 $\beta$  dans des neutrophiles dépourvus de caspase-1 (Dinarello *et al.* 2007).

Dans les monocytes, la caspase-1 associée à l'inflammasome NLRP3 est constitutivement active permettant la libération d'IL-1 $\beta$  active après une stimulation par du LPS (Netea *et al.* 2009). Tandis que les macrophages ont besoin de deux stimuli indépendants : un premier stimulus dépendant des TLRs qui permet la transcription et la traduction de la pro-IL-1 $\beta$  et un deuxième pour activer la caspase-1 permettant de cliver la pro-IL-1 $\beta$  (Kanneganti *et al.* 2007). De plus, les macrophages semblent être complètement dépendants de l'ATP pour libérer de l'IL-1 $\beta$  (Ward *et al.* 2010).

La majorité des protéines sont sécrétées selon un mécanisme que l'on dit classique, c'est-à-dire *via* le réticulum endoplasmique (RE), l'appareil de Golgi et une sécrétion sous forme de granules sécrétoires. Ainsi, des cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 et TNF- $\alpha$  sont sécrétées selon ce mécanisme (Halban et Irminger, 1994).

Cependant, comme d'autres cytokines de la famille de l'IL-1, l'IL-1 $\beta$  est synthétisée sous forme d'un précurseur dépourvu de peptide signal permettant sa sortie de la cellule de façon conventionnelle (Dinarello, 2010). Ainsi la littérature propose de nombreux mécanismes de libération non conventionnelle de cette cytokine.

La libération peut se faire par formation de corps multivésiculaires et d'exosomes (Qu *et al.* 2007), par exocytose de lysosomes (Rubartelli *et al.* 1990 ; Andrei *et al.* 2004), par libération de microvésicules (Mac Kenzie *et al.* 2001) ou par des transporteurs membranaires spécifiques (Zhou *et al.* 2002) (Fig. 10).

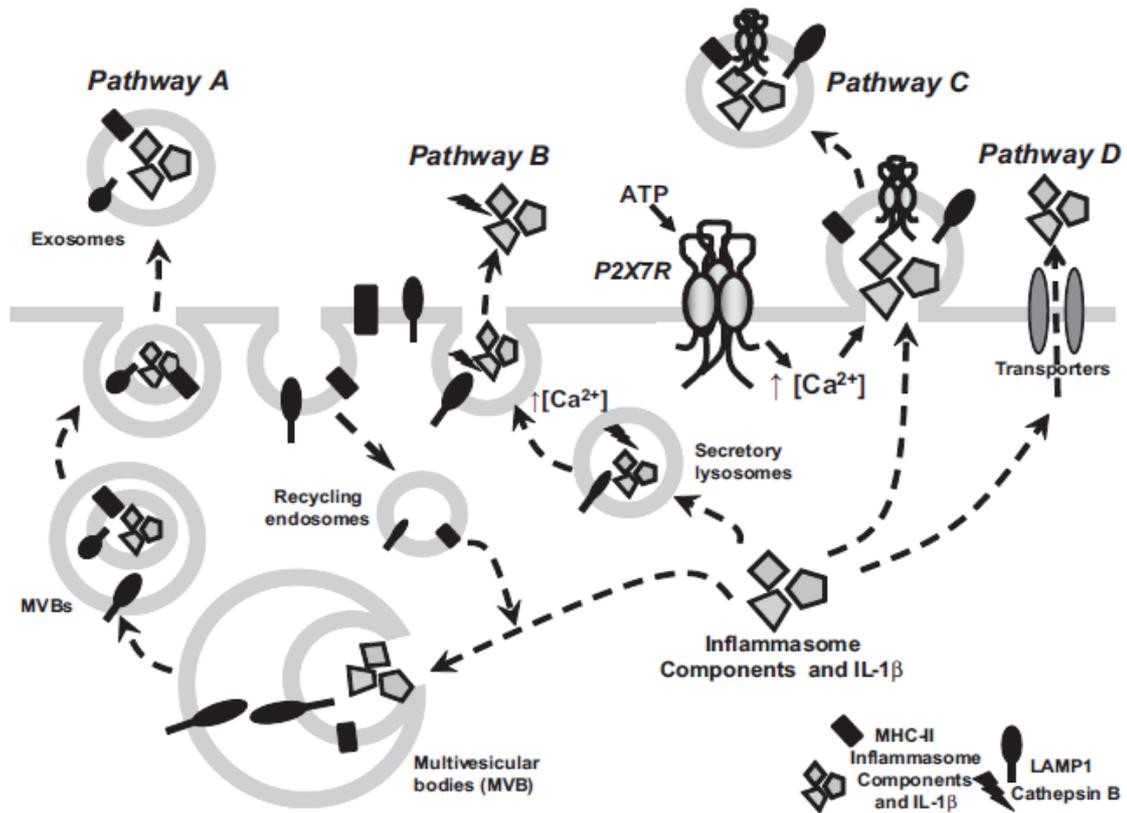


Figure 10. Mécanismes proposés de libération d'IL-1 $\beta$  (Qu *et al.* 2007)

Pathway A : par formation de corps multivésiculaires (MVBs) qui vont libérer l'IL-1 $\beta$  sous forme d'exosomes au niveau extracellulaire. Pathway B : par exocytose de lysosomes. Pathway C : par libération de microvésicules. Pathway D : par des transporteurs membranaires spécifiques.

Il est bien établi que la libération d'IL-1 $\beta$  se fait de façon non conventionnelle, mais le mécanisme physiologique exact reste encore mal connu et dépend du type cellulaire. Ainsi, il est difficile de conclure sur la voie de libération principale, mais il semble que l'IL-1 $\beta$  peut être libérée par deux ou trois façons différentes, en parallèle (Eder, 2009).

Il a été suggéré que la lyse cellulaire pouvait permettre de relarguer l'IL-1 $\beta$  (Hogquist *et al.* 1991). Cependant, il a été bien démontré que la libération d'IL-1 $\beta$  diffère d'une libération aspécifique du contenu cytoplasmique de la cellule mais est possible durant la pyroptose, une mort cellulaire dépendante de la caspase-1 (Eder, 2009).

### 1.3.1.2. *IL-1 $\alpha$*

L'IL-1 $\alpha$  (IL-1F1) et l'IL-1 $\beta$  sont codées par des gènes différents et possèdent de faibles homologies structurales (20 à 30%). Cependant, ces deux cytokines ont de nombreuses similitudes dans leurs structures tridimensionnelles, elles peuvent donc se lier aux mêmes récepteurs et possèdent les mêmes propriétés biologiques (Rider *et al.* 2013).

L'IL-1 $\alpha$  est exprimée de façon constitutive et physiologique par de nombreux types cellulaires. Cette cytokine est synthétisée sous forme d'un précurseur de 31 kDa, la pro-IL-1 $\alpha$ . Ce zymogène va pouvoir être clivé en position C-terminale par une protéase, la calpaïne (Kobayashi *et al.* 1990). L'IL-1 $\alpha$  n'a pas besoin de ce clivage protéolytique pour être biologiquement active, en effet, la pro-IL-1 $\alpha$  est elle-même un agoniste entier d'IL-1R1, mais le clivage va augmenter la puissance de cette cytokine (Dinarello, 2011 ; Yazdi et Drexler, 2013).

Au niveau cellulaire, l'IL-1 $\alpha$  peut être retrouvée dans le noyau, le cytoplasme, liée à la membrane ou libérée dans le milieu extracellulaire, aussi bien sous forme de précurseur qu'après clivage par la calpaïne (Rider *et al.* 2013).

L'IL-1 $\alpha$  est préformée au niveau intracellulaire et va être relarguée en cas de lésion cellulaire, jouant ainsi un rôle d'alarmine (Chen *et al.* 2007, Eigenbrod *et al.* 2008). Cette cytokine est libérée comme signal de danger et va pouvoir rapidement déclencher une cascade inflammatoire en induisant la production de cytokines et chimiokines dans le cadre d'une inflammation stérile (Chen *et al.* 2007 ; Rider *et al.* 2011).

Comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-1 $\alpha$  est une puissante cytokine pro-inflammatoire. En se fixant à l'IL-1R1, elle va entraîner la transcription de gènes codant pour des protéines de l'inflammation ou l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales (Ferrari *et al.* 2006). L'IL-1 $\alpha$  ne possède pas de séquence signal ainsi elle est sécrétée de façon non conventionnelle et souvent en même temps que l'IL-1 $\beta$ .

Contrairement à la pro-IL-1 $\beta$ , la caspase-1 n'est pas indispensable à la sécrétion de l'IL-1 $\alpha$ , mais elle semble faciliter celle-ci (Rider *et al.* 2013).

L'IL-1 $\alpha$  possède un double rôle. Elle va pouvoir en même temps avoir un rôle de messager intercellulaire mais également être un facteur nucléaire qui va pouvoir se lier à la chromatine (Rider *et al.* 2013). L'IL-1 $\alpha$  peut ainsi induire l'expression des gènes sans avoir à se fixer sur le récepteur IL-1R1 des cellules (Werman *et al.* 2004).

Les cellules nécrotiques vont libérer de l'IL-1 $\alpha$  comme signal de danger, alors que dans les cellules apoptotiques, l'IL-1 $\alpha$  est séquestrée dans le noyau, lié à la chromatine, ce qui empêche le déclenchement d'une réponse inflammatoire (Rider *et al.* 2013).

Comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-1 $\alpha$  joue un rôle majeur dans les processus d'inflammation stérile, cette cytokine est retrouvée dans de nombreuses pathologies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde ou le psoriasis (Rider *et al.* 2013). Mais quelques différences existent cependant et de part son action directe sur la chromatine, l'IL-1 $\alpha$  est très impliquée dans les pathologies cancéreuses (Garlanda *et al.* 2013).

#### **1.3.1.3. IL-18**

L'IL-18 (IL-1F4) est une cytokine de la famille de l'IL-1 qui est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif de 24 kDa. La caspase-1 va permettre le clivage de la pro-IL-18 en IL-18 active (18 kDa) (Gu *et al.* 1997). Comme l'IL-1 $\alpha$ , la protéine IL-18 possède une forme membranaire et va être libérée de façon non conventionnelle dans le milieu extracellulaire, selon un mécanisme indépendant du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Keller *et al.* 2008).

Contrairement à l'IL-1 $\beta$  ou l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-18 n'est pas un pyrogène endogène. Cette cytokine est principalement synthétisée par les macrophages et les cellules dendritiques. L'IL-18 va amplifier les réponses de l'immunité innée en induisant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-8, le TNF- $\alpha$  ou le GM-CSF (Palma *et al.* 2013).

L'IL-18 a également été identifiée comme un facteur inducteur de l'IFN- $\gamma$  par les cellules NK et les lymphocytes T, ce qui va entraîner une réponse immunitaire de type Th1 (Sattler *et al.* 2008). Cette cytokine pro-inflammatoire semble jouer un rôle important dans la réponse anti-tumorale, mais celui-ci reste encore mal connu (Osaki *et al.* 1999 ; Palma *et al.* 2013).

#### ***1.3.1.4. IL-1Ra***

L'IL-1 Receptor antagonist (IL1Ra) ou IL-1F3 est l'antagoniste naturel du récepteur à l'IL-1. Cette glycoprotéine de 17 kDa produite par les cellules myéloïdes, présente une faible homologie avec l'IL-1 $\beta$  et ne nécessite pas de maturation pour être secrétée (Garlanda *et al.* 2013).

L'IL-1Ra permet une régulation négative de l'effet de l'IL-1 $\beta$ . Cet antagoniste agit en compétition avec l'IL-1 $\beta$  en se fixant aux récepteurs IL-1R1 avec une grande affinité et bloque la voie de signalisation pro-inflammatoire (Arend et Gabay, 2000). Des cytokines connues pour leurs activités anti-inflammatoires comme l'IL-4 ou le TGF- $\beta$  sont des inducteurs de la production d'IL-1Ra.

L'IL-1Ra régule ainsi les propriétés pro-inflammatoires en agissant comme un inhibiteur endogène de l'inflammation produite par l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  (Dinarello, 2000). En effet, des souris KO pour le gène de l'IL-1Ra ont développé spontanément des pathologies proches de la polyarthrite rhumatoïde (Arend et Gabay, 2000).

Ainsi, cet antagoniste compétitif peut ainsi être utilisé en thérapeutique, sous une forme recombinante non glycosylée sous le nom d'anakinra (Kineret®). Ce médicament a obtenu l'AMM (Autorisation de mise sur le marché) en France dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, en association avec le méthotrexate.

Les patients atteints de CAPS sont également traités par l'anakinra à la posologie de 1 à 2 mg/kg/jour par injection sous cutanée journalière. Ce traitement donne de très bons résultats cliniques et biologiques en bloquant la signalisation de l'IL-1 $\beta$  (Hawkins *et al.* 2004). L'efficacité des thérapies anti-IL-1 $\beta$  a ainsi été démontrée chez les enfants atteints de NOMID/CINCA (Goldbach-Mansky *et al.* 2006).

### 1.3.1.5. IL-33

L'IL-33 (IL-1F11) est une cytokine de la famille de l'IL-1 découverte en 2005. Cette cytokine de 30 kDa est constitutivement exprimée dans les tissus humains et particulièrement dans les cellules endothéliales et épithéliales (Schmitz *et al.* 2005).

Comme l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-33 est une cytokine à double fonction. Elle va jouer le rôle d'alarmine et de facteur nucléaire (Garlanda *et al.* 2013). En effet, l'IL-33 est préformée dans la cellule et va pouvoir modifier la transcription de gènes en se fixant à la chromatine. Mais celle-ci va aussi pouvoir être libérée selon un mécanisme non conventionnel ou comme signal de danger par les cellules lors de stress ou de nécrose (Moussion *et al.* 2008). L'IL-33 va ainsi se fixer sur les récepteurs ST2 de différents types cellulaires et induire l'activation de voies de signalisation comme NF- $\kappa$ B ou celle des MAPKs (Schmitz *et al.* 2005).

L'IL-33 peut être clivée par la caspase-1 (Schmitz *et al.* 2005). Initialement, il semblait que l'IL-33 nécessitait une protéolyse pour être active, comme l'IL-1 $\beta$  ou l'IL-18, mais contrairement à ces cytokines, le clivage par la caspase-1 va rendre l'IL-33 inactive (Cayrol et Girard, 2009).

L'IL-33 va se fixer sur de nombreuses cellules de l'immunité comme les lymphocytes, les mastocytes ou les macrophages et induire une réponse de type Th2 (Hazlett *et al.* 2010). Cette cytokine va induire la transcription de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines. Il a été montré que cette cytokine entraînait une polarisation des macrophages en type M2a (Kurowska-Stolarska *et al.* 2009 ; Espinassous *et al.* 2009).

Cette cytokine est très impliquée dans les phénomènes allergiques, la lutte contre les parasites et la réparation cutanée (Yin *et al.* 2013 ; Garlanda *et al.* 2013).

### **1.3.2. IL-6**

L'IL-6 est une cytokine pléiotropique produite par de nombreux types cellulaires. Les cellules du système phagocytaire mononucléé étant les principales cellules sécrétrices d'IL-6 (Horii *et al.* 1988).

Cette cytokine joue de nombreux rôles au niveau systémique comme par exemple dans la thermorégulation ou la production de protéines de l'inflammation par les hépatocytes (Castell *et al.* 1988).

Lors de l'activation de l'immunité innée, ce pyrogène endogène va être rapidement sécrété de manière conventionnelle pour induire une inflammation et faciliter l'élimination des pathogènes.

### **1.3.3. TNF- $\alpha$**

Le TNF- $\alpha$  est sécrété par de nombreux types cellulaires, et notamment les macrophages activés (Aggarwal *et al.* 2012).

Le TNF- $\alpha$  est initialement synthétisé sous forme d'un précurseur de 27 kDa appelé pro-TNF- $\alpha$  qui est ancré dans la membrane. Le pro-TNF- $\alpha$  va être clivé par une metalloprotéinase, ADAM17 (A disintegrin and metalloproteinase 17) entraînant la formation du TNF- $\alpha$  actif (Parameswaran et Patial, 2010). Le TNF- $\alpha$  peut-être stocké dans la cellule sous forme de précurseur et être sécrété selon un mécanisme conventionnel (Halban et Irminger, 1994).

Cette molécule est la première cytokine à être libérée lors d'une réaction inflammatoire. La fonction principale du TNF- $\alpha$  est l'induction de la transcription de protéines pro-inflammatoires comme les chimiokines, les cytokines, les molécules d'adhésion ou les facteurs de croissance. Cette induction va se faire en réponse à la fixation du TNF- $\alpha$  sur son récepteur en activant le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B et la voie des MAPKs. Ainsi le TNF- $\alpha$  va induire la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires comme IL-1 $\beta$  ou IL-6 et possède également un effet cytotoxique sur les cellules tumorales (Park *et al.* 2002).

Comme l'IL-6, le TNF- $\alpha$  va être impliqué dans la thermorégulation, le métabolisme ou des pathologies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn (Striz *et al.* 2014).

D'autres cytokines comme l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-3 ou l'IFN- $\gamma$  ou les facteurs de croissance interviennent aussi dans la réponse inflammatoire.

### **1.3.4. Chimiokines**

Les chimiokines sont des cytokines de faible poids moléculaire (compris entre 8 et 12kDa) ayant des propriétés chimiotactiques.

Ces protéines sont classées en quatre sous-familles (C, CC, CXC et CX3C), en fonction de la position de leurs résidus cystéine en position N-terminale. Les membres de la famille CC ( $\beta$ -chimiokines) possèdent deux premières cystéines adjacentes alors que ceux de la famille CXC ( $\alpha$ -chimiokines) contiennent un acide aminé entre les deux premières cystéines. Dans la famille CX3C ( $\delta$ -chimiokines), les deux premières cystéines sont séparées par trois acides aminés. La famille C ( $\gamma$ -chimiokines) ne contient qu'une seule cystéine (Laing et Secombes, 2004).

Les chimiokines sont produites par de nombreuses cellules, notamment les cellules immunitaires. Leurs récepteurs sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G permettant la transduction du signal (Laing et Secombes, 2004).

Le rôle des chimiokines est de promouvoir le recrutement et l'activation des leucocytes. Les chimiokines vont participer au phénomène d'adhérence des cellules immunitaires aux cellules endothéliales et leur migration vers les sites inflammatoires.

La polarisation des cellules va modifier le profil de production des chimiokines. Ainsi, une polarisation de type M1 des macrophages va induire la production de chimiokines impliquées dans l'activation et l'entretien de la réponse pro-inflammatoire comme par exemple CXCL-1, CCL3, CCL4 ou CCL5 (Mantovani *et al.* 2014).

## 2. ATP et récepteurs purinergiques

### 2.1. Adénosine-5'-triphosphate

#### 2.1.1. L'ATP

L'adénosine-5'-triphosphate (ATP) est un nucléotide de la famille des purines, sa structure est composée d'une base purique, l'adénine, couplée à un ribose ( $\beta$ -D-ribofurannose) formant l'adénosine ainsi qu'à 3 groupements phosphates (Fig. 11). Cette molécule a pour fonction principale de stocker, transporter et fournir de l'énergie nécessaire aux réactions chimiques cellulaires.

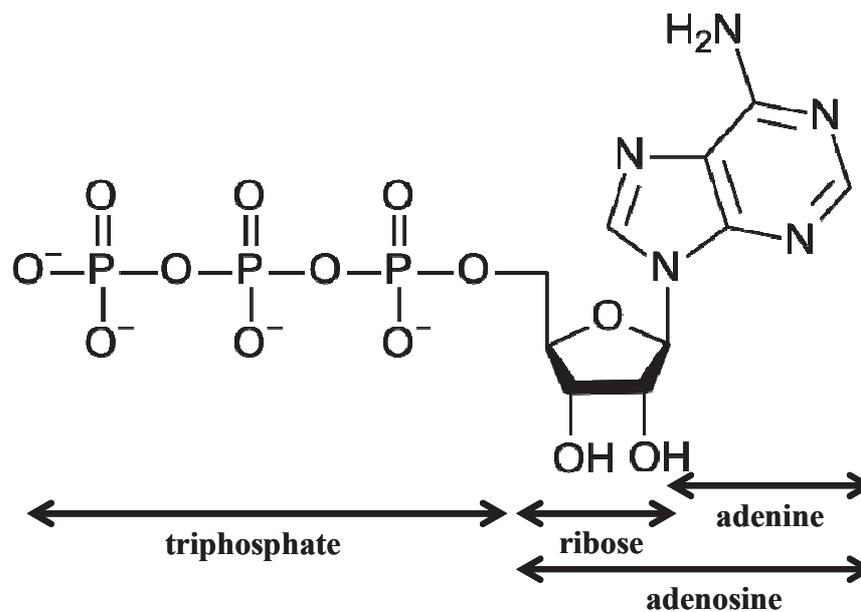


Figure 11. Molécule d'adénosine-5'-triphosphate (ATP)

Les molécules d'ATP sont produites lors de la respiration cellulaire et sont utilisées par les protéines dans de nombreuses fonctions telles que la biosynthèse, la mobilité et la division cellulaire.

L'ATP représente la molécule énergétique de base essentielle à toute cellule vivante. L'hydrolyse d'ATP en ADP ou AMP permet la libération de l'énergie contenue dans les liaisons pyrophosphates. Ces liaisons sont riches en énergie et indispensables à la vie, elles permettent ainsi de stocker très temporairement de l'énergie. Bien que longtemps considérés comme uniquement une réserve d'énergie pour les cellules, on sait aujourd'hui que les nucléotides et les nucléosides jouent également un rôle dans la signalisation au niveau extracellulaire (Burnstock *et al.* 2012).

De nombreux travaux montrent que l'ATP et ses récepteurs sont impliqués dans de nombreux processus physiopathologiques tels que la douleur chronique, l'ischémie, l'inflammation (Boué-Grabot *et al.* 2000), l'asthme (Idzko *et al.* 2007) et la fibrose pulmonaire (Riteau *et al.* 2009). En effet, l'ATP extracellulaire est impliqué dans des fonctions telles que la contraction cellulaire, le transport ionique, le chimiotactisme mais également comme neurotransmetteur ou comme signal de danger (Mariathasan *et al.* 2006).

L'ATP extracellulaire possède plusieurs caractéristiques qui font de lui un bon candidat au rôle de signal de danger : sa concentration bien plus forte au niveau intracellulaire qu'extracellulaire, son hydrophilie, son système de dégradation par des ecto-ATPases est ubiquitaire et enfin l'ATP possède de nombreux récepteurs spécifiques ayant tous des affinités différentes (la Sala *et al.* 2003). Ainsi l'ATP peut jouer ce rôle en étant libéré au niveau extracellulaire par plusieurs mécanismes.

### 2.1.2. Libération d'ATP

Les molécules d'ATP sont stockées dans le cytosol des cellules à une concentration comprise entre 1 et 5 mM. La concentration intracellulaire d'ATP est bien plus importante que sa concentration extracellulaire, de l'ordre du nanomolaire (Bours *et al.* 2006).

L'ATP pouvant être un signal pro-apoptotique au niveau extracellulaire, sa libération du milieu intracellulaire est très régulée, notamment par des transporteurs et des enzymes. Les cellules peuvent libérer de l'ATP lors de lésions cellulaires ou lors d'un stress mécanique, infectieux ou hypoxique.

Plusieurs scénarii sont possibles pour expliquer la libération d'ATP. Selon des mécanismes non lytiques *via* la lumière de l'appareil de Golgi par des transporteurs spécifiques tels que les transporteurs ABC, les pannexines ou les connexines (i), par exocytose calcium-dépendante de granules sécrétoires (ii) ou par efflux cellulaire *via* un mécanisme non élucidé (iii) (Lazarowski et Boucher, 2009) (Fig.12).

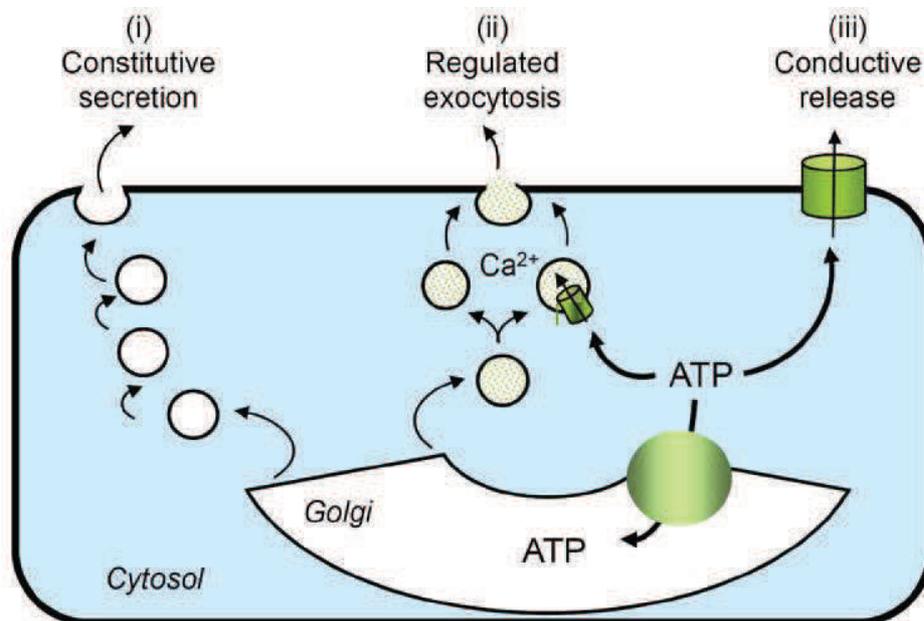


Figure 12. Mécanismes non lytiques de libération d'ATP par les cellules (Lazarowski et Boucher, 2009)

L'ATP peut être stocké dans des vésicules sécrétoires, par exemple au niveau des neurones et être sécrété en même temps que des neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine ou la noradrénaline. La stimulation nerveuse des cellules va alors provoquer l'exocytose de l'ATP de ces vésicules (Burnstock *et al.* 2012).

### **2.1.3. Pannexine-1**

La famille des pannexines (Panx) contient 3 membres, Panx-1, -2 et -3 (Baranova *et al.* 2004). Panx-1 est exprimée de façon ubiquitaire, Panx-2 est exclusivement exprimée au niveau du système nerveux central et Panx-3 est localisée dans les ostéoblastes, les fibroblastes et les chondrocytes (Scemes *et al.* 2009).

Les pannexines sont des canaux plasmatiques hexamériques possédant une structure proche des connexines. Cependant, les pannexines ne peuvent pas former de jonction gap ou autres canaux intercellulaires, elles ne forment que des canaux intracellulaires (Sosinsky *et al.* 2011). Les Panx possèdent un domaine N-terminal cytosolique, quatre domaines transmembranaires avec deux boucles extracellulaires et un domaine C-terminal cytosolique (Boassa *et al.* 2007).

Panx-1 est un hémicanal non sélectif localisé sur la membrane plasmique, mais cette protéine a également été mise en évidence sur le réticulum endoplasmique permettant une fuite de calcium (D'Hondt *et al.* 2011). Une fois activé, le canal Panx-1 va pouvoir s'ouvrir, former un large pore et rendre les cellules perméables à de grosses molécules comme l'ATP (Pelegriin et Surprenant, 2006) (Fig. 13).

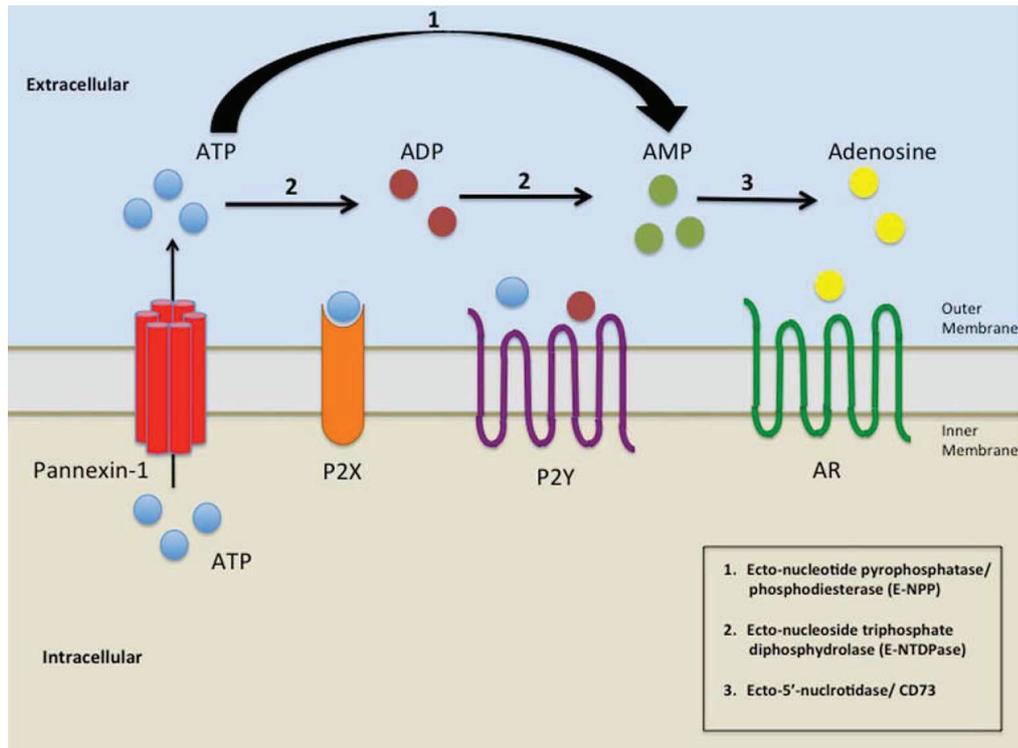


Figure 13. Représentation schématique de la libération d'ATP et son devenir (Velasquez et Eugenin, 2014)

L'ouverture de Panx-1 entraîne une libération d'ATP qui peut être métabolisé ou se fixer sur ses récepteurs. Lors de sa libération dans l'espace extracellulaire, l'ATP a une demi-vie extrêmement courte du fait de sa dégradation rapide en ADP, AMP et adénosine par les ectoenzymes localisées au niveau membranaire ou extracellulaire.

Différentes enzymes entraîne le métabolisme de l'ATP, comme l'ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTDPase) qui hydrolyse l'ATP ou l'ADP, l'ecto-nucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase (E-NPP) qui hydrolyse l'ATP en AMP et l'ecto-5'-nucleotidase (ou CD73) qui hydrolyse l'AMP et adénosine (Velasquez et Eugenin, 2014).

Dans les tissus sains, la libération d'ATP est très régulée et sa concentration extracellulaire est maintenue à un faible niveau par les ATP/ADPases. Cet équilibre disparaît lors des processus inflammatoires car les médiateurs pro-inflammatoires entraînent une libération d'ATP ou une sous-expression des ATP/ADPases (Idzko *et al.* 2007).

L'activation de Panx-1 peut être couplée à l'activation des récepteurs purinergiques. Par exemple, Panx-1 est recrutée et ouverte suite à l'activation de P2X7R permettant la formation d'un pore lors de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Pelegrin et Surprenant, 2006). En effet, Panx-1 est considérée par certains comme essentielle à la production de l'IL-1 $\beta$  mature (Pelegrin et Surprenant, 2007 ; Locovei *et al.* 2007 ; Di Virgilio, 2007).

Les hémicanaux formés par les pannexines ou connexines peuvent s'ouvrir en réponse à des stimuli physiologiques et pathologiques. Ainsi, comme l'ATP et les récepteurs purinergiques, Panx-1 est impliquée dans de nombreuses pathologies (Velasquez et Eugenin, 2014). Cet hémicanal jouerait notamment un rôle dans l'apoptose, la sécrétion de cytokines inflammatoires et la réplication du VIH (Orellana *et al.* 2013 ; Pelegrin *et al.* 2008)

## 2.2. Récepteurs purinergiques

Les nucléotides extracellulaires comme l'ATP se fixent sur les récepteurs purinergiques à la surface des cellules. La distribution de ces récepteurs est ubiquitaire avec une localisation préférentielle propre à chaque sous-type de récepteurs. Les récepteurs purinergiques jouent un rôle important dans la douleur et la réponse inflammatoire (Surprenant et North, 2009).

Chez les vertébrés, la classification des récepteurs a été faite selon des critères génétiques et pharmacologiques. Les récepteurs purinergiques sont classés selon leurs affinités aux agonistes : les récepteurs P1 sont sélectifs de l'adénosine et les récepteurs P2 reconnaissent principalement l'ATP et l'ADP (Ralevic et Burnstock, 1998).

### 2.2.1. Récepteurs P1

Les récepteurs P1 ou récepteurs à l'adénosine (AR) sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires, formés d'hélices  $\alpha$ , couplés aux protéines G. Chez l'homme, il en existe quatre : A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> et A<sub>3</sub> (Junger, 2011).

Ces récepteurs métabotropes ont comme agoniste unique l'adénosine. L'extrémité N-terminale de la protéine se situe au niveau extracellulaire tandis que l'extrémité C-terminale est cytoplasmique permettant la transduction du signal (Fig. 14.a). Les récepteurs A<sub>1</sub> et A<sub>3</sub> sont couplés à la protéine G<sub>i</sub> alors que les récepteurs A<sub>2a</sub> et A<sub>2b</sub> sont couplés à la protéine G<sub>s</sub> (Lazarowski et Boucher, 2009) (Tableau III).

L'adénosine et ses récepteurs ont été mis en évidence comme impliqués dans l'immunité, l'inflammation et dans le développement de pathologies néoplasiques (Baron *et al.* 2014 ; Antonioli *et al.* 2013).

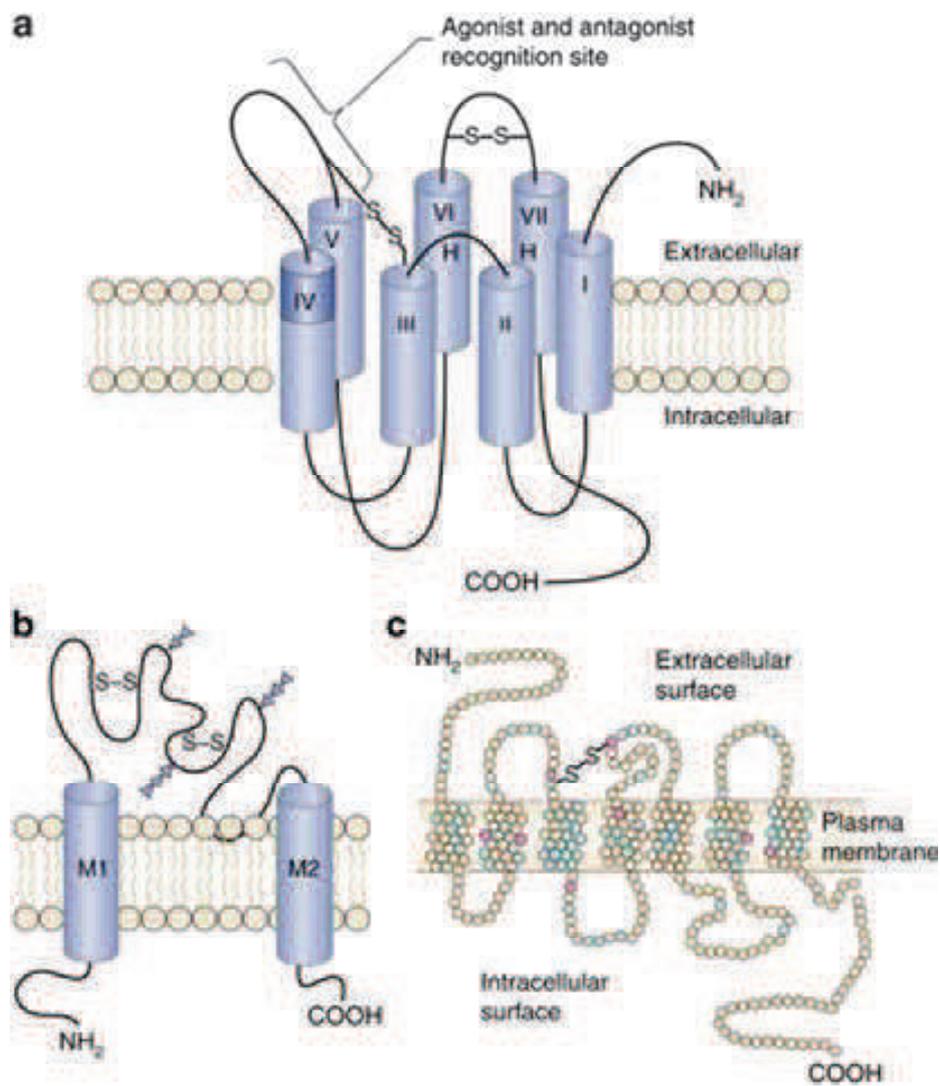


Figure 14. Récepteurs membranaires de l'adénosine et de l'ATP (Burnstock *et al.* 2012)  
**(a)** Famille des récepteurs P1 **(b)** Famille des récepteurs P2X  
**(c)** Famille des récepteurs P2Y

## 2.2.2. Récepteurs P2

En 1994, une sous-classification des récepteurs P2 a été proposée selon leurs mécanismes de transduction. Les récepteurs P2X sont les récepteurs purinergiques ionotropes et les P2Y, les récepteurs métabotropes (Abbracchio et Burnstock, 1994).

	Agonist	Signaling
<i>P2X receptors</i>		
P2X <sub>1</sub> -P2X <sub>7</sub>	ATP	ATP-gated cation channel
<i>P2Y receptors</i>		
P2Y <sub>1</sub>	ADP	Gq/PLCβ → Ca <sup>2+</sup> /PKC
P2Y <sub>2</sub>	ATP = UTP	Gq/PLCβ → Ca <sup>2+</sup> /PKC
P2Y <sub>4</sub>	UTP	Gq/PLCβ → Ca <sup>2+</sup> /PKC
P2Y <sub>6</sub>	UDP	Gq/PLCβ → Ca <sup>2+</sup> /PKC
P2Y <sub>11</sub>	ATP	Gq/PLCβ → Ca <sup>2+</sup> /PKC and Gs → AC/cAMP
P2Y <sub>12</sub>	ADP	Gi → ↓AC/↓cAMP
P2Y <sub>13</sub>	ADP	Gi → ↓AC/↓cAMP
P2Y <sub>14</sub>	UDP-glucose	Gi → ↓AC/↓cAMP
<i>Adenosine receptors</i>		
A <sub>1</sub> , A <sub>3</sub>		Gi → ↓AC/↓cAMP
A <sub>2a</sub> , A <sub>2b</sub>		Gs → AC/cAMP

Tableau III : les récepteurs purinergiques, leurs agonistes et leurs signalisations intracellulaires (Lazarowski et Boucher, 2009)

### 2.2.2.1. Les récepteurs P2Y

Les récepteurs purinergiques P2Y (P2Y<sub>1-2-4-6-11-12-13-14</sub>) sont divisés en 8 sous-types chez les mammifères (Boeynaems *et al.* 2005). Ce sont des protéines à 7 domaines transmembranaires ayant une structure typique des récepteurs couplés aux protéines G et sont constituées de 328 à 377 acides aminés, reliés par des ponts disulfures (Fig. 14.c).

Ces récepteurs peuvent être activés par différents nucléotides sous forme de diphosphates ou triphosphates, puriques ou pyrimidiques, parfois même conjugués à des sucres (Tableau III). La pharmacologie des P2YR est complexe car ces récepteurs ont des localisations très variées et de nombreux ligands : ATP, UTP, ADP, UDP ou UDP-glucose (Junger, 2011).

Parmi les P2YR, P2Y2 est particulièrement impliqué dans l'immunité innée. En effet, la fixation d'ATP sur P2Y2R entraîne un signal chimio-attractant qui est supprimé chez les souris P2Y2<sup>-/-</sup> (Elliott *et al.* 2009). L'activation de P2Y2R entraîne également la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules épithéliales (Kruse *et al.* 2012). De plus, ce récepteur pourrait être impliqué dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse aux nanoparticules (Baron *et al.* 2014).

#### ***2.2.2.2. Les récepteurs P2X***

Les récepteurs purinergiques P2X (P2XR) sont des récepteurs ionotropes divisés en 7 sous-types (P2X<sub>1-7</sub>) et ne possèdent qu'un seul agoniste physiologique, l'ATP. Ces récepteurs canaux comportent 30 à 50% d'homologie entre eux sur la chaîne d'acide aminés et font partie de la famille des canaux ioniques dépendants des ligands (Burnstock *et al.* 2012).

Les P2XR humains sont constitués de sous-unités allant de 379 à 595 acides aminés (Jarvis et Khakh, 2009). Chaque récepteur P2X (P2XR) est constitué de domaines hydrophobes transmembranaires (M1 et M2) séparés par un ectodomaine contenant 10 résidus cystéines formant des ponts disulfures, un site de fixation à l'ATP, une région intracellulaire N et C-terminale et un site de fixation pour les kinases (Burnstock *et al.* 2007) (Fig. 14.b).

Physiologiquement, au moins trois molécules d'ATP doivent se fixer sur la partie extracellulaire des P2X pour les activer (Jarvis et Khakh, 2009). Les récepteurs P2X diffèrent entre eux par rapport à leur sensibilité à l'ATP et à ses analogues.

Les récepteurs ne sont fonctionnels qu'après association des trois sous unités (Nicke *et al.* 1998). Ainsi les P2XR existent sous forme d'homotrimères ou d'hétéromères. Ainsi de nombreuses combinaisons d'hétéromères sont possibles comme P2X<sub>1/2</sub>, P2X<sub>1/4</sub>, P2X<sub>1/5</sub>, P2X<sub>2/3</sub>, P2X<sub>2/6</sub>, P2X<sub>4/6</sub> et P2X<sub>4/7</sub> (Guo *et al.* 2007).

Lors de d'une stimulation prolongée par l'agoniste, les P2XR peuvent subir des changements de conformation et augmenter leur perméabilité (Khakh *et al.* 1999). Ces trimères vont ainsi former un canal cationique non sélectif perméable aux ions de grande taille. Ce flux ionique entraîne un changement de la concentration ionique intracellulaire donc une variation de potentiel de membrane (Khakh et North, 2006).

L'activation des récepteurs P2X peut être suivie d'une période de désensibilisation. Celle-ci va être plus ou moins rapide selon les récepteurs. L'activité des récepteurs P2X peut aussi être régulée par certains ions, par le pH, ou par des xénobiotiques (Khakh et North, 2006).

Parmi les P2XR, les deux récepteurs les plus impliqués dans l'immunité innée et la réponse inflammatoire sont P2X<sub>4R</sub> et P2X<sub>7R</sub> (Stokes et Surprenant, 2009 ; Seil *et al.* 2010 ; Kahlenberg et Dubyak, 2004).

#### - Le récepteur P2X<sub>4</sub>

Les P2X<sub>4R</sub> sont localisés de manière prédominante au niveau intracellulaire car ils sont internalisés par endocytose *via* des vésicules recouvertes de clathrine (Bobanovic *et al.* 2002 ; Royle *et al.* 2002 ; Royle *et al.* 2005). Dans la cellule ils sont principalement localisés dans les lysosomes (Qureshi *et al.* 2007 ; Stokes et Surprenant, 2009).

Des expériences de co-immunoprécipitation indiquent que ce récepteur peut se polymériser avec d'autres sous-unités des P2XR. La fixation d'un agoniste entraîne la formation d'un trimère : soit un homotrimère contenant uniquement des sous-unités P2X<sub>4</sub>, soit un hétérotrimère avec d'autres sous unités P2X, comme par exemple P2X<sub>1</sub> ou P2X<sub>7</sub> (Burnstock *et al.* 2012 ; Guo *et al.* 2007).

Le récepteur P2X4 peut former un canal perméable aux ions calciques et potassiques. Il a été montré que son activation entraînait une diminution de la concentration intracellulaire en  $K^+$  et ainsi la sécrétion d'IL1 $\beta$  chez des macrophages traités par LPS (Seil *et al.* 2010). Ainsi, le récepteur P2X4R pourrait jouer un rôle dans l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Les récepteurs P2X4 sont activés par des concentrations intermédiaires d'ATP, qui est son agoniste le plus puissant. Les récepteurs P2X4 sont relativement insensibles aux antagonistes classiques des récepteurs P2X comme la suramine ou le PPADS (Buell *et al.* 1996). Il n'existe pas d'antagonistes très sélectifs de P2X4R, mais ces récepteurs sont modulés de façon positive par  $Zn^{2+}$  (Garcia-Guzman *et al.* 1997) et par l'ivermectine (Silberberg *et al.* 2007 ; Jelinkova *et al.* 2008). Cet antiparasitaire semble pouvoir augmenter la réponse et le nombre de récepteurs P2X4 à la surface de la membrane en interagissant avec un site allostérique de P2X4R (Asatryan *et al.* 2010). Cependant, l'ivermectine pourrait également être un modulateur allostérique positif de P2X7R dans les macrophages humains (Nörenberg *et al.* 2012).

#### *- Le récepteur P2X7*

Le récepteur P2X7, anciennement appelé P2Z, est largement distribué dans l'organisme des mammifères, notamment au niveau des cellules nerveuses et hématopoïétiques comme les monocytes ou les macrophages (Burnstock et Knight, 2004). Le gène codant pour la sous-unité P2X7 est localisé sur le même chromosome que celui de la sous-unité P2X4. Ainsi, parmi toutes les sous-unités de P2R, le récepteur P2X7 a la séquence en acides aminés la plus proche de la sous-unité P2X4 (environ 49 % d'identité) (North, 2002).

Le récepteur P2X7 possède une affinité plus faible pour l'ATP que les autres récepteurs P2X et le BzATP est son agoniste le plus puissant (Gargett *et al.* 1997 ; Gevert *et al.* 2006). L'activation de ce récepteur est très affectée par les concentrations ioniques (Rassendren *et al.* 1997). Les réponses à l'ATP sont potentialisées dans un milieu contenant une faible concentration en ions bivalents, comme le  $Ca^{2+}$  ou le  $Mg^{2+}$ . Ainsi l'ATP<sup>4-</sup> semble être la forme active d'ATP sur le récepteur P2X7 (Surprenant *et al.* 1996).

Une fois activé ce récepteur peut former des homo- ou des hétéro-trimères et au moins dix isoformes de P2X7R ont été identifiés chez l'homme (Khakh et North, 2006 ; Nicke *et al.* 2009). P2X7R est le plus original des P2XR, en effet sa chaîne C-terminale est plus longue que celle des autres P2XR, ce qui permet des interactions avec des protéines intracellulaires (Kim *et al.* 2001).

Cette différence structurale lui donne la capacité à former un large pore non sélectif permettant le passage d'ions et de molécules ayant un poids moléculaire important (jusqu'à 900 Da) lors d'une stimulation prolongée à l'ATP (Steinberg et Silverstein, 1987 ; Locovei *et al.* 2007). Cette ouverture du pore peut entraîner la mort de la cellule (Surprenant *et al.* 1996).

Certaines études suggèrent l'intervention d'autres protéines dans la formation de pore (Pelegrin et Surprenant, 2006 ; Locovei *et al.* 2007). Ainsi, la fixation d'ATP stimulerait un efflux rapide d'ions  $K^+$  par un canal cationique non sélectif couplé au récepteur P2X7 (Kahlenberg et Dubyak, 2004) et entraînerait le recrutement de Panx-1 (Kanneganti *et al.* 2007). Panx-1 a été identifiée comme impliquée dans le relargage d'ATP en lien avec l'activation de P2X7R dans de nombreux types cellulaires (Iglesias *et al.* 2008). De plus, il a été montré que P2X7R pouvait interagir avec un autre hémicanal impliqué dans le relargage d'ATP, la connexine-43 (Fortes *et al.* 2004 ; Anselmi *et al.* 2008).

Le récepteur P2X7 n'est pas seulement impliqué dans le transport d'ions, celui-ci active également de nombreuses voies de signalisation intracellulaire. Sa stimulation entraîne ainsi l'activation de plusieurs kinases, comme les protéines kinases PKC et PKD, la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) et Extracellular signal-regulated kinases 1 et 2 (ERK1/2) (Aga *et al.* 2002 ; Bradford et Soltoff, 2002 ; Amstrup et Novak, 2003 ; Jacques-Silva *et al.* 2004). Une activation de facteurs de transcription tels que AP-1 (activator protein 1), CREB (cAMP response element-binding protein) et NF- $\kappa$ B en réponse à la stimulation des récepteurs P2X7 a également été mise en évidence (Ferrari *et al.* 1997 ; Ferrari *et al.* 1999 ; Aga *et al.* 2002 ; Lenertz *et al.* 2009). P2X7R est également connu pour être impliqué dans la production de ROS (Parvatheni *et al.* 2003 ; Cruz *et al.* 2007).

L'activation du récepteur P2X7 peut aussi provoquer la mort cellulaire, par nécrose ou par apoptose, en fonction du temps d'incubation de l'agoniste, de la concentration d'ATP et du type cellulaire. Ainsi P2X7 peut être activé lors d'un processus pathologique lorsque la concentration en ATP augmente localement ou que les ecto-nucléotidases sont dérégulées (Lenertz *et al.* 2011).

Le rôle des récepteurs P2X7 a également été mis en évidence dans les processus inflammatoires (Chessell *et al.* 2005) notamment en induisant la maturation et la libération de cytokines comme IL-1 $\beta$  dans les monocytes et les macrophages (Ward *et al.* 2010, Wilson *et al.* 2004 ; Pelegrin et Surprenant, 2006).

Le récepteur P2X7 est associé à de nombreuses pathologies notamment neurologiques, musculo-squelettiques, inflammatoires ou immunitaires. Parmi elles, certaines impliquent également l'inflammasome NLRP3 comme par exemple la sclérose en plaque (Yiangou *et al.* 2006), la maladie d'Alzheimer (Ryu et McLarnon, 2008), la polyarthrite rhumatoïde (Portales-Cervantes *et al.* 2010), la goutte (Tao *et al.* 2013) ou la fibrose pulmonaire (Riteau *et al.* 2010). Certaines études montrent d'ailleurs des résultats intéressants sur ces maladies en antagonisant ou en invalidant P2X7R chez des souris (Chessell *et al.* 2005 ; Riteau *et al.* 2010).

Ces dernières années les récepteurs purinergiques, et notamment P2X7R, sont devenus une cible potentielle de médicaments. Ainsi, des antagonistes sélectifs de P2X7R ont été développés dans un but thérapeutique comme par exemple A-438079 ou A-740003 (Nelson *et al.* 2006 ; Honore *et al.* 2006). De nombreux autres antagonistes de P2X7R ont également été synthétisés par différents laboratoires comme AZ11645373 ; AZD9056 ; AZ11645373, AZ10606120, GSK314181A et A-804598. Certaines molécules ont donné de bons résultats précliniques faisant même l'objet d'essais cliniques chez l'homme (Gever *et al.* 2006 ; Jarvis et Khakh, 2009 ; Arulkumaran *et al.* 2011).

Cependant, les résultats bien qu'encourageants au début n'ont pas toujours donné les résultats attendus. Ainsi, l'antagoniste de P2X7R, l'AZD9056 n'a pas montré d'efficacité supérieure au placebo dans le traitement des symptômes de la polyarthrite rhumatoïde (Keystone *et al.* 2012). De même, la molécule CE-224,535 n'a pas été plus efficace qu'un placebo pour le traitement de la polyarthrite chez des patients résistants au méthotrexate (Stock *et al.* 2012).

### 3. Lien entre les récepteurs purinergiques et l'inflammasome

De nombreux modes d'activation de l'inflammasome NLRP3 ont été mis en évidence (cf 1.2.3.2). Ici, nous nous focaliserons sur l'implication des récepteurs purinergiques dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages.

Les cellules nécrotiques ou activées peuvent libérer de l'ATP extracellulaire qui va se fixer sur les récepteurs purinergiques ou être dégradé par les ecto-ATPases. L'ATP ou ses métabolites sont alors capables d'activer les différents récepteurs purinergiques P2X, P2Y ou P1 (Yegutkin, 2008). Les nucléotides pourront alors activer les cellules de façon paracrine ou autocrine entraînant ainsi une modulation des fonctions immunitaires (Gombault *et al.* 2013).

De plus, il a été montré que les cristaux de MSU, de silice ou d'aluminium pouvaient entraîner une libération d'ATP par les macrophages et activer l'inflammasome NLRP3 de façon autocrine (Sanz *et al.* 2009 ; Riteau *et al.* 2012; Gombault *et al.* 2013).

Initialement, P2X7R semblait être le seul récepteur purinergique impliqué dans l'activation de la libération d'IL-1 $\beta$  (Solle *et al.* 2001 ; Ferrari *et al.* 2006). La stimulation de P2X7R par de l'ATP va induire une production de ROS et un efflux potassique qui permettront l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Kahlenberg et Dubyak, 2004 ; Kanneganti *et al.* 2007). Ainsi, il semblait qu'en réponse aux particules, le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  par les macrophages impliquait une libération d'ATP en tant que signal de danger et une fixation à P2X7R.

Cependant il a été montré que le sérum amyloïde A (SAA) ou le biglycan pouvait activer l'inflammasome NLRP3 *via* P2X7R sans libération d'ATP (Niemi *et al.* 2011 ; Babelova *et al.* 2009). De même, le blocage ou la délétion de P2X7R n'affectent pas la libération d'IL-1 $\beta$  en réponse aux cristaux de MSU, de silice ou d'aluminium (Ataman-Onal *et al.* 2006 ; Iyer *et al.* 2009 ; Eisenbarth *et al.* 2008). Riteau *et al.* (2012) montrent que la délétion dans des BMDM de souris de P2X7 ne diminue pas significativement la libération d'IL-1 $\beta$  en réponse au MSU, mais diminue en réponse à l'ATP exogène. De plus les antagonistes de P2X7R diminuent la libération d'IL-1 $\beta$  en réponse à ces traitements (Riteau *et al.* 2012).

D'autres récepteurs purinergiques ont montré qu'ils pouvaient être impliqués dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 comme P2X4 (Seil *et al.* 2010 ; De Rivero Vaccari *et al.* 2012), P2Y6 (Uratsuji *et al.* 2012), P2Y2 ou les récepteurs P1 à l'adénosine (Baron *et al.* 2014). Selon les activateurs ou les types cellulaires, le mode d'activation de l'inflammasome NLRP3 semble différent.

Ainsi, le rôle de l'ATP et des récepteurs purinergiques dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 est encore mal connu. En effet, l'ATP libéré est dégradé rapidement par des ecto-enzymes en différents métabolites (ADP, AMP et adénosine) qui vont à leur tour venir activer plusieurs types de récepteurs (P2X, P2Y, P1) ce qui rend plus complexe l'élucidation du mécanisme exact d'activation de l'inflammasome (Fig. 15).

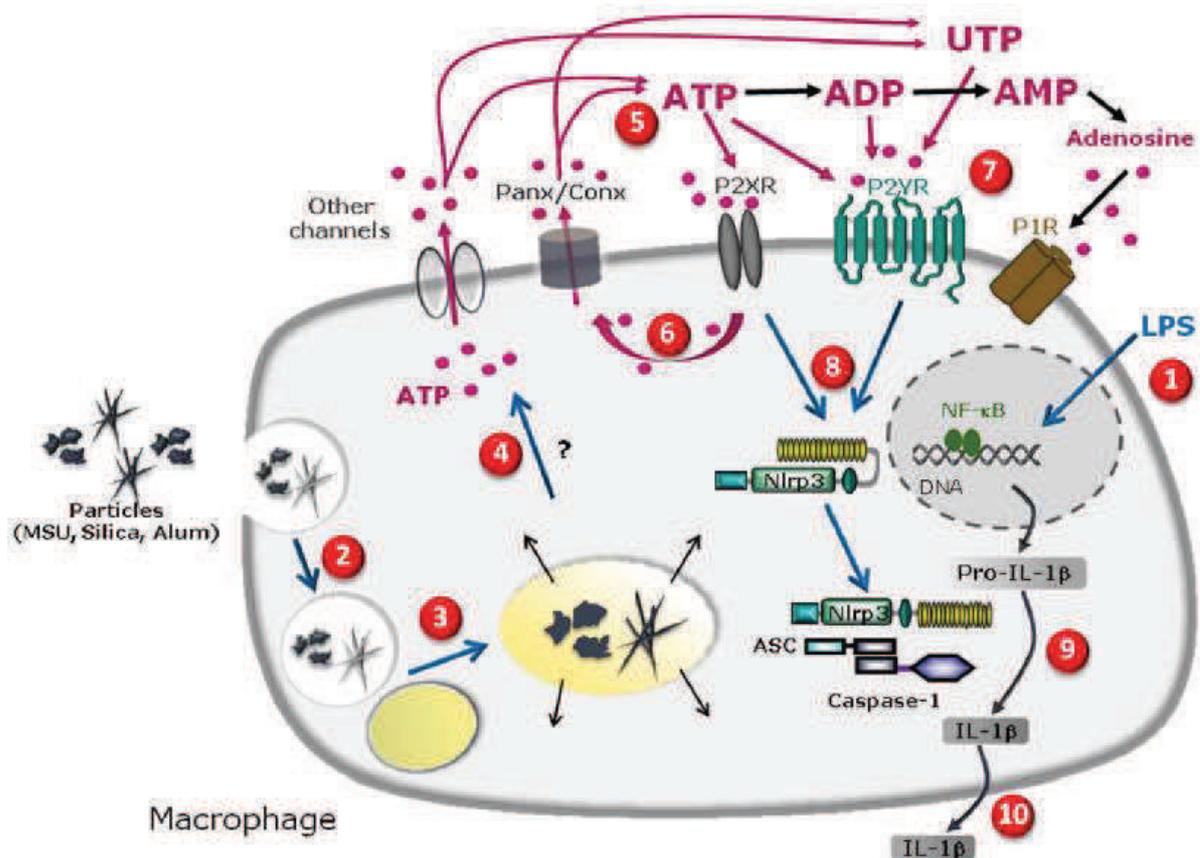


Figure 15. Schéma de la cascade de signalisation permettant la sécrétion d'IL-1β après traitement des macrophages pré-activés par du LPS par des particules (Gombault *et al.* 2013)

Gombault *et al.* (2013) font le bilan de l'activation de l'inflammasome dans les macrophages en réponse aux particules. La pré-activation par le LPS va induire la production de pro-IL-1 $\beta$  (1), la particule est internalisée (2), il y a une fusion avec le lysosome (3) et une déstabilisation du phagolysosome qui entraîne une libération de cathepsines dans le cytosol (4). L'ATP et d'autres nucléotides vont pouvoir être relargués dans le milieu extracellulaire par des canaux, pannexines ou connexines (5). La sécrétion autocrine d'ATP peut être amplifiée par les récepteurs purinergiques P2XR (6). L'ATP ou l'UTP relargués, ainsi que leurs produits de dégradation vont pouvoir activer les différents récepteurs purinergiques P2X, P2Y ou P1 (7) entraînant ainsi l'activation de l'inflammasome NLRP3, le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  (9) et la libération de l'IL-1 $\beta$  (10) (Gombault *et al.* 2013).

En conclusion, de très nombreuses publications montrent que l'ATP et/ou la signalisation purinergique jouent un rôle majeur dans l'activation de l'inflammasome NLRP3, même si d'autres mécanismes peuvent exister. Ainsi, une meilleure compréhension de ces mécanismes permettrait l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

## **II) OBJECTIFS**

Martinon *et al.* (2002) ont décrit l'inflammasome comme une plateforme intracytoplasmique permettant la maturation de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1 $\beta$ . L'inflammasome NLRP3 est actuellement le plus connu des inflammasomes et va permettre la protéolyse de la pro-IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  bioactive par la caspase-1. L'inflammasome NLRP3 est impliqué dans de nombreuses pathologies telles que la maladie de Crohn (Villani *et al.* 2009), la polyarthrite rhumatoïde (Rosengren *et al.* 2005), les cryopyrinopathies (Agostini *et al.* 2004), le diabète (Schroder *et al.* 2010), la fibrose pulmonaire (Gasse *et al.* 2009, Riteau *et al.* 2010) ou la goutte (Martinon *et al.* 2006). L'inflammasome NLRP3 est notamment activé par des cristaux comme l'acide urique (Martinon *et al.* 2006) et par l'ATP extracellulaire (Mariathasan *et al.* 2006). Cependant, les mécanismes moléculaires exacts de l'activation de l'inflammasome NLRP3 *via* les récepteurs purinergiques est encore mal connu.

Initialement le récepteur P2X7 semblait être le seul récepteur purinergique impliqué dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Kahlenberg et Dubyak 2004 ; Ferrari *et al.* 2006 ; Di Virgilio *et al.* 2007). En effet, la stimulation du récepteur P2X7 par l'ATP induit la formation d'un canal permettant l'efflux d'ions K<sup>+</sup>, la production de ROS et entraîne la production de l'IL-1 $\beta$  (Pelegriin et Surprenant, 2006). Mais plus récemment d'autres récepteurs purinergiques pouvant également activer l'inflammasome NLRP3 ont été identifiés, tels que P2X4 (Seil *et al.* 2010), P2Y6 (Uratsuji *et al.* 2012), P2Y2 ou les récepteurs de l'adénosine (Riteau *et al.* 2012 ; Baron *et al.* 2014).

La plupart des études ayant été menées sur la souris ou sur des lignées cellulaires, nous souhaitons vérifier ces hypothèses chez l'homme. De plus, la caspase-1 est bien connue pour cliver la pro-IL-1 $\beta$  mais son implication dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 $\alpha$  ou IL-6 en réponse aux activateurs de l'inflammasome reste encore controversée.

L'objectif de ma thèse a été de mieux caractériser l'implication des récepteurs purinergiques dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages humains. Une meilleure compréhension de cette voie de signalisation permettrait de nouvelles possibilités de traitement des pathologies inflammatoires.

Ainsi le modèle que nous avons utilisé est celui de macrophages humains en culture primaire. Les macrophages proviennent de la différenciation de monocytes du sang périphérique obtenus à partir de sang de donneurs sains auprès de l'Etablissement français du sang (EFS) de Rennes. Ce modèle a été mis au point et caractérisé au cours de mon stage de Master 2. Ces cellules représentent un bon modèle de macrophages tissulaires et expriment les différents récepteurs impliqués dans l'immunité innée et l'inflammation (Locati *et al.* 2013). De plus, ces cellules libèrent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-1 $\alpha$  ou l'IL-6.

Dans un premier temps, nous avons montré l'implication du récepteur P2X7R dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la libération d'IL-1 $\beta$  par les macrophages humains à l'aide d'agonistes purinergiques, ATP $\gamma$ S et BzATP. Notre étude montre également que la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$  et IL-6 est indépendante de cette voie. Ce travail suggère également que le blocage du récepteur P2X7 par des antagonistes sélectifs représente une nouvelle approche thérapeutique permettant le contrôle de la production d'IL-1 $\beta$ . La première partie de ce travail a donné lieu à un article publié dans *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* : « Involvement of purinergic receptors and NLRP3-inflammasome pathway in the ATP-induced cytokine release from macrophages ».

La deuxième partie de notre étude utilise les cristaux d'acide urique (MSU) comme modèle expérimental. Les cristaux d'acide urique représentent un bon modèle d'activation de l'inflammasome NLRP3 et sont d'ailleurs impliqués dans la physiopathologie de la goutte. Dans cette étude, nous avons souhaité mettre en évidence les voies de signalisation impliquées dans la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  et notamment le rôle des récepteurs purinergiques dans l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Pour ce faire, nous avons utilisé des antagonistes ainsi que des ARN interférants (siRNA) ciblant les récepteurs purinergiques. Cette deuxième partie du travail a fait l'objet d'un article soumis dans le journal *Cell Death and Disease* : « IL-1 $\beta$  production is dependent of the activation of purinergic receptors and NLRP3-inflammasome pathway in human macrophages ».

Nos résultats mettent en évidence le rôle primordial des récepteurs purinergiques dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 chez l'homme. Le récepteur P2X7 semble tout particulièrement impliqué ainsi il représente une cible thérapeutique importante dans le traitement de pathologies inflammatoires.

# **III) RESULTATS**

# **Chapitre 1 :**

Implication du récepteur P2X7 dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 des macrophages traités par des analogues de l'ATP

## 1. Contexte scientifique

Le récepteur P2X7 a été décrit comme le premier récepteur purinergique impliqué dans la libération d'IL-1 $\beta$  (Solle *et al.* 2001 ; Ferrari *et al.* 2006 ; Di Virgilio *et al.* 2007). Ainsi, notre étude s'est plus particulièrement portée sur l'implication de ce récepteur dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse aux agonistes de l'ATP.

Nous avons choisi de stimuler les macrophages pendant 18 heures par une faible dose de LPS (0,1  $\mu$ g/mL) afin d'induire l'expression de la pro-IL-1 $\beta$ . Suite à cette étape de pré-activation, nous induisons l'activation l'inflammasome NLRP3 à l'aide d'ATP $\gamma$ S et de BzATP. Ces deux analogues de l'ATP ont une durée de vie prolongée car ils ne sont pas hydrolysables par les ATPases et possèdent une bonne affinité pour le récepteur P2X7 ; le BzATP étant même l'agoniste le plus puissant pour ce récepteur (Gever *et al.* 2006).

Ainsi, nous avons étudié l'expression de NLRP3 et de P2X7R, au niveau protéique par immunocytochimie et au niveau génique par RT-qPCR. Nous avons mesuré l'expression des inflammasomes, de P2X7R et des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  et IL-6 dans des macrophages pré-activés ou non. Afin de mettre en évidence le rôle du récepteur purinergique P2X7 dans la libération de ces cytokines pro-inflammatoires, nous avons prétraités les cellules une heure avant avec des antagonistes sélectifs de P2X7R, A-438079 (A43) et A-740003 (A74).

Article 1 : "Involvement of purinergic receptors and NLRP3-inflammasome pathway in the ATP-induced cytokine release from macrophages"

# Involvement of purinergic receptors and NOD-like receptor-family protein 3-inflammasome pathway in the adenosine triphosphate-induced cytokine release from macrophages

Thomas Gicquel,\* Tatiana Victoni,\* Alain Fautrel,\*<sup>†</sup> Sacha Robert,\* Florence Gleonnec,\* Marie Guezingar,\* Isabelle Couillin,<sup>‡</sup> Véronique Catros,\* Elisabeth Boichot\* and Vincent Lagente\*

\*UMR991 INSERM/University of Rennes 1, <sup>†</sup>Histopathological platform (H2P2), University of Rennes 1, Rennes, and

<sup>‡</sup>UMR7355INEM CNRS, University of Orleans, Orleans, France

## SUMMARY

1. Adenosine triphosphate (ATP) has been described as a danger signal activating the NOD-like receptor-family protein 3 (NLRP3)-inflammasome leading to the pro-inflammatory cytokine, interleukin (IL)-1 $\beta$ , release in the lung. The NLRP3-inflammasome pathway has been previously described to be involved in experimental collagen deposition and the development of pulmonary fibrosis.

2. The aim of the present study was to investigate the role of the NLRP3 inflammasome pathway and P2X<sub>7</sub> purinergic receptor in the activation of human macrophages *in vitro* by ATP.

3. We showed that adenosine 5'-[ $\gamma$ -thio]triphosphate tetralithium salt (ATP $\gamma$ S) and 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP), two stable analogs of ATP, are able to potentiate the release of IL-1 $\beta$  from human monocyte-derived macrophages induced by low concentration of lipopolysaccharide (LPS). However, in the same conditions no increase in IL-1 $\alpha$  and IL-6 was observed. Immunohistochemistry has shown that human macrophages natively express NLRP3 and purinergic P2X<sub>7</sub> receptors (P2X<sub>7</sub>R). NLRP3 and IL-1 $\beta$  mRNA expression were induced from LPS-primed macrophages, but also after 5-h treatment of BzATP as analysed by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. However, other inflammasome pathways (NLRP1, NLRP2, NLRC4, NLRP6 and AIM2) and P2X<sub>7</sub>R were not induced by BzATP. We observed that P2X<sub>7</sub>R antagonists, A-438079 and A-740003, were able to reduce the release of IL-1 $\beta$ , but not of IL-1 $\alpha$  and IL-6 from macrophages stimulated by ATP $\gamma$ S or BzATP.

4. The present results showed the involvement of the P2X<sub>7</sub>R-NLRP3 inflammasome pathway in the secretion of IL-1 $\beta$  from ATP-stimulated human macrophages, and suggest that P2X<sub>7</sub>R were not involved in IL-1 $\alpha$  and IL-6 release. This study also points out that repression of the P2X<sub>7</sub>R represents a novel potential therapeutic approach to control fibrosis in lung injury.

**Key words:** adenosine triphosphate, cytokines, inflammasome, macrophage, NOD-like receptor-family protein 3, purinergic receptors.

## INTRODUCTION

Several inflammatory diseases have been reported to be linked with the activation of the NOD-like receptor (NLR)-family protein (NLRP3)-inflammasome pathway including gout,<sup>1</sup> Crohn's disease,<sup>2</sup> rheumatoid arthritis<sup>3</sup> and cryopyrin-associated periodic syndrome.<sup>4</sup> In addition, it has been previously shown that collagen deposition leading to pulmonary fibrosis is also closely associated with the activation of the inflammasome-NLRP3 pathway.<sup>5–7</sup> Several inflammasome pathways have been described; however, the major pathway consists of three main effectors, NLRP3, pro-caspase-1 and the apoptosis speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) adapter, which link interactions between the former proteins.<sup>8</sup> The interaction of NLRP3 with both ASC and pro-caspase-1 leads to activation of the latter to its effective form, caspase-1, originally termed interleukin (IL)-1-converting enzyme. NLRP3 is mainly expressed by myeloid cells, as monocytes and macrophages, and is upregulated in response to pathogen-associated molecule patterns. However, lipopolysaccharide (LPS) by itself is ineffective as a stimulator of IL-1 $\beta$  release from macrophages. A second signal, such as danger-associated molecule patterns, is required to activate caspase-1.<sup>9</sup> After auto-activation through inflammasome assembly, caspase-1 cleaves pro-IL-1 $\beta$  to its active secreted form, IL-1 $\beta$ .

IL-1 $\beta$  induced the production of several other chemokines or cytokines, such as tumour necrosis factor and IL-6, or proteases, such as matrix metalloproteinase associated with neutrophil recruitment and proliferation of resident cells, mainly fibroblasts.<sup>7</sup>

Unlike monocytes, monocyte-derived macrophages or alveolar macrophages isolated from healthy volunteers stimulated with LPS did not release IL-1 $\beta$ . LPS treatment induced the steady-state levels of IL-1 $\beta$  messenger ribonucleic acid (mRNA) on macrophages, but clearly showed that the defect in IL-1 $\beta$  release is post-translational.<sup>10</sup> Extracellular adenosine triphosphate (ATP) was previously reported to play a major role to trigger synthesis and release of mature IL-1 $\beta$  after prestimulation of macrophages by an inflammatory signal, such as LPS.<sup>11</sup> ATP is described as an agonist of purinergic P2X receptor predominantly expressed

Correspondence: Vincent Lagente, UMR991 INSERM, Université de Rennes 1, Faculté de Pharmacie, 2, avenue du prof Léon Bernard, 35043 Rennes Cedex, France. Email: vincent.lagente@univ-rennes1.fr

Received 29 May 2013; revision 28 November 2013; accepted 20 December 2013.

© 2014 Wiley Publishing Asia Pty Ltd

on immune cells,<sup>12</sup> and is reported to be involved in the pathophysiology of LPS-induced lung injury, modulating airway inflammatory process and functional changes.<sup>13</sup>

The molecular mechanisms by which ATP triggers P2X receptors, inducing IL-1 $\beta$  production from macrophages, leading to inflammation and fibrosis are not clearly described. Using two stable analogues of ATP, we investigated the effects of ATP, and the role of P2X<sub>7</sub> purinergic receptors and the NLRP3-inflammatory pathway in the activation of human macrophages and the release of cytokines including IL-1 $\beta$ .

## METHODS

### Reagents

Phosphate-buffered saline, RPMI 1640, penicillin-streptomycin and L-glutamine were purchased from Invitrogen (Eugene, OR, USA), foetal calf serum was purchased from Hyclone (Logan, UT, USA), and HEPES and BSA were purchased from Eurobio (Les Ulis, France). Ultrapure *Escherichia coli* 0111:B4 LPS was purchased from InvivoGen (Toulouse, France); A-74003 and A-438079 from Tocris Biosciences (Bristol, UK); 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP), a selective P2X<sub>7</sub> receptor agonist; and adenosine 5'-[ $\gamma$ -thio]triphosphate tetralithium salt (ATP $\gamma$ S), a non-hydrolysis P2X receptor agonist, were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA); and recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) from R&D Systems Europe (Lille, France).

### Preparation of macrophages and treatment

Peripheral blood mononuclear cells were obtained from human buffy-coat (EFS, Rennes, France) by differential centrifugation on UNI-SEP U-10 (Novamed, Jerusalem, Israel). The experiments complied with the relevant ethical requirements according to the French law number 93-5 on 4 January 1994 relative to the security of blood transfusion and biologically approved by Etablissement Français du Sang (Rennes, France). Monocytes from healthy donors were enriched using a human CD14 Microbeads separation kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), and cultured at a concentration of 10<sup>6</sup> cells/mL on 24-well plates at 37°C under 5% humidified CO<sub>2</sub> in RPMI supplemented with penicillin 100 UI/mL, streptomycin 100  $\mu$ g/mL, L-glutamine 2 mmol/L and HEPES buffer 1 mmol/L supplemented with 10%

fetal calf serum. Macrophages were obtained after differentiation from monocytes by incubation with 50 ng/mL rhGM-CSF in RPMI medium. After 7 days, the supernatant was removed and cells were stimulated with various stimuli. Macrophages were incubated with 0.1  $\mu$ g/mL Ultrapure *E. coli* 0111:B4 LPS overnight. Cells were then treated with P2X<sub>7</sub>R purinergic antagonists 100  $\mu$ mol/L A-74003 (A74) or 100  $\mu$ mol/L A-438079 (A43) 1 h before treatment with 100  $\mu$ mol/L 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP) or adenosine 5'-[ $\gamma$ -thio]triphosphate tetralithium salt (ATP $\gamma$ S) for 5 or 6 h. Supernatants were removed and replaced with fresh medium during 24 h.

### Measurement of cytokine production

The production of IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  and IL-6 was measured in the supernatant using a Duoset enzyme-linked immunosorbent assay kit (R&D system, Abingdon, UK) according to the manufacturer's procedure.

### Real-time polymerase chain reaction analysis

Macrophages were lysed in RLT buffer (Qiagen, Hilden, Germany) supplemented with 1% 2-mercaptoethanol. Total RNA was isolated using RNeasy MicroKit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Total RNA (1  $\mu$ g) was reverse transcribed into first-strand cDNA using a High-Capacity cDNA Achieve Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's procedure. RNA quantity and purity were assessed with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nyxor Biotech, Paris, France). Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was carried out by the fluorescent dye SYBR Green methodology using the SYBR Green PCR Master Mix and the STEP one Plus (Applied Biosystems). Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the reference gene. Relative quantification values were expressed using the 2<sup>DDCt</sup> method<sup>14</sup> as fold changes in the target gene normalized to the reference gene and related to the expression of the controls. Primer pairs for each transcript were chosen with NCBI software <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Table 1).

### Immunocytochemistry analysis

Macrophages were cultivated in 8-well Labtek tissue culture slides for immunocytochemistry. Cells were washed by

**Table 1** Human primers designed for the present study

Human primers	Sense	Antisense
GAPDH	ATGACATCAAGAAGGTGGTG	CATACCAGGAAATGAGCTTG
NLRP3	GTGTTTTCGAATCCCACTGTG	TCTGCTTCTCACGTACTTTCTG
P2X7R	GAACAATATCGACTTCCCCGG	TTATCGCCTGTTTCTCGGAAG
NLRP1	GGACTGACGATGACTTCTGG	ATCACAAAGCAGAGACCCG
NLRP2	TCGGGTTGGTGTCTTGTC	CAACTTAGCACCCTCATCCAG
NLRC4	CAGTCCCCTCACCATAGAAG	TCAAGTTACCCAAGCTGTTCAG
NLRP6	TCTTCATCCACTTTTCAGGC	CTCAGAAAGGTCTCGGCAG
AIM2	TGAAACCCCGAAGATCAACAC	CCCAGTACTTCCATTTTCCCAG
IL-1 $\beta$	ATGCACCTGTACGATCACTGA	ACAAAGGACATGGAGAACC
IL-1 $\alpha$	CCTCCATTGATCATCTGTCTCTG	GCTTGGATGTTTATAGAGGTTTCAG
IL-6	AAAGAGGCACTGGCAGAAAA	TTTACCAGGCAAGTCTCTCT

phosphate-buffered saline, fixed and permealized by acetone at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Each step of the Ventana DABMap (Roche diagnostic, Basel, Switzerland) detection kit procedure was optimized on the Discovery instrument and was preset. Applications of the Ventana High Temperature Liquid Coverslip (Roche diagnostic) occurred throughout the automated protocol as appropriate. Likewise, the slides were rinsed between steps with Ventana Tris-based Reaction buffer (Roche diagnostic). Endogen peroxidase was blocked with Inhibitor-D 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Roche diagnostic) for 4 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . After rinsing, slides were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 60 min with a 1 : 50 dilution of rabbit polyclonal P2X<sub>7</sub>R (Abcam, Cambridge, UK), 1 : 50 dilution rabbit polyclonal NLRP3 (Sigma), and compared with isotype antibody control. Signal enhancement was carried out using the Ventana DABMap Kit (Roche diagnostic). Biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin G (H + L) secondary antibody (Vector Laboratory, Burlingame, CA, USA). Slides were then counterstained for 4 min with haematoxylin and rinsed. After removal from the instrument, slides were manually dehydrated and coverslipped. Slides were visualized with the Microscope Ni80 (Nikon, Tokyo, Japan) and NIS element software (Nikon).

### Statistical analysis

The results are expressed as means  $\pm$  SEM. Analysis of treatment effects between groups was carried out with a one-way ANOVA with Tukey's *post-hoc* test for group comparisons. The significance of differences between the groups for other parameters was determined using two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test. All analyses were carried out using Prism software (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA). For each analysis, two-sided *P*-values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

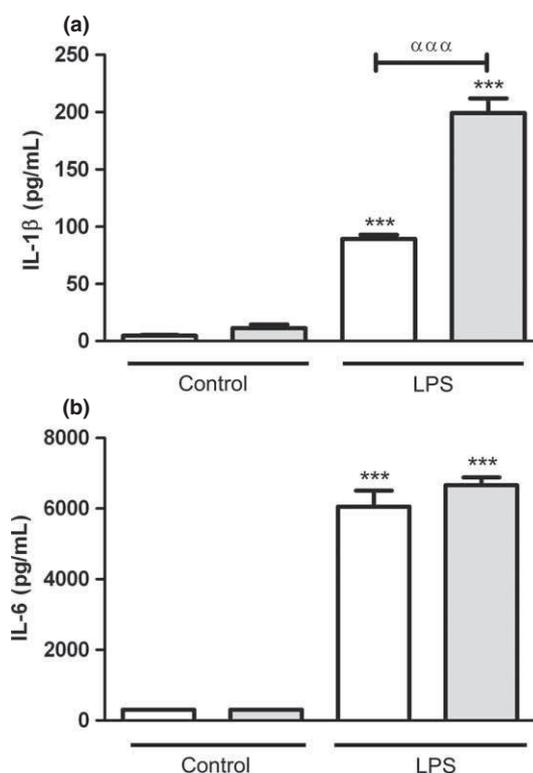
## RESULTS

### Effect of ATP $\gamma$ S on IL-1 $\beta$ production stimulated with LPS

In the absence of incubation with LPS, macrophages did not induce a significant production of IL-1 $\beta$  and IL-6, whereas incubation with 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS elicited a significant release of both cytokines (Fig. 1). However, cotreatment with both ATP $\gamma$ S 300  $\mu\text{mol}/\text{L}$  and LPS significantly increased the release of IL-1 $\beta$  in comparison to the incubation with LPS alone (Fig. 1a). In contrast, the production of IL-6 is not potentiated by ATP $\gamma$ S on LPS-treated macrophages (Fig. 1b).

### Transcript and protein expression of inflammasome pathways and P2X<sub>7</sub>R on macrophages

Immunocytochemistry showed that NLRP3 and P2X<sub>7</sub>R proteins were constitutively expressed by macrophages as compared with the control (non-targeting antibody; Fig. 2a–c). Furthermore, quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis showed that treatment with both LPS and BzATP significantly induced an increase in the expression of NLRP3 starting at 30 min and persisting after 5 h (Fig. 2d,f). P2X<sub>7</sub>R transcript levels were significantly increased after treatment with LPS individually or in combination with BzATP at 30 min (Fig. 2e), but not at 5 h



**Fig. 1** Effect of the combination of lipopolysaccharide (LPS) 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  with adenosine 5'-[ $\gamma$ -thio]triphosphate tetralithium salt (ATP $\gamma$ S) 300  $\mu\text{mol}/\text{L}$  on the production of interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6 from macrophages. Macrophages were incubated overnight with medium alone (control;  $\square$ ) or LPS 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  alone, and then stimulated with medium or ATP $\gamma$ S 300  $\mu\text{mol}/\text{L}$  ( $\square$ ) for 5 h. The culture supernatants were collected, and the concentrations of (a) IL-1 $\beta$  and (b) IL-6 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of one representative experiment in triplicate (one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test. \*\*\**P*  $< 0.001$  compared with the control treatment,  $\alpha\alpha\alpha$ *P*  $< 0.001$  compared with LPS alone).

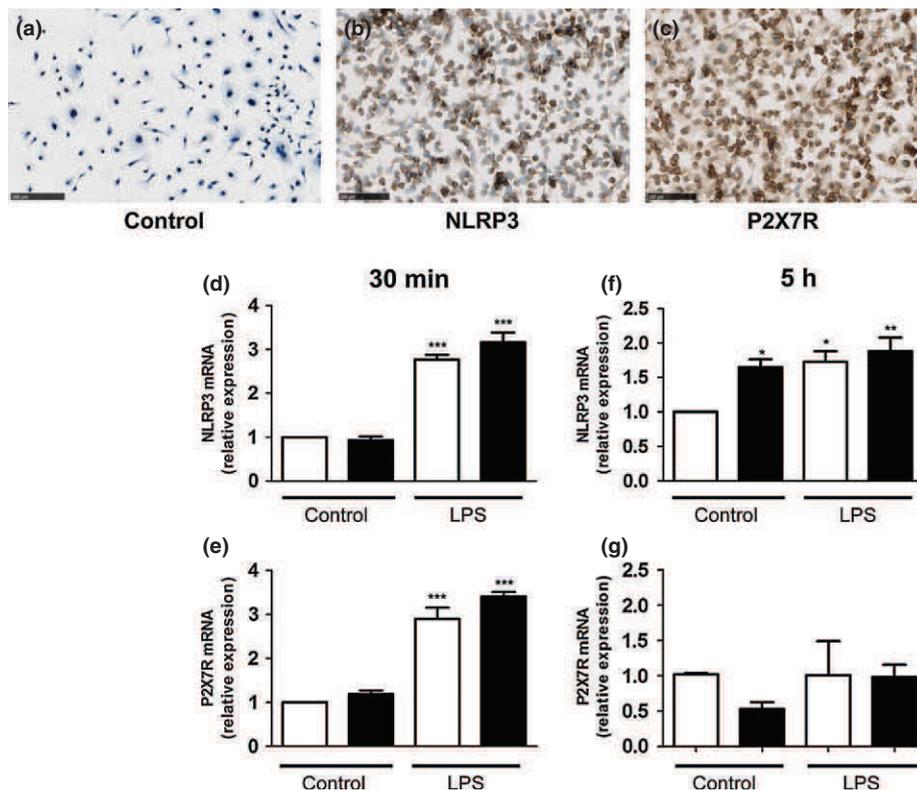
(Fig. 2g). However, the gene expression of other inflammasome pathways (NLRP1, NLRP2, NLRP4, NLRP6 and AIM2) was not modulated at 5 h (Fig. 3).

### Effect of P2X<sub>7</sub>R agonist, BzATP, on IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ and IL-6 mRNA expression

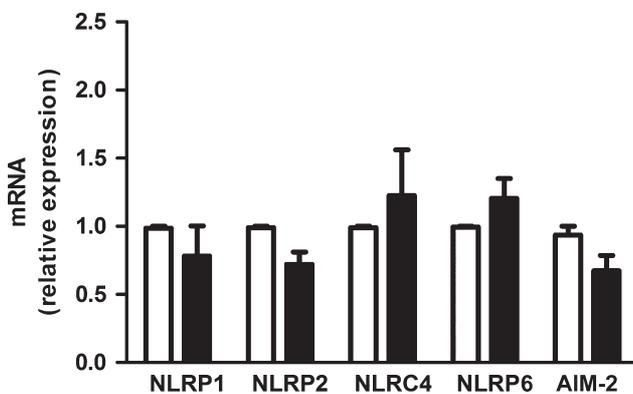
LPS (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and BzATP (250  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) induced an increase in IL-1 $\beta$  and IL-1 $\alpha$  mRNA expression after 30 min, as well as 5 h of treatment (Fig. 4a–d). In contrast, the expression of IL-6 mRNA is significantly increased in response to LPS + BzATP after 30 min (Fig. 4e) and BzATP alone after 5 h of treatment (Fig. 4f).

### Effect of P2X<sub>7</sub>R antagonists on IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ and IL-6 production

To confirm whether ATP induced the release of cytokines mediated by the P2X<sub>7</sub> receptor, macrophages were incubated with purinergic receptor antagonists. After LPS treatment, IL-1 $\beta$  production was significantly increased in the presence of ATP $\gamma$ S or BzATP, whereas the treatment with A-438079 and A-740003



**Fig. 2** Expression of NOD-like receptor-family protein 3 (NLRP3) and P2X<sub>7</sub>R proteins and messenger ribonucleic acid (mRNA) in macrophages. (a–c) Protein expression was analyzed by immunocytochemistry (24 h). (d–g) Macrophages were incubated overnight with medium alone (control; □) or lipopolysaccharide (LPS) 0.1 µg/mL alone, or in combination with 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP) 250 µmol/L (■) for 30 min or 5 h. mRNA expression was determined by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. The results are normalized to the gene expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. The data represent the mean ± SEM of three experiments (one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test). \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 compared with the control treatment.



**Fig. 3** Expression of inflammasomes messenger ribonucleic acid (mRNA) in macrophages. Macrophages were treated by 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP) 250 µmol/L (■) or medium (□) for 5 h. NLRP1, NLRP2, NLRP4, NLRP6, AIM2 mRNA (The results are normalized to the gene expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. The results are expressed as mean ± SEM of one representative experiment in triplicate (two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test). Six multiple comparisons by rows.

reduced ATP-induced IL-1 $\beta$  release at 6 h (Fig. 5a,c), but not at 24 h (Fig. 5b,d). In contrast, the increased release of IL-1 $\alpha$  induced by BzATP or ATP $\gamma$ S in the presence of LPS is not reduced by treatment with purinergic receptor antagonists

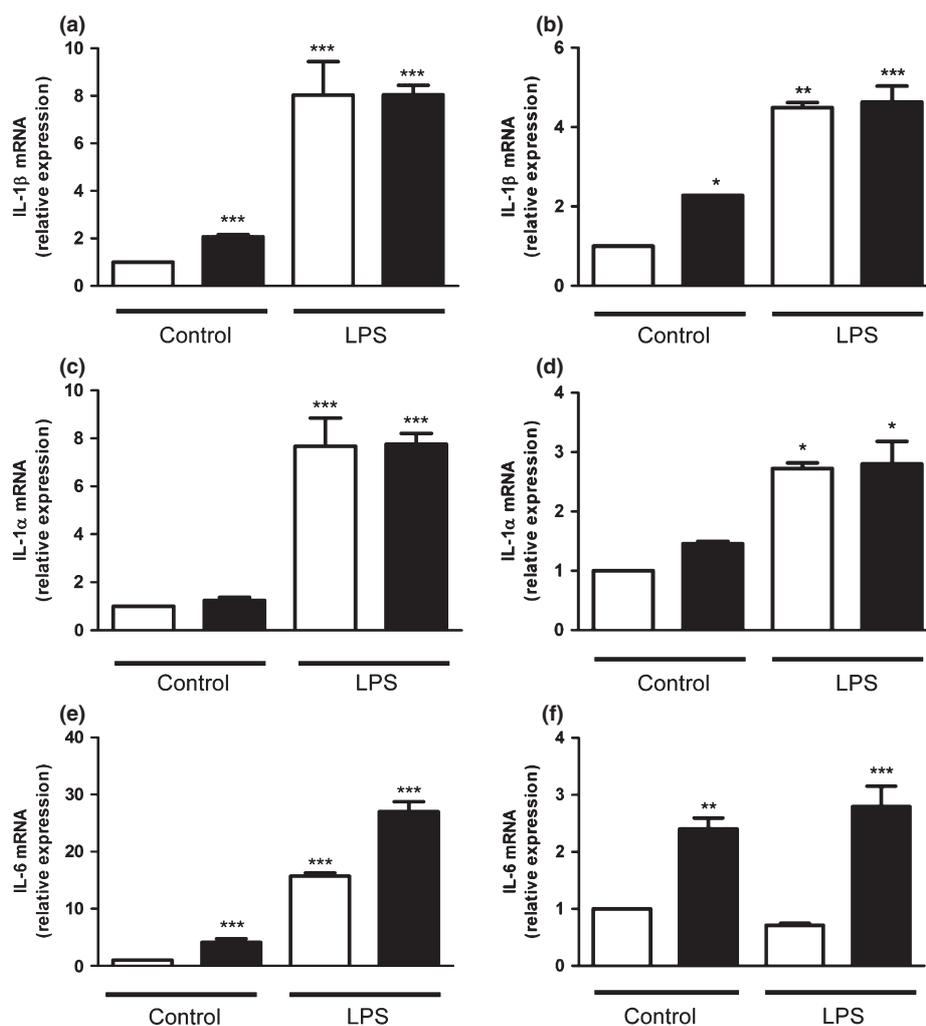
(Fig. 6a–d). Only LPS 0.1 µg/mL alone induced IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production at 24 h (Figs 5b,d, 6b,d). LPS also induced an increase in the release of IL-6 by macrophages (Fig. 6e–h). A-438079, but not A-740003 elicited a significant reduction of LPS + BzATP-induced IL-6 release at 6 and 24 h (Fig. 6e–h).

## DISCUSSION

The present study showed that the activation of human macrophages by a combination of LPS + ATP elicited the release of IL-1 $\beta$ , and this production is mainly as a result of the activation of the P2X<sub>7</sub> purinergic receptor and NLRP3-inflammasome pathway.

NLRP3-inflammasome pathway activation appears as the cornerstone of many inflammatory diseases including pulmonary fibrosis.<sup>5,6</sup> Resident macrophages have been described to be involved in chronic inflammation and in tissue remodelling leading to pulmonary fibrosis.<sup>15</sup> In the current study, we developed an experimental model of human macrophages differentiated from peripheral blood monocytes by GM-CSF. Thus, in these conditions, these cells represent a model of alveolar macrophages.<sup>16</sup>

Here, we showed that ATP $\gamma$ S (300 µmol/L) or BzATP (250 µmol/L), two stable analogues of ATP, are able to potentiate the release of IL-1 $\beta$  induced by a low concentration of LPS. In similar conditions, no significant increase in IL-1 $\alpha$  and IL-6 was observed. These results are consistent with previous studies



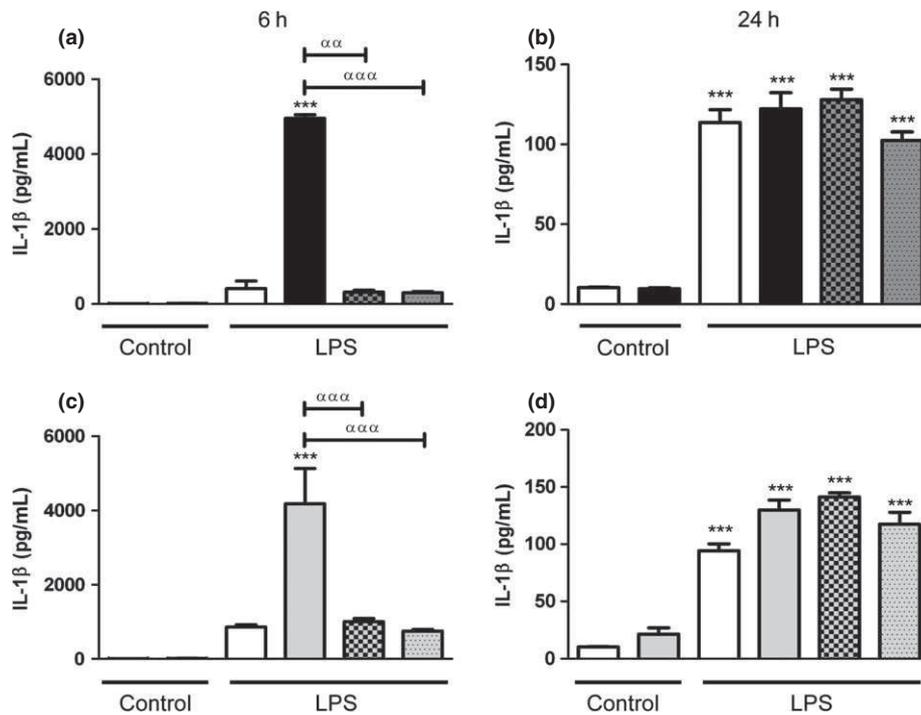
**Fig. 4** Messenger ribonucleic acid (mRNA) expression for (a, b) interleukin (IL)-1 $\beta$ , (c, d) IL-1 $\alpha$  and (e, f) IL-6 after stimulation of macrophages with lipopolysaccharide (LPS) 0.1  $\mu$ g/mL and 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP) 250  $\mu$ mol/L. Macrophages were incubated overnight with medium alone (control;  $\square$ ), or LPS 0.1  $\mu$ g/mL alone and then stimulated with BzATP 250  $\mu$ mol/L ( $\blacksquare$ ) for (a, c, e) 30 min or (b, d, f) 5 h. mRNA expression was determined by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. The results are normalized to the gene expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of one representative experiment in triplicate (one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test). \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 compared with the control treatment.

showing that human macrophages, unlike monocytes, require two independent stimuli to activate caspase-1-NLRP3-inflammasome: first, a Toll-like receptor (TLR)-dependent stimulus, which allows the transcription and translation of pro-IL-1 $\beta$ , and a second stimulus such as ATP to activate caspase-1 to cleave pro-IL-1 $\beta$ .<sup>17</sup> Accordingly, LPS induces the transcription of pro-IL-1 $\beta$  through the activation of TLR, and we showed a significant increase of mRNA expression of IL-1 $\beta$  and NLRP3 from LPS-primed macrophages, but also after BzATP treatment at 5 h by reverse transcription (RT)-qPCR.

Although NLRP1 inflammasome should be activating after ATP release, extracellular ATP has been suggested to selectively activate NLRP3 inflammasome.<sup>18</sup> We presently observed that BzATP only induced the RNA expression of the NLRP3 inflammasome pathway, but not of other inflammasome pathways.

Extracellular ATP is considered as a danger signal that activates the P2X<sub>7</sub> receptor, leading to NLRP3 activation and mature IL-1 $\beta$  production.<sup>19</sup> P2X<sub>7</sub> receptors belong to the family of

ATP-activated ionotropic P2X receptors, which include seven homomeric receptor subtypes (P2X<sub>1</sub>-P2X<sub>7</sub>).<sup>12</sup> P2X<sub>7</sub> receptors have been involved in inflammatory and immunological responses, and their activation modulates pro-inflammatory cytokines production by LPS-challenged macrophages. P2X<sub>7</sub> receptors are known to be implicated in the maturation and release of the pro-inflammatory cytokine, IL-1 $\beta$ , in monocytes and macrophages. P2X<sub>7</sub>R-deficient mice have less inflammation, and reduced pulmonary fibrosis in terms of lung collagen and matrix-remodelling proteins.<sup>6</sup> Mechanisms underlying the release of pro-inflammatory cytokines through the activation of P2X<sub>7</sub>R and NLRP3-inflammasome remain unclear. We showed here by immunocytochemistry that human monocyte-derived macrophages natively express NLRP3 and P2X<sub>7</sub> receptors. We therefore hypothesized that ATP-induced IL-1 $\beta$  release is able to activate human macrophages through the stimulation of P2X<sub>7</sub> receptor. Then we investigated the effects of selective P2X<sub>7</sub> receptor antagonists,<sup>20,21</sup> A-438079 and A-740003, on the IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$



**Fig. 5** Effect of P2X<sub>7</sub>R antagonists: A-740003 (100 μmol/L; A74) and A-438079 (100 μmol/L; A43) on interleukin (IL)-1β production from macrophages stimulated with lipopolysaccharide (LPS) 0.1 μg/mL, (a, b) 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP) 250 μmol/L or (c, d) adenosine 5'-[γ-thio]triphosphate tetralithium salt (ATPγS) 300 μmol/L. (a, c) Cells were incubated overnight with medium alone (control; □), or LPS 0.1 μg/mL alone, and were pretreated with vehicle (control; □), A74 100 μmol/L (■) or A43 100 μmol/L (□) for 1 h, and then stimulated or not with BzATP 250 μmol/L (■) or ATPγS 300 μmol/L (□) for 6 h. (b, d) Supernatants were removed and replaced with fresh medium during 24 h. The results are expressed as mean ± SEM of one representative experiment in triplicate (one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test). \*\*\**P* < 0.001 compared with the control treatment, αα*P* < 0.01, ααα*P* < 0.001 compared with positive control.

and IL-6 release by macrophages. We clearly observed that both A-438079 and A-740003 are able to significantly reduce the release of IL-1β, but not of IL-1α and IL-6 from macrophages stimulated by ATPγS or BzATP. The present results are consistent with those of Ward *et al.*<sup>19</sup> showing that P2X<sub>7</sub>R antagonists, KN62 and A-438079, significantly attenuated 300 μmol/L BzATP-induced IL-1β release on monocyte-derived macrophages pretreated with LPS. Using A-438079 (200 μmol/L) and A-740003 (100 μmol/L), Riteau *et al.*<sup>6</sup> also showed a significant decrease of ATP release from epithelial cells. In the same way, application of A-438079 to peritoneal macrophages significantly decreased, in a dose-dependent manner, the quantity of IL-1β released by the addition of BzATP.<sup>22</sup> Therefore, the present data confirm the involvement of P2X<sub>7</sub>R and the NLRP3-inflammasome pathway in the ATP-induced IL-1β release from macrophages.

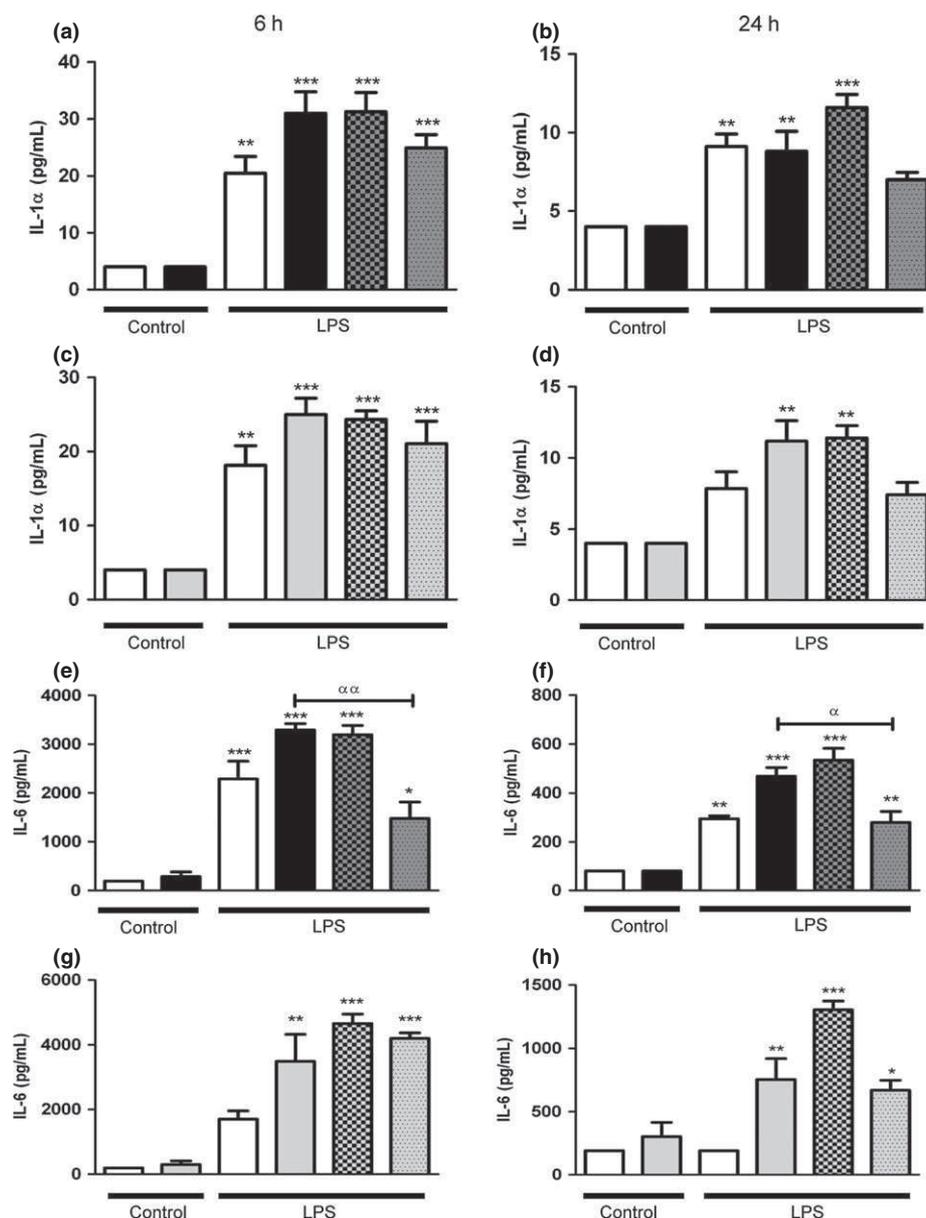
It has been previously reported that IL-1α release occurs through the P2X<sub>7</sub> receptor, and follows a similar time-course to that of IL-1β.<sup>11</sup> The physiological meaning of P2X<sub>7</sub>R-dependent pro-IL-1α cleavage is not clear, because this cytokine, in contrast to pro-IL-1β, is a full agonist at IL-1 receptors. In response to ATP, macrophages also release IL-1Ra through P2X<sub>7</sub>R.<sup>23</sup> Yazdi *et al.*<sup>24</sup> showed that IL-1β release was completely abolished in NLRP3 KO or ASC KO murine bone marrow dendritic cells, whereas the release of IL-1α is only partially dependant on NLRP3 and ASC after monosodium urate crystals stimulation. According to Ward *et al.*<sup>19</sup>, LPS treatment significantly increases

the production of IL-1α from monocyte-derived macrophages. However, we observed that IL-1α release is not modified by the treatment with BzATP. Furthermore, we have shown that LPS-treatment, but not BzATP, significantly induce IL-1α mRNA expression. Similarly, the pretreatment with both P2X<sub>7</sub> receptor antagonists, A-438079 or A-740003, did not reduce IL-1α release, suggesting that IL-1α production was not associated with the activation of P2X<sub>7</sub>R.

Although ATP is found in the synovial fluid from joint patients where a number of P2X<sub>7</sub>R-expressing cells including macrophages are present,<sup>25,26</sup> and the P2X<sub>7</sub>R has also been implicated in the secretion of IL-6 from fibroblasts,<sup>27</sup> no evidence of the involvement of the activation of P2X<sub>7</sub>R in IL-6 release from human macrophages has been reported. BzATP did not also induce IL-6 release from human thyrocytes.<sup>28</sup> Accordingly, we observed that the production of IL-6 was significantly increased after LPS treatment, but is not affected by treatment with ATPγS or BzATP. Although purinergic agonists seemed to not be involved in IL-6 release, we showed that A-438079 pretreatment decreased IL-6 release after BzATP. However, a lack of selectivity for A-438079 at this concentration could explain such an effect.

Furthermore, McGeough *et al.*<sup>29</sup> proposed that IL-1β and IL-6 might not be coupled in the pathogenesis of inflammasome-mediated mouse models; instead, IL-6 is simply a marker of inflammation without a significant causative role.

In our model, IL-6 mRNA expression was increased after 5 h of BzATP addition, but not in the presence of LPS. It has been



**Fig. 6** Effect of P2X<sub>7</sub>R antagonists: A-740003 (100  $\mu$ mol/L; A74) and A-438079 (100  $\mu$ mol/L; A43) on (a–d) interleukin (IL)-1 $\alpha$  and (e–h) IL-6 production from macrophages stimulated with lipopolysaccharide (LPS) 0.1  $\mu$ g/mL, 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP) 250  $\mu$ mol/L or adenosine 5'-[ $\gamma$ -thio]triphosphate tetralithium salt (ATP $\gamma$ S) 300  $\mu$ mol/L. (a, c, e, g) Cells were incubated overnight with medium alone (control;  $\square$ ), or LPS 0.1  $\mu$ g/mL alone, and were pretreated with vehicle (control;  $\square$ ), A74 100  $\mu$ mol/L ( $\blacksquare$ ) or A43 100  $\mu$ mol/L ( $\square$ ) for 1 h, and then stimulated or not with BzATP 250  $\mu$ mol/L ( $\blacksquare$ ) or ATP $\gamma$ S 300  $\mu$ mol/L ( $\square$ ) for 6 h. (b, d, f, h) Supernatants were removed and replaced with fresh medium during 24 h. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of one representative experiment in triplicate (one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test). \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 compared with the control treatment,  $\alpha P$  < 0.05,  $\alpha\alpha P$  < 0.01 compared with positive control.

shown that BzATP, a P2XR agonist, exposure results in a dose-dependent increase in the activation of the nuclear translocation of the transcription factor, nuclear factor- $\kappa$ B, in monocytes.<sup>30</sup> Furthermore MacKenzie *et al.*<sup>31</sup> have shown that P2X<sub>7</sub>R stimulation can initiate local accumulation of IL-1 $\beta$  on THP-1 monocytes. Further investigations might be necessary to better understand the involvement of purinergic receptors in IL-6 release from macrophages.

The current study showed the involvement of the P2X<sub>7</sub>R–NLRP3 pathway in the secretion of IL-1 $\beta$  from macrophages, and suggests that P2X<sub>7</sub>R were not involved in IL-1 $\alpha$  and IL-6

release. However, the exact role of ATP in the pathogenesis of pulmonary fibrosis is still unknown and requires further investigation. The present work also points out that blockage of the P2X<sub>7</sub> receptor and NLRP3-inflammasome represents a potential therapeutic approach to control IL-1 $\beta$  and fibrosis in lung injury.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The present study was supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR) project (ANR2010 MIDI01202) and INSERM. The authors thank Florian Cabillic, Benoit Dessarthe, Aurélie

The authors declare any financial support or relationships that may pose a conflict of interest.

## DISCLOSURE

The authors declare any financial support or relationships that may pose a conflict of interest.

## REFERENCES

- Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; **440**: 237–41.
- Villani AC, Lemire M, Fortin G *et al.* Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet.* 2009; **41**: 71–76.
- Rosengren S, Hoffman HM, Bugbee W, Boyle DL. Expression and regulation of cryopyrin and related proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Ann. Rheum. Dis.* 2005; **64**: 708–14.
- Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1 $\beta$ -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 2004; **20**: 319–25.
- Gasse P, Riteau N, Charron S *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**: 903–13.
- Riteau N, Gasse P, Fauconnier 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**: 774–83.
- Gasse P, Mary C, Guenon I *et al.* IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* 2007; **117**: 3786–99.
- Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . *Mol. Cell* 2002; **10**: 417–26.
- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006; **440**: 228–32.
- Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF *et al.* Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 $\beta$  in monocytes and macrophages. *Blood* 2009; **113**: 2324–35.
- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E *et al.* The P2X7 receptor: A key player in IL-1 processing and release. *J. Immunol.* 2006; **176**: 3877–83.
- Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP, Stojilkovic SS. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol. Rev.* 2007; **63**: 641–83.
- Monção-Ribeiro LC, Cagido VR, Lima-Murad G *et al.* Lipopolysaccharide-induced lung injury: Role of P2X7 receptor. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2011; **179**: 314–25.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**: 402–8.
- Okuma T, Terasaki Y, Kaikita K *et al.* C-C chemokine receptor 2 (CCR2) deficiency improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis by attenuation of both macrophage infiltration and production of macrophage-derived matrix metalloproteinases. *J. Pathol.* 2004; **204**: 594–604.
- Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE* 2010; **5**: e8668.
- Kanneganti TD, Lamkanfi M, Kim YG *et al.* Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* 2007; **26**: 433–43.
- Ali SR, Timmer AM, Bilgrami S *et al.* Anthrax toxin induces macrophage death by p38 MAPK inhibition but leads to inflammasome activation via ATP leakage. *Immunity* 2011; **35**: 34–44.
- Ward JR, West PW, Ariaans MP *et al.* Temporal interleukin-1 $\beta$  secretion from primary human peripheral blood monocytes by P2X7-independent and P2X7-dependent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 2010; **285**: 23147–58.
- Nelson DW, Gregg RJ, Kort ME *et al.* Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists. *J. Med. Chem.* 2006; **49**: 3659–66.
- Honore P, Donnelly-Roberts D, Navomic MT *et al.* A-740003 [N-(1-{{[cyanoimino](5-quinolinylamino) methyl]amino}-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006; **319**: 1376–85.
- McGarraughy S, Chu KL, Namovic MT *et al.* P2X7-related modulation of pathological nociception in rats. *Neuroscience* 2007; **146**: 1817–28.
- Wilson HL, Francis SE, Dower SK, Crossman DC. Secretion of intracellular IL-1 receptor antagonist (type 1) is dependent on P2X7 receptor activation. *J. Immunol.* 2004; **173**: 1202–8.
- Yazdi AS, Guarda G, Riteau N *et al.* Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2010; **107**: 19449–54.
- Tran CN, Lundy SK, Fox DA. Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology* 2005; **12**: 183–9.
- Ryan LM, Rachow JW, McCarty DJ. Synovial fluid ATP: A potential substrate for the production of inorganic pyrophosphate. *J. Rheumatol.* 1991; **18**: 716–20.
- Solini A, Chiozzi P, Morelli A, Fellin R, Di Virgilio F. Human primary fibroblasts in vitro express a purinergic P2X7 receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release. *J. Cell Sci.* 1999; **112**: 297–305.
- Caraccio N, Monzani F, Santini E *et al.* Extracellular adenosine 5'-triphosphate modulates interleukin-6 production by human thyrocytes through functional purinergic P2 receptors. *Endocrinology* 2005; **146**: 3172–8.
- McGeough MD, Pena CA, Mueller JL *et al.* Cutting edge: IL-6 is a marker of inflammation with no direct role in inflammasome-mediated mouse models. *J. Immunol.* 2012; **189**: 2707–11.
- Aga M, Johnson CJ, Hart AP *et al.* Modulation of monocyte signaling and pore formation in response to agonists of the nucleotide receptor P2X(7). *J. Leukoc. Biol.* 2002; **72**: 222–32.
- MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid secretion of interleukin-1 $\beta$  by microvesicle shedding. *Immunity* 2001; **15**: 825–35.

## 2. Résumé des principaux résultats

Nous montrons dans cette partie que l'ATP $\gamma$ S et le BzATP, deux analogues stables de l'ATP sont capables d'induire la libération d'IL-1 $\beta$  après un traitement par de faibles concentrations de LPS dans un modèle de macrophages humains en culture primaire. Cependant, dans les mêmes conditions, la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$  et IL-6 n'est pas significativement plus importante dans le milieu de culture qu'en présence de LPS seul. Nous observons par immunocytochimie une expression native de la protéine NLRP3 ainsi que du récepteur purinergique ionotrope P2X7. Nous montrons aussi par RT-qPCR que l'expression de l'ARNm d'IL-1 $\beta$  et de NLRP3 est induite par un traitement par le LPS pendant 18 heures tout comme après 5 heures de traitement par le BzATP. Cependant, l'expression génique des autres inflammasomes (NLRP1, NLRP2, NLRC4, NLRP6 et AIM2) et du récepteur P2X7 n'est pas induite par le BzATP. Enfin, nous observons qu'un traitement par des antagonistes de P2X7R, A43 et A74, diminue la libération d'IL-1 $\beta$  par des macrophages traités par du LPS et par l'ATP $\gamma$ S ou le BzATP. Par contre, la sécrétion d'IL-1 $\alpha$  et d'IL-6 par les macrophages stimulés n'est pas induite par des agonistes des récepteurs purinergiques et non inhibée en présence d'antagonistes de P2X7R.

### 3. Résultats complémentaires

Nous nous sommes également intéressés à l'expression génique des inflammasomes et des TLRs des macrophages humains. Etant donné que nous observons que parmi les inflammasomes, le BzATP induit uniquement l'expression de NLRP3, nous avons voulu savoir si ces différentes protéines formant des inflammasomes étaient exprimées dans notre modèle cellulaire. Ainsi, nous observons chez 4 donneurs que les protéines NLRP2, NLRP3 et NLRC4 sont bien exprimées alors que NLRP1, NLRP6 et AIM2 sont très faiblement exprimées (Fig. 15).

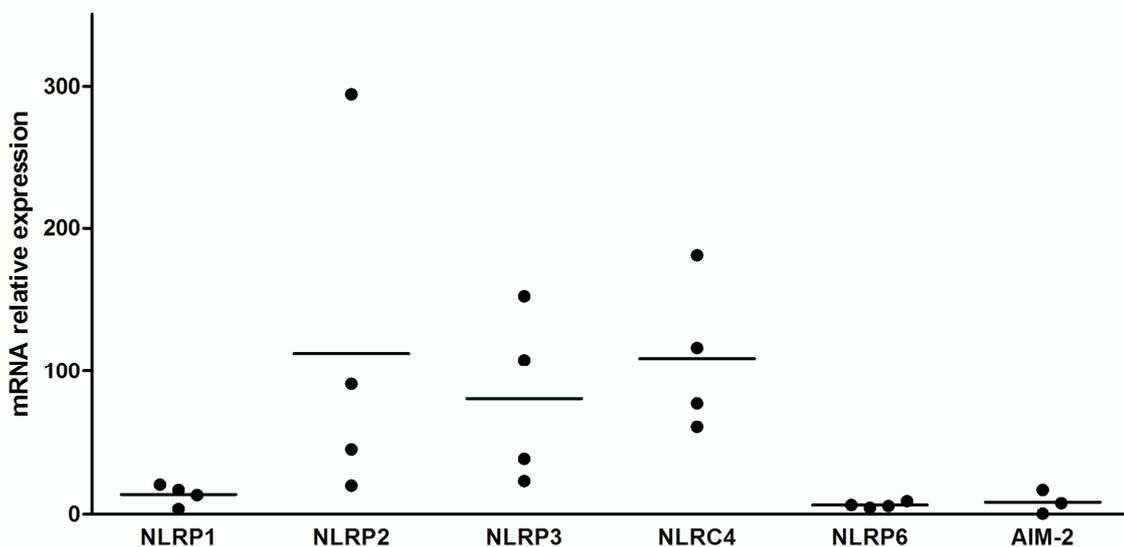


Figure 15 : Expression relative des inflammasomes dans les macrophages humains par RT-qPCR

Nous réalisons une pré-activation des macrophages permettant l'induction de la pro-IL-1 $\beta$  par du LPS ultrapur ciblant spécifiquement le récepteur membranaire TLR4 (Kim *et al.* 2007). Ainsi, nous avons aussi souhaité évaluer l'expression des différents récepteurs TLRs dans les macrophages par RT-qPCR. Nous avons mesuré l'expression relative dans des macrophages humains (J8) (Fig. 16) et également comparé l'expression des TLRs de monocytes (J0) à l'expression des TLRs de macrophages obtenus après différenciation par le GM-CSF (J8) (Fig. 17).

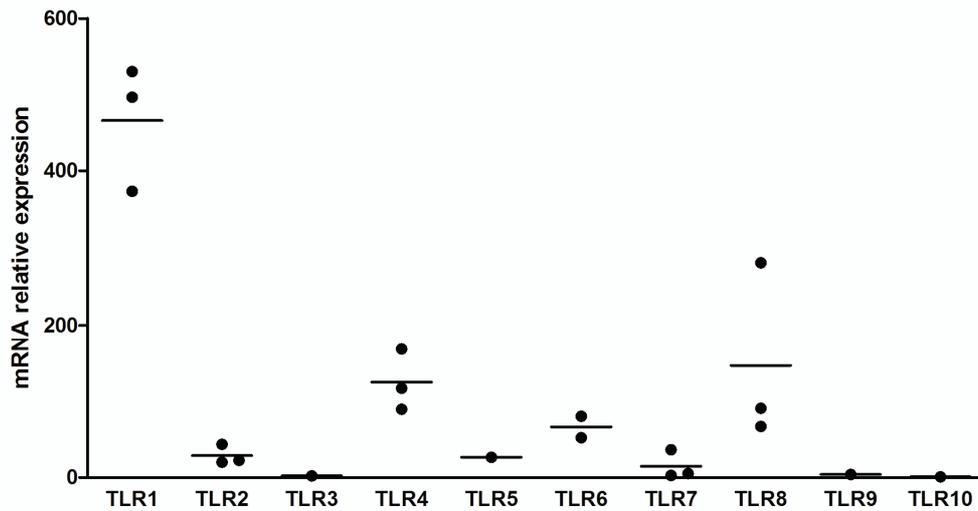


Figure 16 : Expression relative des TLRs de macrophages humains par RT-qPCR

Nous observons que ce sont surtout les TLR1, TLR4, TLR6 et TLR8 qui sont exprimés dans notre modèle de macrophages humains. Conformément à la littérature, TLR4 est bien exprimé par les macrophages, cela va permettre la fixation du LPS servant à la pré-activation (Akira *et al.* 2006) (Fig. 16).

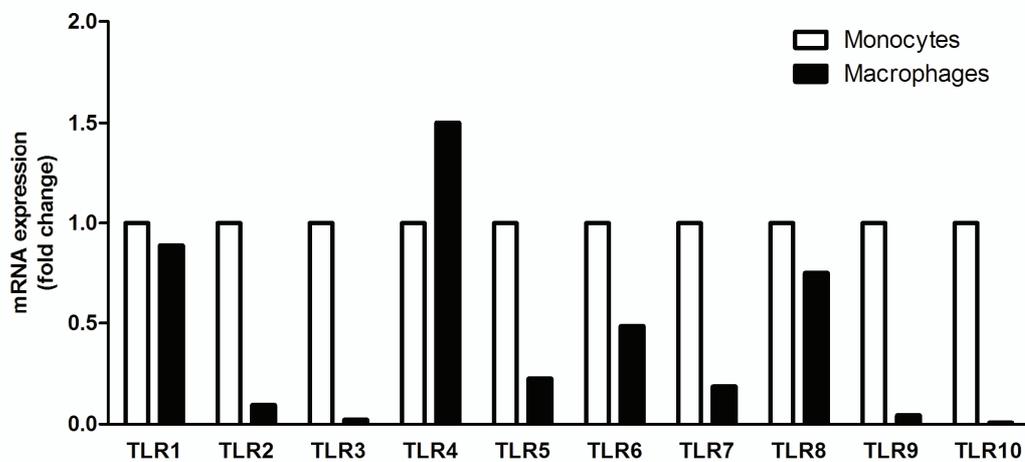


Figure 17 : Expression relative des TLRs de macrophages humains par RT-qPCR par rapport aux monocytes

Suite à la différenciation, seul le récepteur TLR4 va être plus exprimé à la surface des macrophages qu'à celle des monocytes. Les autres TLRs sont plus exprimés par les monocytes, cellules immunitaires circulantes, que par les macrophages (Fig. 17).

## 4. Conclusion

Notre étude montre l'implication du récepteur purinergique P2X7 dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages humains traités par des analogues de l'ATP.

En effet, nous observons dans notre modèle une expression de TLR4 qui fixe le LPS permettant la pré-activation des macrophages. Nous montrons également que les protéines P2X7R et NLRP3 sont exprimées et actives dans ce modèle *in vitro*. De plus, nous mettons en évidence l'importance de P2X7R dans la libération d'IL-1 $\beta$  en réponse à l'ATP extracellulaire mais pas dans la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$  et IL-6.

Cette étude permet d'entrevoir des possibilités thérapeutiques par l'utilisation d'un antagoniste de P2X7R afin de contrôler la sécrétion d'IL-1 $\beta$  chez l'homme.

## **Chapitre 2 :**

Implication des récepteurs purinergiques dans  
l'activation de l'inflammasome NLRP3 des  
macrophages en réponse aux cristaux d'acide urique

# 1. Contexte scientifique

Comme d'autres composés particuliers, les cristaux d'acide urique (MSU) ont été identifiés comme activateur de l'inflammasome NLRP3 et impliqués dans des pathologies comme la goutte (Martinon *et al.* 2006) ou la fibrose pulmonaire idiopathique (Gasse *et al.* 2009).

La cathepsine B joue un rôle indispensable dans l'activation de NLRP3 en réponse aux cristaux de MSU (Riteau *et al.* 2012). Ainsi nous avons souhaité à l'aide d'inhibiteurs de cathepsine B et de caspase-1 mettre en évidence le rôle de ces protéases dans la libération d'IL-1 $\beta$  mais aussi dans la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou l'IL-1 $\alpha$ , également sécrétés en réponse au traitement LPS+MSU.

De plus, il a été montré que la libération d'IL-1 $\beta$  en réponse aux cristaux de MSU impliquait l'activation des TLRs et du récepteur P2X7 (Liu-Bryan *et al.* 2005 ; Tao *et al.* 2013). En effet, le récepteur P2X7 a bien été mis en évidence comme dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Ferrari *et al.* 2006 ; Di Virgilio *et al.* 2007) mais d'autres récepteurs purinergiques ont été identifiés comme pouvant également activer l'inflammasome NLRP3, tels que P2X4R (Seil *et al.* 2010), P2Y6R (Uratsuji *et al.* 2012) ou P2Y2R (Riteau *et al.* 2012 ; Baron *et al.* 2014). Ainsi l'objectif de notre étude était de caractériser le rôle des récepteurs purinergiques P2 dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 par le MSU dans un modèle de macrophages humains en culture primaire.

Article 2 : "IL-1 $\beta$  production is dependent of the activation of purinergic receptors and NLRP3-inflammasome pathway in human macrophages"

# IL-1 $\beta$ production is dependent of the activation of purinergic receptors and NLRP3-inflammasome pathway in human macrophages

Thomas Gicquel\*, Sacha Robert\*, Pascal Loyer\*, Tatiana Victoni\*, Aude Bodin\*,  
Florence Gleonnec\*, Isabelle Couillin†, Elisabeth Boichot\* and Vincent Lagente\*

\* : UMR991 INSERM, Université de Rennes 1, Rennes, France

† : UMR-IEM CNRS6218, Université d'Orléans, France.

**Running title:** IL-1 $\beta$  production, NLRP3 and purinergic receptors

**Corresponding author:**

Dr. Thomas Gicquel

UMR991 INSERM, Université de Rennes 1

Faculté de Pharmacie

2, avenue du prof Léon Bernard

35043 Rennes cedex, France

Tel : +33 2 99 28 43 00

Email : [thomas.gicquel@univ-rennes1.fr](mailto:thomas.gicquel@univ-rennes1.fr)

## **SUMMARY :**

NLRP3-inflammasome pathway is known to be activated by danger signals such as Monosodium Urate (MSU). We investigated the role of P2 purinergic receptors in the activation of NLRP3-inflammasome pathway after MSU treatment in primary human monocyte-derived macrophages (MDM). In this study, we found that MSU crystals increased the expression and induce the release of IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  and IL-6 from LPS-primed MDM. Inhibition of caspase-1 and cathepsin-B activity decreased in a dose-dependent manner the production of IL-1 $\beta$  whereas MSU treatment induced P2X7R and NLRP3 mRNA expression. We also observed that the P2X7 purinergic receptor antagonist A-740003, decreased IL-1 $\beta$  production and pro-IL-1 $\beta$  cleavage after treatment with LPS and MSU. Remarkably, P2X7R RNA silencing, but not siP2X4R, reduced the release of IL-1 $\beta$  and others M1-macrophages cytokines from MDM stimulated by LPS+MSU. Together, these results show the involvement of purinergic receptor and NLRP3 inflammasome pathway in the secretion of IL-1 $\beta$  from MSU-stimulated human macrophages and suggest that P2 receptors-NLRP3 inflammasome pathway represents a novel potential therapeutic target to control inflammation in MSU-associated inflammatory diseases.

## INTRODUCTION

Nod-like receptor (NLR)-family protein, NLRP3, has been described to be expressed mainly by myeloid cells, including monocytes and macrophages and up-regulated by pathogen-associated molecule patterns (PAMPs) (1). NLRP3-inflammasome pathway activation appears as the corner stone of many inflammatory diseases including Crohn's disease (2), rheumatoid arthritis (3), and cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) (4), idiopathic pulmonary fibrosis (5,6) and gout (7).

Several inflammasome pathways have been described, however the canonical pathway consists of three main effectors the NLRP3, the pro-caspase-1, and the Apoptosis speck-like protein containing a CARD (ASC) adapter, which bridges the interactions between the NLRP3 and the pro-caspase-1. The final outcome of the NLRP3 inflammasome assembly is the cleavage of cytosolic pro-IL-1 $\beta$  into the mature proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  by the activated caspase-1 (8). The best known danger signal triggering NLRP3 activation is the extracellular ATP through stimulation of P2X7 receptor (P2X7R) (9, 10), potassium efflux (11), and recruitment of pannexin-1 channel (12).

Uric acid, a product of purine catabolism, is released from damaged cells and has been described as a danger signal in response to variety of stresses (13). At high local concentration, uric acid precipitates to monosodium urate (MSU) and forms crystals that cause inflammation observed in clinical gout. Several mechanisms were identified for MSU recognition and cells activation, such as CD14, TLR-2, TLR-4, MyD88, NF- $\kappa$ B, cathepsin B or ROS production (6,14-17). The inflammasome activation by MSU involves lysosomal damage and the release of cathepsin B into the cytosol (18-20), with subsequent activation of NLRP3 inflammasome via an unidentified mechanism. However extracellular ATP and purinergic receptors, such as P2X7 receptor, could contribute to the IL-1 $\beta$  release mediated by MSU (21,22)

Until recently it was widely admitted that P2X7 receptors are the only purinergic receptors of macrophages triggering IL-1 $\beta$  secretion (23). However, recently others purinergic receptors have been described to be involved in IL-1 $\beta$  production such as P2X4 (24,25), P2Y2 (26) or P2Y6 (27).

Although mechanisms underlying the release of pro-inflammatory cytokines through the activation of P2X7 and NLRP3-inflammasome are now better understood (28), the role of other purinergic receptors in the activation of inflammasome pathway after particles treatment remains unclear. The aim of our study was to further characterize the role production of cytokines and the activation of the NLRP3 pathway activation following MSU stimulation in human primary macrophages and to identify the purinergic receptors mediating NLRP3 activation.

## MATERIALS AND METHODS

### *Reagents*

PBS, RPMI 1640, penicillin-streptomycin, L-glutamine were purchased from Life Technologies (Eugene, OR, USA), Fetal Calf Serum (FCS) was from Hyclone (Logan, UT, USA), Acrylamide, SDS, Tris, HEPES and Bovine Serum Albumine (BSA) were from Eurobio (Les Ulis, France). Bradford protein assay and precision plus protein dual color standards were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Ultrapure E. coli 0111:B4 LPS was purchased from InvivoGen (Toulouse, France), A-74003 from Tocris® (Bristol, U.K.), rhIL-1 $\beta$ , rhGM-CSF from R&D Systems Europe (Lille, France). Ivermectine and Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Z-YVAD-FMK and CA-O74Me were provided from Calbiochem (Darmstadt, Germany). The antibodies against HSC 70 and IL-1 $\beta$  were purchased from Santa Cruz (CA, USA) and from R&D Systems (Minneapolis, USA), respectively.

### *Crystals preparation*

Monosodium urate (MSU) crystals were prepared by recrystallization from uric acid, as previously described (7). Briefly, MSU crystals were obtained by dissolving 1.68 mg in 500mL of 0.01 M NaOH preheated to 70°C (pH 7.1-7.2). The solution was slowly and continuously agitated at room temperature until crystals formed. The crystals were washed twice with 100% ethanol, dried, autoclaved, and weighed under sterile conditions. Crystals were resuspended in PBS by sonication and examined under phase microscopy prior to experiments.

### *Preparation of macrophages and treatment*

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from human buffy-coat (EFS, Rennes, France) by differential centrifugation on UNI-SEP® U-10 (Novamed, Jerusalem, Israel). The experiments are complied with the relevant ethical requirements accordingly to the French law number 93-5 on 1993, January 4st relative to the security of blood transfusion and biologically approved by Etablissement Français du Sang (Rennes, France). Monocytes from healthy donors were enriched using human CD14 Microbeads separation kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and plated at a density of  $1.10^6$  cells/well in 24 well-plates and cultured at 37°C under 5% humidified CO<sub>2</sub> in RPMI

supplemented with penicillin 100 UI/mL-streptomycin 100 µg/mL, L-glutamine 2 mM and HEPES Buffer 1 mM supplemented with 10% FCS. Macrophages were obtained after differentiation from monocytes by incubation with 50 ng/mL rhGM-CSF in RPMI medium. After 7 days, the supernatant was removed and cells were stimulated with various stimuli. Macrophages were incubated with 0.1 µg/mL Ultrapure E. coli 0111:B4 LPS overnight. Cells were then incubated with A-74003, Ivermectine, CA-O74Me or Z-YVAD-FMK one hour before treatment with MSU for 6 hours.

#### *THP-1 cells*

THP-1 cells were cultured at a density of  $1.10^6$  cells/well in 6 well-plates at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in humidified incubator in 2 mL/well of RPMI 1640 medium supplemented with penicillin 100 UI/mL-streptomycin 100 µg/mL, sodium pyruvate 1 mM, L-glutamine 2 mM and 10% FCS. THP-1 cells were differentiated by stimulating with 10 ng/mL of PMA in RPMI medium for 3 days, followed by 1 day without PMA in RPMI medium supplemented with 2% FCS. The supernatant was removed and cells were stimulated with various stimuli. Differentiated THP-1 cells were incubated with 0.1 µg/mL Ultrapure E. coli 0111:B4 LPS overnight. Cells were then treated with MSU for 6 hours at 250, 500 or 1000 µg/mL.

#### *Electroporation of human primary macrophages*

After 6 days of differentiation, the macrophages were trypsinized and electroporated using the Neon® transfection system (Life Technologies) available at the SynNanoVect core facility from Biogenouest. Sets of siRNA for P2X4R, P2X7R and Non targeting (NT) ON-TARGET Plus Human siRNA SMARTpool (Thermo Scientific Dharmacon) were used to knock-down the purinergic receptor expressions. After counting macrophages were centrifuged at 450g for 10 minutes and resuspended in Buffer R (Life Technologies) at the density of  $1.10^6$  cells/mL. Without delay, 100 pmoles of siRNA per  $10^6$  cells were added and electroporation was performed according to procedures set up by the SynNanoVect facility (29) with the following parameters: one pulse at 1600 V during 30 msec. After electroporation, macrophages were cultured in 24-well plates at the density of  $1.10^6$  cells/well.

### *Immunoblotting analysis*

Cells were washed in PBS and scraped in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, 0.1% SDS, 1% NP-40 and 0.5% sodium deoxycholate) supplemented with protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Mannheim, Germany). Cells homogenates were sonicated and centrifuged for 20 min at 1000 g. This step was performed at 4°C, and cell extracts were immediately stored at -20°C in blue loading buffer, whereas an aliquot was kept apart for protein estimation by the method described by Bradford (30). Proteins were resolved by denaturing SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (10% gel, w/v) and transferred to nitrocellulose membranes in transfer buffer (25 mM Tris, 200 mM glycine, ethanol 20% and SDS 0.1%). Membranes were blocked in 5% skim milk in Tris-buffer saline (TBS) (65 mM TrisHCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) 1 h at room temperature. Then, primary antibodies were incubated overnight in 5% skim milk in TBS-T. Rabbit anti-HSC 70 (dilution 1:200) and a mouse anti-IL-1 $\beta$  (dilution 1:500) were incubated overnight in 5% skim milk in TBS-T. After washing with TBS-T, appropriate secondary antibodies linked to horseradish peroxidase, either a swine anti-rabbit (1:10000, DakoCytomation) or a rabbit anti-mouse (1:10000, DakoCytomation) were incubated for 1 h in 5% skim milk in TBS-T. Membranes were washed again with TBS-T prior band detection using chemiluminescence with SuperSignal West Pico Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA) using the LAS-3000 analyzer (Fujifilm).

### *Measurement of cytokine production*

The production of IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , and IL-6 was measured in the culture medium using DuoSet® ELISA kit (R&D system, Abingdon, United Kingdom) according to the manufacturer's procedure. Cell supernatants were also applied to the cytokine array, Proteome Profiler Human Cytokine Array Panel A (R&D system, Abingdon, United Kingdom) following the manufacturer's instructions.

### *Real-Time PCR (RT-qPCR) analysis*

Macrophages were lysed in RLT buffer (Qiagen, Hilden, Germany) supplemented with 1% 2-mercaptoethanol. Total RNA was isolated using RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. RNA quantity and purity were assessed with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nyxor Biotech, Paris, France).

Total RNA (1 µg) was reverse transcribed into first-strand cDNA using High-Capacity cDNA Achieve Kit (Applied Biosystems) following the manufacturer's procedure. qPCR was performed by the fluorescent dye SYBR Green methodology using the SYBR Green PCR Master Mix and the Step One Plus equipment (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primer pairs for each transcript were chosen with NCBI software <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Table 1). Human GAPDH was used as the reference gene. Relative quantification values were expressed using the  $2^{\text{DDCt}}$  method (31). Relative expressions were calculated as follow: relative expression =  $1000 \times 2^{-\text{DCt}}$ .

### *Statistical Analysis*

The results are expressed as means  $\pm$  SEM. Analysis of treatment effects between groups was performed with a one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post hoc test for group comparisons. The significance of differences between the groups for other parameters was determined using two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test. All analyses were performed using Prism software (Graphpad Software, La Jolla, CA). For each analysis, two sided  $p$  value less than 0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

### *Effect of MSU on pro-inflammatory cytokines production stimulated with LPS*

MSU was reported to induce the production of various inflammatory cytokines including IL-1 $\beta$  and IL-6 on THP-1 cells or on mouse macrophages (5,6). In our model, MSU significantly induced dose-dependently the release of IL-1 $\beta$  from MDM primed with a low concentration of LPS (0.1  $\mu$ g/mL) at 6h (Fig. 1A). The production of IL-1 $\alpha$  and IL-6 was induced by MSU in a dose-dependant manner but the release of IL-1 $\alpha$  and IL-6 was not significantly potentiated by 0.1  $\mu$ g/mL LPS (Fig. 1B, 1C). These findings indicated that MSU crystals induce the production of inflammatory cytokines from human macrophages and that the overnight LPS-priming is effective exclusively on the IL-1 $\beta$  release. We have also observed that Z-YVAD-FMK, an irreversible caspase-1 inhibitor significantly decreased the release of IL-1 $\beta$  induced by LPS + MSU at 500  $\mu$ g/mL in a dose-dependant manner (Fig. 2A). In contrast, the release of IL-1 $\alpha$  and IL-6 was not significantly affected by Z-YVAD-FMK in macrophages stimulated by LPS + MSU at 6h (Fig. 2B, 2C). After caspase-1 inhibition, there was a reduced production of IL-1 $\beta$  following MSU stimulation in LPS-primed MDM, however IL-1 $\alpha$  and IL-6 production were not affected, as previously observed in NHK cells (27).

Because cathepsin B seems to be important for NLRP3-inflammasome activation, we investigated the mechanism of lysosomal destabilization by MSU crystals. We observed that CA-074Me, a cathepsin B inhibitor, dose-dependently decreased the production of IL-1 $\beta$  measured by ELISA after MSU treatment in LPS-primed MDM (Fig. 2D). This result confirms the involvement of cathepsin B on the release of IL-1 $\beta$  from human macrophages as previously observed in mouse cells (21) The inhibition of cathepsin B by CA-074Me elicits also a dose-dependant decrease in the release of IL-1 $\alpha$  and IL-6 following LPS + MSU treatment at 6 h (Fig. 2E, 2F). These results showed that cathepsin B and caspase-1 are important for the release of IL-1 $\beta$  by human MDM while caspase-1 is not involved in the release of IL-1 $\alpha$  and IL-6.

### *Inflammasome factor and pro-inflammatory cytokine mRNAs expression*

MSU crystals trigger the activation of the established signaling pathway from TLR2, TLR4 and CD14 receptors to induce NF- $\kappa$ B signaling pathway (14-15, 32). We first determined the MSU effects on pro-inflammatory expression. Quantitative PCR analysis showed an increase in the mRNA expression of IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  and IL-6 on macrophages after treatment with MSU 500  $\mu$ g/mL at 6h, alone or associated with LPS (Fig. 3A, 3B, 3C). As previously reported using ATP agonists, we have observed for the first time that NLRP3 transcript is increased 6h after MSU treatment in macrophages (28). Thus we confirmed that MSU induce the activation of the NLRP3-inflammasome via the increase in the NLRP3 and IL-1 $\beta$  mRNA levels in MDM. These data suggest that MSU can play a role in the priming step and would explain why MSU alone can induce the release of IL-1 $\beta$  (Fig. 1A). However, the gene expressions of other inflammasome pathways (*e.g.* NLRP1, NLRP2, NLRC4, NLRP6 and AIM2) were not modified at 6h (Fig. 3E).

### *Effect of MSU on purinergic P2 receptors mRNA expression*

Macrophages are known to express different subtypes of purinergic receptors and these receptors have been reported to be implicated in NLRP3-inflammasome activation (10, 21, 26-27, 33-34). The expression of purinergic receptors have been investigated in macrophages from 6 independent donors (Fig. 4A). We observed a strong expression of P2X1, P2X4 and P2X7 as a relative expression of P2X5, P2Y2 and P2Y6 receptor on macrophages. Moreover, MSU (500  $\mu$ g/mL) also induced a significant increase in P2X7R mRNA expression in MDM at 6h (Fig. 4B). P2X7R mRNA expression also increased dose-dependently after MSU treatment in THP-1 macrophages (Fig. 4C). For the first time, we showed the induction of P2X7 receptor expression with MSU treatment by RT-qPCR after 6 hours. These results are consistent with the literature showing that the purinergic receptor P2X7 contributes to inflammation and the IL-1 $\beta$  release (23). In contrast, P2X1R, P2X4R, P2Y2R or P2Y6R mRNA expressions were not significantly increased in response to MSU after 6 hours of treatment (Fig. 4B, 4C). Taken together, these results show that among the purinergic receptors, P2X7R seems to be involved in macrophages activation after MSU-stimulation in MDM, as observed after ATP-stimulation (28, 34).

### *Analysis of cleavage of pro-IL-1 $\beta$ by co-treatment by LPS and MSU*

To investigate the possible involvement of caspase-1 and P2X7R in pro-IL-1 $\beta$  cleavage after MSU treatment, we used Z-YVAD-FMK and the selective P2X7R antagonist A-740003 (A74). Western blotting analysis showed that after overnight treatment with LPS (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), the 31 kDa form of pro-IL-1 $\beta$  was detectable in cell lysates (Fig. 5A). The expression of pro-IL-1 $\beta$  dose-dependently decreased in macrophages treated with MSU (250, 500 and 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and a treatment by Z-YVAD-FMK (100  $\mu\text{M}$ ) partially prevented the decrease in the pro-IL-1 $\beta$  expression after LPS+MSU treatment. As expected, IL-1 $\beta$  (17 kDa) was not detected in cell lysates as already shown in a mice macrophages model (33). This data suggests that MSU-treatment induces the release of IL-1 $\beta$  (Fig. 1A) by the maturation processing of pro-IL-1 $\beta$  in a caspase-1 mediated pathway in LPS-primed human macrophages.

To determine if the cleavage of pro-IL-1 $\beta$  induced by MSU was mediated by the P2X7 receptor, human macrophages were incubated with 100  $\mu\text{M}$  of A74. The treatment with A74 prevented the decrease in pro-IL-1 $\beta$  cleavage induced by the co-treatment with LPS and MSU (Fig. 5A).

### *Involvement of purinergic receptors in IL-1 $\beta$ production*

To confirm the role of P2X7R in IL-1 $\beta$  release, we pretreated MDM with A74 incubated overnight with LPS or medium and then stimulated with MSU or medium. We observed that the increase in IL-1 $\beta$  release induced by LPS and MSU treatment was significantly decreased by the treatment with A74 (Fig. 5B). Thus, we demonstrate that P2X7R plays a role in pro-IL-1 $\beta$  cleavage and IL-1 $\beta$  secretion in MDM treated by LPS+MSU.

P2X4 and P2X7 subunits are likely to physically interact and formed heterotrimers (24, 35-36) and it has been also shown the implication of P2X4R on IL-1 $\beta$  release in macrophages (24). Thus, we investigated the hypothesis that P2X4 receptors contributed to the inflammatory response following LPS and MSU treatment. We incubated the macrophages with ivermectine, a positive allosteric modulator of P2X4R. Here, the release of IL-1 $\beta$  induced by LPS and MSU was not significantly affected by ivermectine (Fig. 5C). These results suggest that P2X4R would not be involved in the release of IL-1 $\beta$  from human macrophages.

To further investigate the involvement of purinergic receptors in IL-1 $\beta$  production, we used small interfering RNA (siRNA) transfection directed against P2X4R, P2X7R and a non-targeting control siRNA. Silencing of purinergic receptors was maximal between 48 and 72 hours (Supplemental Fig. *SI*). Thus, the electroporation at day 6 of culture was compatible with our protocol of LPS priming at day 7 and 6 hours of MSU-treatment at day 8 *ie* 54 hours after siRNA transfection. Electroporation of siRNAs directed against P2X4 and P2X7 receptors led to the specific and significant knock-down of P2R mRNA in macrophages at 54h (Fig. *6A*, *6B*, *6C*). Furthermore, the silencing affected only the targeted purinergic receptor, since the expressions of the other receptors were not affected by this specific siRNA (Fig. *6A*).

As presented in Figure *6D*, M1 macrophages cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-23, CCL4 and CCL2) were released after LPS and MSU co-treatment. Conversely, M2 macrophages cytokines are poorly produced. As expected, we show here that our human GM-CSF-differentiated MDM model induces a secretion of classically activated M1 macrophages cytokines panel after LPS and MSU stimulation. M1 macrophage cytokines release, particularly IL-1 $\beta$ , were decreased from macrophages transfected by siP2X7R, but not by siP2X4R compared to control (Fig. *6D*). In contrast, M2 macrophage cytokines were increased after siP2X7R transfection. The decrease in M1 macrophage cytokines production after siP2X7R transfection supports the conclusion that P2X7 receptor is the pro-inflammatory receptor involved in the MSU-mediated activation of human macrophages.

## DISCUSSION

We presently reported that MSU-induced IL-1 $\beta$  production in LPS-primed MDM and mainly involved activation of purinergic P2 receptors and NLRP3-inflammasome pathway including caspase-1 activation and cathepsin B.

NLRP3-inflammasome pathway has been largely described to be involved in many inflammatory diseases. Monosodium Urate (MSU) is a potent danger signal activating NLRP3-inflammasome pathway through mechanisms involving ATP release and autocrine purinergic signalling (21, 38). We presently reported that MSU crystals induce IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  and IL-6 mRNA expression and release in MDM. In contrast, we observed the increase only in IL- $\beta$  production from LPS-primed MDM after MSU treatment. This result confirmed that human macrophages require two independent stimuli to activate NLRP3-inflammasome: a first TLR-dependent stimulus which allows the transcription and traduction of pro-IL-1 $\beta$  and a second stimulus, namely MSU, to activate the post-translational caspase-1 dependent pro-IL-1 $\beta$  cleavage (12).

NLRP3 expression is highly inducible upon various stimuli (1). Then, we have investigated if other inflammasome pathways (NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRC4, NLRP6 and AIM2) can be activated by MSU in LPS-primed MDM. We observed only the induction of NLRP3 mRNA expression after MSU crystals treatment and this induction is further enhanced in LPS-primed MDM. This is consistent with our previous study using BzATP, a non-hydrolysable ATP agonist of purinergic receptors (28).

Many crystalline compounds have been shown to induce lysosomal destabilization and rupture, following by the release of cathepsin B into the cytosol and activation of the NLRP3-inflammasome (18, 39). Here, we showed that IL-1 $\beta$  release is dependent of both caspase-1 and cathepsin B accordingly to the results of Riteau et al. (21) showing a reduction of IL-1 $\beta$  release on cathepsin B, NLRP3 or caspase 1-deficient mice BMDM treated by LPS + MSU. CA-074Me, elicited a reduction of the release of IL-1 $\alpha$  and IL-6 induced by a combination of LPS + MSU in a dose-dependent manner showing that the pro-inflammatory signal induced by MSU crystals is mediated by cathepsin B. However, caspase-1 inhibition did not affect IL-1 $\alpha$  and IL-6 release. Studies yet provide evidence to

support the notion that IL-1 $\alpha$  release is regulated by the NLRP3-inflammasome (40,41). These results are consistent with a previous study showing that ATP analogs (BzATP or ATP $\gamma$ S), two NLRP3-inflammasome activators, are able to potentiate the release of IL-1 $\beta$ , but not IL-1 $\alpha$  and IL-6, induced by low concentration of LPS (28). Thus, our study shows that IL-1 $\alpha$  secretion seems to be caspase-1 independent in a primary human macrophages.

Peripheral myeloid cells are known to express different subtypes of purinergic receptors in mice (42,43) However purinergic receptor expressions are poorly studied in human. In this study, we showed that MDM expresses some purinergic receptors: P2X1, P2X4, P2X5, P2X7, P2Y2 and P2Y6 receptors but the expression of P2X1, P2X4 and P2X7 appears to be more important. It has been largely reported that P2X7 receptors are involved in inflammatory process (5,44), by promoting maturation and release of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  in monocytes and macrophages (33,45) or in lymphocytes (46). The role of P2X7 receptor in ATP-dependant IL-1 $\beta$  secretion is well known (47). However the mechanisms underlying the release of pro-inflammatory cytokines through the activation of P2X7R and NLRP3-inflammasome remain unclear. In this study we clearly showed the involvement of P2X7R in MSU-induced IL-1 $\beta$  production in macrophages (differentiated THP1 and in MDM).

We further investigated the effects of selective competitive P2X7 receptor antagonist A-740003 (A74) on the release of cytokines from macrophages. A74 decreased the release of IL-1 $\beta$  and reduced the production of pro-IL-1 $\beta$  following co-treatment with LPS and MSU in macrophages. These results are consistent with those previously reported after activation with analogs of ATP on LPS-primed BMDM stimulated with MSU macrophages (21).

We also investigated the functional role of purinergic P2 receptors in the activation of NLRP3-inflammasome pathway after MSU treatment in human macrophages. P2R transcription was extinguished by specific siRNA, which elicited an effective extinction of mRNA expression for P2X4R and P2X7R. Importantly, we found that the specific extinction of purinergic receptor expression by siRNA did not affect other receptors and no compensation was observed particularly between P2X4R and P2X7R, two ionotropic receptors currently associated (24,35,48).

Although the P2X7 receptor has been claimed to be the only purinergic receptor triggering IL-1 $\beta$  secretion thus contributing to several inflammatory processes (23), P2X4R and P2X7R are able to form hybrid structures (24, 35, 48).

Ivermectin has been described as a positive allosteric modulator on P2X4 channels and increases apparent affinity for ATP (49). Seil et al. (24) show that ivermectine triggers the release of IL-1 $\beta$  by macrophages. Here, we reported that in the presence of ivermectin the co-treatment with MSU and LPS did not modify the release of IL-1 $\beta$ . They hypothesized that this drug triggers a potassium efflux and generates the activation of caspase-1 and the secretion of IL-1 $\beta$ . The combination of ATP and ivermectin also decreased the intracellular concentration of potassium and promoted the secretion of IL-1 $\beta$  (24). However, we showed that ivermectine and siRNA for P2X4R did not affect IL-1 $\beta$  production thus P2X4 receptors were not probably involved in IL-1 $\beta$  secretion by human macrophages stimulated with MSU.

A dichotomy has been proposed for macrophage activation: classical or alternative, also called M1 or M2 macrophages, respectively. The M1 stimuli, such as LPS or GM-CSF, are grouped accordingly to induce prototypic inflammatory response whereas M2 stimuli antagonize this response (37). Using protein microarray, we observed that our GM-CSF-differentiated macrophages model release M1 macrophages cytokine after LPS + MSU treatment.

We were further interested if other cytokines can be depended of the activation of P2X4R and P2X7R .We observed that the blockage of P2X7R reduced the production of cytokines type M1 macrophages such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  or IL-6 and induced the production of M2 macrophages cytokines, suggesting that P2X7 receptor is a pro-inflammatory receptor on human macrophages.

Our results showed the involvement of purinergic receptors and NLRP3-inflammasome pathway in the secretion of IL-1 $\beta$  from MSU-stimulated human macrophages. The present study confirms the relative difference between NLRP3-inflammasome activation by MSU crystals or by exogenous ATP and suggests that blockade of the NLRP3-inflammasome or purinergic P2X7 receptor represents a novel potential therapeutic approach to control the inflammatory process in several associated pathologies.

## **Acknowledgments**

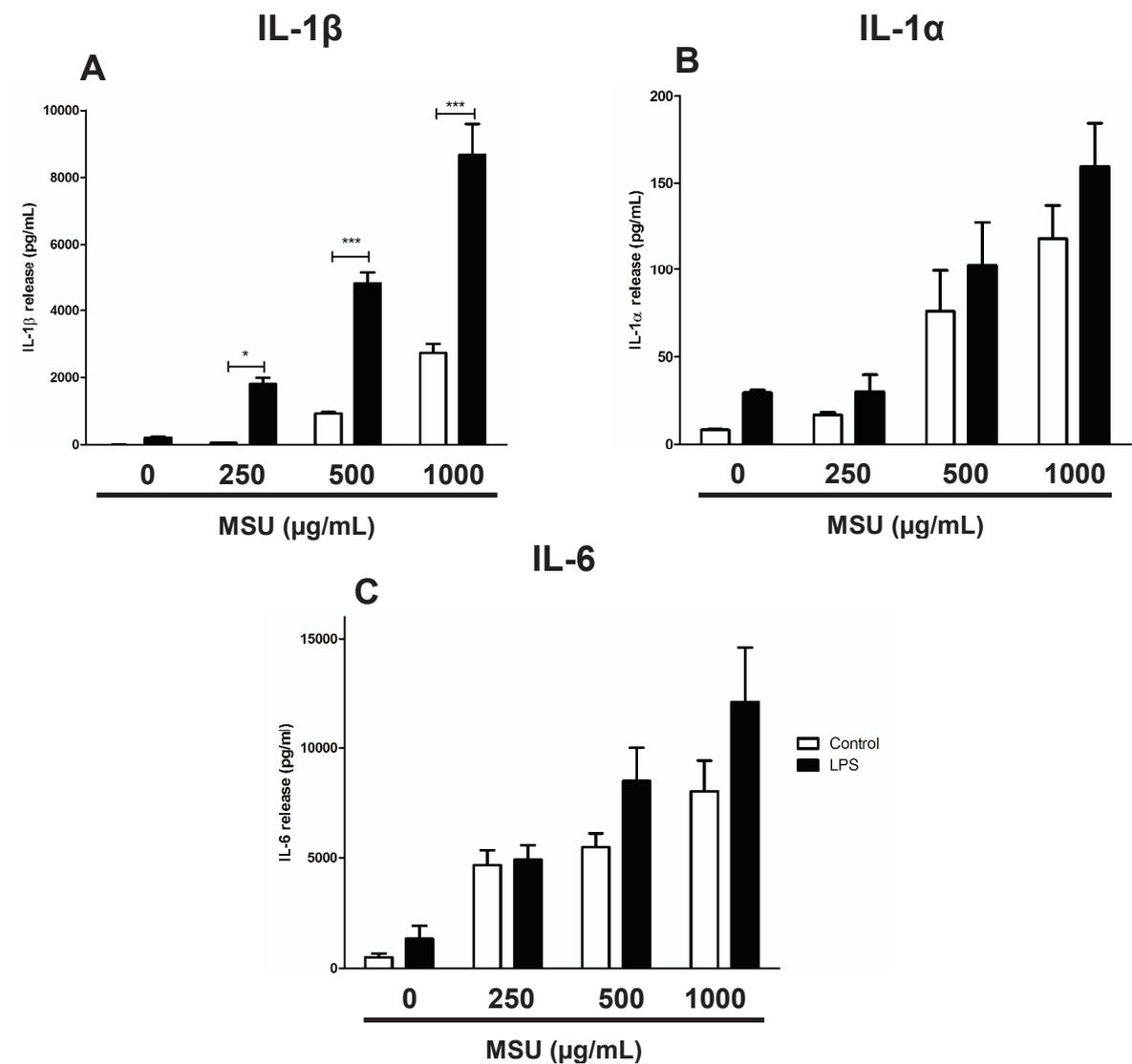
This study is supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR) project (ANR2010 MIDI01202) and INSERM. The authors thank Ahmad Sharanek for his helpful contribution and the Biogenouest SynNanoVect platform (IBiSA – ISO 9001) for the technical support for electroporation experiments.

## **Disclosures**

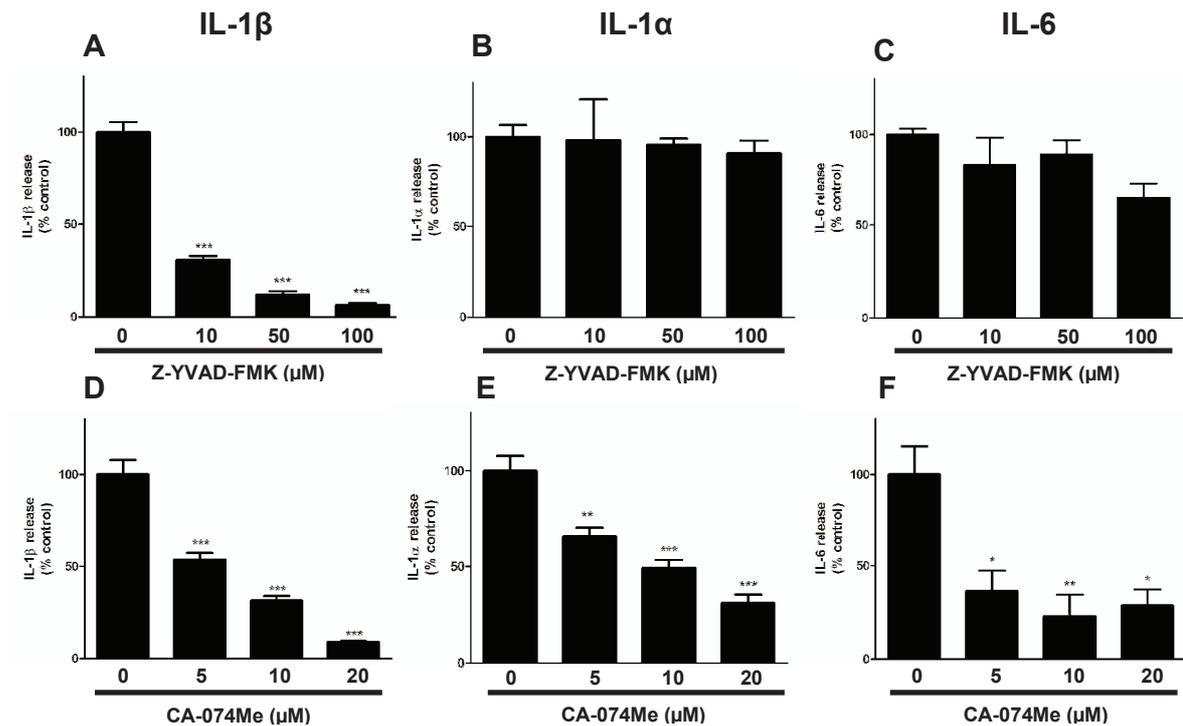
The authors have no financial conflicts of interest.

<b>Human primers</b>	<b>Sense</b>	<b>Antisense</b>
GAPDH	ATGACATCAAGAAGGTGGTG	CATACCAGGAAATGAGCTTG
NLRP1	GGACTGACGATGACTTCTGG	ATCACAAAGCAGAGACCCG
NLRP2	TCGGGTTGGTGTCTTGTTTC	CAACTTAGCACCCCTCATCCAG
NLRP3	GTGTTTCGAATCCCCTGTG	TCTGCTTCTCACGTACTTCTG
NLRC4	CAGTCCCCTCACCATAGAAG	TCAAGTTACCCAAGCTGTCAG
NLRP6	TCTTCATCCACTCTTCAGGC	CTCAGAAAGGTCTCGGCAG
AIM2	TGAAACCCCGAAGATCAACAC	CCCAGTACTTCCATTTTCCCAG
IL-1 $\beta$	ATGCACCTGTACGATCACTGA	ACAAAGGACATGGAGAACACC
IL-1 $\alpha$	CCTCCATTGATCATCTGTCTCTG	GCTTGGATGTTTTAGAGGTTTCAG
IL-6	AAAGAGGCACTGGCAGAAAA	TTCACCAGGCAAGTCTCCT
P2X1R	GGTGTGGGATTCGCTTTG	TTAGGCAGGATGTGAAGCAG
P2X2R	CATCCTGCTCTACTTCGTGTG	GTGATCCCCTTGACCTTGG
P2X3R	CTGGTATACGGGAATGCTGG	TCTTGGCTTTGTACTGGTCG
P2X4R	TGTGGCGGATTATGTGATACC	GTGGTCGCATCTGGAATCTC
P2X5R	TCTTGATAAAGCTGCCTCTGAG	CTGCGTCTCGGTAATATCTGG
P2X6R	TTGGGATCGTGGTCTATGTG	TTGATCTGAGTGACGGAACACC
P2X7R	GAACAATATCGACTTCCCCGG	TTATCGCCTGTTTCTCGGAAG
P2Y2	TCTACACCAACCTTTACTGCAG	GTAAGACGCCAGACACC
P2Y6	CTCCTACAGAACTCACAGCC	CCGGACACAATGGCAAATATG

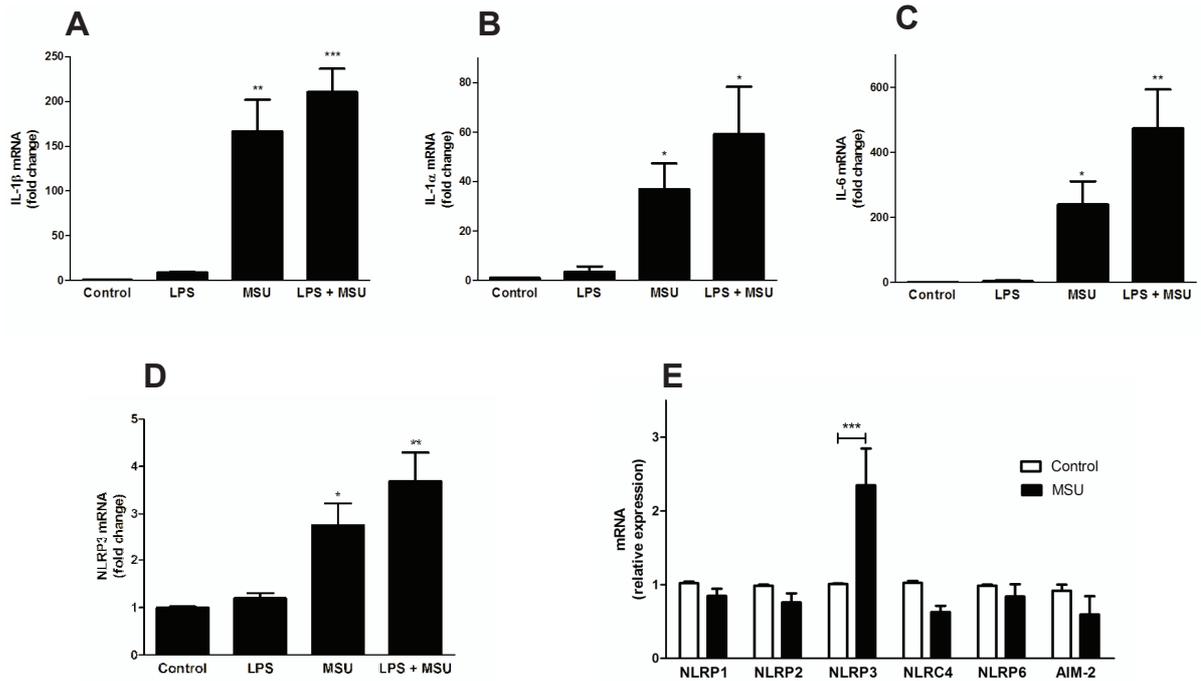
**Table 1.** Human primers designed for this study.



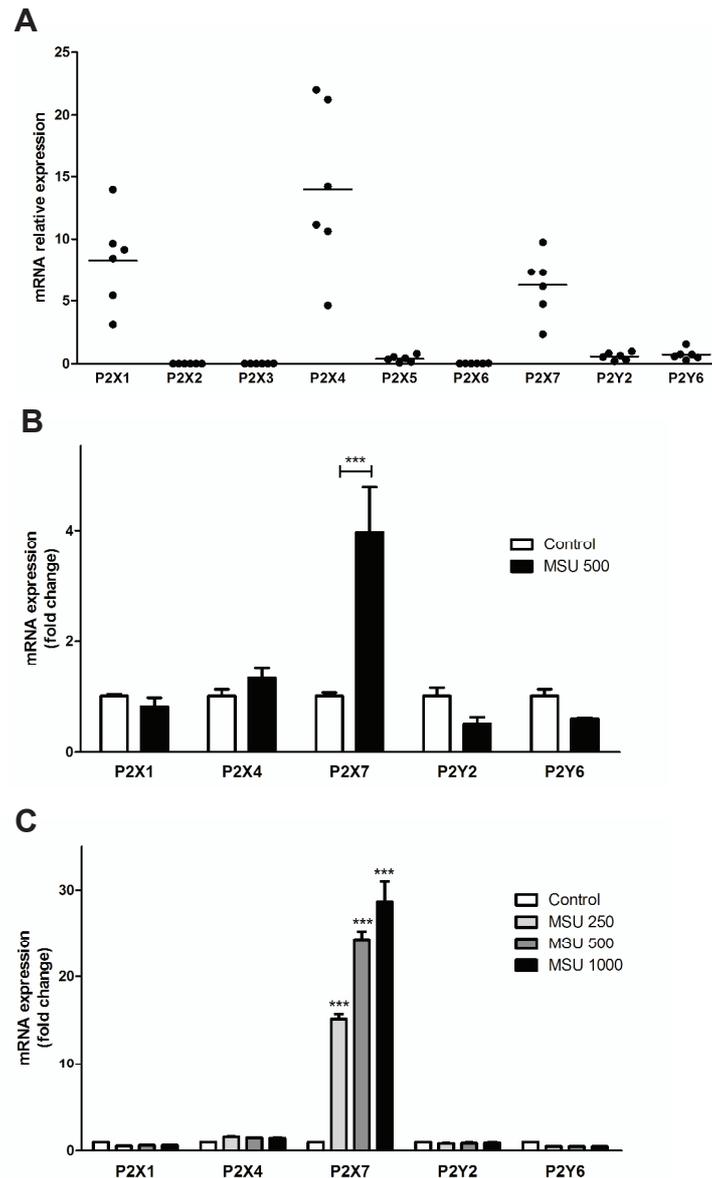
**FIGURE 1.** Effect of the combination of LPS and MSU crystals on the production of IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  and IL-6 from macrophages. Macrophages were incubated overnight with medium alone (control, white bars) or 0.1  $\mu\text{g/mL}$  LPS alone (black bars) and then stimulated with medium or 250, 500 or 1000  $\mu\text{g/mL}$  MSU for 6h. Culture supernatants were collected and the concentrations of IL-1 $\beta$  (A), IL-1 $\alpha$  (B), and IL-6 (C) were measured by ELISA. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of one representative of experiments in triplicate (\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  compared with the control treatment)



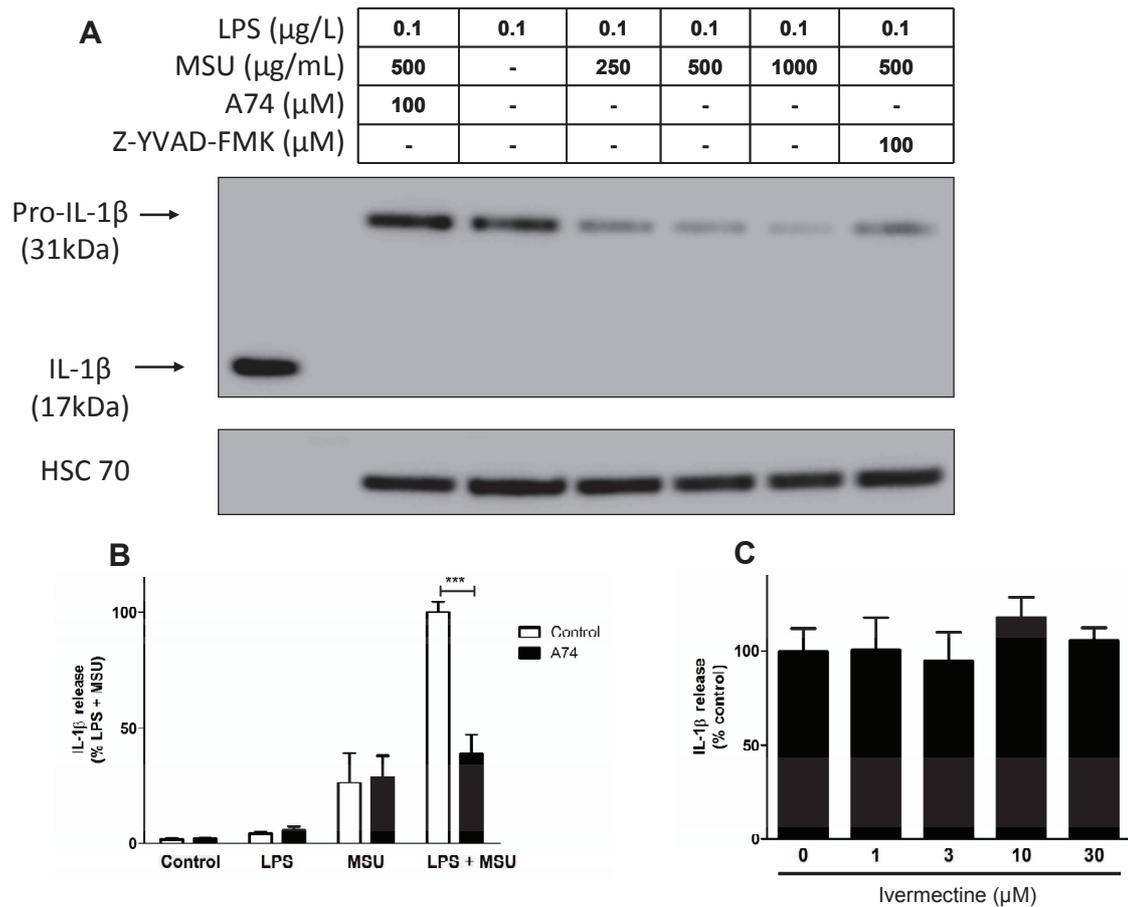
**FIGURE 2.** Effect of the caspase-1 inhibitor (Z-YVAD-FMK) and the cathepsin-B inhibitor (CA-074Me) on the the release of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  and IL-6) from macrophages stimulated with LPS (0.1  $\mu$ g/mL) and MSU (500  $\mu$ g/mL). Macrophages were incubated overnight with 0.1  $\mu$ g/mL LPS and were pretreated with 10, 50 or 100  $\mu$ M Z-YVAD-FMK (A,B,C) or 5, 10 or 20  $\mu$ M CA-074Me (D,E,F) or medium for 1h and then stimulated with 500  $\mu$ g/mL MSU (black bars) for 6h. Culture supernatants were collected and the concentrations of IL-1 $\beta$  (A,D), IL-1 $\alpha$  (B,E), and IL-6 (C,F) were measured by ELISA. Data are means  $\pm$  SEM of three independent experiments expressed relative to LPS+MSU treatment which is arbitrary set at 100% (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 compared with the positive control).



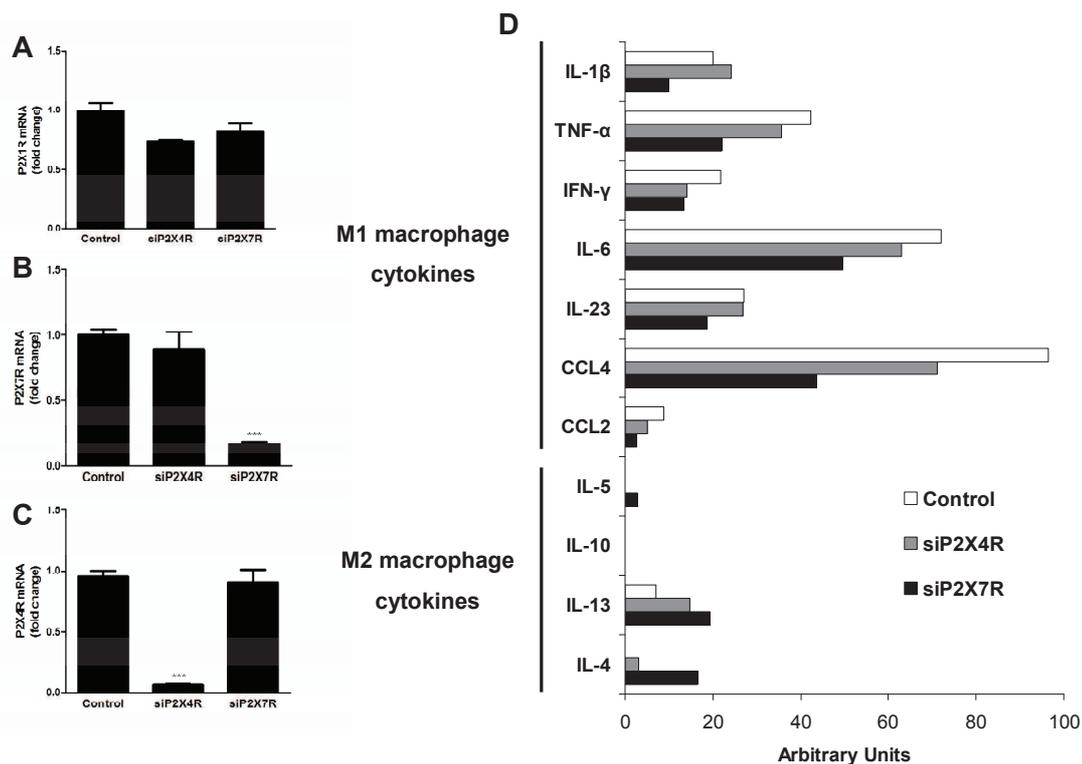
**FIGURE 3.** Expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  and IL-6) and inflammasomes (NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRC4, NLRP6 and AIM-2). Macrophages were incubated overnight with medium or 0.1  $\mu$ g/mL LPS and then stimulated with 500  $\mu$ g/mL MSU or medium for 6h. Cell lysates were collected and IL-1 $\beta$  (A), IL-1 $\alpha$  (B), IL-6 (C), NLRP3 (D) and inflammasomes (NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRC4, NLRP6 and AIM-2) (E) mRNA expression was determined by RT-qPCR. The results are normalized relative to GAPDH gene expression. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  compared with the control treatment).



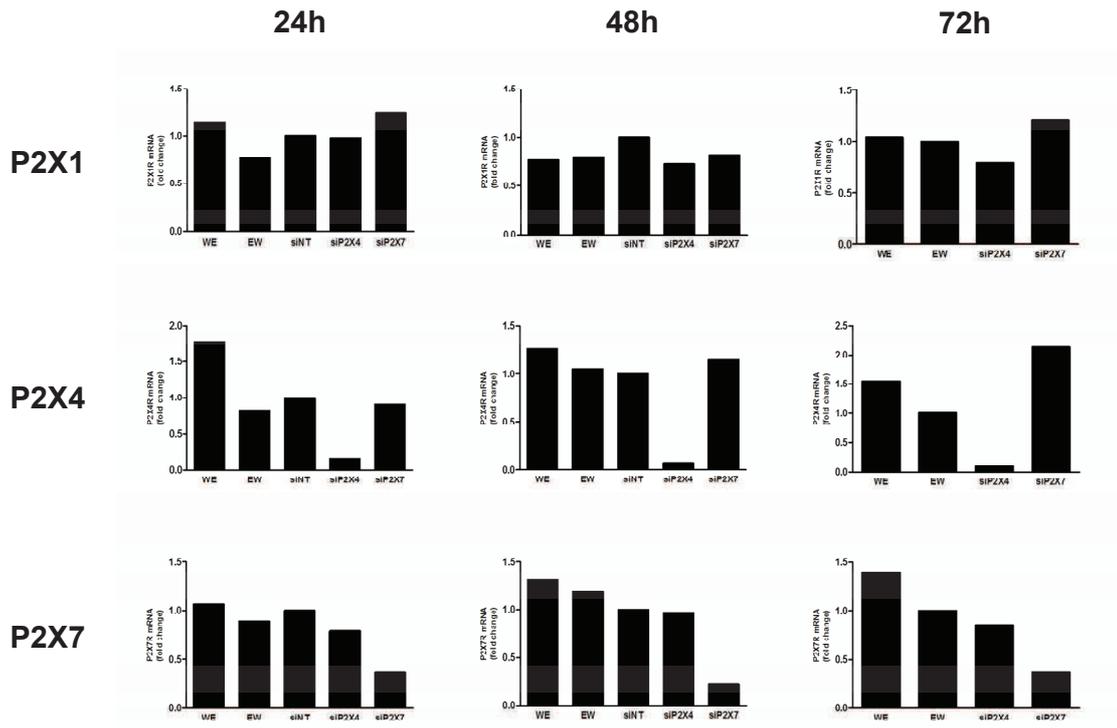
**FIGURE 4.** Expression of purinergic P2 receptors on human macrophages by RT-qPCR. *A*, Macrophages were obtained after differentiation from monocytes by incubation with rhGM-CSF (50 ng/mL) in medium. After 8 days, cell lysates were collected and the gene expression of purinergic receptors (P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7, P2Y2 and P2Y6) was determined by RT-qPCR. P2R gene expression is normalized to the gene expression of GAPDH. Data represented 6 different donors and the means of each relative expression. *B*, The treatment by MSU induces the expression of P2X7R mRNA on human macrophages by RT-qPCR. Monocytes-derived macrophages (MDM) were stimulated with 500  $\mu$ g/mL MSU (black bars) or medium (white bars, control) for 6h. *C*, PMA-differentiated THP-1 cells were stimulated with medium or 250, 500 or 1000  $\mu$ g/mL MSU for 6h. The cell lysates were collected and the expression of mRNA purinergic receptors (P2X1, P2X4, P2X7, P2Y2 and P2Y6) was determined by RT-qPCR. The expression of P2XR is normalized relative to GAPDH gene expression. Data represent the mean  $\pm$  SEM of at least 3 independent experiments (\*\*\*)  $p < 0.001$  compared with the control treatment).



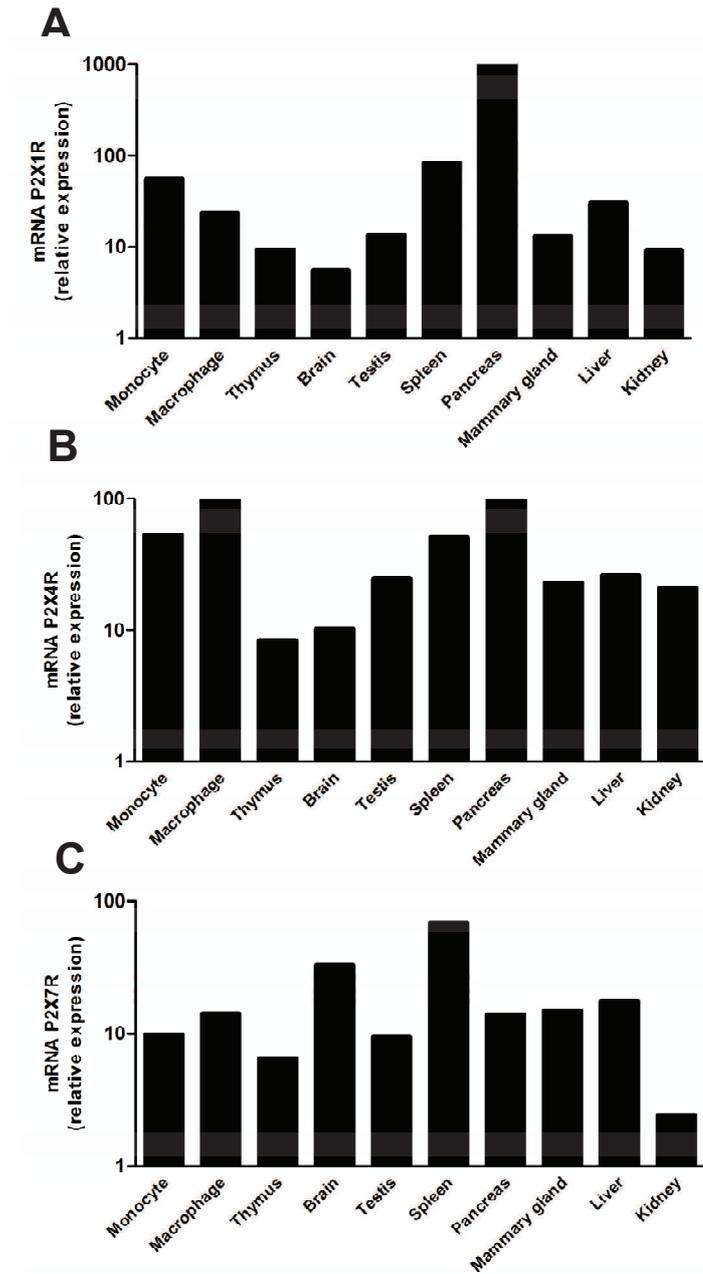
**FIGURE 5.** The antagonist of P2X7R (A-740003) and the inhibitor of caspase-1 (Z-YVAD-FMK) decrease the cleavage of pro-IL-1 $\beta$  after the treatment of LPS+MSU by immunoblot analysis. *A*, Macrophages are incubated overnight with LPS 0.1  $\mu\text{g/mL}$  and are pretreated with 100  $\mu\text{M}$  A-740003 (A74) or 100  $\mu\text{M}$  Z-YVAD-FMK or medium for 1h and then stimulated with 250, 500 or 1000  $\mu\text{g/mL}$  MSU or medium for 6h. Cell lysates were collected and pro-IL-1 $\beta$  expression was assessed by immunoblotting. A positive control (rhIL-1 $\beta$ ) show the 17kDa IL-1 $\beta$  form. Blot shown is representative of three similar experiments. *B*, Macrophages are incubated overnight with 0.1  $\mu\text{g/mL}$  LPS or medium and are pretreated with 100  $\mu\text{M}$  A-740003 (A74) (black bars) or medium (white bars) for 1h and then stimulated with 500  $\mu\text{g/mL}$  MSU or medium for 6h. Culture supernatants were collected and IL-1 $\beta$  release was measured by ELISA. *C*, Macrophages are incubated overnight with 0.1  $\mu\text{g/mL}$  LPS and are pretreated with medium or 1, 3, 10 or 30 $\mu\text{M}$  ivermectine, a positive allosteric modulator of P2X4R for 1h and then stimulated with 500  $\mu\text{g/mL}$  MSU (black bars) for 6h. Data are means  $\pm$  SEM from three independent experiments expressed relative to LPS+MSU treatment set to 100% (\*\*\*)  $p < 0.001$  compared with the positive control).



**FIGURE 6.** Small interfering RNA (siRNA) electroporation extinct purinergic receptors mRNA expression at 54h. Macrophages are transfected at day 6 by small interference RNA (siRNA) targeting P2X4R, P2X7R or by a non targeting siRNA (control) by electroporation and cultured on medium. Cell lysates are collected 54h after electroporation and the expressions of P2X1R (A), P2X4R (B) and P2X7R (C) mRNA are measured by RT-qPCR. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. Results are normalized relative to the gene expression of GAPDH (\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  compared with the control). D, At day 7, macrophages (control, siP2X4R and siP2X7R) are incubated overnight with 0.1  $\mu\text{g/mL}$  LPS and then stimulated with 500  $\mu\text{g/mL}$  MSU for 6h. Culture supernatants were collected and the concentrations of cytokines were measured by a cytokine array (Proteome Profiler Human Cytokine Array Panel A, R&D Systems). Data represent the relative expression of one experiment in triplicate.



**FIGURE S1.** Small interfering RNA (siRNA) electroporation extinct efficacely purinergic receptors mRNA expression at 24h, 48h and 72h. At day 6, macrophages are cultured without electroporation (WE), electroporated without small interference RNA (siRNA) (WE) or transfected by siRNA targetting P2X4R, P2X7R or by a non targeting siRNA (siNT) by electroporation and cultured on medium. The cell lysates are collected 24, 48 or 72h after electroporation and the expressions of P2X1R, P2X4R and P2X7R mRNA are measured by RT-qPCR.



**FIGURE S2.** Purinergic receptor P2X1R (A), P2X4R (B) and P2X7R (C) mRNA expression of different tissues was measured by RT-qPCR.

## REFERENCES

1. Bauernfeind, F. G., G. Horvath, A. Stutz, E. S. Alnemri, K. MacDonald, D. Speert, T. Fernandes-Alnemri, J. Wu, B. G. Monks, K. A. Fitzgerald, V. Hornung, and E. Latz. 2009. Cutting edge: NF- $\kappa$ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol.* 183: 787–791.
2. Villani, A.C., M. Lemire, G. Fortin, E. Louis, M.S. Silverberg, C. Collette, N. Baba, C. Libioulle, J. Belaiche, A. Bitton, D. Gaudet, A. Cohen, D. Langelier, P.R. Fortin, J.E. Wither, M. Sarfati, P. Rutgeerts, J.D. Rioux, S. Vermeire, T.J. Hudson, and D. Franchimont. 2009. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 41: 71-6.
3. Rosengren, S., H.M. Hoffman, W. Bugbee, and D.L. Boyle. 2005. Expression and regulation of cryopyrin and related proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Ann Rheum Dis* 64: 708-14.
4. Agostini, L., F. Martinon, K. Burns, M.F. McDermott, P.N. Hawkins, and J. Tschopp. 2004. NALP3 forms an IL-1 $\beta$ -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20: 319-25.
5. Riteau, N, P. Gasse, L. Fauconnier, A. Gombault, M. Couegnat, L. Fick, J. Kanellopoulos, V.F. Quesniaux, S. Marchand-Adam, B. Crestani, B. Ryffel, and I. Couillin. 2010. Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 774-83.
6. Gasse, P., N. Riteau, S. Charron, S. Girre, L. Fick, V. Pétrilli, J. Tschopp, V. Lagente, V.F. Quesniaux, B. Ryffel, and I. Couillin. 2009. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 179: 903-13.
7. Martinon, F., V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel, and J. Tschopp. 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440: 237–41.
8. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . *Mol Cell.* 10: 417-26.
9. Kahlenberg, J.M., and G.R. Dubyak. 2004. Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor mediated K<sup>+</sup> release. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: 1100-1108.
10. Mariathasan, S., D.S. Weiss, K. Newton, J. McBride, K. O'Rourke, M. Roose-Girma, W.P. Lee, Y. Weinrauch, D.M. Monack, and V.M. Dixit. 2006 Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440: 228-32.

11. Pétrilli, V., S. Papin, C. Dostert, A. Mayor, F. Martinon and J. Tschopp. 2007. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 14(9): 1583-1589.
12. Kanneganti, T. D., M. Lamkanfi, Y. G. Kim, G. Chen, J. H. Park, L. Franchi, P. Vandenabeele, and G. Nunez. 2007. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll like receptor signaling. *Immunity* 26: 433–443.
13. Shi, Y., J. E. Evans, and K.L. Rock. 2003. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425: 516-521.
14. Liu-Bryan, R., P. Scott, A. Sydlaske, D.M Rose, and R. Terkeltaub. 2005. Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum* : 52:2936–2946.
15. Scott, P., H. Ma, S. Viriyakosol, R. Terkeltaub, and R. Liu-Bryan. 2006 .Engagement of CD14 mediates the inflammatory potential of monosodium urate crystals. *J Immunol.* : 177:6370–6378.
16. Chen, C.J., Y. Shi, A. Hearn, K. Fitzgerald, D. Golenbock, G. Reed, S. Akira, and K.L. Rock. 2006. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *J Clin Inves* : 116:2262–2271.
17. Wu, J., Z. Yan, D.E. Schwartz, J. Yu, A.B. Malik, and G. Hu. 2013. Activation of NLRP3 inflammasome in alveolar macrophages contributes to mechanical stretch-induced lung inflammation and injury. *J Immunol.* : 190(7):3590-9.
18. Hornung, V., F. Bauernfeind, A. Halle, E. O. Samstad, H. Kono, K. L. Rock, K. A. Fitzgerald, and E. Latz. 2008. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* 9: 847–856.
19. Halle, A., V. Hornung, G. C. Petzold, C. R. Stewart, B. G. Monks, T. Reinheckel, K. A. Fitzgerald, E. Latz, K. J. Moore, and D.T. Golenbock. 2008. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat. Immunol* 9: 857–865.
20. Duewell, P., H. Kono, K. J. Rayner, C. M. Sirois, G. Vladimer, F. G. Bauernfeind, G. S. Abela, L. Franchi, G. Nunñez, M. Schnurr, et al. 2010. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464: 1357–1361.
21. Riteau, N., L. Baron, B. Villeret, N. Guillou, F. Savigny, B. Ryffel, F. Rassendren, M. Le Bert, A. Gombault, and I. Couillin. 2012. ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell Death Dis.* doi: 10.1038/cddis.2012.144.

22. Tao, J.H., Y. Zhang, and X.P. Li. 2013. P2X7R: a potential key regulator of acute gouty arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* : (3):376-80.
23. Ferrari, D., C. Pizzirani, E. Adinolfi, R.M. Lemoli, A. Curti, M. Idzko, E. Panther, and F. Di Virgilio. 2006. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol.* : 176: 3877-83.
24. Seil, M., M. El Ouaaliti, U. Fontanils, I.G. Etxebarria, S. Pochet, G. Dal Moro, A. Marino, and J.P. Dehaye. 2010. Ivermectin-dependent release of IL-1beta in response to ATP by peritoneal macrophages from P2X(7)-KO mice. *Purinergic Signal.*: (4):405-16.
25. De Rivero Vaccari, J.P., D. Bastien, G. Yurcisin, I. Pineau, W.D. Dietrich, Y. De Koninck, R.W. Keane, and S. Lacroix. 2012. P2X4 receptors influence inflammasome activation after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 32 (2012) 3058–3066.
26. Baron, L., A. Gombault, F. Manoussa, B. Villeret, F. Savigny, N. Guillou, V. Lagente, F. Rassendren, N. Riteau and I. Couillin. The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine via receptor signaling and adenosine cellular uptake (submitted)
27. Uratsuji, H., Y. Tada, T. Kawashima, M. Kamata, C.S. Hau, Y. Asano, M. Sugaya, T. Kadono, A. Asahina, S. Sato, and K. Tamaki. 2012. P2Y6 receptor signaling pathway mediates inflammatory responses induced by monosodium urate crystals. *J Immunol.* 188(1):436-44.
28. Gicquel, T., T. Victoni, A. Fautrel, S. Robert, F. Gleonnec, M. Guezingar, I. Couillin, V. Catros, E. Boichot and V. Lagente. 2014. Involvement of purinergic receptors and NOD-like receptor-family protein 3-inflammasome pathway in the adenosine triphosphate-induced cytokine release from macrophages. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 41(4):279-86.
29. Laurent, V., A. Fraix, T. Montier, S. Cammas-Marion, C. Ribault, T. Benvegna, P-A. Jaffres, and P. Loyer. 2010. Highly efficient gene transfer into hepatocyte-like cells : new means for drug metabolism and toxicity studies. *Biotechnol J*, 2010, 5, 314-320.
30. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54
31. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25: 402-408.
32. Jaramillo, M., P.H. Naccache, and M. Olivier. 2004. Monosodium urate crystals synergize with IFN-gamma to generate macrophage nitric oxide: involvement of

- extracellular signal-regulated kinase 1/2 and NF-kappa B. *J Immunol.* 172(9):5734-42.
33. Pelegrin, P., C. Barroso-Gutierrez, and A. Surprenant. 2008. P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. *J Immunol.* 1;180(11):7147-57.
  34. Ward, J.R., P.W. West, M.P. Ariaans, L.C. Parker, S.E. Francis, D.C. Crossman, I. Sabroe, and H.L. Wilson. 2010. Temporal interleukin-1beta secretion from primary human peripheral blood monocytes by P2X7-independent and P2X7-dependent mechanisms. *J Biol Chem.* 285: 23147-58.
  35. Guo, C., M. Masin, O. S. Qureshi and R.D. Murrell-Lagnado. 2007. Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol.* 72(6):1447-56.
  36. Casas-Pruneda, G., J.P. Reyes, G. Pérez-Flores, P. Pérez-Cornejo, and J. Arreola. 2009. Functional interactions between P2X4 and P2X7 receptors from mouse salivary epithelia. *J Physiol.* 587(Pt 12):2887-901.
  37. Martinez F.O. and S. Gordon. 2004. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6:13.
  38. Gombault, A., L. Baron, and I. Couillin. 2013. ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Front Immunol.* 3:414. doi: 10.3389/fimmu.2012.00414.
  39. Dostert, C., V. Pétrilli, R. Van Bruggen, C. Steele, B. T. Mossman, and J. Tschopp. 2008. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320: 674–677.
  40. Gross, O., A.S. Yazdi, C.J. Thomas, M. Masin, L.X. Heinz, G. Guarda, M. Quadroni, S.K. Drexler, and J. Tschopp. 2012. Inflammasome activators induce interleukin-1a secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity* 36:388–400.
  41. Fettelschoss, A., M. Kistowska, S. LeibundGut-Landmann, H.D. Beer, P. Johansen, G. Senti, E. Contassot, M.F. Bachmann, L.E. French, A. Oxenius, and T.M. Kundig. 2011. Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  target IL-1 $\alpha$  for secretion as opposed to surface expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:18055–60.
  42. Brône, B., D. Moechars, R. Marrannes, M. Mercken, and T. Meert. 2007. P2X currents in peritoneal macrophages of wild type and P2X4  $-/-$  mice. *Immunol Lett.* 113(2):83-9.
  43. Sim, J.A., C.K. Park, S.B. Oh, R.J. Evans, and R.A. North. 2007. P2X1 and P2X4 receptor currents in mouse macrophages. *Br J Pharmacol.* (8):1283-90.
  44. Chessell, I.P., J.P. Hatcher, C. Bountra, A.D. Michel, J.P. Hughes, P. Green, J. Egerton, M. Murfin, J. Richardson, W.L. Peck, C.B. Grahames, M.A. Casula, Y.

- Yiangou, R. Birch, P. Anand, and G.N. Buell. 2005. Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 114: 386–396.
45. Pelegrin, P., and A. Surprenant. 2006. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 $\beta$  release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 25(21):5071-82.
46. Eleftheriadis, T., G. Pissas, A. Karioti, G. Antoniadi, S. Golfinopoulos, V. Liakopoulos, A. Mamara, M. Speletas, G. Koukoulis, and I. Stefanidis. 2013. Uric acid induces caspase-1 activation, IL-1 $\beta$  secretion and P2X7 receptor dependent proliferation in primary human lymphocytes *HIPPOKRATIA*, 17, 2:141-145.
47. Solle, M., J. Labasi, D.G. Perregaux, E. Stam, N. Petrushova, B.H. Koller, R.J. Griffiths, and C.A. Gabel. 2001. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem.* 276(1):125-32.
48. Nicke, A. 2008. Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008. 377(3):803-8.
49. Priel, A., and S. D. Silberberg. 2004. Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. *J Gen Physiol* 123, 281:293.

## 2. Résumé des principaux résultats

Nous avons montré que des cristaux de MSU peuvent induire la libération d'IL-1 $\beta$  de manière dose-dépendante par les macrophages prétraités pendant 18h par du LPS. De plus, un inhibiteur de caspase-1 (Z-YVAD-FMK) et un inhibiteur de la cathepsine B (CA-074Me) sont capables de diminuer de façon dose-dépendante le relargage d'IL-1 $\beta$  après un traitement par LPS + MSU. Par contre, la sécrétion d'IL-1 $\alpha$  et d'IL-6 n'est significativement diminuée qu'en présence de CA-074Me, pas avec Z-YVAD-FMK. L'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 est significativement induite après traitement par le MSU. Par technique de RT-qPCR nous montrons également que NLRP3 est le seul inflammasome induit par le MSU, et le récepteur P2X7 est le seul récepteur P2 induit.

Afin de mettre en évidence le rôle des récepteurs purinergiques dans l'activation de l'inflammasome NLRP3, nous utilisons un modulateur allostérique de P2X4R comme l'ivermectine, un antagoniste de P2X7R (A74) ou des ARN interférants (siRNA) ciblant les récepteurs purinergiques. Ainsi l'ivermectine n'induit pas la libération d'IL-1 $\beta$  alors que l'A74 diminue significativement sa concentration dans le milieu extracellulaire. Par une technique de transfection de siRNA par électroporation, nous inhibons efficacement l'expression des récepteurs purinergiques dans les macrophages. Cette extinction génique est maximale entre 48 et 72 heures. Ainsi nous montrons que les macrophages électroporés par siP2X7R libèrent moins d'IL-1 $\beta$  que les autres. Nous montrons également, que les cytokines de type M1, comme l'IL-6 ou le TNF- $\alpha$ , sont moins sécrétées par les macrophages transfectés par un siP2X7R.

### 3. Résultats complémentaires

Nous avons montré que les cristaux de MSU pouvaient activer la caspase-1 dans les macrophages et ainsi cliver la pro-IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  suite à une pré-activation par du LPS. Par ailleurs, l'IL-33, une cytokine pro-inflammatoire de la famille de l'IL-1, peut être clivée par la caspase-1 (Schmitz *et al.* 2005), ainsi nous souhaitons évaluer la libération d'IL-33 en réponse au traitement LPS+MSU. Cependant, nous n'avons pas observé de libération d'IL-33 dans le surnageant de culture (Fig. 18).

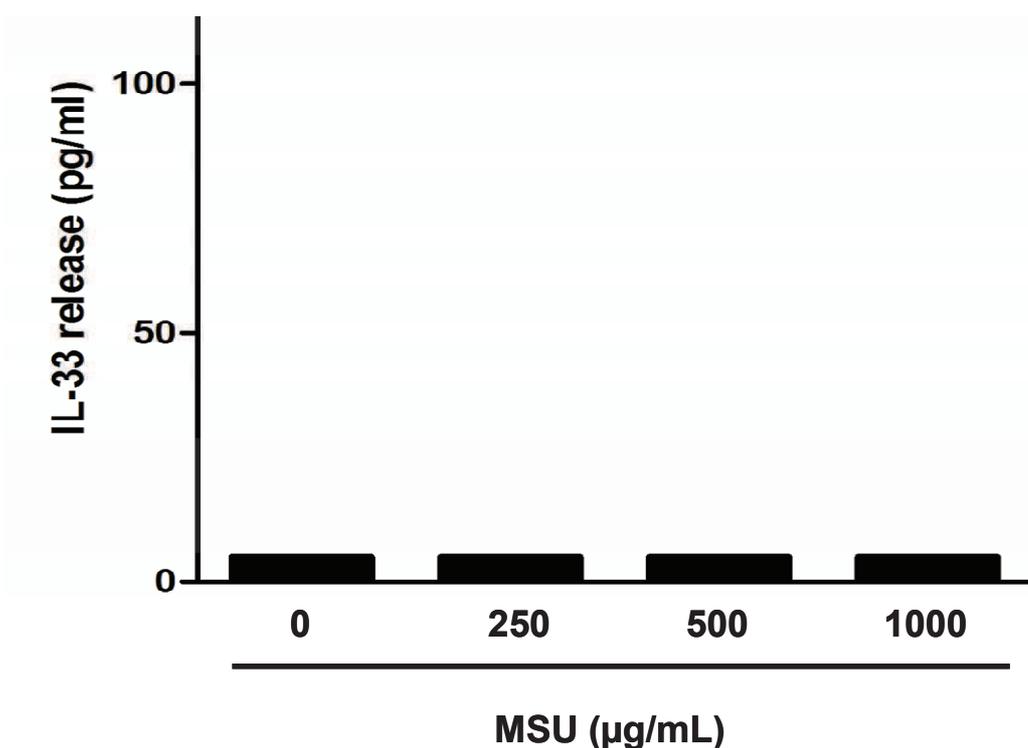


Figure 18 : Mesure de la production d'IL-33 par des macrophages pré-activés par du LPS (0,1  $\mu\text{g/mL}$ ) + MSU par technique ELISA

Liu-Bryan *et al.* (2005) montrent une implication des TLR2 et TLR4 dans la réponse inflammatoire induite par les cristaux de MSU. Ainsi, nous avons voulu voir si le MSU était capable dans notre modèle d'induire les TLRs mais aucun TLR ne semble être significativement induit par le MSU (500  $\mu\text{g/mL}$ ) (Fig. 18).

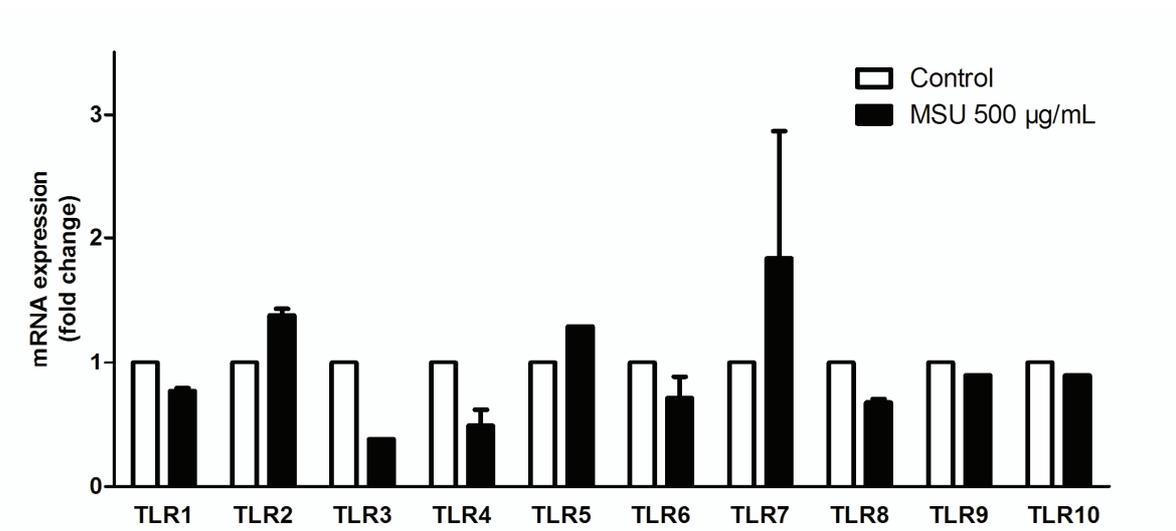


Figure 19 : Expression des TLRs des macrophages humains par RT-qPCR avec ou sans traitement par le MSU (500µg/mL)

Afin de mettre en évidence l'implication des récepteurs purinergiques dans la libération d'IL-1 $\beta$  en réponse au traitement LPS+MSU, nous avons transfecté les macrophages par des siRNA ciblant les récepteurs P2X1, P2X4, P2X7, P2Y2 et un contrôle (siNT). Dès 24h après la transfection, les cibles des siRNA sont sous-exprimées par rapport au contrôle (Figs. 6 et S1). Les macrophages pourront ensuite être pré-activés par du LPS, puis traités à J8 par du MSU.

Ainsi nous observons après traitement par LPS+MSU que la libération d'IL-1 $\beta$  est plus faible dans les macrophages transfectés par un siP2X7 ou siP2Y2 (Fig. 20)

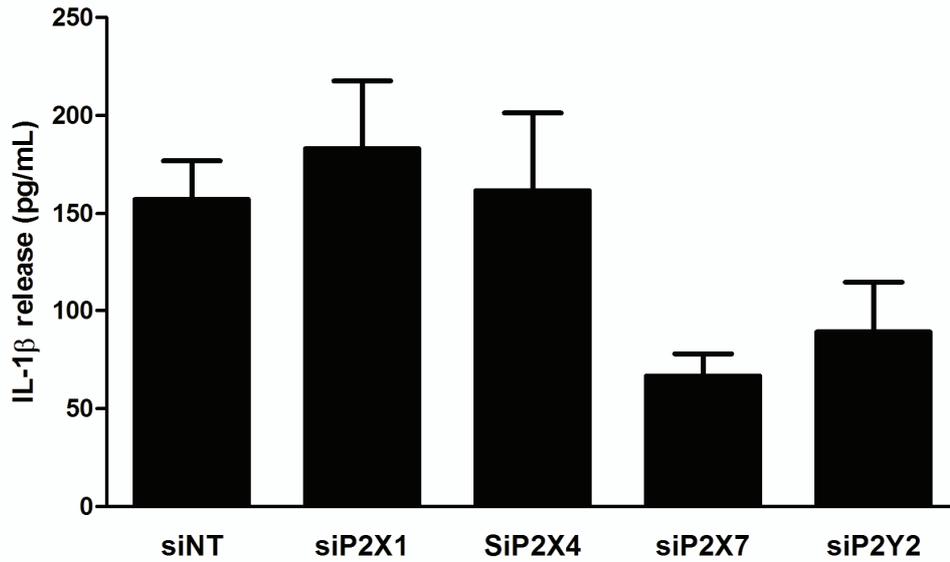


Figure 20 : Mesure de la production d'IL-1 $\beta$  par technique ELISA dans le surnageant de macrophages transfectés par des siRNA ciblant les récepteurs purinergiques en réponse au traitement par LPS (0,1  $\mu$ g/mL) + MSU (500  $\mu$ g/mL)

De même, la sécrétion d'IL-1 $\alpha$  en réponse au traitement LPS+MSU est diminuée en présence d'un siRNA ciblant le récepteur P2X7 (Fig. 21) mais également les cytokines CCL4, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-17E, IL-32- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  et IL-6 (Figs. 22 et 23).

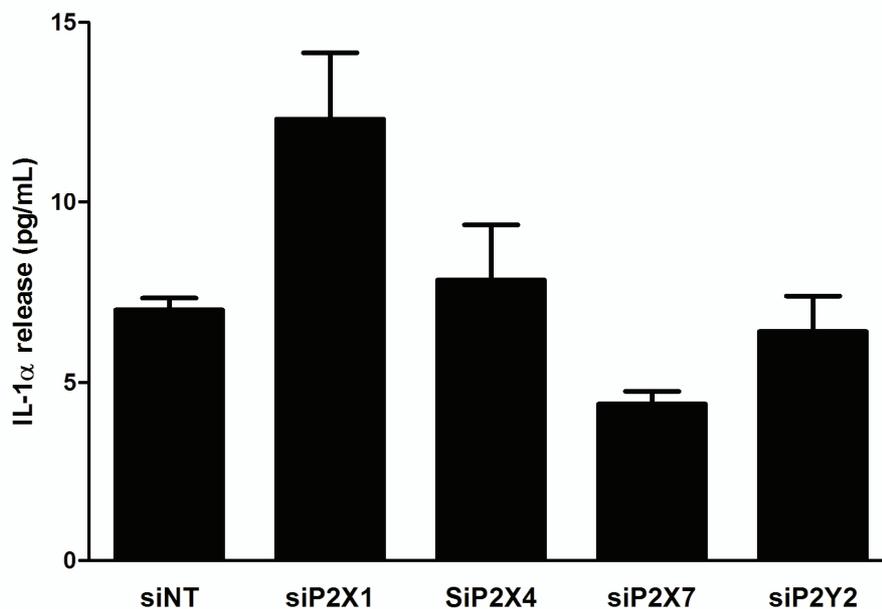


Figure 21 : Mesure de la production d'IL-1 $\alpha$  par technique ELISA dans le surnageant de macrophages transfectés par des siRNA ciblant les récepteurs purinergiques en réponse au traitement par LPS (0,1  $\mu$ g/mL) + MSU (500  $\mu$ g/mL)

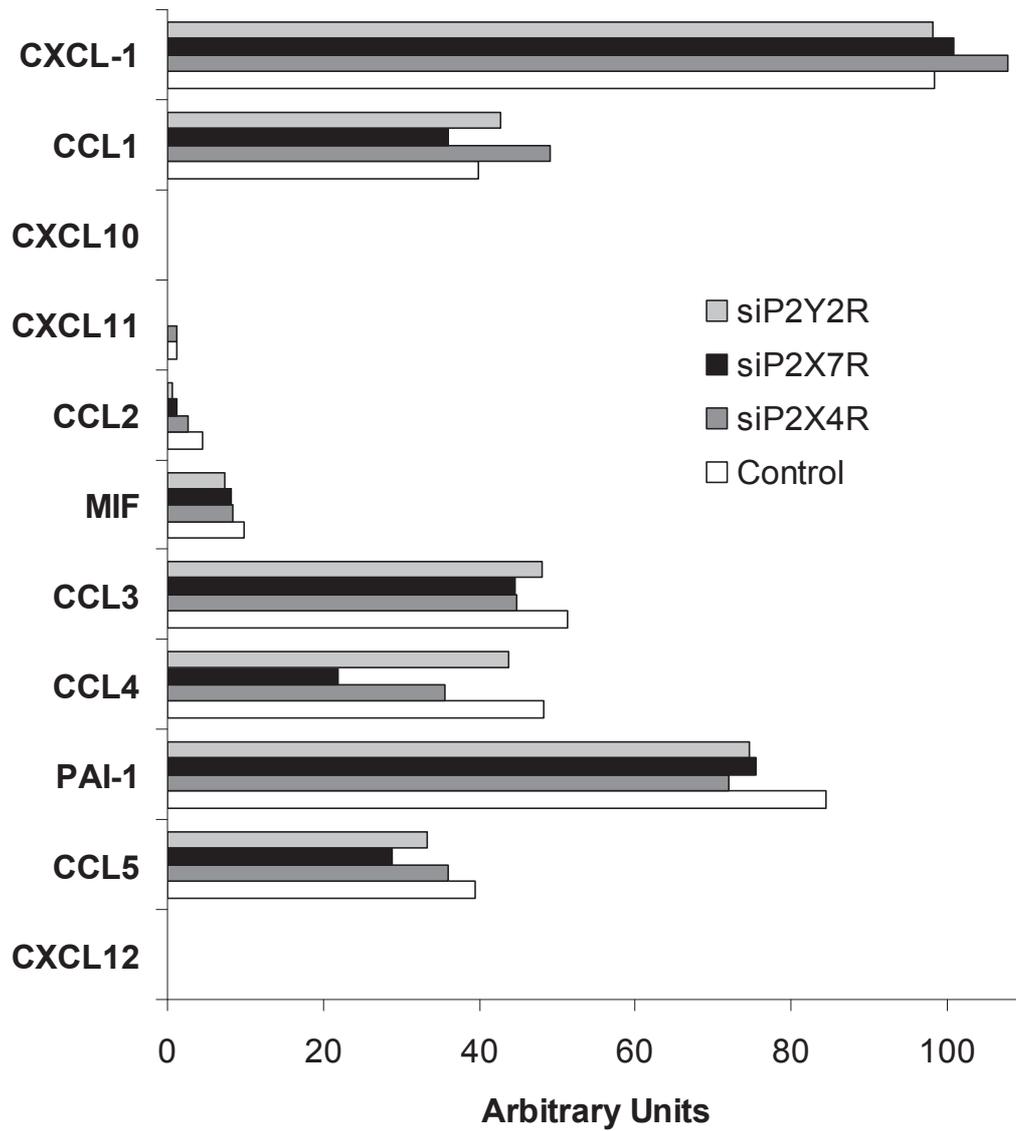


Figure 22 : Mesure de l'expression de chimiokines dans le surnageant de macrophages en réponse au traitement par LPS (0,1 µg/mL) + MSU (500 µg/mL) sur une membrane Proteome Profiler (Human Cytokine Array Panel A)

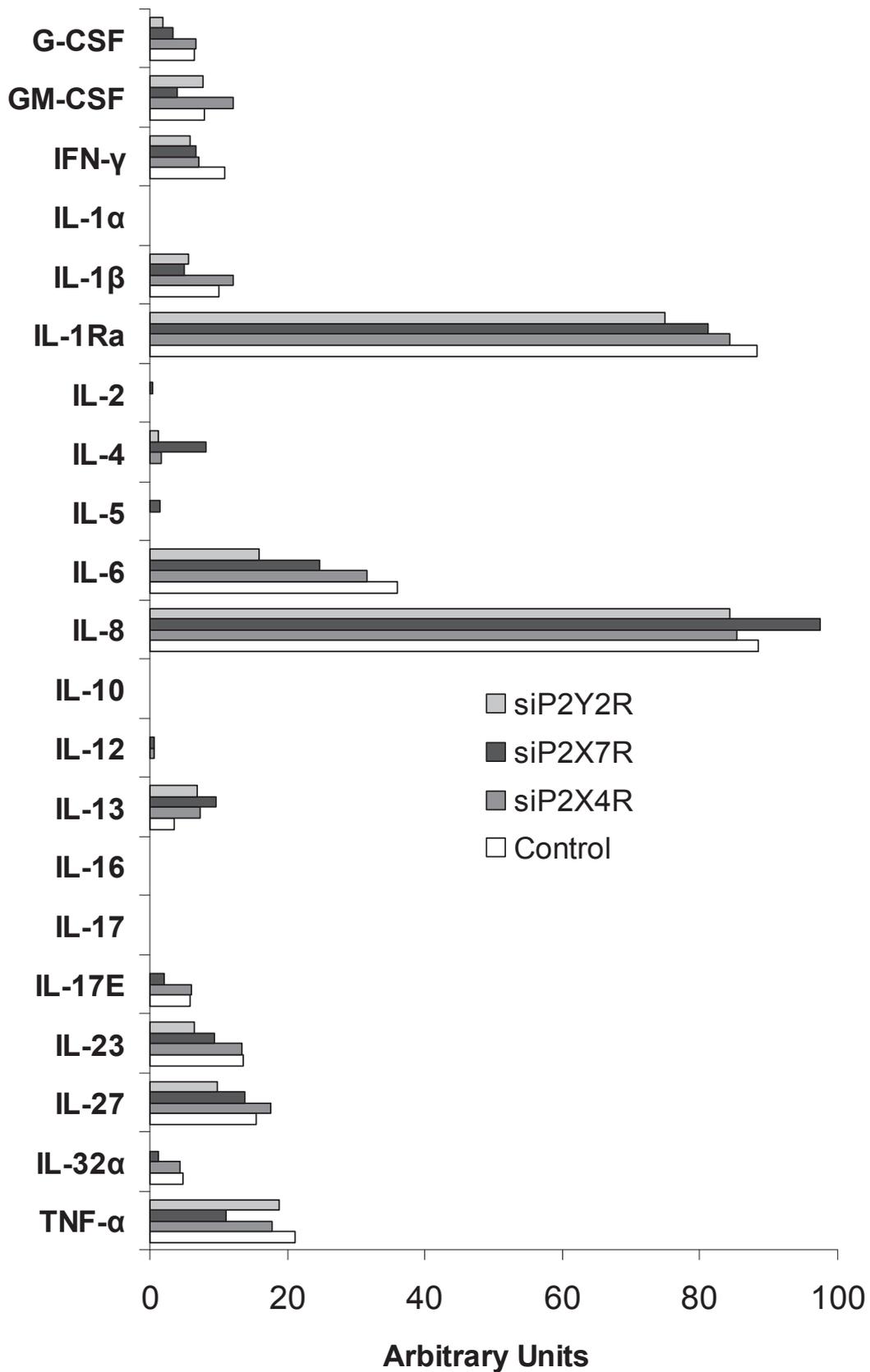


Figure 23 : Mesure de l'expression des interleukines dans le surnageant de macrophages en réponse au traitement par LPS (0,1 µg/mL) + MSU (500 µg/mL) sur une membrane Proteome Profiler (Human Cytokine Array Panel A)

Nous montrons également une diminution de libération des cytokines IL-1 $\beta$ , G-CSF, IL-1Ra, IL-6, IL-17E, IL-23 et IL-32 $\alpha$  dans les macrophages transfectés par un siRNA ciblant P2Y2 (Figs. 20, 22 et 24).

En présence d'un antagoniste du récepteur P2X7 (A74), la sécrétion d'IL-6 en réponse au traitement LPS+MSU est également significativement réduite à la concentration de 100 $\mu$ M et de 200 $\mu$ M (Fig. 24).

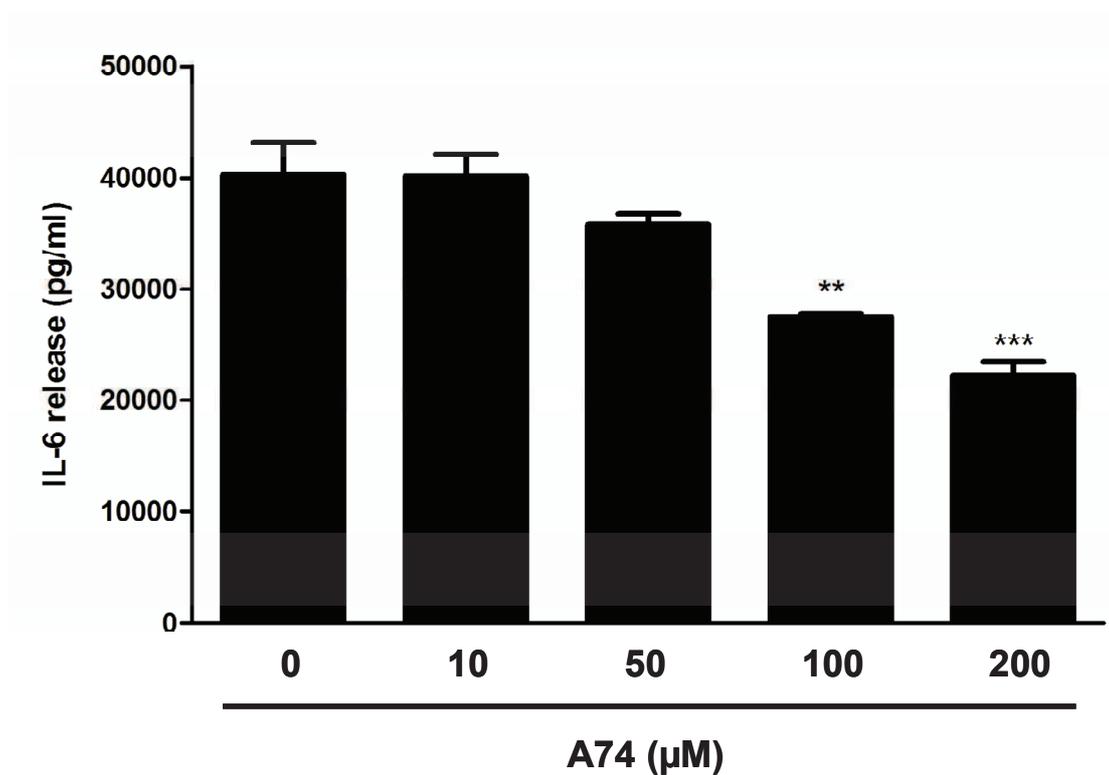


Figure 24 : Mesure de la production d'IL-6 par technique ELISA dans le surnageant de macrophages prétraités ou non par un antagoniste de P2X7R, l'A74, après traitement par LPS (0,1  $\mu$ g/mL) + MSU (500  $\mu$ g/mL)

## 4. Conclusion

Nos résultats montrent ainsi l'implication des récepteurs purinergiques dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse aux cristaux de MSU.

En effet, dans un premier temps, nous mettons en évidence le rôle de la cathepsine B et de la caspase-1 dans la libération d'IL-1 $\beta$  dans les macrophages après traitement par LPS+MSU. Nous montrons ensuite à l'aide d'antagonistes et de siRNA que le récepteur P2X7 est indispensable à la libération d'IL-1 $\beta$ , à l'inverse P2X4R ne semble pas impliqué dans notre modèle. Cependant, nos résultats préliminaires laissent entrevoir une implication du récepteur métabotrope P2Y2 dans la libération d'IL-1 $\beta$ .

De plus, les récepteurs purinergiques semblent également impliqués dans la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires de type M1 en réponse au traitement LPS+MSU.

Ainsi, ces résultats suggèrent que les récepteurs purinergiques représentent une cible thérapeutique intéressante dans le traitement des pathologies inflammatoires.

# **IV) DISCUSSION**

Les macrophages jouent un rôle très important dans l'immunité en tant que CPA mais également dans la défense contre les PAMPs et les DAMPs (Locati *et al.* 2013). Ainsi dans notre étude nous avons développé un modèle de macrophages humains en culture primaire exprimant les récepteurs purinergiques et l'inflammasome NLRP3 permettant ainsi une libération de cytokines pro-inflammatoires en réponse aux analogues de l'ATP (Chapitre 1) ou aux cristaux de MSU (Chapitre 2).

## **A) Modèle de macrophages en culture primaire**

Nous avons mis en place un modèle de macrophages dérivés de monocytes à partir de sang périphérique de donneurs que nous avons différencié pendant 7 jours avec du GM-CSF (Daigneault *et al.* 2010). Ce modèle cellulaire est intéressant car il exprime l'inflammasome NLRP3 et permet le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  mature ainsi que la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-6.

D'autres modèles expérimentaux auraient pu être utilisés comme par exemple des lignées cellulaires ou des macrophages provenant de prélèvements biologiques, mais ce modèle cellulaire nous paraissait relativement approprié et présentait l'intérêt d'avoir un accès facile à une importante quantité de matériel biologique d'origine humaine.

Bien que ce modèle soit couteux et qu'il nécessite du temps pour trier les monocytes à partir du sang périphérique, son avantage principal est qu'il représente un modèle humain avec une expression propre à chaque individu. Ainsi, en multipliant les expériences à partir de différents prélèvements nous pensons obtenir des résultats plus proches de ce qui peut se passer dans des conditions physiopathologiques chez l'homme.

Afin de vérifier certaines de nos hypothèses de travail, nous avons pu confirmer plusieurs de nos résultats sur la lignée monocyttaire THP-1 différenciée en macrophages par du Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA).

Les récepteurs purinergiques ont un rôle important dans la réponse inflammatoire (Di Virgilio, 2007). Nous observons que plusieurs récepteurs purinergiques sont exprimés dans les macrophages. Les récepteurs P2X1, P2X4 et P2X7 étant les plus exprimés (Chapitre 2 : Fig. 4A).

Nous avons voulu observer l'expression de ces récepteurs purinergiques dans d'autres tissus. Ainsi, nous avons mesuré par qPCR l'expression relative des récepteurs P2X1, P2X4 et P2X7 à la surface des monocytes du sang périphérique, des macrophages différenciés par du GM-CSF et différents tissus humains : thymus, cerveau, testicule, rate, pancréas, glandes mammaires, foie et rein (Chapitre 2 : Fig. S2). Nous observons une expression hétérogène des récepteurs purinergiques dans ces différents tissus. Les tissus n'expriment pas forcément tous autant les mêmes récepteurs. Ainsi, P2X1R et P2X4R sont surtout exprimés dans les monocytes, les macrophages, la rate et le pancréas. Bien que P2X7R ait été identifié dans de nombreux types cellulaires, sa distribution dans les tissus entiers est aujourd'hui peu connue (Bartlett *et al.* 2014). Nous observons ici que le cerveau et la rate sont les tissus exprimant le plus P2X7R chez l'homme

Notre modèle expérimental met en évidence une expression de TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 et TLR8 et une absence d'expression de TLR3, TLR9 et TLR10 (Chapitre 1 : Fig. A2). Ces résultats concordent avec ceux observés à l'UPRES EA220 dans un modèle de macrophages pulmonaires humains (Abrial, 2014, Thèse de l'université Versailles-Saint Quentin). Ceci montre que notre modèle expérimental est valable pour étudier l'immunité innée, puisque l'expression des récepteurs TLRs est proche d'un modèle physiologique comme les macrophages pulmonaires.

Nous avons également souhaité mettre en évidence l'expression relative des différents NLRs pouvant former des inflammasomes dans les macrophages. Nous observons que NLRP2, NLRP3 et NLRC4 sont les plus exprimées (Chapitre 1 : Fig. A1). Nous montrons aussi par immunocytochimie que les protéines P2X7R et NLRP3 sont exprimées dans les macrophages (Chapitre 1 : Fig. 2).

Ce modèle nous a également permis d'utiliser la technique de transfection de siRNA par électroporation au bout de 6 jours de culture. En effet, nous disposions d'une quantité suffisante de cellules pour pouvoir réaliser des électroporations sur des macrophages différenciés.

Notre technique s'avère efficace puisque l'expression des récepteurs est significativement diminuée par les siRNA dès 24h et jusqu'à 72h après la transsection. Ce principe de transfection par électroporation s'est révélé spécifique puisqu'une transfection d'un siRNA ciblant un récepteur purinergique n'affecte pas les autres P2Rs (Chapitre 2 : Figs. 6 et S1).

Afin d'avoir une extinction efficace pour les différents siRNA et conserver notre protocole expérimental, nous avons réalisé la transfection à J6, traité les macrophages par le LPS à J7 et par le MSU à J8. Ainsi les surnageants et lysats cellulaires ont été prélevés à J8 comme précédemment et ceci 54h après la transfection, ce qui donne une extinction maximale des récepteurs purinergiques (Chapitre 2 : Fig. 6).

Nous souhaitons au cours de cette étude nous focaliser sur un type cellulaire possédant un phénotype proche de macrophages périphériques de type M1. Ainsi, nous avons utilisé une puce à protéine (Protein Array, Cytokine A, R&D) pour mettre en évidence quelles étaient les cytokines sécrétées par ces cellules différenciées par du GM-CSF puis traitées par LPS+MSU. Nous avons pu voir que les cytokines sécrétées étaient principalement de type M1 et très peu de cytokines étaient du type M2 (Chapitre 2 : Figs. 22 et 23). L'activation classique des macrophages M1 est caractérisée par une production de cytokines de type Th1 comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$ , et à une faible production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10. Les macrophages de type M2b sont également capables de produire ces cytokines pro-inflammatoires, mais elles produisent conjointement de l'IL-10 (Mantovani *et al.* 2004 ; Martinez *et al.* 2008). Ainsi, nous pouvons penser que notre modèle cellulaire correspond bien à des macrophages ayant une polarisation de type M1.

Bien que faisant partie de la famille de l'IL-1 et pouvant être clivée par la caspase-1 (Schmitz *et al.* 2005), l'IL-33 n'est pas sécrétée par notre modèle de macrophages en réponse au traitement LPS+MSU (Chapitre 2 : Fig. 18). En effet cette cytokine est plutôt impliquée dans la polarisation de type M2 (Hazlett *et al.* 2010 ; Kurowska-Stolarska *et al.* 2009).

Ceci montre bien que notre modèle cellulaire, bien qu'issu du sang périphérique, représente un bon modèle de macrophages tissulaires dans des conditions inflammatoires. Ce modèle peut ainsi servir à tester des molécules à visée anti-inflammatoire, comme peuvent l'être les antagonistes de P2X7R.

## B) Activation de l'inflammasome NLRP3

Il a été montré que les macrophages avaient besoin de deux signaux indépendants pour libérer l'IL-1 $\beta$  : un premier signal dépendant des TLRs qui permet la transcription et la traduction de la pro-IL-1 $\beta$  et un deuxième pour activer la caspase-1 permettant de cliver la pro-IL-1 $\beta$  (Kanneganti *et al.* 2007).

Ainsi, nous mettons en évidence ce mécanisme en réalisant tout d'abord une pré-activation des macrophages par du LPS ultrapur, spécifique du TLR4, à faible concentration (0,1  $\mu$ g/mL) pendant 18h puis une activation de l'inflammasome NLRP3 par du MSU ou des analogues de l'ATP pour permettre la libération d'IL-1 $\beta$ .

L'expression de NLRP3 peut être induite par de nombreux stimuli (Bauernfeind *et al.* 2009) ainsi nous observons une induction de l'ARNm de NLRP3 par le LPS, le BzATP (Chapitre 1 : Fig. 2) ou par le MSU (Chapitre 2 : Fig. 3). Cependant les autres inflammasomes (NLRP1, NLRP2, NLRC4, NLRP6 et AIM2) ne sont induits ni par le BzATP, ni par le MSU.

Il a été montré que les signaux activateurs de l'inflammasome NLRP3 peuvent être des DAMPs comme l'ATP (Mariathasan *et al.* 2006) ou le MSU (Martinon *et al.* 2006). Nous observons ici que ces signaux peuvent non seulement activer mais également induire l'expression de la protéine NLRP3.

Pour être active et sécrétée la pro-IL-1 $\beta$  doit être clivée en IL-1 $\beta$  par la caspase-1 de l'inflammasome NLRP3. Nous observons que la libération extracellulaire d'IL-1 $\beta$  peut se faire suite à une stimulation par les analogues de l'ATP (Chapitre 1 : Fig. 5) et de manière dose-dépendante en réponse au MSU (Chapitre 2 : Fig. 1A) après une pré-activation par du LPS. Nous montrons également par western blotting que le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  intracellulaire se fait de manière dose-dépendante en réponse au MSU (Chapitre 2 : Fig. 3A). Une fois clivée, l'IL-1 $\beta$  ne reste pas au niveau intracellulaire puisqu'aucune bande correspondant à 31 kDa n'est observée dans le lysat cellulaire. Ce résultat supporte l'idée que l'IL-1 $\beta$ , cytokine pro-inflammatoire très puissante, ne reste pas au niveau intracellulaire car elle est toxique pour la cellule (Yazdi *et al.* 2010).

Les cytokines pro-inflammatoires sont connues pour être induites par des signaux pro-inflammatoires comme les signaux de danger (Bauernfeind *et al.* 2009). Nous observons que les gènes d'IL-1 $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$  sont significativement induits par le LPS, le BzATP et le MSU, excepté pour l'IL-1 $\alpha$  par le BzATP. Ainsi, l'induction de l'expression des gènes pro-inflammatoires se fait dès l'étape de pré-activation par du LPS puis par les activateurs de l'inflammasome NLRP3. Notre modèle expérimental permet d'étudier des macrophages lors d'un processus inflammatoire comme le sont des macrophages tissulaires dans un environnement inflammatoire.

Nous avons observé qu'un inhibiteur irréversible de caspase-1, Z-YVAD-FMK, diminuait le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  par la caspase-1 après le traitement par LPS+MSU (Chapitre 2 : Fig. 2A et 5). Ce résultat concorde avec ce qui a été observé par d'autres auteurs : peu importe le signal activateur de l'inflammasome NLRP3 ou le modèle cellulaire, l'inhibition de la caspase-1 bloque toujours la libération d'IL-1 $\beta$  (Riteau *et al.* 2012 ; Yazdi *et al.* 2010 ; Niemi *et al.* 2011).

La pro-IL-1 $\alpha$  n'est pas un substrat de la caspase-1, cependant certains auteurs suggèrent une implication de l'inflammasome NLRP3 et notamment de la caspase-1 dans la sécrétion d'IL-1 $\alpha$  (Keller *et al.* 2008 ; Nickel et Rabouille, 2009 ; Gross *et al.* 2012 ; Fettelschoss *et al.* 2011).

Feldmeyer *et al.* (2007) montrent que l'activation de la caspase-1 par des UV est liée à la sécrétion d'IL-1 $\alpha$  dans un modèle humain de kératinocytes. De même, un traitement par un inhibiteur de caspase-1 diminue la libération d'IL-1 $\alpha$  (Keller *et al.* 2008). Il a également été montré sur des modèles murins caspase-1  $-/-$  qu'un traitement LPS + MSU sur les macrophages des souris KO induisait une libération plus faible d'IL-1 $\beta$  (Riteau *et al.* 2012) mais aussi plus faible d'IL-1 $\alpha$  (Sutterwala *et al.* 2006). Yazdi *et al.* (2010) montrent aussi une dépendance partielle de la sécrétion d'IL-1 $\alpha$  par la caspase-1 après stimulation par des cristaux de MSU sur un modèle de kératinocytes et sur des macrophages d'origine murine.

Pourtant dans notre modèle de macrophages humains traités par LPS+MSU, nous ne mettons pas en évidence cette implication de la caspase-1. Même à une concentration de 100  $\mu$ M de Z-YVAD-FMK, la sécrétion d'IL-1 $\alpha$  n'est pas significativement inhibée (Chapitre 2 : Fig. 2B).

Des études complémentaires semblent indispensables pour conclure à une absence de dépendance entre IL-1 $\alpha$  et caspase-1 étant donné la contradiction avec la littérature actuelle. Mais à notre connaissance, ce lien n'a pas été mis en évidence sur des modèles de macrophages humains mais sur des modèles murins ou de kératinocytes humains.

McGeough *et al.* (2012) montrent sur un modèle murin que l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 ne jouent pas le même rôle dans la physiopathologie des maladies impliquant l'inflammasome NLRP3, l'IL-6 étant simplement un marqueur de l'inflammation sans rôle initial avec la pathologie. Ainsi nous pouvons penser qu'il en est de même chez l'homme et que la sécrétion d'IL-6 ne dépend pas de l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Nous montrons à l'aide d'un inhibiteur de caspase-1 que la sécrétion d'IL-6 n'est pas significativement diminuée après un traitement LPS+MSU (Chapitre 2 : Fig. 2). Nous pensons que l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 affecte uniquement les cytokines clivées par la caspase-1 comme l'IL-1 $\beta$ . Ce qui montre bien la spécificité de la libération de cette cytokine.

## C) Implication de la cathepsine-B

La cathepsine B est une cystéine protéase impliquée dans les maladies inflammatoires, comme la pancréatite ou la polyarthrite rhumatoïde où plusieurs protéases de la famille de la cathepsine ont été retrouvées dans les articulations des malades (Mort *et al.* 1984 ; Lemaire *et al.* 1997). La fonction principale de la cathepsine B est la dégradation des protéines entrées dans le système lysosomal depuis l'extérieur de la cellule, par phagocytose ou endocytose, ou provenant des autres compartiments de la cellule (Schotte *et al.* 2001). Lors de la rupture du lysosome, la cathepsine B contribue à l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse aux particules (Hornung *et al.* 2008 ; Niemi *et al.* 2011 ; Riteau *et al.* 2012).

Ainsi, il a été montré qu'en présence de CA-074Me, un puissant inhibiteur de la cathepsine B, la sécrétion d'IL-1 $\beta$  en réponse à l'amiante, la silice, le sérum amyloïde A ou le MSU était diminuée (Hornung *et al.* 2008 ; Niemi *et al.* 2011 ; Riteau *et al.* 2012). De plus, Riteau *et al.* (2012) ont montré une diminution de la libération d'IL-1 $\beta$  après un traitement par LPS+MSU sur des BMDMs (Bone marrow-derived macrophages) de souris cathepsine B *-/-*. Ils ont également observé que l'inhibition de la cathepsine B diminuait la libération d'ATP. Nos résultats confirment ici l'implication de la cathepsine B dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 sur un modèle humain traité par LPS+MSU (Chapitre 2 : Fig. 2).

Le mécanisme d'action de l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les substances particulières est encore aujourd'hui mal connu. D'après Yazdi *et al.* (2010), il n'y aurait pas besoin de phagocytose des particules pour activer l'inflammasome NLRP3. Ceci expliquerait pourquoi des cellules non phagocytaires comme les kératinocytes peuvent également activer l'inflammasome NLRP3 (Feldmeyer *et al.* 2007).

Ainsi la diminution de l'activation de l'inflammasome NLRP3 en présence de CA-074Me serait due à une inhibition de la rupture lysosomiale et non pas à une inhibition de la phagocytose. En effet, une rupture lysosomiale artificielle est suffisante pour activer l'inflammasome NLRP3 (Hornung *et al.* 2008). Il a également été montré que la rupture du lysosome permet l'activation de l'inflammasome NLRP1 (Newman *et al.* 2009).

Les DAMPs tels que l'ATP (5 mM) ou le MSU (250 µg/mL) ont été mis en évidence comme inducteurs du relargage de la cathepsine B de macrophages de souris (Savage *et al.* 2001). De plus, il a été montré que la libération d'IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  était diminuée en présence d'un inhibiteur de cathepsine B dans un modèle de macrophages de souris traitées par du LPS (Schotte *et al.* 2001). Nous montrons ici que l'inhibition de la cathepsine B, de manière dose-dépendante, va diminuer la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$  et IL-6 (Chapitre 2 : Fig. 2). Ceci laisse penser que le relargage de la cathepsine B pourrait être un mécanisme pro-inflammatoire commun en réponse aux PAMPs ou aux DAMPs.

## D) Implication des récepteurs purinergiques

### 1) Expression des récepteurs purinergiques après traitement

Nous montrons que les récepteurs purinergiques principalement exprimés dans notre modèle de macrophages humains sont P2X1, P2X4, P2X7, P2Y2 et P2Y6 (Chapitre 2 : Fig. 4). Ainsi notre étude va s'intéresser plus particulièrement à ces récepteurs suspectés de jouer un rôle dans l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Nous montrons ici pour la première fois que l'expression du récepteur P2X7 peut être induite spécifiquement par le MSU. En effet, le traitement par le MSU augmente l'expression de l'ARNm de P2X7R dans deux modèles cellulaires différents : notre modèle de macrophages différenciés par du GM-CSF ou de manière dose-dépendante dans un modèle de THP-1 différencié par du PMA (Chapitre 2 : Fig. 4). A l'inverse, Baron *et al.* (2014) montrent qu'en réponse aux nanoparticules l'expression de P2X7R de BMDM est diminuée. Bien qu'une induction de l'expression des ARN messagers ne signifie pas forcément une implication dans l'activité biologique, nous pensons que le récepteur P2X7 joue un rôle dans la réponse inflammatoire au MSU.

Les autres récepteurs purinergiques ne montrent pas de modification d'expression par le MSU dans les macrophages humains (Chapitre 2 : Fig. 4). Pourtant, il a été montré sur des BMDMs qu'en réponse aux nanoparticules, Nano-SiO<sub>2</sub> ou Nano-TiO<sub>2</sub>, l'expression de P2Y2 était induite et celle de P2Y6 était diminuée (Baron *et al.* 2014). A l'inverse Uratsuji *et al.* (2012) montrent une induction de P2Y6, et pas des autres P2YRs, en réponse au MSU dans un modèle de THP-1 différenciés et de kératinocytes humains, ainsi que l'implication de ce récepteur dans la libération d'IL-1 $\beta$ .

Nous pouvons noter que selon le modèle cellulaire, le stimulus activateur ou les auteurs, les résultats sur l'expression des récepteurs purinergiques sont variables. Des études plus poussées se focalisant sur l'expression protéique de ces récepteurs et leurs réponses aux activateurs de l'inflammasome NLRP3 permettraient de mieux comprendre le lien entre inflammation et signalisation purinergique chez l'homme.

## ***2) Implication du récepteur P2X7 dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires***

Le récepteur P2X7 a été mis en évidence depuis quelques années comme impliqué dans la libération d'IL-1 $\beta$  (Solle *et al.* 2001), mais le rôle exact de ce récepteur dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires chez l'homme est encore mal connu.

Nous observons que les antagonistes de P2X7R sont capables de diminuer significativement la libération d'IL-1 $\beta$  par des macrophages pré-activés en réponse au BzATP, à l'ATP $\gamma$ S ou au MSU. L'antagoniste sélectif de P2X7R, A74 inhibe également le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  induit par le traitement LPS+MSU (Chapitre 2 : Fig. 5). De plus, un siRNA ciblant spécifiquement le récepteur purinergique P2X7 diminue aussi la libération d'IL-1 $\beta$  (Chapitre 2 : Figs. 20 et 22). Ces résultats renforcent ainsi le lien entre P2X7R et l'activation de l'inflammasome NLRP3 mis en évidence dans plusieurs modèles (Niemi *et al.* 2011 ; Eleftheriadis *et al.* 2013; Baron *et al.* 2014). Pourtant Riteau *et al.* (2012) montrent qu'il n'y a pas de réduction significative de la libération d'IL-1 $\beta$  en réponse au MSU sur des BMDMs de souris P2X7R  $-/-$ , alors qu'un traitement par des antagonistes de P2X7R diminue la libération d'IL-1 $\beta$  par les BMDMs.

Ainsi, les résultats doivent être interprétés avec une certaine prudence, mais nous montrons ici à l'aide d'un antagoniste sélectif et d'un siRNA que P2X7R est impliqué dans la libération d'IL-1 $\beta$  en réponse au MSU dans un modèle de macrophages humains en culture primaire.

En revanche l'implication des récepteurs purinergiques dans la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires conventionnelles semble moins évidente.

Dans le premier chapitre, nous montrons que les antagonistes de P2X7R ne diminuent pas significativement la sécrétion d'IL-1 $\alpha$  et d'IL-6 après traitement par le BzATP ou l'ATP $\gamma$ S sur des macrophages pré-activés avec du LPS. A l'inverse, dans le deuxième chapitre, nous observons une diminution de leurs sécrétions lors du blocage de P2X7R par un antagoniste. En effet, après traitement par l'A74, la sécrétion d'IL-6 par les macrophages traités par LPS+MSU est significativement plus faible (Chapitre 2 : Fig. 24). De même la sécrétion d'IL-6, de TNF- $\alpha$ , de l'IFN- $\gamma$  (Chapitre 2 : Fig. 6D) ou d'IL-1 $\alpha$  (Chapitre 2 : Fig. 21) après traitement par LPS+MSU est plus faible lors de la transfection par un siP2X7R. Ceci met en évidence une différence d'implication du récepteur P2X7 dans la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires selon les stimuli pro-inflammatoires.

L'implication de P2X7R dans la sécrétion d'IL-1 $\alpha$  est encore mal connue mais il a été montré que la libération d'IL-1 $\alpha$  *via* le récepteur P2X7 suivait la même cinétique que celle de l'IL-1 $\beta$  (Ferrari *et al.* 2006). Nous observons qu'un siRNA ciblant spécifiquement P2X7R diminue la sécrétion d'IL-1 $\alpha$  (Chapitre 2 : Fig. 21). Ainsi nous montrons à l'aide de notre modèle de macrophages humains, que la sécrétion d'IL-1 $\alpha$  implique le récepteur P2X7 après stimulation par LPS+MSU. De plus, nous observons qu'excepté le clivage de leur précurseur, la transcription et la libération d'IL-1 $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  se fait selon une même cinétique.

Bien qu'il ait été montré que la sécrétion d'IL-6 était dépendante du récepteur P2X7 dans des fibroblastes humains (Solini *et al.* 1999), rien n'indique que la sécrétion de cette cytokine par des macrophages humains implique P2X7R. Comme pour l'IL-1 $\alpha$ , nous observons que l'expression et la sécrétion d'IL-6 sont induites par le LPS et le MSU, mais pas par l'ATP $\gamma$ S ou le BzATP (Chapitre 1 : Figs. 1 et 6). L'antagoniste A74 n'inhibe pas la sécrétion d'IL-6 induite par les agonistes de l'ATP mais inhibe celle induite par le MSU (Chapitre 2 : Fig. 24). De plus, un siRNA dirigé contre P2X7R va diminuer la sécrétion d'IL-6 en réponse au LPS+MSU (Chapitre 2 : Fig. 6).

Ainsi, à l'heure actuelle, il nous paraît difficile de décrire précisément le mécanisme de sécrétion de ces cytokines pro-inflammatoires. Nous pensons que l'implication de P2X7 dans la libération des cytokines pro-inflammatoires dépend du stimulus activateur. Les messagers pro-inflammatoires induits par du LPS, de l'ATP extracellulaire ou des particules cristallines ne semblent pas impliquer de la même façon les récepteurs purinergiques.

Nous pensons que les analogues de l'ATP ciblent le récepteur P2X7 à la surface du macrophage entraînant ainsi l'activation de l'inflammasome NLRP3 qui va cliver la pro-IL-1 $\beta$  indépendamment des autres cytokines pro-inflammatoires.

Le MSU produit un signal pro-inflammatoire fort qui va entraîner une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par le macrophage ainsi qu'une libération endogène d'ATP (Gombault *et al.* 2013). Ainsi les cytokines vont être libérées en réponse à la fixation de l'ATP endogène sur P2X7R mais également suite à l'activation d'autres récepteurs purinergiques ou même d'autres cascades de signalisation, comme par exemple par fixation de l'IL-1 $\beta$  sur son récepteur.

Il serait intéressant de voir si dans notre modèle cellulaire, nous observons bien une libération d'ATP extracellulaire suite à une stimulation par du MSU. De plus, à l'aide d'un siP2X7R nous pourrions voir si l'extinction de son expression influence la libération d'ATP endogène et donc la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

Même si l'utilisation de souris KO, de siRNA, ou d'antagonistes sur des modèles cellulaires donnent de précieuses informations, l'implication exacte d'un récepteur en condition physiopathologique reste difficile à mettre en évidence. Ainsi, des études complémentaires semblent nécessaires pour mieux comprendre ce mécanisme chez l'homme.

### ***3) Implication des autres récepteurs purinergiques dans la libération d'IL-1 $\beta$***

Bien qu'il soit très exprimé dans notre modèle de macrophages, aucune publication ne fait état d'une éventuelle implication du récepteur P2X1 dans l'activation de l'inflammasome NLRP3. Par ailleurs, nous n'observons pas de diminution de libération d'IL-1 $\beta$  dans les macrophages transfectés par un siRNA ciblant P2X1R traités par LPS+MSU (Chapitre 2 : Fig. 20). Ce résultat confirme que P2X1R, bien qu'il puisse s'associer à d'autres P2X pour former des hétérotrimères (Guo *et al.* 2007) ne semble pas jouer de rôle dans la libération d'IL-1 $\beta$ .

Uratsuji *et al.* (2012) ont observé une induction de l'expression du récepteur P2Y6 en réponse au MSU dans un modèle de THP-1 différenciés. Cependant, sur ce même modèle nous n'observons pas cette induction, pas plus que dans les macrophages humains (Chapitre 2 : Fig. 4).

De plus, il a été mis en évidence une implication de P2Y6R dans la libération d'IL-1 $\beta$  dans des modèles de THP-1 différenciés et de kératinocytes humains (Uratsuji *et al.* 2012). En revanche, Baron *et al.* (2014) n'observent pas de diminution significative de libération d'IL-1 $\beta$  avec un antagoniste de P2Y6, le MRS 2578, sur un modèle de BMDM traités par des nanoparticules.

Ainsi, face à ces divergences, l'implication de P2Y6 dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages humains reste encore mal connue et des expériences complémentaires doivent être menées en utilisant des siRNA ciblant P2Y6 ou un antagoniste sélectif.

Certains auteurs ont mis en évidence le récepteur P2X4 comme pouvant intervenir dans la libération d'IL-1 $\beta$  (Seil *et al.* 2010 ; Hung *et al.* 2013). Cette hypothèse est d'autant plus crédible que P2X4 et P2X7 peuvent s'associer pour former des hétérotrimères (Guo *et al.* 2007).

Hung *et al.* (2013) montrent une activation de l'inflammasome NLRP3 *via* P2X4 dans des cellules épithéliales. Seil *et al.* (2010) observent qu'un traitement par de l'ivermectine + ATP augmente la concentration intracellulaire en Ca<sup>2+</sup>, induit la formation d'un pore, diminue la concentration intracellulaire en K<sup>+</sup> et entraîne une libération d'IL-1 $\beta$ . Ainsi ils montrent chez des souris P2X7R -/- que P2X4R pourrait être le récepteur purinergique activateur de l'inflammasome NLRP3 en présence d'ivermectine. A l'inverse, il a été montré sur des BMDMs de souris P2X4R -/- que la libération d'IL-1 $\beta$  n'est pas significativement diminuée après traitement par le MSU (Riteau *et al.* 2012).

Cependant, nous n'observons pas de modification de la libération d'IL-1 $\beta$  en réponse au traitement LPS+MSU en présence d'ivermectine ou après transfection par un siRNA ciblant P2X4R (Chapitre 2 : Figs. 6 et 20). Ainsi, nos résultats montrent que le récepteur P2X4 ne semble pas impliqué dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans un modèle de macrophages humains.

Comme pour P2X4R, le rôle de P2Y2R dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 est sujet à débat. Il a été montré à l'aide de souris KO que P2Y2 n'était pas impliqué dans la libération d'IL-1 $\beta$  en réponse au MSU dans un modèle de BMDM (Riteau *et al.* 2012). Cependant le récepteur P2Y2 est induit par les nanoparticules (Baron *et al.* 2014).

En l'absence d'antagonistes spécifiques de P2Y2R, les auteurs utilisent des inhibiteurs de la voie de signalisation du récepteur, impliquant la protéine Gq et la PLC $\beta$ . Ainsi, un inhibiteur de PLC $\beta$  bloque l'augmentation de calcium intracellulaire induit par l'ATP dans les macrophages péritonéaux de souris sauvages comme chez les souris P2X7R -/- (Seil *et al.* 2010). De même, l'inhibition de la PLC $\beta$  dans un modèle de BMDMs traités par les nanoparticules entraîne une diminution de la libération d'IL-1 $\beta$  (Baron *et al.* 2014).

Ainsi, nous pouvons penser que l'activation de récepteurs purinergiques tels que P2Y2, couplés à la protéine Gq, intervient dans l'activation de l'inflammasome NLRP3. Mais contrairement aux siRNA qui sont très spécifiques, l'inhibition de la PLC $\beta$  n'affecte pas qu'un seul récepteur puisque PLC $\beta$  est impliquée dans la voie de signalisation de nombreux récepteurs purinergiques métabotropes (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 et P2Y11) (Lazarowski *et al.* 2009).

Dans notre modèle, nous observons une diminution de la libération des cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1 $\beta$  en réponse au traitement LPS+MSU dans des macrophages transfectés par un siP2Y2R (Chapitre 2 : Fig. 20, 22 et 23). Cependant, à cause d'écart-types trop importants, nous n'obtenons pas de significativité statistique permettant de montrer que la diminution d'IL-1 $\beta$  est due à ce récepteur. Ainsi, comme d'autres auteurs, nous pensons que P2Y2 pourrait être impliqué dans la libération d'IL-1 $\beta$  mais nous ne disposons pas d'éléments suffisants pour l'affirmer.

Nous montrons que P2X7R est impliqué dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 suite au traitement par les agonistes de l'ATP ou aux cristaux de MSU dans un modèle de macrophages humains. Ainsi P2X7R semble être le principal récepteur purinergique impliqué dans la libération d'IL-1 $\beta$ . Cependant selon la littérature et nos résultats préliminaires concernant P2Y2R, il existe probablement une implication d'autres récepteurs fixant l'ATP, l'ADP ou l'adénosine (Gombault *et al.* 2013 ; Baron *et al.* 2014).

Nous observons cependant que les résultats varient entre les modèles murins, les types cellulaires ou les différentes lignées. Ainsi, les mécanismes mis en jeu ne semblent pas forcément être les mêmes selon le modèle utilisé et nous pouvons penser que les résultats que nous obtenons pourraient être propres à notre modèle cellulaire humain.

## Conclusion générale

Le mécanisme exact d'activation de l'inflammasome NLRP3 chez l'homme reste mal connu et des différences semblent apparaître entre les différents modèles cellulaires et les substances activatrices utilisées. Dans ce contexte, il est difficile de comparer nos résultats obtenus sur des macrophages humains avec la littérature et des expériences complémentaires semblent nécessaires pour mieux comprendre cette cascade de signalisation.

Dans notre modèle, nous pensons que le traitement des macrophages par le MSU induit une libération d'ATP et de cytokines pro-inflammatoires. Cet environnement inflammatoire entraîne probablement l'activation d'autres voies de signalisation que celle de l'inflammasome NLRP3, ainsi l'interprétation des résultats est plus complexe.

Nous montrons cependant clairement dans ce travail une implication des récepteurs purinergiques, non seulement dans l'activation de l'inflammasome NLRP3, mais également dans la sécrétion d'autres cytokines comme IL-1 $\alpha$  et IL-6 indépendamment de la caspase-1. Ceci suggère un rôle important des récepteurs purinergiques dans les pathologies inflammatoires chez l'homme.

# **V) CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

L'ensemble de ces travaux montre une implication des récepteurs purinergiques dans l'activation de la voie de l'inflammasome NLRP3 dans des macrophages humains stimulés par de l'ATP $\gamma$ S, du BzATP ou des cristaux d'acide urique (MSU).

Au cours de ce travail, nous avons pu mettre en évidence les récepteurs impliqués dans l'immunité innée, tels que les TLRs, les NLRs ou les récepteurs purinergiques. Nous montrons également que le MSU ou des analogues de l'ATP (ATP $\gamma$ S ou BzATP) sont capables d'induire la libération d'IL-1 $\beta$  par des macrophages pré-activés par du LPS. Pour la première fois, nous montrons une induction de l'expression du récepteur P2X7 en réponse au MSU sur deux modèles cellulaires. Nous confirmons l'implication de P2X7R dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 en diminuant la libération d'IL-1 $\beta$  par les macrophages activés en présence d'antagonistes de P2X7R ou d'un siP2X7R. De plus, nous mettons en évidence le rôle capital de la caspase-1 et de la cathepsine B dans le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  en réponse au MSU. Enfin, nous avons mis en évidence l'implication des récepteurs purinergiques dans l'initiation du processus inflammatoire. En effet, alors que le siP2X4R ne modifie pas la libération de cytokines pro-inflammatoires en réponse au MSU, les siP2X7R et siP2Y2R diminuent la libération de ces cytokines dont IL-1 $\beta$ , d'IL-1 $\alpha$  et IL-6. Ainsi, les récepteurs purinergiques P2X7R et P2Y2 semblent être impliqués dans la libération des cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages. Cependant, des expérimentations complémentaires sont nécessaires.

Dans un premier temps, il paraît important de confirmer nos résultats sur d'autres modèles cellulaires humains, comme des lignées cellulaires ou des macrophages issus de prélèvements pathologiques. En effet, nos conclusions ne sont basées que sur un seul modèle cellulaire et sont, pour certaines, discordantes avec la littérature. Il semble donc important de poursuivre le travail dans cette direction.

Nous avons mis en évidence une implication possible du récepteur P2Y2 dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 par des cristaux de MSU, alors que les résultats sur des modèles murins P2Y2R  $-/-$  étaient contradictoires (Riteau *et al.* 2012). Il serait donc intéressant de poursuivre les expérimentations dans ce sens. En l'absence d'antagonistes spécifiques du récepteur P2Y2, les expérimentations à l'aide de siRNA transfectés par électroporation pourraient être continuées.

Afin de mettre en évidence le rôle des macrophages au niveau tissulaire, des co-cultures avec d'autres types cellulaires sont à envisager. Ainsi, une co-culture entre macrophages et fibroblastes permettrait de voir si la libération d'IL-1 $\beta$  par les macrophages affecte l'activation des fibroblastes environnants et donc leur rôle dans le développement d'une fibrose. Les résultats préliminaires de notre équipe montrent qu'un traitement par IL-1 $\beta$  recombinante sur une lignée de fibroblastes hépatiques (LX-2) augmente l'expression des métalloprotéinases MMP-1, MMP-3, MMP-9 en ARNm, comme en protéine. Ce traitement entraîne également une diminution de l'expression protéique de la tissue inhibitors of metalloproteinases-2 et -3 (TIMP-2 et -3), l'alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) et des collagènes de type I et IV. De plus, ses effets sont réduits lors d'un prétraitement par l'IL-1Ra (Robert S, Gicquel T *et al*, en cours de publication). Cela suggère un rôle important de la communication entre les macrophages et les fibroblastes pour l'équilibre de la balance MMPs/TIMPs et la production de collagène dans le contrôle de la fibrose hépatique.

Nous souhaiterions également mettre en évidence un lien entre le stress du réticulum endoplasmique et l'activation de l'inflammasome NLRP3. En effet, la protéine NLRP3 à l'état inactif est localisée proche du réticulum endoplasmique (Zhou *et al.* 2011). Il a également été montré que le flux calcique associé à un stress du RE joue un rôle dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Murakami *et al.* 2012 ; Lee *et al.* 2012). Cependant à l'heure actuelle le lien NLRP3/Stress du RE reste très mal connu. Un projet ANR a été déposé sur ce thème en lien avec l'INSERM U1065 (Nice).

Une autre perspective serait de mesurer la sécrétion d'ATP endogène par notre modèle de macrophages humains traités par le MSU. Il paraît bien établi que l'ATP active l'inflammasome NLRP3 *via* P2X7R et entraîne la libération d'IL-1 $\beta$ . De même, les ROS, les flux ioniques ou un dysfonctionnement mitochondrial semblent pouvoir affecter l'activation de l'inflammasome NLRP3. Ainsi, l'ATP, en tant que signal de danger ne pourrait-il pas être le dénominateur commun à ces différents modèles d'activation ?

Cependant le schéma n'est sûrement pas aussi simple et dépend des types cellulaires. De plus, l'ATP n'est pas la seule molécule à pouvoir jouer ce rôle et d'autres agonistes purinergiques pourraient également être impliqués. L'ATP serait ainsi en même temps activateur des récepteurs P2, mais également précurseur de l'ADP, l'AMP et l'adénosine qui joueraient aussi un rôle dans cette activation (Gombault *et al.* 2013).

Ces résultats nous laisse penser que bloquer le récepteur P2X7 représente une perspective de traitement des maladies inflammatoires chez l'homme, notamment celles où l'inflammasome NLRP3 est impliqué comme la goutte, la polyarthrite rhumatoïde, la fibrose pulmonaire ou la maladie de Crohn (Martinon *et al.* 2006 ; Al-Shukaili *et al.* 2008 ; Villani *et al.* 2009 ; Riteau *et al.* 2012).

Notre étude pourrait être poursuivie sur des macrophages issus de prélèvement de patients souffrant de pathologies inflammatoires. Nous pourrions par exemple mesurer l'expression des récepteurs purinergiques des macrophages de personnes atteintes et corrélés ces résultats à la clinique des malades.

Ainsi, dans le cadre du prochain contrat de l'unité INSERM, une collaboration avec le service de gastro-entérologie du CHU de Rennes se met en place. Nous pourrions avoir accès à des prélèvements de patients touchés par la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique et évaluer l'expression des cytokines pro-inflammatoires, de l'inflammasome NLRP3 et des récepteurs purinergiques dans ces tissus, en comparaison avec des prélèvements de sujet sains.

L'implication de l'inflammasome NLRP3 dans la maladie de Crohn est connue (Villani *et al.* 2009). Cependant le rôle des récepteurs purinergiques dans cette pathologie a été très peu étudié. Ainsi, nous pensons qu'il serait intéressant de chercher dans cette direction afin de mieux comprendre le rôle des P2R dans les pathologies inflammatoires.

En bloquant le récepteur P2X7, l'antagoniste s'opposerait ainsi aux événements précoces de la cascade inflammatoire (Baroja-Mazo et Pelegrin, 2012). Ces antagonistes pourraient être une alternative thérapeutique dans les pathologies inflammatoires aux côtés des anti-inflammatoires classiques et des biothérapies comme l'anakinra ou les anticorps dirigés contre les cytokines pro-inflammatoires ou leur récepteurs tels que le tocilizumab (IL-6R), canakinumab (IL-1), certolizumab pegol (IL-1), infliximab (TNF- $\alpha$ ) ou le golimumab (TNF- $\alpha$ ).

Initialement, il existait un consensus sur le fait que P2X7R soit le seul récepteur purinergique des macrophages entraînant la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , faisant de celui-ci une cible potentielle de traitement anti-inflammatoire (Bartlett *et al.* 2014). C'est pourquoi de nombreux antagonistes de P2X7R ont été développés et ont montré leur efficacité sur des modèles *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal. Cependant, les premiers résultats d'utilisation d'antagonistes de P2X7R chez l'homme dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde ne semblent pas concluants (Keystone *et al.* 2012 ; Stock *et al.* 2012). Cependant d'autres essais sont en cours et ces molécules pourraient être développées dans d'autres indications comme la maladie de Crohn par exemple.

# **VI) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## A

Abbracchio MP, Burnstock G (1994) Purinoceptors : are there families of P2X and P2Y purinoceptors ? *Pharmacol. Ther.* **64**(3):445-75.

Aga M, Johnson CJ, Hart AP, Guadarrama AG, Suresh M, Svaren J, Bertics PJ, Darien BJ (2002) Modulation of monocyte signaling and pore formation in response to agonists of the nucleotide receptor P2X(7). *J. Leukoc. Biol.* **72**: 222-32.

Aganna E, Martinon F, Hawkins PN, Ross JB, Swan DC, Booth DR, Lachmann HJ, Bybee A, Gaudet R, Woo P, Feighery C, Cotter FE, Thome M, Hitman GA, Tschopp J, McDermott MF (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**(9):2445-52.

Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH (2012) Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood.* **119**:651–665.

Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J (2004) NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity.* **20**: 319-25.

Akira S, Takeda K, Kaisho T (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* **2**(8): 675-80.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* **124**(4): 783-801.

Al-Shukaili A, Al-Kaabi J, Hassan B (2008) A comparative study of interleukin-1beta production and p2x7 expression after ATP stimulation by peripheral blood mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis patients and normal healthy controls. *Inflammation.* **31**(2):84-90.

Allam R, Darisipudi MN, Rupanagudi KV, Lichtnekert J, Tschopp J, Anders HJ (2011) Cutting edge: Cyclic polypeptide and aminoglycoside antibiotics trigger IL-1b secretion by activating the NLRP3 inflammasome. *J. Immunol.* **186**: 2714-2718.

Amano SU, Cohen JL, Vangala P, Tencerova M, Nicoloso SM, Yawe JC, Shen Y, Czech MP, Aouadi M (2014) Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metab.* **19**(1):162-71.

Amstrup J, Novak I (2003) P2X7 receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca<sup>2+</sup> influx. *Biochem J.* **374**(Pt 1):51-61.

Andrei C, Margiocco P, Poggi A, Lotti LV, Torrisi MR, Rubartelli A (2004) Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**(26):9745-50.

Anselmi F, Hernandez VH, Crispino G, Seydel A, Ortolano S, Roper SD, Kessaris N, Richardson W, Rickheit G, Filippov MA, Monyer H, Mammano F (2008) ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca<sup>2+</sup> signals across the inner ear. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 18770–18775.

Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G (2013) Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat. Rev. Cancer*. **13**(12):842-57.

Arend WP, Gabay C (2000) Physiologic role of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Res.* **2**: 245–248.

Arulkumaran N, Unwin RJ, Tam FW (2011) A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opin. Investig. Drugs* **20** (7): 897-915.

Asatryan L, Popova M, Perkins D, Trudell JR, Alkana RL, Davies DL (2010) Ivermectin antagonizes ethanol inhibition in purinergic P2X4 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **334**(3):720-8.

Ataman-Onal Y, Munier S, Ganée A, Terrat C, Durand PY, Battail N, Martinon F, Le Grand R, Charles MH, Delair T, Verrier B (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**(2):175-85.

## B

Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W, Zeng-Brouwers J, Eickelberg O, Young M. F, Bruckner P, Pfeilschifter J, Schaefer RM, Gröne HJ, Schaefer L (2009) Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *J. Biol. Chem.* **284**: 24035–24048.

Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, Kelmanson I, Shagin D, Nazarenko S, Geraymovych E, Litvin O, Tiunova A, Born TL, Usman N, Staroverov D, Lukyanov S, Panchin Y (2004) The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics*. **83**(4):706-16

Barochia A, Solomon S, Cui X, Natanson C, Eichacker PQ (2011) Eritoran tetrasodium (E5564) treatment for sepsis: review of preclinical and clinical studies. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **7**(4): 479-94.

Baroja-Mazo A, Pelegrin P (2012) Modulating P2X7 Receptor Signaling during Rheumatoid Arthritis: New Therapeutic Approaches for Bisphosphonates. *J. Osteoporos.* **2012**:408242.

Baron L, Gombault A, Manoussa F, Villeret B, Savigny F, Guillou N, Lagente V, Rassendren F, Riteau N, Couillin I (2014) The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine via receptor signaling and adenosine cellular uptake (*en revision*).

Bartlett R, Stokes L, Sluyter R (2014) The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease. *Pharmacol. Rev.* **66**(3): 638-75.

Bauernfeind F, Ablasser A, Bartok E, Kim S, Schmid-Burgk J, Cavlar T, Hornung V (2011a) Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cell Mol. Life Sci.* **68**(5):765-83.

Bauernfeind F, Bartok E, Rieger A, Franchi L, Núñez G, Hornung V (2011b) Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J. Immunol.* **187**(2):613-7.

Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V, Latz E (2009) Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol.* **183**(2): 787-91.

Benoit M, Desnues B, Mege JL (2008) Macrophage polarization in bacterial infections. *J. Immunol.* **181**(6):3733-9.

Beutler B, Rietschel ET (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Rev. Immunol.* **3**: 169–176.

Boassa D, Ambrosi C, Qiu F, Dahl G, Gaietta G, Sosinsky G (2007) Pannexin 1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **282**: 31733–31743.

Bobanovic LK, Royle SJ, Murrell-Lagnado RD (2002) P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *J. Neurosci.* **22**(12):4814-24.

Boeynaems JM, Communi D, Gonzalez NS, Robaye B (2005) Overview of the P2 receptors. *Semin. Thromb. Hemost.* **31**(2): 139-49.

Bonizzi G, Karin M (2004) The two NFkB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**: 280-288.

Boué-Grabot E, Akimenko MA, Séguéla P (2000) Unique functional properties of a sensory neuronal P2X ATP-gated channel from zebrafish. *J. Neurochem.* **75**(4):1600-7.

Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* **112**(2): 358-404.

Bradford MD, Soltoff SP (2002) P2X7 receptors activate protein kinase D and p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) downstream of protein kinase C. *Biochem J.* **366**(Pt 3):745-55.

Brouckaert P, Libert C, Everaerd B, Takahashi N, Cauwels A, Fiers W (1993) Tumor necrosis factor, its receptors and the connection with interleukin 1 and interleukin 6. *Immunobiology* **187**:317-329.

Buell G, Lewis C, Collo G, North RA, Surprenant A (1996) An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO J.* **15**(1):55-62.

Burnstock G, Knight GE (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol.* **240**: 31–304.

Burnstock G (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol. Life Sci.* **64**(12):1471-83.

Burnstock G, Knight GE, Greig AVH (2012) Purinergic Signaling in Healthy and Diseased Skin. *J. Invest. Dermatol.* **132**: 526–546.

Burnstock G (2014) Purinergic signalling in the urinary tract in health and disease. *Purinergic Signal.* **10**(1): 103-55.

## C

Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Sadler JJ, Colegio OR, Tephly LA, Carter AB, Rothman PB, Flavell RA, Sutterwala FS (2008) The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**: 9035–9040.

Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC (1988) Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett.* **232**:347–350.

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

Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA (1992) *Science.* **256** (5053): 97-100.

Chen CJ, Shi Y, Hearn A, Fitzgerald K, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL (2006) MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *J. Clin. Invest.* **116**: 2262–2271.

Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL (2007) Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat. Med.* **13**: 851–856.

Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, Egerton J, Murfin M, Richardson J, Peck WL, Grahames CB, Casula MA, Yiangou Y, Birch R, Anand P, Buell GN (2005) Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain.* **114**: 386–396.

Cookson BT, Brennan MA (2001) Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol.* **9**:113–114.

Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura AL, Persechini PM, Ojcius DM (2007) ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J. Biol. Chem.* **282**: 2871–2879.

## D

D'Hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, Vinken M, De Vuyst E, De Bock M, Wang N, Rogiers V, Leybaert L, Himpens B, Bultynck G (2011) Pannexin channels in ATP release and beyond: an unexpected rendez vous at the endoplasmic reticulum. *Cell. Signal.* **23**: 305–316.

Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH (2010) The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One.* **5**: e8668.

David Dong ZM, Aplin AC, Nicosia RF (2009) Regulation of angiogenesis by macrophages, dendritic cells, and circulating myelomonocytic cells. *Curr. Pharm. Des.* **15**(4):365-79.

De Rivero Vaccari JP, Bastien D, Yurcisin G, Pineau I, Dietrich WD, De Koninck Y, Keane RW, Lacroix S (2012) P2X4 receptors influence inflammasome activation after spinal cord injury. *J. Neurosci.* **32**: 3058–3066.

Del Rey A, Renigunta V, Dalpke AH, Leipziger J, Matos JE, Robaye B, Zuzarte M, Kavelaars A, Hanley PJ (2006) Knock-out mice reveal the contributions of P2Y and P2X receptors to nucleotide-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in macrophages. *J. Biol. Chem.* **281**(46): 35147–55.

Denes A, Lopez-Castejon G, Brough D (2012) Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg ? *Cell Death Dis.* **3**: e338.

Di Virgilio F (2007) Liaisons dangereuses: P2X(7) and the Inflammasome. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**: 465-472.

Dinarello CA (1996a) Thermoregulation and the pathogenesis of fever. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **10**(2): 433-49.

Dinarello CA (1996b) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* **87**(6):2095-147.

Dinarello CA (2000) The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N. Engl. J. Med.* **343**: 732–734.

Dinarello CA (2002) The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* **20**: S1–S13.

Dinarello CA (2007) A signal for the caspase-1 inflammasome free of TLR. *Immunity.* **26**(4): 383-5.

Dinarello CA (2010) IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Eur. J. Immunol.* **40**(3):599-606.

Dinarello CA (2011) Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* **117**:3720–32.

Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J (2008) Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science.* **320**: 674–677.

## E

Eder C (2009) Mechanisms of interleukin-1beta release. *Immunobiology.* **214**(7):543-53.

Eigenbrod T, Park JH, Harder J, Iwakura Y, Núñez G (2008) Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 released from dying cells. *J Immunol.* **181**: 8194–8198.

Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA (2008) Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature.* **453**: 1122–1126.

Eleftheriadis T, Pissas G, Karioti A, Antoniadis G, Golfinopoulos S, Liakopoulos V, Mamara A, Speletas M, Koukoulis G, Stefanidis I (2013) Uric acid induces caspase-1 activation, IL-1 $\beta$  secretion and P2X7 receptor dependent proliferation in primary human lymphocytes *HIPPOKRATIA.* **17**, 2:141-145.

Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N, Ravichandran KS (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature.* **461**(7261):282-6.

Espinassous Q, Garcia-de-Paco E, Garcia-Verdugo I, Synguelakis M, von Aulock S, Sallenave JM, McKenzie AN, Kanellopoulos J (2009) IL-33 enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production from mouse macrophages by regulating lipopolysaccharide receptor complex. *J. Immunol.* **183**:1446–1455.

## F

Fearon DT, Locksley RM (1996) The instructive role of innate immunity and the acquired immune response. *Science.* **272**(5258):50-3.

Feldmann M, Brennan FM, Maini RN (1996) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 397-440.

Feldmeyer L, Keller M, Niklaus G, Hohl D, Werner S, Beer HD (2007) The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Curr. Biol.* **17**(13):1140-5.

Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Melchiorri L, Baricordi OR, Di Virgilio F (1997) Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J. Immunol.* **159**(3):1451-8.

Ferrari D, Stroh C, Schulze-Osthoff K (1999) P2X7/P2Z purinoreceptor-mediated activation of transcription factor NFAT in microglial cells. *J. Biol. Chem.* **274**(19):13205-10.

Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F (2006) The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J. Immunol.* **176**: 3877-83.

Fettelschoss A, Kistowska M, LeibundGut-Landmann S, Dietmar Beera H, Johansen P, Senti G, Contassot E, Bachmann M, French L, Oxenius A, Kündig T (2011) Inflammasome activation and IL-1b target IL-1a for secretion as opposed to surface expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**:18055–60.

Fortes FSA, Pecora IL, Persechini PM, Hurtado S, Costa V, Coutinho-Silva R, Braga MB, Silva-Filho FC, Bisaggio RC, De Farias FP, Scemes E, De Carvalho AC, Goldenberg RC (2004) Modulation of intercellular communication in macrophages: possible interactions between GAP junctions and P2 receptors. *J. Cell Sci.* **117**: 4717–4726.

## G

Garcia-Guzman M, Soto F, Gomez-Hernandez JM, Lund PE, Stühmer W (1997) Characterization of recombinant human P2X4 receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue. *Mol. Pharmacol.* **51**(1):109-18.

Gargett CE, Cornish JE, Wiley JS (1997) ATP, a partial agonist for the P2Z receptor of human lymphocytes. *Br. J. Pharmacol.* **122**(5):911-7.

Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A (2013) The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* **39**(6):1003-18.

Gasse P, Mary C, Guenon I, Noulin N, Charron S, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Akira S, Quesniaux VF, Lagente V, Ryffel B, Couillin I (2007) IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* **117**: 3786-99.

Gasse P, Riteau N, Charron S, Girre S, Fick L, Pétrilli V, Tschopp J, Lagente V, Quesniaux VF, Ryffel B, Couillin I (2009) Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**: 903-13.

Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. **19**(1):71-82.

Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford A (2006) Pharmacology of P2X channels. *Eur. J. Physiol.* **452**: 513–537.

Goldbach-Mansky R, Dailey NJ, Canna SW, Gelabert A, Jones J, Rubin BI, Kim HJ, Brewer C, Zalewski C, Wiggs E, Hill S, Turner ML, Karp BI, Akseptijevich I, Pucino F, Penzak SR, Haverkamp MH, Stein L, Adams BS, Moore TL, Fuhlbrigge RC, Shaham B, Jarvis JN, O'Neil K, Vehe RK, Beitz LO, Gardner G, Hannan WP, Warren RW, Horn W, Cole JL, Paul SM, Hawkins PN, Pham TH, Snyder C, Wesley RA, Hoffmann SC, Holland SM, Butman JA, Kastner DL (2006) Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1beta inhibition. *N. Engl. J. Med.* **355**(6):581-92.

Gombault A, Baron L, Couillin I (2013) ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Front. Immunol.* **3**:414.

Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**: 953–964.

Gordon S, Martinez FO (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. **32**(5):593-604.

Gross O, Yazdi AS, Thomas CJ, Masin M, Heinz LX, Guarda G, Quadroni M, Drexler SK, Tschopp J (2012) Inflammasome activators induce interleukin-1a secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity*. **36**: 388–400.

Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, Hayashi N, Higashino K, Okamura H, Nakanishi K, Kurimoto M, Tanimoto T, Flavell RA, Sato V, Harding MW, Livingston DJ, Su MS (1997) Activation of interferon- $\gamma$  inducing factor mediated by interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Science*. **275**:206–209.

Guarda G, Zenger M, Yazdi AS, Schroder K, Ferrero I, Menu P, Tardivel A, Mattmann C, Tschopp J (2011) Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *J. Immunol.* **186**(4):2529-34.

Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD (2007) Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol. Pharmacol.* **72**(6):1447-56.

## H

Halban PA, Irminger JC (1994) Sorting and processing of secretory proteins. *Biochem. J.* **299**: 1–18.

Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT (2008) The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat. Immunol.* **9**: 857–865.

Hawkins PN, Lachmann HJ, Aganna E, McDermott MF (2004) Spectrum of clinical features in Muckle-Wells syndrome and response to anakinra. *Arthritis Rheum.* **50**(2):607-12.

Hazlett LD, McClellan SA, Barrett RP, Huang X, Zhang Y, Wu M, van Rooijen N, Szliter E (2010) IL-33 shifts macrophage polarization, promoting resistance against *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**(3):1524-32.

Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic MT, Hsieh G, Zhu CZ, Mikusa JP, Hernandez G, Zhong C, Gauvin DM, Chandran P, Harris R, Medrano AP, Carroll W, Marsh K, Sullivan JP, Faltynek CR, Jarvis MF (2006) A-740003 [N-(1-[[[(cyanoimino)(5-quinolinylamino)methyl]amino]-2,2-dimethylpropyl]-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**: 1376-85.

Hogquist KA, Nett MA, Unanue ER, Chaplin DD (1991) Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**(19):8485-9.

Horii Y, Muraguchi A, Suematsu S, Matsuda T, Yoshizaki K, Hirano T, Kishimoto T (1988) Regulation of BSF-2/IL-6 production by human mononuclear cells. Macrophage dependent synthesis of BSF-2/IL-6 by T cells. *J. Immunol.* **141**:1529–1535.

Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E (2008) Silica crystals and aluminum salts activate the NLRP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* **9**: 847–856.

Hung SC, Choi CH, Said-Sadier N, Johnson L, Atanasova KR, Sellami H, Yilmaz Ö, Ojcius DM (2013) P2X4 assembles with P2X7 and pannexin-1 in gingival epithelial cells and modulates ATP-induced reactive oxygen species production and inflammasome activation. *PLoS One.* **8**(7):e70210.

## I

Iglesias, R, Locovei S, Roque A, Alberto AP, Dahl G, Spray DC, Scemes E (2008) P2X7 receptor-Pannexin-1 complex: pharmacology and signaling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295**: C752–C760.

Imler JL, Hoffmann JA (2001) Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol.* **11**(7):304-11.

Iyer SS, Pulsikens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK, Eisenbarth SC, Florquin S, Flavell RA, Leemans JC, Sutterwala FS (2009) Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**(48):20388-93.

Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Willart MA, Muskens F, Hoogsteden HC, Luttmann W, Ferrari D, Di Virgilio F, Virchow JC Jr, Lambrecht BN (2007) Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat. Med.* **13**(8):913-9.

## J

Jacques-Silva MC, Rodnight R, Lenz G, Liao Z, Kong Q, Tran M, Kang Y, Gonzalez FA, Weisman GA, Neary JT (2004) P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* **141**(7):1106-17.

Janeway CA Jr, Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* **20**: 197-216.

Jarvis MF, Khakh BS (2009) ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology.* **56**(1):208-15.

Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, MacDonald AS, Allen JE (2011) Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science.* **332**(6035):1284-8.

Jelínková I, Vávra V, Jindrichová M, Obsil T, Zemkova HW, Zemkova H, Stojilkovic SS (2008) Identification of P2X(4) receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. *Pflugers Arch.* **456**(5):939-50.

Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, Farias A, Qin F, Alnemri ES (2012) Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J. Biol. Chem.* **287**(43):36617-22.

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

## K

Kahlenberg JM, Dubyak GR (2004) Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor mediated K<sup>+</sup> release. *Am J Physiol Cell Physiol.* **286**: 1100-1108.

Kanneganti TD, Lamkanfi M, Kim YG, Chen G, Park JH, Franchi L, Vandenabeele P, Núñez G (2007) Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity.* **26**: 433-43.

Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* **11**: 115–22.

Kestra AM, Bäumlér AJ (2014) Detection of enteric pathogens by the nodosome. *Trends Immunol.* **35**(3): 123-30.

Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer HD (2008) Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell.* **132**: 818–831.

- Keystone EC, Wang MM, Layton M, Hollis S, McInnes IB (2012) Clinical evaluation of the efficacy of the P2X7 purinergic receptor antagonist AZD9056 on the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in patients with active disease despite treatment with methotrexate or sulphasalazine. *Ann Rheum Dis.* **71**(10):1630-5.
- Khakh BS, Bao XR, Labarca C, Lester HA (1999) Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat. Neurosci.* **2**(4):322-30.
- Khakh BS, North RA (2006) P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* **442**(7102):527-32.
- Khare S, Dorfleutner A, Bryan NB, Yun C, Radian AD, de Almeida L, Rojanasakul Y, Stehlik C (2012) An NLRP7-containing inflammasome mediates recognition of microbial lipopeptides in human macrophages. *Immunity* **36**: 464–476.
- Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, Oh SC, Enkhbayar P, Matsushima N, Lee H, Yoo OJ, Lee JO (2007) Crystal structure of the TLR4–MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell.* **130**: 906–917.
- Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J.* **20**(22):6347-58.
- Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway CA Jr, Medzhitov R, Flavell RA (2002) IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell.* **110**(2):191-202.
- Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K (1990) Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:5548–52.
- Kobe B, Kajava AV (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin. Struct. Biol.* **11**(6): 725-32.
- Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **47**(4):333-43.
- Kruse R, Säve S, Persson K (2012) Adenosine triphosphate induced P2Y2 receptor activation induces proinflammatory cytokine release in uroepithelial cells. *J. Urol.* **188**(6):2419-25.
- Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, Pitman N, Mirchandani A, Rana B, van Rooijen N, Shepherd M, McSharry C, McInnes IB, Xu D, Liew FY (2009) IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J. Immunol.* **183**(10): 6469.

## L

- la Sala A, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, Girolomoni G (2003) Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J. Leukocyte Biol.* **73**: 339–343.
- Laing KJ, Secombes CJ (2004) Chemokines. *Dev Comp Immunol.* **28**(5):443-60.
- Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, Misaghi S, Fedorova A, Deshayes K, Lee WP, Hoffman HM, Dixit VM (2009) Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J. Cell Biol.* **187**(1):61-70.
- Landsman L, Jung S (2007) Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *J. Immunol.* **179**: 3488–3494.
- Lazarowski ER, Boucher RC (2009) Purinergic receptors in airway epithelia. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**(3):262-7.
- Lee GS, Subramanian N, Kim AI, Aksentijevich I, Goldbach-Mansky R, Sacks DB, Germain RN, Kastner DL, Chae JJ (2012) The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca<sup>2+</sup> and cAMP. *Nature.* **492**(7427):123-7.
- Lemaire R, Huet G, Zerimech F, Grard G, Fontaine C, Duquesnoy B, Flipo RM (1997) Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells. *Br. J. Rheumatol.* **36**:735–743.
- Lenertz LY, Gavala ML, Hill LM, Bertics PJ (2009) Cell signaling via the P2X(7) nucleotide receptor: linkage to ROS production, gene transcription, and receptor trafficking. *Purinergic Signal.* **5**(2):175-87.
- Li Q, Verma IM (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**(10): 725-34.
- Lightfield KL, Persson J, Brubaker SW, Witte CE, von Moltke J, Dunipace EA, Henry T, Sun YH, Cado D, Dietrich WF, Monack DM, Tsois RM, Vance RE (2008) Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy terminal domain of flagellin. *Nat. Immunol.* **9**: 1171–8.
- Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A, Rose DM, Terkeltaub R (2005) Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum* **52**: 2936–2946.
- Locati M, Mantovani A, Sica A (2013) Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Adv. Immunol.* **120**:163-84.
- Locovei S, Scemes E, Qiu F, Spray DC, Dahl G (2007) Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X7 receptor death complex. *FEBS Lett.* **581**:483–488.

Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K (1999) The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity*. **10**(6): 629-39.

Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. **42**(2): 145-51.

## M

MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A (2001) Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity*. **15**: 825-35

Magalhaes JG, Sorbara MT, Girardin SE, Philpott DJ (2011) What is new with Nods? *Curr. Opin. Immunol.* **23**(1): 29-34.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**(12):677-86.

Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**: 228-32.

Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M (2008) Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* **13**:453-61.

Martinez FO, Helming L, Gordon S (2009) Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* **27**:451-83.

Martinez FO, Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation : time for reassessment. *F1000 Prime Rep.* **6**: 13.

Martinon F, Burns K, Tschopp J (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* **10**: 417-26.

Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature.* **440**: 237-41.

Martinon F, Mayor A, Tschopp J (2009) The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* **27**: 229-65.

Martinon F (2010a) Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur. J. Immunol.* **40**(3):616-9.

Martinon F (2010b) Mechanisms of uric acid crystal-mediated autoinflammation. *Immunol. Rev.* **233**(1):218-32.

- Masters SL, Simon A, Akseptijevich I, Kastner DL (2009) Horror autoinflammaticus : the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. *Annu. Rev. Immunol.* **27**:621-68.
- McCullough KC, Basta S, Knötig S, Gerber H, Schaffner R, Kim YB, Saalmüller A, Summerfield A (1999) Intermediate stages in monocyte-macrophage differentiation modulate phenotype and susceptibility to virus infection. *Immunology.* **2**:203-12.
- McGeough MD, Pena CA, Mueller JL, Pociask DA, Broderick L, Hoffman HM, Brydges SD (2012) Cutting edge: IL-6 is a marker of inflammation with no direct role in inflammasome-mediated mouse models. *J. Immunol.* **189**: 2707-11.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science.* **296**(5566):298-300.
- Menu P, Vince JE (2011) The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly *Clin. Exp. Immunol.* **166**(1):1-15.
- Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T, Akira S (2013) Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* **14**(5):454-60.
- Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**: 958–969.
- Moore CB, Bergstralh DT, Duncan JA, Lei Y, Morrison TE, Zimmermann AG, Accavitti-Loper MA, Madden VJ, Sun L, Ye Z, Lich JD, Heise MT, Chen Z, Ting JP (2008) NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature.* **451**: 573–7.
- Mort JS, Recklies AD, Poole AR (1984) Extracellular presence of the lysosomal proteinase cathepsin B in rheumatoid synovium and its activity at neutral pH. *Arthritis Rheum.* **27**:509–515.
- Moussion C, Ortega N, Girard JP (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.
- Murakami T, Ockinger J, Yu J, Byles V, McColl A, Hofer AM, Horng T (2012) Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**(28):11282-7.
- Murray PJ, Wynn TA (2011a) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **11**(11):723-37.
- Murray PJ, Wynn TA (2011b) Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J. Leukoc. Biol.* **89**(4):557-63.
- Murphy J, Summer R, Wilson AA, Kotton DN, Fine A (2008) The prolonged life-span of alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **38**: 380–385.

## N

Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP, Fitzgerald KA, Ryter SW, Choi AM (2011) Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* **12**(3):222-30.

Nelson DW, Gregg RJ, Kort ME, Perez-Medrano A, Voight EA, Wang Y, Grayson G, Namovic MT, Donnelly-Roberts DL, Niforatos W, Honore P, Jarvis MF, Faltynek CR, Carroll WA (2006) Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists. *J. Med. Chem.* **49**: 3659-66.

Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, Van Der Meer JW, Kullberg BJ (2002) The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J. Infect. Dis.* **185**(10):1483-9.

Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, van de Veerdonk FL, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I, Funk CJ, Mason RJ, Kullberg BJ, Rubartelli A, van der Meer JW, Dinarello CA (2009) Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood.* **113**: 2324-35.

Newman ZL, Leppla SH, Moayeri M (2009) CA-074Me protection against anthrax lethal toxin. *Infect. Immun.* **77**(10):4327-36.

Ng G, Sharma K, Ward SM, Desrosiers MD, Stephens LA, Schoel WM, Li T, Lowell CA, Ling CC, Amrein MW, Shi Y (2008) Receptor-independent, direct membrane binding leads to cell-surface lipid sorting and Syk kinase activation in dendritic cells. *Immunity.* **29**(5):807-18.

Nicke A, Bäumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G (1998) P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* **17**(11):3016-28.

Nicke A, Kuan YH, Masin M, Rettinger J, Marquez-Klaka B, Bender O, Górecki DC, Murrell-Lagnado RD, Soto F (2009) A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. *J. Biol. Chem.* **284**(38):25813-22.

Nickel W, Rabouille C (2009) Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**:148–155.

Nickerson K, Sisk TJ, Inohara N, Yee CS, Kennell J, Cho MC, Yannie PJ, Nunez G, Chang CH (2001) Dendritic cell-specific MHC Class II transactivator contains a caspase recruitment domain that confers potent transactivation activity. *J. Biol. Chem.* **276**: 19089–93.

Niemi K, Teirilä L, Lappalainen J, Rajamäki K, Baumann MH, Öörni K, Wolff H, Kovanen PT, Matikainen S, Eklund KK (2011) Serum Amyloid A Activates the NLRP3 Inflammasome via P2X7 Receptor and a Cathepsin B-Sensitive Pathway. *J. Immunol.* **186**(11):6119-28.

Nörenberg W, Sobottka H, Hempel C, Plötz T, Fischer W, Schmalzing G, Schaefer M (2012) Positive allosteric modulation by ivermectin of human but not murine P2X7 receptors. *Br. J. Pharmacol.* **167**(1):48-66.

North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* **82**(4): 1013–67.

## O

Orellana JA, Velasquez S, Williams DW, Saez JC, Berman JW, Eugenin EA (2013) Pannexin 1 hemichannels are critical for HIV infection of human primary CD4+ T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* **94**: 399–407.

Osaki T, Hashimoto W, Gambotto A, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Lotze MT, Tahara H (1999) Potent antitumor effects mediated by local expression of the mature form of the interferon-inducing factor, interleukin-18 (IL-18). *Gene Ther.* **6**(5):808–815.

## P

Palma G, Barbieri A, Bimonte S, Palla M, Zappavigna S, Caraglia M, Ascierio PA, Ciliberto G, Arra C (2003) Interleukin 18: friend or foe in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1836**(2):296-303.

Parameswaran N, Patial S (2010) Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **20**(2):87-103.

Park H, Park SG, Kim J, Ko YG, Kim S (2002) Signaling pathways for TNF production induced by human aminoacyl-tRNA synthetase-associating factor, p43. *Cytokine* **20**:148–153.

Parvathenani LK, Tertysnikova S, Greco CR, Roberts SB, Robertson B, 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**(15):13309-17.

Pedra JH, Cassel SL, Sutterwala FS (2009) Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. *Curr. Opin. Immunol.* **21**(1):10-6.

Pelegriin P, Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 $\beta$  release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* **25**:5071–5082.

Pelegriin P, Surprenant A (2007) Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1 $\beta$  release through a dye uptake-independent pathway. *J. Biol. Chem.* **282**:2386–2394.

Pelegriñ P, Barroso-Gutierrez C, Surprenant A (2008) P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. *J. Immunol.* **180**(11): 7147-57.

Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J (2007) Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ.* **14**: 1583–1589.

Philpott DJ, Sorbara MT, Robertson SJ, Croitoru K, Girardin SE (2014) NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **14**: 9–23.

Portales-Cervantes L, Niño-Moreno P, Salgado-Bustamante M, García-Hernández MH, Baranda-Candido L, Reynaga-Hernández E, Barajas-López C, González-Amaro R, Portales-Pérez DP (2012) The His155Tyr (489C>T) single nucleotide polymorphism of P2RX7 gene confers an enhanced function of P2X7 receptor in immune cells from patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol.* **276**(1-2):168-75.

## Q

Qu Y, Franchi L, Nunez G, Dubyak GR (2007) Non classical IL-1b secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J. Immunol.* **179**: 1913–1925.

Qureshi OS, Paramasivam A, Yu JC, Murrell-Lagnado RD (2007) Regulation of P2X4 receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis. *J. Cell. Sci.* **120**(Pt 21):3838-49.

## R

Rajamaki K, Lappalainen J, Oorni K, Valimaki E, Matikainen S, Kovanen PT, Eklund KK (2010) Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS ONE.* **5**: e11765.

Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **50**: 413–492.

Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A (1997) The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J. Biol. Chem.* **272**(9):5482-6.

Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, Vanaja SK, Monks BG, Ganesan S, Latz E, Hornung V, Vogel SN, Szomolanyi-Tsuda E, Fitzgerald KA (2010) The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat. Immunol.* **11**(5):395-402.

Rider P, Carmi Y, Guttman O, Braiman A, Cohen I, Voronov E, White MR, Dinarello CA, Apte RN (2011) IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J. Immunol.* **187**(9):4835-43.

Rider P, Carmi Y, Voronov E, Apte RN (2013) Interleukin-1 $\alpha$ . *Semin. Immunol.* **25**(6):430-8.

Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, Kanellopoulos J, Quesniaux VF, Marchand-Adam S, Crestani B, Ryffel B, Couillin I (2010) Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am. J. Respir Crit Care Med.* **182**: 774-83.

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

Rosengren S, Hoffman HM, Bugbee W, Boyle DL (2005) Expression and regulation of cryopyrin and related proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Ann Rheum Dis.* **64**: 708-14.

Royle SJ, Bobanović LK, Murrell-Lagnado RD (2002) Identification of a non-canonical tyrosine-based endocytic motif in an ionotropic receptor. *J. Biol. Chem.* **277**(38):35378-85.

Royle SJ, Qureshi OS, Bobanović LK, Evans PR, Owen DJ, Murrell-Lagnado RD (2005) Non-canonical YXXGPhi endocytic motifs: recognition by AP2 and preferential utilization in P2X4 receptors. *J. Cell Sci.* **118**(Pt 14):3073-80.

Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, Sitia R (1990) A novel secretory pathway for interleukin-1b, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.* **9**: 1503–1510.

Ryu JK, McLarnon JG (2008) Block of purinergic P2X(7) receptor is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease. *Neuroreport.* **19**(17):1715-9.

## S

Sanz JM, Chiozzi P, Ferrari D, Colaianna M, Idzko M, Falzoni S, Fellin R, Trabace L, Di Virgilio F (2009) Activation of microglia by amyloid {beta} requires P2X7 receptor expression. *J. Immunol.* **182**(7):4378-85.

Sattler A, Wagner U, Rossol M, Sieper J, Wu P, Krause A, Schmidt WA, Radmer S, Kohler S, Romagnani C, Thiel A (2008) Cytokine-induced human IFN-gamma-secreting effector-memory Th cells in chronic autoimmune inflammation. *Blood.* **113**(9):1948–1956.

Saxena M, Yeretssian G (2014) NOD-Like Receptors: Master Regulators of Inflammation and Cancer. *Front Immunol.* **5**: 327.

Scemes E, Spray DC, Meda P (2009) Connexins, pannexins, innexins : novel roles of “hemichannels”. *PflugersArch.* **457** :1207–1226.

- Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA (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**: 479-90.
- Schotte P, Schauvliege R, Janssens S, Beyaert R (2001) The cathepsin B inhibitor z-FA.fmk inhibits cytokine production in macrophages stimulated by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **276**(24):21153-7.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* **75**(2):163-89.
- Schroder K, Tschopp J (2010) The inflammasomes. *Cell* **140**: 821–832.
- Schroder K, Zhou R, Tschopp J (2010) The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger ? *Science*. **327**(5963):296-300.
- Scott P, Ma H, Viriyakosol S, Terkeltaub R, Liu-Bryan R (2006) Engagement of CD14 mediates the inflammatory potential of monosodium urate crystals. *J. Immunol.* **177**: 6370–6378.
- Seil M, El Ouaaliti M, Fontanils U, Etxebarria IG, Pochet S, Dal Moro G, Marino A, Dehaye JP (2010) Ivermectin-dependent release of IL-1beta in response to ATP by peritoneal macrophages from P2X(7)-KO mice. *Purinergic Signal.* **4**: 405-16.
- Shenoy AR, Wellington DA, Kumar P, Kassa H, Booth CJ, Cresswell P, MacMicking JD (2012) GBP5 promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals. *Science*. **336**(6080):481-5.
- Shi Y, Evans JE, Rock KL (2003) Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. **425**: 516–521.
- Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, Ramanujan VK, Wolf AJ, Vergnes L, Ojcius DM, Rentsendorj A, Vargas M, Guerrero C, Wang Y, Fitzgerald KA, Underhill DM, Town T, Arditi M (2012) Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* **36**(3):401-14.
- Silberberg SD, Li M, Swartz KJ (2007) Ivermectin Interaction with transmembrane helices reveals widespread rearrangements during opening of P2X receptor channels. *Neuron*. **54**(2):263-74.
- Sims JE, Smith DE (2010) The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **10**(2):89-102.
- Sokol RJ, Hudson G, James NT, Frost IJ, Wales J (1987) Human macrophage development: a morphometric study. *J. Anat.* **151**:27-35.

Solini A, Chiozzi P, Morelli A, Fellin R, Di Virgillio F (1999) Human primary fibroblasts in vitro express a purinergic P2X7 receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release. *J Cell Sci.* **112**: 297-305.

Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J. Biol. Chem.* **1**:125-32.

Sosinsky GE, Boassa D, Dermietzel R, Duffy HS, Laird DW, MacVicar B, Naus CC, Penuela S, Scemes E, Spray DC, Thompson RJ, Zhao HB, Dahl G (2011) Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels.* **5** :193–197.

Steinberg TH, Silverstein SC (1987) Extracellular ATP<sup>4-</sup> promotes cation fluxes in the J774 mouse macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* **262**(7): 3118–22.

Stock TC, Bloom BJ, Wei N, Ishaq S, Park W, Wang X, Gupta P, Mebus CA (2012) Efficacy and safety of CE-224,535, an antagonist of P2X7 receptor, in treatment of patients with rheumatoid arthritis inadequately controlled by methotrexate. *J. Rheumatol.* **39**(4):720-7.

Stokes L, Surprenant A (2009) Dynamic regulation of the P2X4 receptor in alveolar macrophages by phagocytosis and classical activation. *Eur. J. Immunol.* **39**(4):986-95.

Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM (2007) Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J. Leukoc. Biol.* **82**(2):244-52.

Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Sekerkova A (2014) Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clin. Sci.* **126**(9):593-612.

Subramanian N, Natarajan K, Clatworthy MR, Wang Z, Germain RN (2013) The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. *Cell.* **153**: 348–61.

Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science.* **272**(5262):735-8.

Surprenant A, North RA (2009) Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu. Rev. Physiol.* **71**:333-59.

Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL (2014) Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann. NY Acad. Sci.* **1319**:82-95.

## T

Takeda K, Akira S (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**(1):1-14.

Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. **140**: 805–820.

Tao JH, Zhang Y, Li XP (2013) P2X7R: a potential key regulator of acute gouty arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* **43**(3):376-80.

Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J *et al.* (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*. **356**(6372): 768-74.

Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK, Flavell RA, Girardin SE, Godzik A, Harton JA, Hoffman HM, Hugot JP, Inohara N, Mackenzie A, Maltais LJ, Nunez G, Ogura Y, Otten LA, Philpott D, Reed JC, Reith W, Schreiber S, Steimle V, Ward PA (2008) The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity*. **28**(3):285-7.

Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG (2012) Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev.* **76**(1):16-32.

Tschopp J, Schroder K (2010) NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production. *Nat. Rev. Immunol.* **10**(3): 210-5.

## U

Underhill DM, Goodridge HS (2012) Information processing during phagocytosis. *Nat. Rev. Immunol.* **12**(7):492-502.

Uratsuji H, Tada Y, Kawashima T, Kamata M, Hau CS, Asano Y, Sugaya M, Kadono T, Asahina A, Sato S, Tamaki K (2012) P2Y6 receptor signaling pathway mediates inflammatory responses induced by monosodium urate crystals. *J. Immunol.* **188**(1):436-44.

## V

Velasquez S, Eugenin EA (2014) Role of Pannexin-1 hemichannels and purinergic receptors in the pathogenesis of human diseases. *Front. Physiol.* **5**:96.

Villani AC, Lemire M, Fortin G, Louis E, Silverberg MS, Collette C, Baba N, Libioulle C, Belaiche J, Bitton A, Gaudet D, Cohen A, Langelier D, Fortin PR, Wither JE, Sarfati M, Rutgeerts P, Rioux JD, Vermeire S, Hudson TJ, Franchimont D (2009) Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet.* **41**: 71-6.

## W

Ward JR, West PW, Ariaans MP, Parker LC, Francis SE, Crossman DC, Sabroe I, Wilson HL (2010) Temporal interleukin-1beta secretion from primary human peripheral blood

monocytes by P2X7-independent and P2X7-dependent mechanisms. *J. Biol. Chem.* **285**: 23147-58.

Werman A, Werman-Venkert R, White R, Lee JK, Werman B, Krelin Y, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN (2004) The precursor form of IL-1alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**(8):2434-9.

Wilson HL, Francis SE, Dower SK, Crossman DC (2004) Secretion of intracellular IL-1 receptor antagonist (type 1) is dependent on P2X7 receptor activation. *J. Immunol.* **173**: 1202-8.

## Y

Yang HC, Cheng ML, Ho HY, Chiu DT (2011) The microbicidal and cytoregulatory roles of NADPH oxidases. *Microbes Infect.* **13**:109-120.

Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, Tschopp J (2010) Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**: 19449-54.

Yazdi AS, Drexler SK (2013) Regulation of interleukin 1 $\alpha$  secretion by inflammasomes. *Ann. Rheum. Dis.* **72** Suppl 2:ii96-9

Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta.* **1783**(5):673-94.

Yiangou Y, Facer P, Durrenberger P, Chessell IP, Naylor A, Bountra C, Banati RR, Anand P (2006) COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol.* **6**:12.

Yin H, Li X, Hu S, Liu T, Yuan B, Gu H, Ni Q, Zhang X, Zheng F (2013) IL-33 accelerates cutaneous wound healing involved in upregulation of alternatively activated macrophages. *Mol. Immunol.* **56**(4):347-53.

## Z

Zhou X, Engel T, Goepfert C, Erren M, Assmann G, von Eckardstein A (2002) The ATP-binding cassette transporter A1 contributes to the secretion of interleukin-1b from macrophages, but not from monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**: 598–604.

Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J (2010) Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat. Immunol.* **11**: 136–140.

Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* **469**(7329):221-5.

# VII) ANNEXES

## Article 3 :

ICCB 2012. Proceedings of the 10th International Congress on Cell Biology (July 25th- 28th, 2012 - Rio de Janeiro, Brazil)

### **Role of matrix metalloproteinases and inflammasome pathway in the development of airway inflammation and fibrosis**

**Lagente V.<sup>1</sup>, Gicquel T.<sup>1</sup>, Victoni T.<sup>1</sup>, Robert S.<sup>1</sup>, Viel R.<sup>2</sup>, Fautrel A.<sup>1,2</sup>, Valença S.<sup>3</sup>, Porto L.C.<sup>4</sup>, Boichot E.<sup>1</sup>**

*1: UMR991 INSERM/Université de Rennes 1, Faculté de Pharmacie, Rennes, France*

*2: Histopathological platform H2P2, University de Rennes 1 ;, Rennes, France*

*3: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil*

*4: Universidade do Estado de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil*

*E-mail : [vincent.lagente@univ-rennes1.fr](mailto:vincent.lagente@univ-rennes1.fr)*

Il s'agit d'une revue qui se focalise sur l'implication de l'inflammasome NLRP3 dans le déséquilibre de la balance entre Matrix metalloproteinases (MMPs) et les Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) leurs inhibiteurs naturels dans le développement de pathologies pulmonaires. En effet, l'activation de l'inflammasome NLRP3 va conduire à la libération d'IL-1 $\beta$  connue pour augmenter TIMP-1 et induire une fibrose pulmonaire chez la souris. Ainsi, l'inflammasome NLRP3 pourrait être une cible thérapeutique dans le traitement de pathologies inflammatoires mais également fibrosantes au niveau pulmonaire.

# **Role of matrix metalloproteinases and inflammasome pathway in the development of airway inflammation and fibrosis**

Lagente V<sup>1</sup>, Gicquel T<sup>1</sup>, Victoni T<sup>1</sup>, Robert S<sup>1</sup>, Viel R<sup>2</sup>,  
Fautrel A<sup>1,2</sup>, Valença S<sup>3</sup>, Porto LC<sup>4</sup> and Boichot E<sup>1</sup>

1 :UMR991 INSERM/Université de Rennes 1, Faculté de Pharmacie, Rennes, France

2 :Histopathological platform H2P2, University de Rennes 1 ;, Rennes, France

3: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

4 :Universidade do Estado de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Corresponding author:

Pr. Vincent Lagente

UMR991 INSERM-Université de Rennes 1

Faculté de Pharmacie,

2, avenue du professeur Léon Bernard

35043 Rennes cedex, France

Tel.: (+33) 2 23 23 48 35, Fax : (+33) 2 23 23 47 85

E-mail : [vincent.lagente@univ-rennes1.fr](mailto:vincent.lagente@univ-rennes1.fr)

## **Summary**

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a major group of proteases known to regulate the turn-over of extracellular matrix (ECM) and so they are suggested to be important in tissue remodeling such as pulmonary fibrosis. Pulmonary fibrosis is associated with deposition of ECM components mainly collagen in the lung interstitium. The excessive airway remodelling as a result of an imbalance in the equilibrium of the normal processes of synthesis and degradation of extracellular matrix components. We previously showed a correlation of the differences in collagen deposition in the lungs of bleomycin-treated mice with a reduced molar pro-MMP-9/TIMP-1 ratio. We also suggested that early altered regulation of matrix turnover may be involved in the development of fibrosis. We then demonstrated that NLRP3-inflammasome pathway associated with the IL-1R/MyD88 signaling is required in the increased TIMP-1 level and pulmonary fibrosis in mice. Finally, these observations emphasize those effective therapies for these disorders must be given early in the natural history of the disease, prior to the development of tissue remodeling and fibrosis.

## 1) Introduction

The increasing family of matrix metalloproteinases (MMPs) has been subject to sustained research and has been widely demonstrated to be important in various fields of medicine including inflammatory process and pathology. MMPs were primarily described to be involved in homeostasis and the turnover of the extracellular matrix (ECM), but there has been numerous evidence suggesting that MMPs act on cytokines, chemokines and protein mediators to regulate various aspects of inflammation and immunity [1,2]. The matrix metalloproteinases (MMPs) form a group of structurally related extracellular zinc endopeptidases known for their ability to cleave one or several constituents of the extracellular matrix [3]. Zymogen forms of the MMPs (pro-MMPs) are secreted into the extracellular space from a large number of cell types, where the activation of the pro-MMPs in the local microenvironment can result in discrete alterations in the tissue architecture. MMP synthesis and functions are regulated by transcriptional activation, post-transcriptional processing (release of pro-domain, cell surface shedding), and the control of activity by a family of endogenous inhibitors collectively known as tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP). Upon stimulation, many cell types have been identified as producers of MMPs and TIMPs in a context of inflammatory process, strongly suggesting the involvement of MMPs in numerous inflammatory diseases. Based on this property, MMPs are not only put forward as physiological mediators of the “turnover” of the extracellular matrix but are also considered to be critical factors of the remodeling processes in pathological conditions [4]. Indeed, a marked increase in their expression is observed and associated with a variety of inflammatory diseases.

Consequently, MMPs have been speculated to play a critical role in various inflammatory diseases, such as airway diseases associated with inflammatory process including acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS) [5], chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [6], pulmonary fibrosis [7], but also liver diseases, rheumatoid arthritis [8] and cancer [9]. In these conditions, we have to consider MMPs as therapeutic targets which can be inhibited by non-selective and/or selective inhibitors as possible novel anti-inflammatory compounds.

## 2) Role of TIMPs in the development of pulmonary fibrosis

Tissue inhibitors of the metalloproteinases (TIMPs) are specific endogenous inhibitors that bind to the active site of MMPs in a stoichiometric 1:1 molar ratio, thereby blocking access to extracellular matrix substrates. Four TIMPs (TIMP-1, -2, -3 and -4) have been identified in vertebrates, and their expressions are regulated during development, tissue remodelling but also inflammation [10]. The mammalian TIMP family presents substantial sequence homology and structural identity on a protein level [11]. Basically, all members of the TIMP family inhibit MMPs activity. This is accomplished through the coordination of the  $Zn^{+2}$  of the MMP active site by the amino- and carbonyl- groups of the TIMPs N-terminal cysteine residues. Nevertheless, a selective inhibition of some members of the MMP has been reported. For example, although TIMP-1 is the most potent inhibitor for most MMP family members, it is a poor inhibitor of the membrane-type MMPs (MT-MMPs) and MMP-19 [12,13]. TIMP-3 inhibits members of the A Disintegrin And Metalloproteinase (ADAM) family of proteases, although the mechanism for this inhibition appears to be different from MMP inhibition [14,15]. TIMP-2 selectively interacts with MT1-MMP to facilitate the cell-surface activation of pro-MMP-2 [12,13,16]. Thus, TIMP-2 can both inhibit MMP activity and promote the cell surface activation of pro-MMP-2 by MT1-MMP. TIMPs can be regulated on a transcriptional level by various cytokines and growth factors, resulting in tissue-specific, constitutive, or inducible expression [17].

Strong evidences imply that TIMPs / MMPs imbalance are an important element in the fibrogenic process: TIMPs, and especially TIMP-1 are upregulated in cases of human pulmonary fibrosis and in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. TIMPs, and particularly TIMP-1 induction could lead to a "non collagenolytic microenvironment", building adequate conditions for a further extracellular matrix deposition to occur. Indeed, we previously reported that TIMP-1 was markedly increased in mice's lungs, 24 h after the administration of bleomycin [18]. During this period, we were not able to observe collagen deposition, but bleomycin induced an important inflammatory reaction characterized by an influx of neutrophils and probably an increase in macrophage activity. However, the depletion of mice in neutrophils did not modify the level of the TIMP-1 protein in comparison with control mice [18].

We also reported that the non selective MMPs inhibitor, batimastat, reduced the development of bleomycin-induced fibrosis in mice, associated with a decrease in TIMP-1 levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) [19]. In another study, we reported the inability of phagocytes from p47<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> KO mice to produce large quantities of ROS via the NADPH oxidase pathway inhibits the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis [20]. This inhibition is associated with changes in IL-6 production and in the molar MMP-9/TIMP-1 ratio in favor of the production of TIMP-1, both probably key factors in airway remodeling and fibrosis. We also investigated MMP-9, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3 in the fibrotic response to bleomycin of “fibrosis prone” C57BL/6J and “fibrosis resistant” BALB/c mice [21]. Fourteen days after bleomycin administration, hydroxyproline assay and histological study revealed that BALB/c mice developed significantly less fibrosis compared to C57BL/6J mice. At day 1, bleomycin enhanced TIMP-1, MMP-2 and MMP-9 protein levels in bronchoalveolar lavage fluid, and induced corresponding genes in lung tissue of both strains. The rise of *Timp-1*, *Mmp-9* and *Mmp-2* genes levels were significantly stronger in lungs of C57BL/6J, whereas gelatinase activities of MMP-2 and MMP-9 were similar. At day 14, neither MMP-2 nor MMP-9 levels exhibited strain-dependent protein level or gene expression although TIMP-1 was markedly associated with fibrosis. Interestingly, bleomycin induced neither *Timp-2* nor *Timp-3* in lung tissue at any time of the study [21]. These studies show that early altered regulation of TIMP-1 following bleomycin administration may be involved in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. This strongly suggests that TIMP-1 may be considered as an available target for tissue remodelling and fibrosis. However, TIMPs which have affinities with the picomolar range seem ideal inhibitors but they do not present selectivity and possess other biological functions, which could lead to side effects [22].

It has also been suggested that the TIMP-1 function is also influenced by the cellular context, specifically in that MMPs, in particular MMP-9, may reduce the effective concentration of TIMP-1 and compete with TIMP-1 for binding to the cell surface receptor CD63 [22]. In contrast to TIMP-2, TIMP-1 blood concentrations are increased in cancer patients, particularly in those with breast or colorectal carcinoma, and this increase is negatively associated with patient outcome [23-25]. These recent studies have demonstrated the clinical utility of TIMP-1 as a biomarker and independent prognostic factor in breast, colorectal, and several hematological cancers.

The characterization of receptors for TIMP family members is a first step to understand the MMP-independent, cytokine-like functions of the TIMPs. Hopefully, this can lead to a starting point for the molecular dissection of signaling events associated with the various activities of these proteins and their function in both normal physiologic and pathologic processes. It is clear that the pleiotropic activities of the TIMP family members are complex and depend on interactions with other extracellular components, as well as direct interactions with cell binding partners.

### **3) Role of Inflammasome pathway in the development of pulmonary fibrosis**

Several inflammatory diseases have been reported to be linked with the activation of NLRP3-inflammasome pathway including gout [26], Crohn's disease [27], rheumatoid arthritis [28] and cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) [29].

The best-characterized inflammasome consists of three main components, the Nod-like receptor (NLR)-family protein, NLRP3, pro-caspase-1, and the ASC (Apoptosis speck-like protein containing a CARD) adapter, which bridge interactions between the former proteins [30]. NLRP3 is expressed by myeloid cells and is upregulated in response to the stimulation of macrophages with pathogen-associated molecule patterns (PAMPs) or danger-associated molecule patterns (DAMPs) such as ATP. NLRP3 interacts with ASC and pro-caspase-1 to become effective. Following autoactivation via inflammasome assembly, caspase-1 cleaves pro-IL-1 $\beta$ , whose biologically active form IL-1 $\beta$  is then secreted.

IL-1 $\beta$  is a cytokine with major roles in inflammation and innate immune responses. This cytokine is produced by activated monocytes, macrophages and dendritic cells, inducing the production of chemokines or cytokines such as TNF and IL-6, or proteases such as matrix metalloproteinases (MMPs) associated with neutrophil recruitment and proliferation of resident cells mainly fibroblasts [31]. Since mature IL-1 $\beta$  is very potent, its production is tightly regulated on expression, transcription and secretion [32].

It has also been previously demonstrated that pulmonary fibrosis is closely associated with the activation of NLRP3-inflammasome pathway, production of IL-1 $\beta$  and TIMP-1 [33,34]. Indeed, several studies using KO mice for several components of inflammasome pathway including NLRP3, ASC and caspase 1 showed a reduction of experimental pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice [33-35]. The inhibition of the collagen deposition and fibrosis is well correlated with the imbalance between MMPs and TIMP-1 in favour to increased TIMP-1 production. Moreover, production of TIMP-1 and collagen deposition is reduced in IL-1 receptor and MyD88 deficient mice [31]. Similarly, cigarette smoke-induced inflammation and elastase-induced emphysema in mice depends on inflammasome pathway and IL-1R1/MyD88 signaling [36,37].

Abnormal cell activation may provide signal that alert the immune system to danger, triggering innate immunity activation leading to inflammatory process and remodelling. In this context, dying cells release danger signals that may activate the immune system and stimulate innate and adaptive immunity. The danger signals are recognized by membrane receptors such as TLRs [38] or cytosolic receptors such NLRP3-inflammasome [30]. It was clearly demonstrated that uric acid is a danger signal activating NLRP3-inflammasome pathway in gout arthritis [26]. Uric acid is a product of purine catabolism which is produced from injured tissue in vivo after tumor chemotherapy leading to tumor lysis syndrom characterized by hyperuricemia [39]. At high local concentration, uric acid precipitates and forms crystals that cause inflammation as observed in gout and activate the caspase-1-containing NALP3-inflammasome, leading to the production of IL-1 $\beta$ . It has been demonstrated that uric acid locally produced in the lung upon bleomycin-induced DNA damage and degradation induced the activation of NLRP3-inflammasome pathway. Reduction of uric acid levels using the inhibitor of uric acid synthesis allopurinol or uricase leads to a decrease in bleomycin-induced IL-1 $\beta$  and TIMP-1 production, lung inflammation and fibrosis. Finally, local administration of exogenous uric acid crystals recapitulates lung inflammation and fibrosis, which depend on the NLRP3 inflammasome, MyD88, and IL-1R1 pathways and Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 for optimal inflammation but are independent of the IL-18 receptor.

Adenosine triphosphate (ATP) has been described also as a danger signal activating NLRP3-inflammasome leading to the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  release in lung. Extracellular ATP was shown to play a major role to trigger synthesis and release of mature IL-1 $\beta$  after prestimulation of macrophages by an inflammatory signal such as LPS [40]. ATP is described as an agonist of purinergic P2 receptor predominantly expressed on immune cells [41] and is reported to be involved in the pathophysiology of LPS-induced lung injury, modulating airway inflammatory process and functional changes [42].

ATP mainly activates the P2X<sub>7</sub> purinergic receptor, leading to trigger ASC-caspase-1 complex in a NLRP3-dependent manner, leading to the production of IL-1 $\beta$ . Fibrotic patients have elevated ATP content in BALF in comparison with control individuals [34]. It has been shown an early increase in ATP levels in BALF on bleomycin administration in mice. Modulation of eATP levels with the ATP-degrading enzyme apyrase greatly reduced bleomycin -induced inflammatory cell recruitment, lung IL-1 $\beta$ , and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 production. P2X<sub>7</sub> receptor-deficient mice presented dramatically reduced lung inflammation, with reduced fibrosis markers such as lung collagen content, TIMP-1 and MMP-9 [34]. This clearly proposed that ATP released from bleomycin-injured lung cells constitutes a major endogenous danger signal that engages the P2X<sub>7</sub> receptor/pannexin-1 axis, leading to IL-1 $\beta$  maturation and lung fibrosis. We recently showed that ATP $\gamma$ S and BzATP, two analogs of ATP are able to potentiate the release of IL-1 $\beta$  from human monocyte-derived macrophages induced by low concentration of LPS [43]. In the same conditions no increase in IL-1 $\alpha$  and IL-6 was observed. We also observed that P2X<sub>7</sub>R antagonists, A-438079 and A-740003, were able to reduce the release of IL-1 $\beta$ , but not of IL-1 $\alpha$  and IL-6 from macrophages stimulated by ATP $\gamma$ S or BzATP strongly suggesting the involvement of the P2X<sub>7</sub>R/NLRP3 pathway in the secretion of IL-1 $\beta$  from ATP-stimulated human macrophages [43].

#### **4) Conclusions and future directions**

It has not yet been clearly established which MMP activity needs to be inhibited in order to have an impact on inflammatory diseases. Since numerous reported evidences suggest that different MMPs play an important role in the pathogenesis of tissue remodelling associated with inflammatory processes in several diseases, broad spectrum MMPs inhibitors may have therapeutic potential, nevertheless, associated with adverse events [44,45]. It is therefore possible that a selective MMP inhibitor may have reduced side-effects.

One alternative is a gene transfer to overexpress TIMPs which can reduce MMPs activity and modulate tissue remodelling. Several preclinical studies of various diseases have reported encouraging data. For example, cartilage degradation and invasion by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by the gene transfer of TIMP-1 and TIMP-3 [46]. However, expressing wild-type TIMPs could have drawbacks because multiple MMPs may be inhibited. The best route to success is probably the development of engineered TIMPs with altered specificity, to enable the targeting of specific MMPs. One alternative of selective MMP inhibitors could be the RNA interference therapy development.

The recent characterization of the involvement of the NLRP3-inflammasome pathway has opened a large possibility of new therapeutic targets for the reduction of collagen deposition and fibrosis. However, we need of selective and available tools to validate the right target. For instance, our goal is to investigate the role of purinergic receptors. Regarding the recent data, P2X7 receptor would be a good candidate. However, it is not excluded that blockade of one type of receptors may induce a compensation by others. The screening of potential drugs effective in preclinical models of fibrosis would be the next challenge.

#### **Acknowledgments**

The authors are grateful to the CAPES-COFECUB for funding and bilateral agreement (Brazil-France). This study is also supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR) project (ANR2010 MIDI01202) and INSERM.

## References

1. GREENLEE KJ, WERB Z, KHERADMAND F Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol Rev* 87: 69-98 (2007)
2. PARKS WC, WILSON CL, LOPEZ-BOADO YS Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 4: 617-629 (2004)
3. VU T, WERB Z. Gelatinase B: structure, regulation, and function. In *Matrix Metalloproteinases*. W. C. Parks and R. P. Mecham, editors. Academic Press, San Diego. 115–148 (1998).
4. MOTT JD, WERB Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 16: 558–564 (2004).
5. FLIGIEL SE, STANDIFORD T, FLIGIEL HM, TASHKIN D, STRIETER RM, WARNER RL, JOHNSON KJ, VARANI J Matrix metalloproteinases and matrix metalloproteinase inhibitors in acute lung injury. *Hum Pathol* 37: 422-430 (2006).
6. OHNISHI K, TAKAGI M, KUROKAWA Y, SATOMI S, KONTTINEN YT Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest* 78: 1077-1087 (1998).
7. MAISI P, PRIKK K, SEPPER R, PIRILA E, SALO T, HIETANEN J, SORSA T Soluble membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and gelatinase A (MMP-2) in induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid of human bronchial asthma and bronchiectasis. *APMIS*, 110: 771-782 (2002).
8. KONTTINEN YT, AINOLA M, VALLEALA H, MA J, IDA H, MANDELIN J, KINNE RW, SANTAVIRTA S, SORSA T, LOPEZ-OTIN C, TAKAGI M Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 58: 691-697 (1999).
9. URBANSKI SJ, EDWARDS DR, MAITLAND A, LECO KJ, WATSON A, KOSSAKOWSKA AE Expression of metalloproteinases and their inhibitors in primary pulmonary carcinomas. *Br J Cancer* 66: 1188-1194 (1992).
10. BREW K. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477: 267–283 (2000).
11. TUUTTILA A, MORGUNOVA E, BERGMANN U, LINDQVIST Y, MASKOS K, FERNANDEZ-CATALAN C, BODE W, TRYGGVASON K, SCHNEIDER G. Three-dimensional structure of human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* 284: 1133–1140 (1998).
12. LAMBERT E, DASSE E, HAYE B, PETITFRERE E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 49:187–198 (2004).
13. BAKER AH, EDWARDS DR, MURPHY G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 115: 3719–3727 (2002).
14. BREW K, DINAKARPANDIAN D, NAGASE H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477: 267–283 (2000).
15. AMOUR A, SLOCOMBE PM, WEBSTER A, BUTLER M, KNIGHT CG, SMITH BJ, STEPHENS PE, SHELLEY C, HUTTON M, KNAUPER V, DOCHERTY AJ, MURPHY G. TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Letters* 435: 39–44 (1998).
16. STETLER-STEVENSON WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 103: 1237–1241 (1999).

17. CLARK IM, SWINGLER TE, SAMPIERI CL, EDWARDS DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 12 :006 (2007).
18. MANOURY B, NENAN S, GUENON I, LAGENTE V, BOICHOT E. Influence of early neutrophil depletion on MMPs/TIMP-1 balance in bleomycin-induced lung fibrosis. *Int Immunopharmacol* 7: 900-911. (2007).
19. CORBEL M, CAULET-MAUGENDRE S, GERMAIN N, LAGENTE V, BOICHOT E. Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by the matrix metalloproteinase inhibitor, batimastat. *J Pathol* 193: 538-545 (2001).
20. MANOURY B, LECLERC O, NÉNAN S, GUENON I, BOICHOT E, PLANQUOIS JM, BERTRAND C, LAGENTE, V. The absence in reactive oxygen species production protects against bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice. *Respir Res*, 6: 11 (2005)
21. MANOURY B., CAULET-MAUGENDRE S, GUÉNON I, LAGENTE V, BOICHOT E. TIMP-1 is a key factor of fibrogenic response to bleomycin on lung of mice. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 19: 471-487 (2006).
22. CHIRCO R, LIU XW, JUNG KK, KIM HR. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev* 25: 99–113, 2006.
23. HOLTEN-ANDERSEN MN, FENGER C, NIELSEN HJ, RASMUSSEN AS, CHRISTENSEN IJ, BRUNNER N, KRONBORG O. Plasma TIMP-1 in patients with colorectal adenomas: a prospective study. *Eur J Cancer* 40: 2159–2164, 2004.
24. MCCARTHY K, MAGUIRE T, MCGREAL G, MCDERMOTT E, O’HIGGINS N, DUFFY MJ. HIGH levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predict poor outcome in patients with breast cancer. *Int J Cancer* 84: 44–48, 1999.
25. NAKOPOULOU L, GIANNOPOULOU I, STEFANAKI K, PANAYOTOPOULOU E, TSIRMPA I, ALEXANDROU P, MAVROMMATIS J, KATSAROU S, DAVARIS P. Enhanced mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in breast carcinomas is correlated with adverse prognosis. *J Pathol* 197:307–313, 2002.
26. MARTINON F., PETRILLI V., MAYOR A., TARDIVEL A., TSCHOPP J., Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome, *Nature*, 440: 237-241, 2006.
27. VILLANI AC, LEMIRE M, FORTIN G, LOUIS E, SILVERBERG MS, COLLETTE C, BABA N, LIBIOULLE C, BELAICHE J, BITTON A, GAUDET D, COHEN A, LANGELIER D, FORTIN PR, WITHER JE, SARFATI M, RUTGEERTS P, RIOUX JD, VERMEIRE S, HUDSON TJ, FRANCHIMONT D, Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility, *Nature Genetics* 41: 71-76, 2009.
28. ROSENGREN H, HOFFMAN M, BUGBEE W, BOYLE DL, Expression and regulation of cryopyrin and related proteins in rheumatoid arthritis synovium, *An Rheumatic Dise* 64: 708-714, 2005.
29. AGOSTINI L, MARTINON F, BURNS K, MCDERMOTT MF, HAWKINS PN, AND TSCHOPP J, NALP3 Forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder, *Immunity* 20: 319-325, 2004.
30. MARTINON F, BURNS K, TSCHOPP J, The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta, *Mol Cell* 10: 417–426, 2002.
31. GASSE P, MARY C, GUENON I, NOULIN N, CHARRON S, SCHNYDER-CANDRIAN S, SCHNYDER B, AKIRA S, QUESNIAUX VF, LAGENTE V,

- RYFFEL B AND COUILLIN I, IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice,” *J Clin Invest*, 117: 3786-3799, 2007.
32. MARTINON F, MAYOR A AND TSCHOPP J, The inflammasomes: guardians of the body, *Ann Rev Immunol*, 27: 229-265, 2009.
  33. GASSE P, RITEAU N, CHARRON S, GIRRE S, FICK L, PÉTRILLI V, TSCHOPP J, LAGENTE V, QUESNIAUX VF, RYFFEL B, COUILLIN I. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis, *Am J Resp Crit Care Med* 179: 903-913, 2009.
  34. RITEAU N, GASSE P, FAUCONNIER L, GOMBAULT A, COUEGNAT M, FICK L, KANELLOPOULOS J, QUESNIAUX VF, MARCHAND-ADAM S, CRESTANI B, RYFFEL B AND COUILLIN I, Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 774-783, 2010.
  35. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O’Rourke K, Roose-Girma M, Lee MP, Weinrauch Y, Monack DM and Dixit VM, Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP, *Nature* 440: 228–232, 2006.
  36. DOZ E, NOULIN N, BOICHOT E, GUÉNON I, FICK L, LE BERT M, LAGENTE V, RYFFEL B, SCHNYDER B, QUESNIAUX VF, COUILLIN I. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent. *J Immunol* 180(2):1169-1178, 2008.
  37. COUILLIN I, VASSEUR V, CHARRON S, GASSE P, TAVERNIER M, GUILLET J, LAGENTE V, FICK L, JACOBS M, COELHO FR, MOSER R, RYFFEL B. IL-1R1/MyD88 signaling is critical for elastase-induced lung inflammation and emphysema. *J Immunol* 183(12): 8195-8202, 2009.
  38. TIAN J, AVALOS AM, MAO SY, CHEN B, SENTHIL K, WU H, PARROCHE P, DRABIC S, GOLENBOCK D, SIROIS C, HUA J, AN LL, AUDOLY L, LA ROSA G, BIERHAUS A, NAWORTH P, MARSHAK-ROTHSTEIN A, CROW MK, FITZGERALD KA, LATZ E, KIENER PA, COYLE AJ. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 8(5): 487-496, 2007.
  39. CAMMALLERI L, MALAGUARNERA M. RASBURICASE REPRESENTS A NEW TOOL FOR HYPERURICEMIA IN TUMOR LYSIS SYNDROME AND IN GOUT. *INT J MED SCI* 4(2):83-93, 2007.
  40. FERRARI D, PIZZIRANI C, ADINOLFI E, LEMOLI RM, CURTI A, IDZKO M, PANTHER E, DI VIRGILIO F. The P2X7 receptor: A key player in IL-1 processing and release, *J Immunol*, 176: 3877–3883, 2006.
  41. CODDOU C, YAN Z, OBSIL T, HUIDOBRO-TORO JP, STOJILKOVIC SS, Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels, *Pharmacol Rev* 63: 641-683, 2011.
  42. MONÇÃO-RIBEIRO LC, CAGIDO VR, LIMA-MURAD G, SANTANA PT, RIVA DR, BOROJEVIC R, ZIN WA, CAVALCANTE MC, RIÇA I, BRANDO-LIMA M, TAKIYA CM, FAFFE DS, COUTINHO-SILVA R. Lipopolysaccharide-induced lung injury: role of P2X7 receptor. *Respir Physiol Neurobiol*, 179: 314-325, 2011.
  43. GICQUEL T, VICTONI T, FAUTREL A, ROBERT S, GLEONNEC F, GUEZINGAR M, COUILLIN I, CATROS V, BOICHOT E, LAGENTE V. Involvement of purinergic receptors and NLRP3-inflammasome pathway in the ATP-induced cytokine release from macrophages. *Clin Exp Pharmacol Physiol*;41(4):279-86, 2014.
  44. DORMAN G, CSEH S, HDJU I, BARNA L, KONYA D, KUPAI K, KOVACS L,

- FERDINANDY P. Matrix metalloproteinase Inhibitors. *Drugs* 70: 949-964, 2010.
45. PAVLAKI M, ZUCKER S. Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPi)s: The beginning of phase I or the termination of phase III clinical trials. *Cancer Metastasis Rev* 22: 177–203, 2003
  46. VAN DER LAAN WH, QUAX PH, SEEMAYER CA, HUISMAN LG, PIETERMAN EJ, GRIMBERGEN JM, VERHEIJEN JH, BREEDVELD FC, GAY RE, GAY S, HUIZINGA TW, PAP T. Cartilage degradation and invasion by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by gene transfer of TIMP-1 and TIMP-3. *Gene Ther* 10: 234-242, 2003.

# Implication des récepteurs purinergiques dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages

Thomas GICQUEL

## Abstract :

NLRP3-inflammasome pathway activation appears as the corner stone of many inflammatory diseases including pulmonary fibrosis, rheumatoid arthritis, gout and Crohn disease. This pathway is known to be activated by danger signals such as ATP or Monosodium urate (MSU) leading to the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  release. The aim of this study is to investigate the role of purinergic receptors in the activation of NLRP3-inflammasome pathway in human macrophages. We found here that MSU or analogs of ATP (ATP $\gamma$ S or BzATP) induced the release of IL-1 $\beta$  from LPS-primed MDM obtained from buffy coat (EFS, Rennes). We observed that purinergic P2X7 receptor antagonists, cathepsin B or caspase-1 inhibitors, siRNA targeting P2Y2R or P2X7R were able to reduce the release of IL-1 $\beta$  from activated macrophages. Furthermore we studied the role of purinergic receptors in pro-inflammatory cytokines release, such as IL-1 $\alpha$  or IL-6. This study suggests that P2 receptors-NLRP3 inflammasome pathway represents a novel potential therapeutic target to control inflammation in inflammatory diseases.

**Keywords:** NLRP3 inflammasome, purinergic receptors, ATP, macrophages, interleukines, inflammation, innate immunity

## Résumé :

L'inflammasome NLRP3 est très impliqué dans de nombreuses pathologies inflammatoires comme la fibrose pulmonaire, la polyarthrite rhumatoïde, la goutte ou la maladie de Crohn. Cette voie de signalisation permet la libération de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  après activation par des signaux de danger comme l'ATP ou les cristaux d'acide urique (MSU). L'objectif de cette étude est de mieux comprendre le rôle des récepteurs purinergiques dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages humains. Nous montrons ici que le MSU ou les analogues de l'ATP (ATP $\gamma$ S ou BzATP) induisent la libération d'IL-1 $\beta$  dans des macrophages pré-activés par du LPS. Ces macrophages proviennent de la différenciation de monocytes issus de poches de sang périphérique (buffy coat) obtenues à l'EFS (Rennes). Nous observons que des antagonistes du récepteur purinergique P2X7, des inhibiteurs de la cathepsine B ou de la caspase-1 et des siRNA ciblant les récepteurs P2X7 et P2Y2 sont capables de réduire la libération d'IL-1 $\beta$  par les macrophages activés. De plus, dans cette étude nous mettons en évidence le rôle des récepteurs purinergiques dans la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\alpha$  ou l'IL-6. Ce travail suggère que la voie d'activation de l'inflammasome NLRP3 par les récepteurs purinergiques représente une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement des pathologies inflammatoires.

**Mots clés:** Inflammasome NLRP3, récepteurs purinergiques, ATP, macrophages, interleukines, inflammation, immunité innée