



**HAL**  
open science

# Inflammasomes : des mécanismes d'activation de la caspase-1 à la progression tumorale

Baptiste Guey

► **To cite this version:**

Baptiste Guey. Inflammasomes : des mécanismes d'activation de la caspase-1 à la progression tumorale. Cancer. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1113 . tel-01401450

**HAL Id: tel-01401450**

**<https://theses.hal.science/tel-01401450>**

Submitted on 23 Nov 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.



N°d'ordre NNT : 2016LYSE1113

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 340**  
**Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire**

**Spécialité de doctorat** : Biologie

**Discipline** : Cancérologie

Soutenue publiquement le 01/07/2016, par :

**Baptiste Guey**

---

# **Inflammasomes : des mécanismes d'activation de la caspase-1 à la progression tumorale**

---

Devant le jury composé de :

Pr. Mathias Faure

CIRI

Président

Pr. Isabelle Cremer

CRC des Cordeliers

Rapporteure

Pr. Fabio Martinon

Université de Lausanne

Rapporteur

Dr. Nathalie Bendriss-Vermare

CRCL

Examinatrice

Pr. François Ghiringhelli

Inserm U866

Examineur

Dr. Virginie Petrilli

CRCL

Directrice de thèse



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE



Je dédie mon travail de thèse à tous les bénévoles et donateurs de la ligue contre le cancer et de la fondation ARC. C'est grâce à leur soutien et à l'argent de leurs collectes que cette thèse a pu aboutir.

---

# REMERCIEMENTS

---

C'est en débutant l'écriture de mes remerciements que je sens le poids de ces 4 années de thèse s'envoler. Ces pages marquent véritablement la fin d'une aventure incroyable qui m'a fait rencontré un tas de personnalités hautes en couleur. Ces pages leurs sont totalement dédiées.

Je tiens tout d'abord à remercier mes rapporteurs, le **Pr Isabelle CREMER** et le **Pr Fabio MARTINON** pour avoir accepté de relire mon manuscrit de thèse, de m'avoir prodigué leurs conseils et de venir écouter et discuter des résultats de ces années de thèse lors de ma soutenance le 1er juillet 2016.

Merci au **Pr Mathias FAURE** qui, après m'avoir enseigné l'immunologie à l'université de manière fortement originale, a accepté de présider mon jury de thèse.

Merci au **Pr François GHIRINGHELLI** et au **Dr Nathalie BENDRISS-VERMARE** d'avoir régulièrement observé l'avancement de ma thèse durant mes comités de suivi de thèse, de m'avoir consacré un peu de votre temps et apporter vos conseils et de finalement participer à ma soutenance en tant qu'examineurs. **Nathalie**, tu as pu voir l'évolution de mon projet, de ses prémices (présentation à BMIC) à sa finalisation (soutenance de thèse). Je suis heureux de pouvoir te présenter ce travail (presque abouti) et je te remercie énormément pour tout le soutien que tu m'as apporté.

Mon merci le plus sincère et le plus profond va à ma directrice de thèse, le **Dr Virginie PETRILLI**. **Virginie**, je n'étais qu'un jeune étudiant de M1 lorsque je t'ai rencontré, il y a maintenant 5 ans ! 5 années à suivre ton enseignement et à perfectionner mon raisonnement scientifique. Je crois avoir eu énormément de chance de pouvoir apprendre tout ça à tes côtés et d'avoir pu compter sur ton encadrement hors pair. Toutes ces années à travailler sur l'inflammasome font qu'il restera toute ma vie dans un coin de ma tête. Je me rappellerai longtemps ces moments où tu venais nous trouver au laboratoire en fin de journée (parfois avec une tablette de chocolat entre les mains) pour nous proposer une petite pause et discuter pour se changer un peu les idées. Ce sont également ces moments non-scientifiques qui ont permis de maintenir ma motivation ! J'ai ainsi découvert l'univers des jeux de société et de nombreux restaurants (je suis devenu un inconditionnel de Flair) grâce à tes conseils. Je te souhaite le meilleur pour l'équipe et j'espère qu'on sera amené à retravailler ensemble dans un avenir plus ou moins proche.

Un grand merci à **Mélanie**, ma co-doctorante ! 4 années à partager nos galères et à se remotiver l'un l'autre. Je sais que je t'en ai mis plein les oreilles mais je suis sûr que rentrer



chez toi en chantant du Patrick Sébastien te manque un petit peu ;). Ta présence au labo au cours des derniers mois de ma thèse m'a clairement manqué et j'aurai bien aimé qu'on puisse décompresser ensemble lors de mes longues soirées de rédaction ^^ . En tous les cas, c'était génial d'avoir quelqu'un comme toi dans mon dos (littéralement) et j'espère retrouver une ambiance comme on arrivait à la mettre ensemble dans mon futur labo. A côté de ça, tu m'as refilé le virus du jeu de société et maintenant je n'arrête plus les parties de Seven Wonders (C'est malin :p). Je te souhaite le meilleur pour ton avenir mais je sais qu'au niveau professionnel tu as trouvé un boulot qui a l'air de te passionner et qu'au niveau personnel tout va pour le mieux avec ton mari Florent.

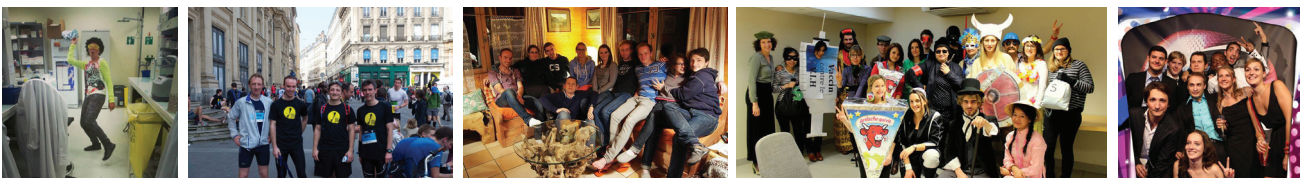
Aaaahh, **Sabine**, la maman de l'équipe ! Si sensible et paradoxalement si forte en caractère. On a eu bien de la chance de t'accueillir dans l'équipe il y a plus de deux ans maintenant. Même si j'ai tenté de te faire apprécier l'immunité, je sais maintenant que tu préféreras à jamais les ribosomes... Merci pour ta bonne humeur quotidienne qui permettait de réchauffer les coeurs et de régler les ptits soucis au labo. Merci pour ces histoires avec tes gamins qui nous font bien rire le midi. Merci pour ta bienveillance et ton soutien au quotidien. En bref, merci pour toutes ces petites choses qui font qu'on se sent bien quand on vient te voir.

Merci **Christine** pour ton aide à l'animalerie. On s'est quand même bien démené tous les deux pour maintenir nos élevages de souris ! On est devenu des pros du rasage et de l'injection intra-mammaire. Je te souhaite le meilleur pour la suite, en espérant que tu trouves bientôt un boulot où tu pourras te poser.

**Méryl**, la dernière venue ! Tu t'es vite intégrée à l'équipe mais j'avoue que nos centres d'intérêts scientifiques ne tournent pas autour des mêmes machines d'analyse. Tu es plutôt CFX-96 (analyse qPCR) alors que je suis plutôt Fortessa (cytométrie) ^^ . Mais bon, on rigole quand même bien ! J'espère ne pas trop te désespérer avec mes blagues incessantes. Tu reviens quand même un peu trop souvent toute bronzée de tes vacances ! Mais merci d'avoir tenté d'apporter le soleil à l'équipe (avec ton tee-shirt). Je te souhaite le meilleur pour la suite et une fin de Post-doc détonnante avec plein de papiers.

**Julie**, la petite stagiaire a bien grandi depuis le M1. Je suis bien content qu'on ait réussi à te convertir à la recherche et aux longues études ! Mais maintenant, c'est à ton tour de jouer. BMIC et la thèse te tendent les bras, j'espère que tu auras ton financement et que tu prendras la suite de nos projets. Avec Sabine et Méryl tout du moins, tu sais déjà que tu seras bien entourée. Surtout du courage pour ta future thèse et si tu as un coup de mou, je viendrai te rebooster !

Merci aux anciens de l'équipe **Nazli** et **Lionel** pour avoir participé à développer nos projets.



Merci à tous les stagiaires que j'ai formé durant ma thèse qui m'ont permis d'enseigner (chose que j'adore faire !) : **Mathilde, Julie, Rachel, et Estelle**. J'espère que vous avez apprécié mes conseils et mon enseignement, en tous les cas moi j'ai adoré vous former !

Mais mes remerciements ne peuvent s'arrêter à ma simple équipe. Merci à toutes les personnes qui partagent le 6ème étage du Cheney D du CRCL. En premier lieu, merci **Clément** de m'avoir apporté un peu de compagnie masculine au labo ! Je penserai à toi à chaque Zap de Spion que je regarderai et à chaque nouvel épisode de Star Wars. Tic et Tac ont fait une sacré équipe pendant un peu plus d'un an et je suis sûr que tu seras bientôt primé aux oscars pour tes interprétations de haute volée dans les films de thèse. J'espère que l'avenir te réserve une super année dans l'hémisphère Sud et qu'on se retrouvera en France quelques temps plus tard.

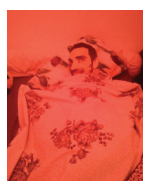
Merci **Marie** ! Tu le sais déjà mais qu'est-ce que c'est agréable de bosser avec ta joie débordante dans les parages. En repensant à toi, j'ai tellement de scènes qui me reviennent en mémoire... La soirée à Aussois, les minions, les soirées au barberousse, la frappadingue (et la «boue»), Chiomonte, et... le Placage en règle au -1. Et tout ça, dans la joie et la bonne humeur ^^.

Merci petite **Mélanie**, pour tes aides au quotidien et pour gérer une grande partie du 6ème à toi toute seule ! Enfin, ce que je retiendrai quand même c'est ta passion pour ta jument et pour le lion que tu héberges chez toi (hein ?! C'est juste un chat ?). Merci également pour les rigolades au quotidien et les discussions qui ont souvent tourné autour de nos «fabuleux» stagiaires ^^.

Un grand merci à **Béa** (Encore un pillier de notre laboratoire), **Léa** (l'homme parfait existe... ou pas), **Nelly** (Bientôt le César de la meilleure réalisatrice), **François, Karène, Audrey** (on a vraiment passé notre temps à se taquiner !), **Sofiane, Yann, Virginie** (la petite), **Carmen, Cédric** (le NEW CR !!) et **Jöelle** qui font vivre ce 6ème étage tous les jours !

Merci aux anciens du 6ème, **Florent** et **Marc** pour vos blagues un peu «borderline» et **Amandine** pour ta bonne humeur au quotidien (et tes talons hauts). Merci **Justine** et **Anne-Laure**, les anciennes thésardes du groupe Manié. Vous m'avez mis sur le chemin de la thèse et m'avez soutenu pendant mes stages donc un grand merci. Malgré la chaussette, je ne serai vraiment libre qu'après ma soutenance ;).

Le cheney D a bien changé mais avant, il y avait une grande histoire d'amour entre les personnes du 5ème et du 6ème du cheney D. Merci **Rémy**, tu es un sacré phénomène et tu as été un peu comme mon grand frère pendant tes dernières années de thèse. Merci pour tout tes conseils et de m'avoir guidé pendant mes premières années de thèse ! Je suis super heureux pour



toi et Sophie ! J'ai hâte de voir la bouille du petit Arthur.

Merci aux autres anciens, **Rami**, tes séances de sport au -1 resteront dans les annales. Merci **Chloé, Estelle et Doriane**, vos déguisements de mardi gras étaient géniaux, je vous souhaite le meilleur pour la suite et j'espère qu'on pourra se recroiser à Lyon ou dans des congrès ;).

Merci **Romain**, pour ces conversations venues d'ailleurs. Je me demande d'ailleurs si, ne serait-ce qu'une seule fois, nous nous sommes abstenus de parler de nos organes reproducteurs dans une conversation...

On arrive à la plus belle d'entre toutes : **Elise**, la princesse du royaume du CRCL ! Bon, je sais que nous ne resterons que des «collègues» (aaahhh, ces satanés échelles...) mais je tenais quand même à te remercier pour tous ces SUPER bons moments (faut-il vraiment que j'en fasse la liste ? Elle serait vraiment trop longue ^^). Il n'y a qu'un seul mot qui puisse te décrire parfaitement : Supercalifragilisticexpialidocious ! Où que tu atterrisses, n'oublie pas de nous envoyer une invitation quand tu démarreras ton post-doc ;). Je finirai de te remercier en citant Walt Disney : «if you can dream it, you can do it».

Merci à la grande **Team Caux** (trop de monde pour tous vous citer). Parmi vous, merci **Nathalie** (encore), **Marie-cécile, Nadège et Isabelle** pour votre aide.

Un immense merci à mes copains de promotions. **Loïc**, on a passé un temps fou à la bibliothèque universitaire pendant nos études et on est maintenant tous les deux pas loin de devenir chercheurs :). Merci pour ton aide précieuse, les répétitions avant les oraux, les fiesta après les exams, la visite de l'Ecosse. Merci **Thomas** également. On s'est mutuellement tiré vers le haut durant ces années de fac pendant lesquelles tu m'as, bien malgré moi au départ, transformé en Apple Addict ! Merci **Martin et Céline** ! On a été bien triste que vous partiez à Génissieux l'année dernière mais vous nous avez permis de rentrer un peu dans votre famille et on adore voir la petite **Couette-couette** grandir chaque fois qu'on peut descendre. Merci pour votre soutien, les apéros improvisés et les parties de Seven ;).

Merci **Nicolas et Amélien**, les thésards made in Caux, pour votre soutien au quotidien, les parties de poker et les rigolades. Si jamais vous arrêtez la science, vous pourrez toujours lancer une agence de maquinnat ou créer un nouveau concours de Miss ;). Merci **Florian**, pour tes tours de magie et les découvertes cinématographiques. On termine notre thèse le même jour et j'espère qu'on pourra fêter ça ensemble. En tous les cas, boutonne ta chemise jusqu'en haut pour le jour de la soutenance, c'est mieux ;).

Merci à mes collègues représentants à BMIC : **Thibault, Antoine, Laetitia**. Ca a été une





expérience très enrichissante et je pense qu'on a vraiment aidé notre école doctorale à évoluer et à écouter un peu plus ses étudiants.

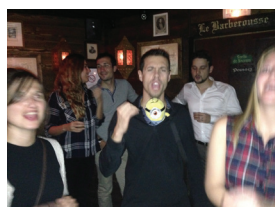
Merci au **Thierry** pour ton aide et ton implication à la fin de ma thèse et pour la collaboration que nous avons pu mettre en place. Merci **Annabelle** de m'avoir si bien accueilli les quelques fois où je suis venu faire des manip chez vous au CIRI.

Merci aux personnes hors labo qui m'ont soutenu du début à la fin de ces études. Merci mon **Jibi** ! Pas facile d'entretenir notre relation à distance mais ça tient toujours et ça tiendra encore longtemps. J'espère qu'on pourra bientôt repartir en voyage ensemble (et même à 4 ^^).

Merci à la fameuse bande créée grâce à l'ESMISAB. **Adrien, Canneton, Clémi, De Castres, Jacky, Lina, Poutch, et Tristano**, on a vécu de sacrées aventures aux quatre coins de la France pendant mes 4 années de thèse. Les fous-rire, les saint Sylvestre, le parapente, la Slackline, la via ferrata, les crêpe-parties, le beaujolais, les vosges, le musée de médecine, le roller... De grands moments qui m'ont permis de prendre un peu de recul. J'espère que cette bande se réunira encore souvent et je vous souhaite à tous du bonheur pour la suite (avec les bébés qui commencent à pointer le bout de leurs nez !!).

Un immense merci à mes **parents**. Si j'ai été un adolescent un peu turbulent par moment, merci de m'avoir toujours soutenu et d'avoir cru en moi malgré mes quelques échecs. J'ai finalement atteint le but que je cherchais à atteindre depuis que j'ai commencé à faire de la biologie et je vais bientôt devenir chercheur (ou plutôt trouveur hein ?!) ! Et tout cas, je sais que c'est en grande partie grâce à vous que je fais ce que j'ai toujours eu envie de faire aujourd'hui, alors encore merci. Merci **soeurette** ! Tu as toujours été là pour me donner un petit coup de pouce et tu es toujours la première à me féliciter (même dans les petites victoires), et ça, ça fait chaud au coeur :). Merci **Annie** pour ton soutien, ton accueil et les parties de tarot avant le dodo. J'aurai dû me méfier du proverbe : telle mère, telle fille ^^!

Enfin, je veux dire merci à **Alyson**. Je sais que ces 4 années n'ont pas été simple pour toi non plus et que ça n'a pas été facile de me supporter tous les jours mais tu m'as soutenu dans les moments les plus durs et je t'en suis reconnaissant. Merci d'avoir ce petit grain de folie (que j'ai aussi) qui anime notre petite vie. Merci de m'avoir permis de m'évader de Lyon et de m'éloigner du labo au cours de voyages extraordinaires. Finalement, c'est en septembre que commencera la véritable aventure ! Je suis sûr que l'avenir ne nous réserve que de bonnes surprises et de toute façon, tant que nous serons ensemble, tout ira bien.



---

# TABLE DES MATIÈRES

---

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>5</b>
<b>PRINCIPALES ABREVIATIONS</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>16</b>
<b>Chapitre 1. Le système immunitaire</b>	<b>17</b>
<b>A. Concepts de base en matière d'immunobiologie</b>	<b>17</b>
<b>B. L'immunité innée</b>	<b>19</b>
a. Les monocytes et macrophages	19
b. Les cellules dendritiques	21
c. Les granulocytes	22
i. Les neutrophiles	22
ii. Les autres cellules granulocytaires	22
d. Les cellules NK	22
<b>C. L'immunité adaptative</b>	<b>25</b>
<b>D. Conclusion du chapitre 1</b>	<b>27</b>
<b>Chapitre 2. L'inflammasome, un complexe primordial de l'immunité innée</b>	<b>28</b>
<b>A. Les récepteurs de l'immunité innée : les PRRs</b>	<b>28</b>
a. Les PRRs transmembranaires	29
i. Les TLRs	29
ii. Les CLRs	31
b. Les PRRs cytosoliques	33
i. Les RLRs et les senseurs de l'ADN	33
ii. Les NLRs	35
<b>B. Une plateforme moléculaire : l'inflammasome</b>	<b>37</b>
<b>C. Les inflammasomes</b>	<b>37</b>
a. NLRP1	37
i. Humain/Souris	37
ii. Mécanisme d'activation de l'inflammasome NLRP1b	39
b. NLRP3	41
i. Description	41
ii. Un mécanisme d'activation en 2 temps	42
iii. Régulation de l'inflammasome NLRP3	43
iv. L'inflammasome NLRP3 non canonique	44
c. AIM2	44
d. NLRC4	45
e. Autres inflammasomes	46
f. Inflammasomopathies	46
<b>D. Les autres composants de l'inflammasome</b>	<b>47</b>
a. L'adaptateur ASC	47
b. La caspase-1	47
c. La caspase-8	49

<b>E. Les fonctions biologiques régulées par l'inflammasome</b>	<b>49</b>
a. L'IL-1 $\beta$	49
b. L'IL-18	50
c. La régulation d'autres cytokines	51
d. La pyroptose	51
<b>F. Conclusion du Chapitre 2</b>	<b>53</b>
<b>Chapitre 3. Les cancers du sein et leur microenvironnement</b>	<b>55</b>
<b>A. Epidémiologie du cancer du sein</b>	<b>55</b>
<b>B. Classification des cancers du sein</b>	<b>55</b>
a. Classification histologique	56
b. Classification moléculaire	56
<b>C. Traiter les cancers du sein</b>	<b>57</b>
<b>D. La réponse immunitaire face au développement tumoral</b>	<b>57</b>
a. Les lymphocytes cytotoxiques face aux cellules tumorales mammaires	59
b. Les cellules NK dans les cancers du sein.	60
c. Subversion et échappement	61
<b>E. Inflammation et cancer du sein.</b>	<b>62</b>
a. L'inflammation à l'origine du cancer	62
b. L'inflammation favorise la progression tumorale	63
<b>F. Conclusion du chapitre 3</b>	<b>63</b>
<b>Chapitre 4. Inflammasome et cancer, amis ou ennemis ?</b>	<b>65</b>
<b>A. Le rôle de l'IL-1<math>\beta</math> au cours de la progression tumorale</b>	<b>65</b>
<b>B. Rôle de l'IL-18 au cours de la progression tumorale</b>	<b>67</b>
<b>C. L'inflammasome NLRP3 dans le cancer</b>	<b>67</b>
<b>Chapitre 5. Intérêt scientifique et problématique du projet de thèse</b>	<b>69</b>
<b>RÉSULTATS</b>	<b>73</b>
<b>Publication 1. La nécessité du clivage de la caspase-1 varie selon l'inflammasome activé.</b>	<b>74</b>
<b>Publication 2. L'inflammasome favorise la croissance tumorale en modulant l'activité des cellules NK</b>	<b>88</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>117</b>
<b>Chapitre 1. Mise en avant d'une auto-protéolyse de la caspase-1 différente selon les inflammasomes activés.</b>	<b>118</b>
<b>A. Les inflammasomes NLRP3 et NLRP1b fonctionnent indépendamment l'un de l'autre</b>	<b>118</b>
<b>B. L'autoprotéolyse de la caspase-1 n'est pas indispensable à son activité et dépend du</b>	



complexe moléculaire qui la recrute.	119
C. L'adaptateur ASC forme une plateforme pour amplifier l'inflammation	119
<b>Chapitre 2. Rôle de l'inflammasome au cours de la progression tumorale mammaire</b>	<b>121</b>
<hr/>	
A. Un rôle pour l'inflammasome, oui, mais pour quel inflammasome ?	121
B. De quelle manière l'inflammasome régule-t-il l'activité immunitaire anti-tumorale ?	124
a. Quelles sont les cellules à l'origine de l'activation de l'inflammasome ?	124
b. Les MDSC perturbent-elles la réponse anti-tumorale en présence de l'inflammasome ?	124
c. L'inflammasome inhibe l'activité anti-tumorale des cellules NK	126
C. Quel facteur, régulé par l'inflammasome, favorise la progression tumorale mammaire ?	128
a. L'IL-1 $\beta$ favorise-t-elle la croissance tumorale des cellules 4T1 en présence de la caspase-1 ?	128
b. Un rôle pour l'IL-18 dans la progression tumorale mammaire ?	130
c. Un rôle pour d'autres cytokines et mécanismes régulés par l'inflammasome ?	131
D. Un rôle de l'inflammasome dépendant ou indépendant du modèle 4T1 ?	132
E. L'inflammasome comme cible thérapeutique ?	132
<b>Chapitre 3. Conséquence de la suppression de l'inflammasome dans un modèle de tumeurs spontanées de la glande mammaire</b>	<b>135</b>
<hr/>	
<b>CONCLUSION</b>	<b>137</b>
<b>MATERIEL ET METHODES SUPPLEMENTAIRES</b>	<b>139</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>140</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>167</b>
<b>Annexe 1 : Assessing Caspase-1 Activation</b>	<b>169</b>
<hr/>	



---

## PRINCIPALES ABBREVIATIONS

---

ADCC	Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AIM2	Absent In Melanoma 2
AOM	azoxymethane
APAF-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
ARN	Acide Ribonucléique
ASC	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD
ATP	Adénosine TriPhosphate
BIR	Baculoviral Inhibition of apoptosis protein Repeat domain
BRCC3	BRCA1/BRCA2-containing complex 3
CAPS	Cryopyrin-associated periodic syndrome
CARD	Caspase Recruiting Domain
CARDIF	CARD adapter inducing Interferon beta
CCI	Carcinome Canalaire Infiltrant
CCIS	Carcinome Canalaire In Situ
CCL	CC-Chemokine Ligand
CD	Cluster of Differentiation
cGAMP	dinucléotide cyclique 2',5'cGAMP
cGAS	cyclic GMP-AMP Synthase
CIITA	Class II transactivator
CINCA	Chronic Infantile Neurological, Cutaneous, and Articular
CLR	C-type Lectin Receptor
DAI	DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors
DAMP	Danger Associated Molecular Pattern
DED	Death Effector Domain
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DSS	Dextran-sodium sulfate
FCAS	Familial Cold Autoinflammatory Syndrome
FIIND	Function to Find
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulation Factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GTP	Guanosine TriPhosphate
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HMGB1	High-Mobility Group Box 1
IFI16	Interferon gamma-inducible protein 16
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
I $\kappa$ B $\alpha$	Inhibitor of NF- $\kappa$ B alpha
IL	Interleukine
IL-18BP	Interleukine-18 Binding Protein
IL-1Ra	IL-1 Receptor antagonist
IRAK	IL-1receptor-associated kinase
IRF	Interferon Regulating Factor
K <sup>+</sup>	Ion potassium
KIR	Killer cell Immunoglobulin-like Receptor
LBP	LPS Binding Protein

LGP	Laboratory of Genetics and Physiology
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucin Rich Repeat
LT	Lethal Toxin
MAL	MyD88 Adapter-Like
MAP-K	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAVS	Mitochondrial AntiViral Signaling
MDA	Melanoma Differentiation-Associated gene
MDP	Muramyl Dipeptide
MDSC	Myeloid-derived Suppressor Cell
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMP-9	Matrix metalloproteinase 9
MMTV	Mouse mammary tumor virus
MSU	Monosodium Urate Crystals
MWS	Muckle-Wells Syndrome
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NACHT	NAIP, CIITA, HET-E et TP1
NAIP	NLR family of Apoptosis Inhibitory Proteins
NCR	Natural Cytotoxicity Receptor
NEK	Never in mitosis A (NIMA)-related Kinase
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa B
NK	Natural Killer
NKG2D	Natural Killer Group 2D
NLR	Nod Like Receptor
NLRC	NLR family CARD domain-containing family
NLRP	NACHT, LRR, and PYD (Pyrin Domain) domain-containing family
NOD	Nucleotide Oligomerization Domain
NSCLC	Non-small cell lung cancer
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PD-1	Programmed Death 1
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PRR	Pattern Recognition Receptor
PYD	Pyrin Domain
PYHIN	Pyrin and HIN domain
RIG	Retinoic acid-Inducible Gene
RIP	Receptor-Interacting Protein
RLR	Rig Like Receptor
ROS	Reactive Oxygen Species
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
STING	Stimulator of IFN Genes
TBK1	TANK Binding Kinase
TCR	T Cell Receptor
TIR	Toll/IL-1 Receptor
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAF	TNF-receptor-associated factor
Treg	T Regulator cell
TRIF	Toll-interleukin-1 receptor-domain-containing adapter-inducing IFN- $\beta$
TXNIP	thioredoxin-interacting protein
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule 1

# **INTRODUCTION**

---

## Chapitre 1. Le système immunitaire

---

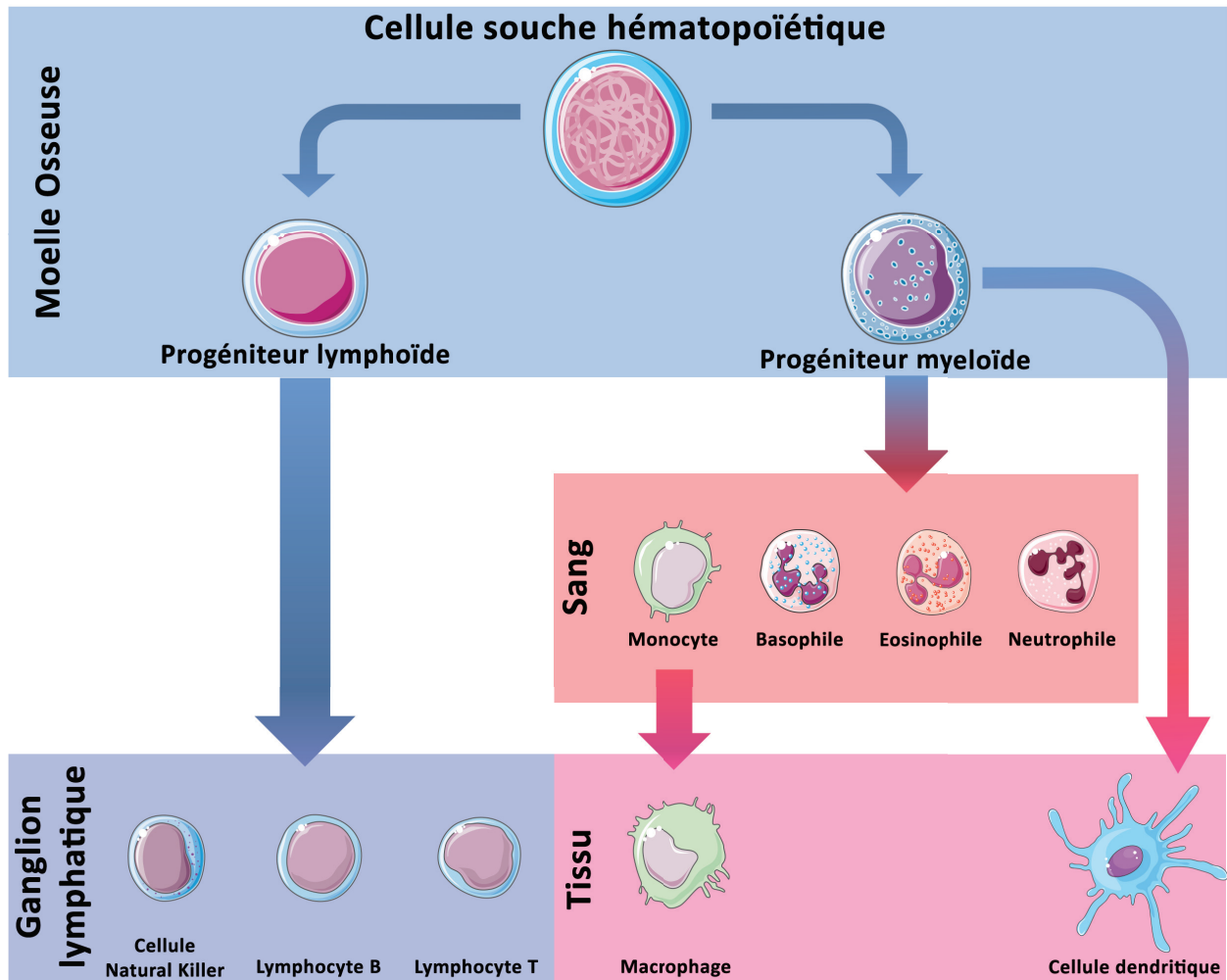
### A. Concepts de base en matière d'immunobiologie

L'organisme est constamment soumis à des facteurs tels que les agents infectieux ou d'autres substances comme des toxines contre lesquels il doit se protéger. Le mécanisme de défense de notre organisme est constitué de cellules effectrices et de diverses molécules solubles qui forment le système immunitaire (Murphy et al., 2012).

Lorsqu'un agent pathogène ou une toxine parvient pour la première fois à franchir les barrières de l'organisme que sont les muqueuses et la peau notamment, le système immunitaire entre en jeu. Les premières cellules à réagir à l'infection sont les phagocytes résidents dans les tissus ou les muqueuses. Comme leur nom l'indique, ce sont des cellules capables de phagocyter, ingérer et détruire, tout agent pathogène avec lequel elles sont en contact. Dans cette catégorie de cellules, on retrouve plus particulièrement les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles. En matière d'évolution, il est important de noter que les phagocytes sont des types cellulaires que l'on retrouve chez tous les animaux. Cette première ligne de défense contre les pathogènes permet de contenir et d'éliminer la plupart des infections (Murphy et al., 2012).

Permettant de soutenir cette première phase de réponse, l'évolution des organismes a permis l'émergence d'un second type de réponse immunitaire, il s'agit de la réponse immunitaire adaptative. Contrairement à l'immunité innée, l'immunité adaptative met quelques heures à quelques jours pour se mettre en place mais permet une réponse bien plus efficace et spécifique contre les infections (Murphy et al., 2012). Cette adaptation du système immunitaire n'existe que chez les vertébrés et dépend d'un mécanisme de reconnaissance spécifique du pathogène afin d'orienter la réponse immunitaire contre lui. L'immunité adaptative se base sur la détection d'antigènes, des molécules du «non-soi», par des cellules qui portent des récepteurs spécialisés et uniques. En effet, les milliards de cellules qui composent ce système adaptatif sont autant de récepteurs différents qui, ensemble, peuvent reconnaître tout antigène auquel l'organisme peut être exposé. Grâce à cette réponse spécifique, le système immunitaire se focalise alors sur le/les antigènes détectés pour cibler l'agent pathogène qui aurait franchi la barrière de l'immunité innée. La réponse adaptative se traduit alors par une prolifération de clones de lymphocytes et une production massive d'anticorps reconnaissant les antigènes cibles qui persistent dans l'organisme, empêchant une seconde infection par le même pathogène. Cette capacité de mémoire génère également une immunité à long terme permettant une réponse à la fois plus rapide et plus puissante lors d'une seconde rencontre avec l'agent infectieux. C'est cette mémoire immunologique qui est utilisée dans le principe des vaccins (Murphy et al., 2012).

Les cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative ont toutes pour origine une



**Figure 1 : Différenciation et localisation des cellules du système immunitaire.**

Les cellules souches hématopoïétiques débutent leur différenciation dans la moelle osseuse en devenant des progéniteurs lymphoïdes ou myéloïdes. Après leur maturation à partir des progéniteurs lymphoïdes, les lymphocytes T, B résident dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques. Une partie des cellules NK résident également dans les ganglions tandis qu'une autre patrouille continuellement dans la circulation sanguine. Les progéniteurs myéloïdes sont les précurseurs des monocytes et des granulocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles) qui patrouillent dans le sang. Lors de l'inflammation, ils traversent l'endothélium vasculaire pour migrer vers le tissu endommagé. Les macrophages et les cellules dendritiques sont des cellules résidentes des tissus et forment le premier rempart immunitaire face aux pathogènes.

cellule souche hématopoïétique multipotente présente dans la moelle osseuse. Dans un premier temps, la cellule souche hématopoïétique peut se diviser pour donner deux types de progéniteurs différents : les progéniteurs lymphoïdes et les progéniteurs myéloïdes (Murphy et al., 2012) (Figure 1). L'observation des cellules immunitaires est possible via le marquage des molécules qu'elles expriment à leur surface au moyen d'anticorps. Chez la souris, comme chez l'homme, toutes les cellules immunitaires issues des cellules souches hématopoïétiques peuvent être observées via le marqueur CD45 (Cluster of Differentiation 45) qu'elles expriment.

## **B. L'immunité innée**

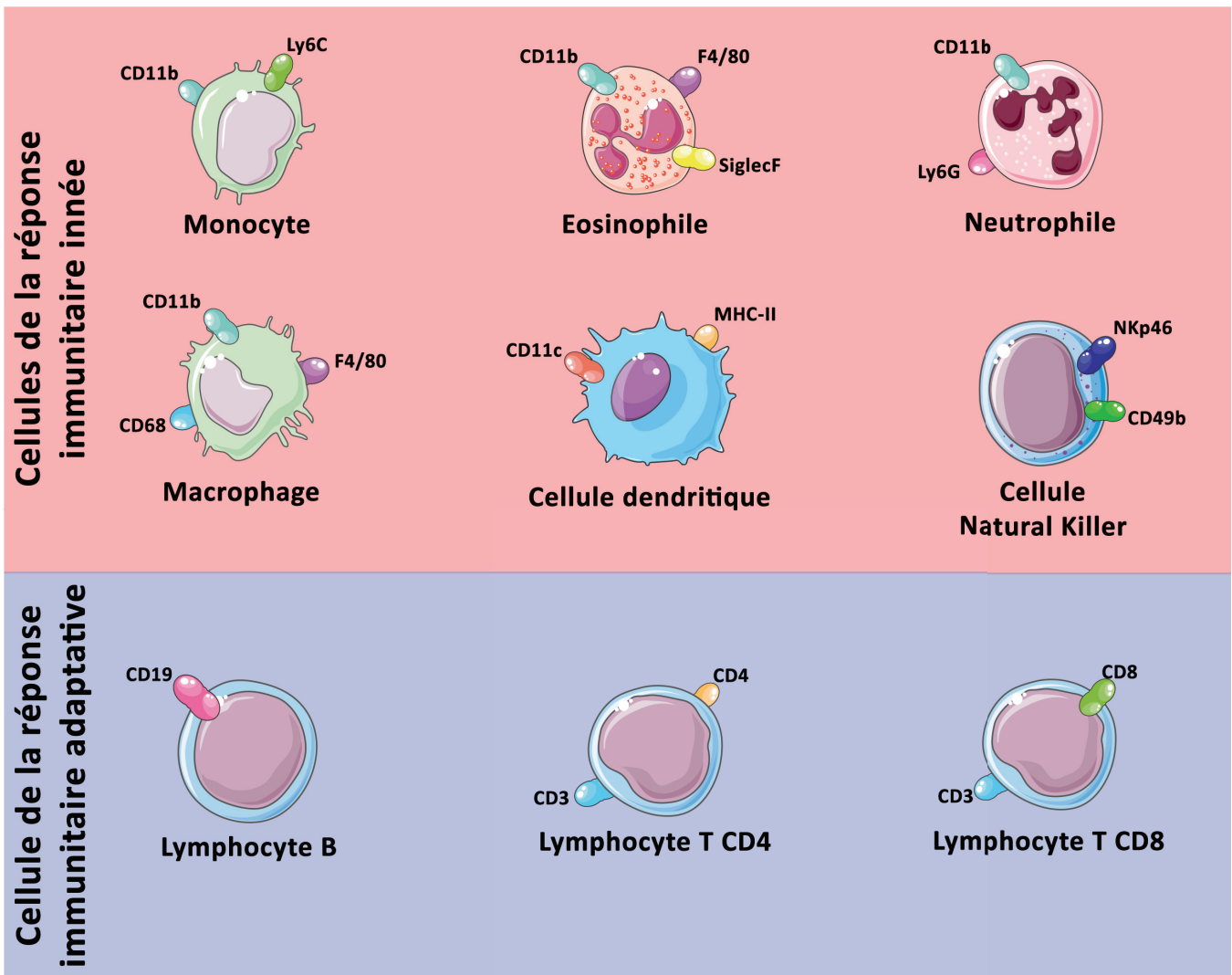
Les cellules de l'immunité innée sont issues des progéniteurs myéloïdes de la moelle osseuse (Figure 1). Seule exception, les cellules lymphoïdes innées (ILC), dont font partie les cellules tueuses naturelles (cellules NKs), sont issues des progéniteurs lymphoïdes mais font partie de la réponse immunitaire innée (Spits et al., 2013).

### **a. Les monocytes et macrophages**

Les monocytes sont des globules blancs circulant continuellement dans les vaisseaux sanguins (Figure 1). Lorsqu'ils extravasent et migrent vers un tissu, ils se différencient généralement en macrophages et parfois en cellules dendritiques selon les signaux moléculaires qu'ils reçoivent. Les macrophages sont donc des cellules tissulaires. Historiquement, les macrophages résidents dans certains tissus se sont vus donner différents noms tels que cellules microgliales dans le cerveau ou cellules de Kupffer dans le foie. Présents dans tous les tissus de notre organisme, les macrophages et les monocytes font partie de l'une des 3 classes de cellules qui ont la capacité de phagocyter. Cette caractéristique leur permet d'ingérer et de détruire tout micro-organisme qui a pu pénétrer dans un tissu. En effet, lorsque le macrophage phagocyte un pathogène, ce dernier se retrouve capturé dans le phagosome à l'intérieur du macrophage. Le phagosome fusionne alors avec le lysosome qui contient des enzymes puissantes, dont des lipases et des protéases, et des radicaux libres permettant la dégradation de l'agent pathogène. Via cette fonction de phagocyte, les macrophages sont capables d'éliminer les pathogènes ainsi que les cellules qui ont été ciblées par le système immunitaire adaptatif (Flannagan et al., 2012).

En absence de toute infection, les macrophages résidents des tissus fonctionnent comme des sentinelles en absorbant tous les débris et les restes de cellules mortes. La surface de leur membrane plasmique est composée de nombreux récepteurs leur permettant de détecter des pathogènes, des substances étrangères (silice ou amiante), ou des cellules endommagées (Taylor et al., 2005). Ces récepteurs, nommés Pattern Recognition Receptors (PRRs), seront détaillés au chapitre suivant. L'activation de ces PRRs induit la phagocytose, l'activation des macrophages et provoque la sécrétion de nombreux médiateurs de l'inflammation dont des cytokines





**Figure 2 : Schéma des marqueurs retrouvés à la surface des cellules immunitaires chez la souris.**

Les cellules immunitaires sont identifiables via les marqueurs qu'elles expriment à leur surface. De manière générale, les cellules dérivées de la souche hématopoïétique expriment le marqueur CD45 (non indiqué).

et chimiokines (Elinav et al., 2011a; Flannagan et al., 2012; Iwasaki and Medzhitov, 2015; Kawai and Akira, 2011).

L'inflammation provoque tout d'abord une forte prolifération et un fort recrutement de monocytes et de neutrophiles au sein du tissu endommagé, grâce au facteur de croissance G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) et à la sécrétion des chimiokines CC-Chemokines Ligands 2 (CCL2) et CCL5 (Serbina et al., 2008), puis le recrutement de lymphocytes de la réponse immunitaire adaptative. Les macrophages dérivés des monocytes recrutés sur le site inflammatoire peuvent avoir différentes fonctions selon les types de signaux qu'ils reçoivent. Activés via leurs PRRs, les macrophages s'orientent vers un type M1 et participent à la défense contre les bactéries, les virus, les parasites et également à la lutte contre l'apparition de cellules tumorales. Activés via la cytokine IL (interleukine)-4, les macrophages s'orientent vers un type M2 et participent à la réparation tissulaire et à la synthèse de molécules anti-inflammatoires tels que le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor-beta) (Italiani and Boraschi, 2014; Murray and Wynn, 2011).

Les monocytes et les macrophages expriment, comme la majorité des cellules myéloïdes, le marqueur CD11b. En plus de ce marqueur, les monocytes expriment Ly6C tandis que les macrophages expriment les marqueurs F4/80 et CD64 (Figure 2).

## **b. Les cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques sont la seconde classe de cellules capables de phagocyter. Leur nom vient de leur particularité physique à disposer de longues dendrites telles qu'on peut les observer sur les cellules du système nerveux. Ces dendrites leur permettent de scanner leur environnement à la recherche d'éléments à ingérer. En plus de la phagocytose, les cellules dendritiques absorbent également le liquide extracellulaire via la macropinocytose et utilisent un mécanisme d'endocytose médiée par récepteur. Le rôle des cellules dendritiques diffère cependant de celui des macrophages. Alors que l'absorption d'un pathogène est directement liée à son éradication chez les macrophages, le rôle premier des cellules dendritiques est l'édition d'antigènes provenant des pathogènes qu'elles vont ensuite présenter via leur complexe majeur d'histocompatibilité (MHC)(Segura and Villadangos, 2009). Activées par les pathogènes, les cellules dendritiques migrent alors vers les organes lymphoïdes secondaires, tels que les ganglions lymphatiques, afin de déclencher la réponse immunitaire adaptative via la présentation d'antigènes aux lymphocytes T et l'expression de molécules de co-stimulation telles que CD80 et CD86 (Randolph et al., 2005).

Les marqueurs présents à la surface des cellules dendritiques peuvent rapidement évoluer du fait qu'elles sont des cellules présentatrices d'antigènes. Cependant, de manière générale, il est possible de les observer chez la souris grâce au CD11c et au marqueur d'activation MHC de classe II qu'elles expriment le plus souvent (Figure 2).

## **c. Les granulocytes**

### **i. Les neutrophiles**

Les neutrophiles sont la troisième et dernière catégorie de cellules ayant la capacité de phagocyter. Leur vie est particulièrement courte comparée aux cellules dendritiques et aux macrophages, et ils résident principalement dans le sang en absence d'inflammation. Les neutrophiles sont les premières cellules recrutées sur un site inflammatoire, elles ingèrent de nombreux pathogènes et procèdent à leur élimination rapide grâce à de puissantes molécules antimicrobiennes (Amulic et al., 2012; Segal, 2005). D'abord considérés, à tort, comme de simples phagocytes, les études récentes montrent que les neutrophiles permettent l'amplification de la réponse inflammatoire via la sécrétion de cytokines telles que l'IL-8 ou l'IL-1 $\beta$  (Karmakar et al., 2016; Tecchio et al., 2014). De plus, via des interactions cellulaires directes, les neutrophiles ont la capacité d'activer les cellules dendritiques, et favorisent ainsi la production d'IL-12 permettant d'induire la prolifération des lymphocytes T et l'activation des cellules NK (Amulic et al., 2012).

A l'instar des monocytes et des macrophages, les neutrophiles expriment le marqueur CD11b. De plus, elles se distinguent des autres cellules par la forte expression du marqueur Ly6G (Figure 2).

### **ii. Les autres cellules granulocytaires**

Les éosinophiles, les basophiles et les mastocytes sont également des cellules granulocytaires mais leur fonction est beaucoup moins connue. Ces trois types cellulaires sont principalement connus pour leur implication dans la réponse allergique où leur rôle est plus délétère que protecteur (Stone et al., 2010). Aujourd'hui, on considère qu'elles forment la défense immunitaire contre les parasites. Elles contiennent des granules remplis d'enzymes et de protéines toxiques libérées lorsqu'elles sont activées.

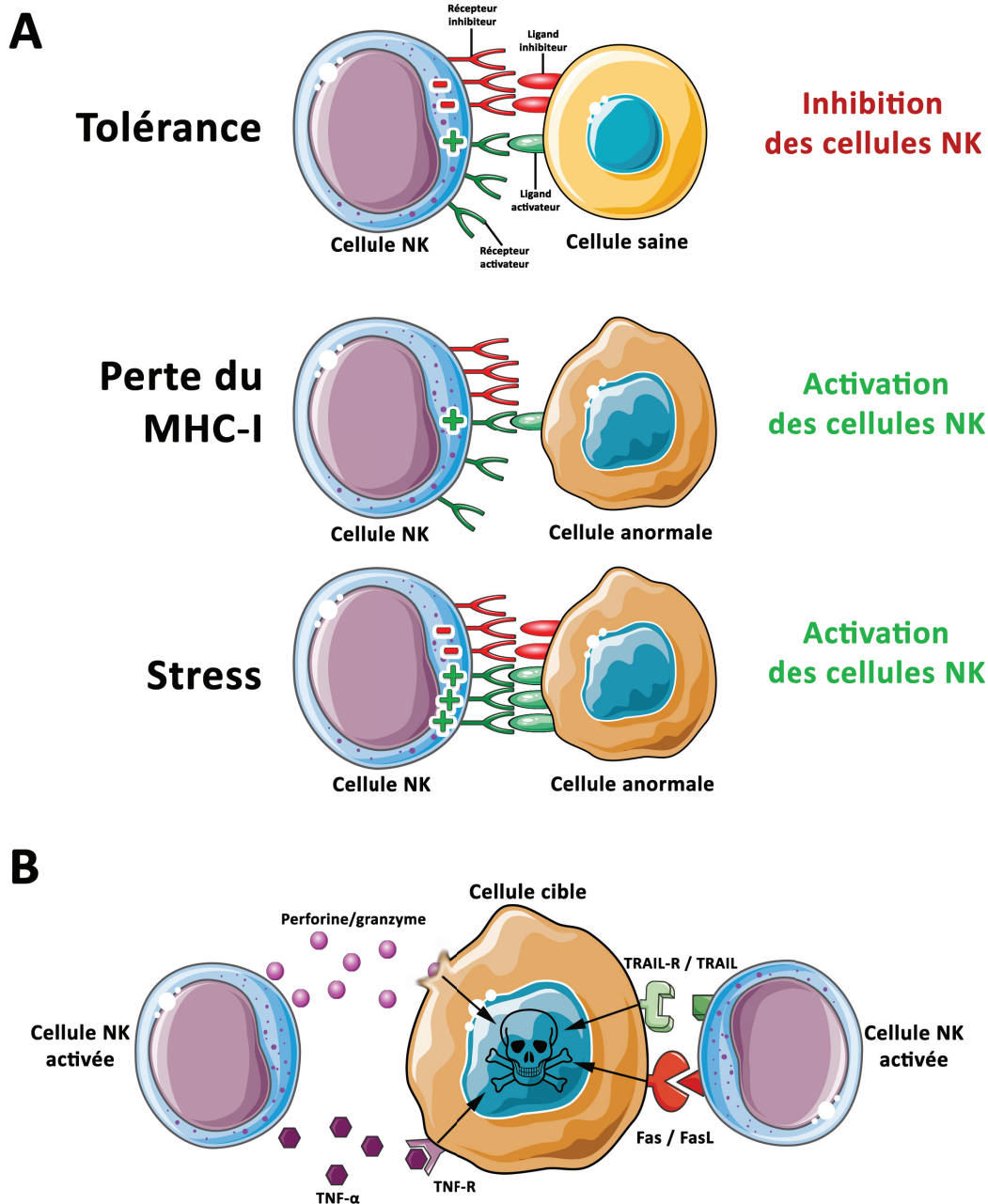
## **d. Les cellules NK**

Les cellules NK sont des cellules immunitaires innées issues du lignage des cellules lymphoïdes (Figure 1). Sur un site inflammatoire, les cellules NK sont activées par l'interféron-alpha (IFN- $\alpha$ ) sécrété par les macrophages. En agissant en synergie, l'IL-12 et l'IL-18 sont également capables d'activer les cellules NK et de les faire produire de grande quantité d'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ) (Takeda et al., 1998). Au sein de l'organisme, les cellules NK ont la faculté de distinguer une cellule infectée ou anormale, d'une cellule saine. Cette distinction est possible grâce à une somme de signaux activateurs et inhibiteurs émis par les cellules (Long et al., 2013) (Figure 3A). En effet, les cellules NKs entrent en contact avec les cellules environnantes grâce aux récepteurs qu'elles possèdent à leur surface (Pegram et al., 2011). Parmi ces récepteurs, les KIRs (Killer-cell immunoglobulin-like receptors) permettent aux cellules NKs de sonder la présence du complexe

majeur d'histocompatibilité de classe 1 (MHC-I) (Ivarsson et al., 2014). La présence du MHC-I sur les cellules cibles provoque l'induction d'un signal inhibiteur, rendant les cellules NK tolérantes, ou activateur selon le récepteur KIR impliqué dans la détection (Ivarsson et al., 2014). D'un autre côté, les cellules NK expriment également un grand nombre de récepteurs pouvant provoquer leur activation en présence d'un ligand. Parmi eux, le récepteur NKG2D (Natural Killer Group 2D) a été particulièrement bien étudié chez l'humain et la souris (Jamieson et al., 2002; Steinle et al., 2001). Les ligands de NKG2D, homologues du MHC I, sont peu exprimés par les cellules normales, cependant, en condition de stress, d'infection ou de prolifération excessive, leur expression augmente fortement, envoyant un signal activateur aux cellules NK et provoquant leur activation (Figure 3A)(Bauer et al., 1999; Cosman et al., 2001; Steinle et al., 2001). Les récepteurs cytotoxiques naturels (NCRs), tels que NKp46 ou NKp30, sont également des récepteurs activateurs dont les ligands se composent de protéines encodées par les virus, les bactéries ou les parasites (Hudspeth et al., 2013; Magri et al., 2011). DNAM1 (DNAX accessory molecules) est également un récepteur activateur des cellules NK dont les ligands font partie de la famille des Nectin (Gilfillan et al., 2008) et sont exprimés par un grand nombre de types cellulaires et par certaines tumeurs. Enfin, de manière intéressante, le récepteur CD16 (ou FcγRIII) présent sur les cellules NK reconnaît la partie constante (Fc) des immunoglobulines de type G (IgG) et permet l'induction d'une cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC – Antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity) (Anegón et al., 1988; Perussia et al., 1983). En définitive, les cellules sur-exprimant des ligands activateurs ou sous-exprimant des ligands inhibiteurs deviennent les cibles de la cytotoxicité induite par les cellules NK (Figure 3A).

L'activité cytotoxique des cellules NK est liée à deux principales voies de signalisation aboutissant à la mort de la cellule cible. Tout d'abord, l'activation d'une cellule NK aboutit à la sécrétion par exocytose de granules cytotoxiques. La perforine et les granzymes contenues dans ces granules provoquent la mort de la cellule par apoptose. Les cellules stressées expriment également la récepteur Fas (CD95) à leur surface qui peut être activé par son ligand FasL (CD178) exprimé par les cellules NK et les lymphocytes T CD8 activés (Figure 3B). L'activation de FAS conduit à la mort des cellules via l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose. En plus de FAS, les cellules NK peuvent exprimer TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) qui peut interagir avec ses deux récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2. Une fois activé par TRAIL, ces deux récepteurs engagent la voie extrinsèque de l'apoptose via l'activation de FADD et caspase-8 (Chávez-Galán et al., 2009). Enfin, les cellules NK activées sécrètent du TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor-alpha) qui, en se liant à son récepteur à la surface des cellules cibles, provoque également la mort par apoptose (Figure 3B) (Chávez-Galán et al., 2009).

Les cellules NK expriment des marqueurs différents selon le fond génétique des souris. Les souris de fond génétique BALB/c, expriment notamment les marqueurs Ly49b et NKp46 (Fi-



**Figure 3 : Mécanisme d'activation et d'induction de mort des cellules NK.**

(A) L'activation ou la tolérance des cellules NK repose sur une addition de signaux activateurs et inhibiteurs envoyés par les cellules ciblées. Une cellule saine enverra une succession de signaux inhibiteurs notamment via l'expression du CMH de classe I. La diminution de l'expression du CMH I aboutira à une absence de signal inhibiteur provenant de la cellule et à une activation de la cellule NK. Une cellule infectée ou stressée pourra également exprimer fortement des ligands activateurs des cellules NK.

(B) Pour conduire à la mort cellulaire, les cellules NK sécrètent, d'une part, des enzymes (perforine/granzyme) ou du TNF- $\alpha$ . D'autre part, les cellules NK activées expriment à leur surface le ligand de FAS et TRAIL permettant d'activer la voie extrinsèque de l'apoptose chez la cellule cible.

gure 2) tandis que les souris de fond C57BL/6 expriment le marqueur NK1.1. Techniquement, il est possible d'utiliser un anticorps dirigé contre NK1.1 pour dépléter la population de cellules NK spécifiquement chez la souris C57BL/6. Chez la souris BALB/c, il est possible d'utiliser des anticorps dirigés contre l'antigène Asialo-GM1 pour dépléter les cellules NK, cependant cela aboutit également à la déplétion de certaines populations de cellules myéloïdes (Nishikado et al., 2011).

### C. L'immunité adaptative

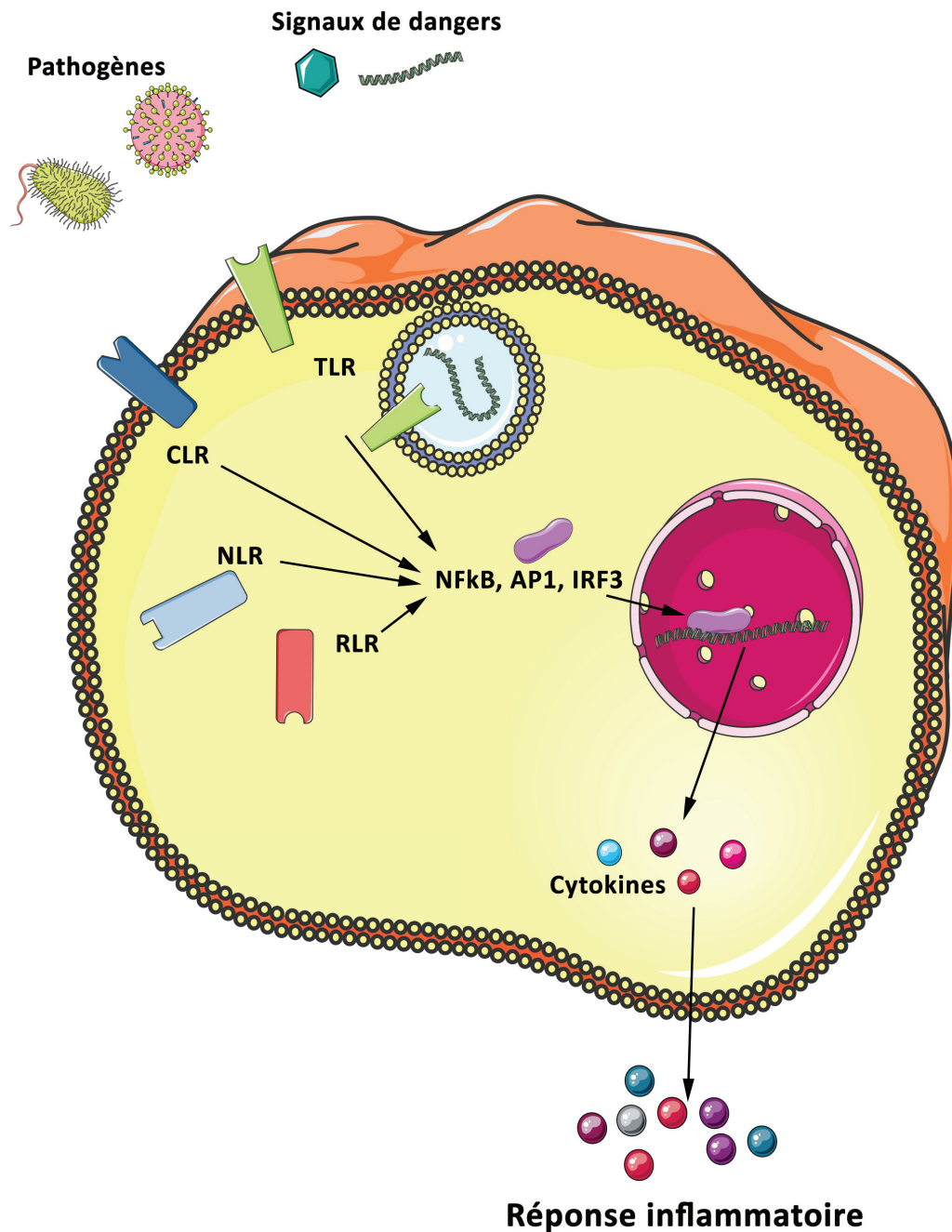
Outre les cellules du système immunitaire inné, les cellules souches hématopoïétiques peuvent également se différencier en cellules de l'immunité adaptative. Cette immunité est composée des lymphocytes T et B (Figure 1).

Les lymphocytes T se développent exclusivement dans le thymus et se divisent en 2 populations les T CD4+ et T CD8+ (Figure 2). En fin de maturation, ils rejoignent les organes lymphoïdes secondaires où ils attendent un signal de l'immunité innée pour s'activer et déclencher la réponse immunitaire adaptative. Les lymphocytes T ont la particularité d'exprimer le TCR (T cell receptor), un récepteur issu d'un réarrangement génique. Le TCR exprimé par les cellules T CD8 permet la reconnaissance d'un complexe MHC I-peptide spécifique (van der Merwe and Dushek, 2011). Lors de la reconnaissance d'un signal par le TCR et d'un signal de co-stimulation via les récepteurs CD80 et CD86, les lymphocytes T CD8 entrent dans une phase d'expansion clonale. Les lymphocytes T CD8 ainsi générés participent à la réponse immunitaire via leur fonction cytotoxique. Comme les cellules NK, les lymphocytes T CD8 induisent la mort des cellules ciblées notamment via la voie Fas/FasL, la voie perforine/granzyme et la voie du TNF (Chávez-Galán et al., 2009). Une fois la menace éliminée, une partie des T CD8 va survivre devenant des lymphocytes T mémoires.

Contrairement aux lymphocytes T CD8, le TCR des lymphocytes T CD4 reconnaît un complexe MHC II-peptide. Une fois activé, les lymphocytes T CD4 ont la particularité de se différencier en différents sous-types cellulaires n'ayant pas les mêmes fonctions. Actuellement, on distingue six sous-types de cellules T CD4 : Th1, Th2, Th9, Th17, T régulateurs (Treg) et T follicular helper (Tfh) (Luckheeram et al., 2012). Contrairement aux T CD8, les lymphocytes T CD4 ne possèdent pas de forts effets cytotoxiques directs mais soutiennent la réponse immunitaire via la sécrétion de cytokines telles que l'IL-2 qui stimule la prolifération lymphocytaire. Il est intéressant de noter que parmi les sous-types de T CD4, les Treg sont une population qui possède un rôle anti-inflammatoire et régule négativement la réponse immunitaire.

Les lymphocytes B se développent exclusivement dans la moelle osseuse avant de rejoindre les organes lymphoïdes secondaires. La reconnaissance d'un antigène par le BCR (B-cell receptor), également issu d'un réarrangement génique, conduit à la maturation du lymphocyte B en plasmocyte (Nutt et al., 2015) ou en lymphocyte B mémoire. Le principal rôle du plasmocyte est la génération d'immunoglobuline (Ig), ou anticorps. Les anticorps sont des molécules haute-





**Figure 4 :** La réponse immunitaire innée repose sur l'expression de Pattern Recognition Receptor permettant de détecter des signaux de danger ou émanant de pathogènes.

Il existe 4 grandes familles de PRR. Les CLR et les TLRs sont des récepteurs transmembranaires scrutant l'extérieur de la cellule. Certains TLRs sont spécifiquement exprimés à la membrane des endosomes. Les NLRs et les RLRs sont des récepteurs intracellulaires permettant de détecter tout danger ou pathogène ayant pénétré dans le cytosol des cellules.

L'activation de l'un ou l'autre de ces récepteurs aboutit à l'activation d'un programme transcriptionnel pro-inflammatoire et à la sécrétion de cytokines et chimiokines permettant d'induire l'inflammation.

ment spécifiques d'un antigène et qui permettent la neutralisation du pathogène. Une fois fixés sur la bactérie ou le virus cible, les anticorps sont reconnus par les macrophages et les neutrophiles et induisent la phagocytose, un processus dit d'opsonisation (Pieper et al., 2013). En cas d'une seconde infection par le même antigène, les lymphocytes B mémoires permettent une réponse plus intense, plus rapide et plus longue. Chez la souris, les lymphocytes B sont facilement identifiables par le marqueur CD19 qu'ils expriment à leur surface.

#### **D. Conclusion du chapitre 1**

Le système immunitaire est un dispositif biologique extrêmement complexe qui implique différents organes, un grand nombre de cellules et une grande variété de substances interagissant les unes avec les autres. La détection du pathogène ou du signal de danger est primordial et permet d'aboutir à une coordination des cellules immunitaires pour l'élimination de la menace. Ce premier événement est lié aux récepteurs de l'immunité innée qui seront traités dans le chapitre suivant.



---

## Chapitre 2. L'inflammasome, un complexe primordial de l'immunité innée

---

### A. Les récepteurs de l'immunité innée : les PRRs

Dans le but de combattre les micro-organismes étrangers, le système immunitaire inné possède un grand nombre de récepteurs reconnaissant des motifs moléculaires des pathogènes (PAMPs) encodés de manière germinale nommés Pattern Recognition Receptors (PRRs). Ces récepteurs sont cependant bien moins nombreux que les récepteurs de l'immunité adaptative. De manière générale, la reconnaissance d'un PAMP par un PRR active une voie de signalisation aboutissant à une réponse inflammatoire via la sécrétion de cytokines et l'activation de la réponse immunitaire adaptative (Figure 4). Bien que spécifique d'un motif moléculaire, ces récepteurs ont également une certaine forme de redondance puisqu'ensemble, ils peuvent reconnaître des composants différents d'un même pathogène, il est donc généralement admis qu'ils agissent de concert et non indépendamment les uns des autres. Les PRRs faisant partie de la réponse immunitaire innée, ils sont principalement exprimés par les cellules immunitaires innées, à savoir les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles. Il est intéressant de noter que d'autres types cellulaires expriment également des PRR tels que les cellules épithéliales (Takeuchi and Akira, 2010).

Historiquement, Charles Janeway a développé l'hypothèse selon laquelle nos cellules immunitaires détectent et répondent à tout motif moléculaire de pathogène. Cependant, ce modèle n'expliquait pas comment notre système immunitaire distinguait les bactéries commensales des bactéries pathogènes. Pour y répondre, P. Matzinger avance une théorie alternative selon laquelle notre système immunitaire inné ne fait pas de distinction entre le «soi» et le «non-soi» mais répond aux signaux de dangers émis par les cellules de l'organisme (Matzinger, 1994). En réalité, il semblerait que les processus mis en avant dans ces théories soient complémentaires. En ne se contentant pas de distinguer le «soi» du «non-soi», notre système immunitaire est capable d'induire une réponse inflammatoire en réaction à toute situation délétère pour notre organisme (Pradeu and Cooper, 2012).

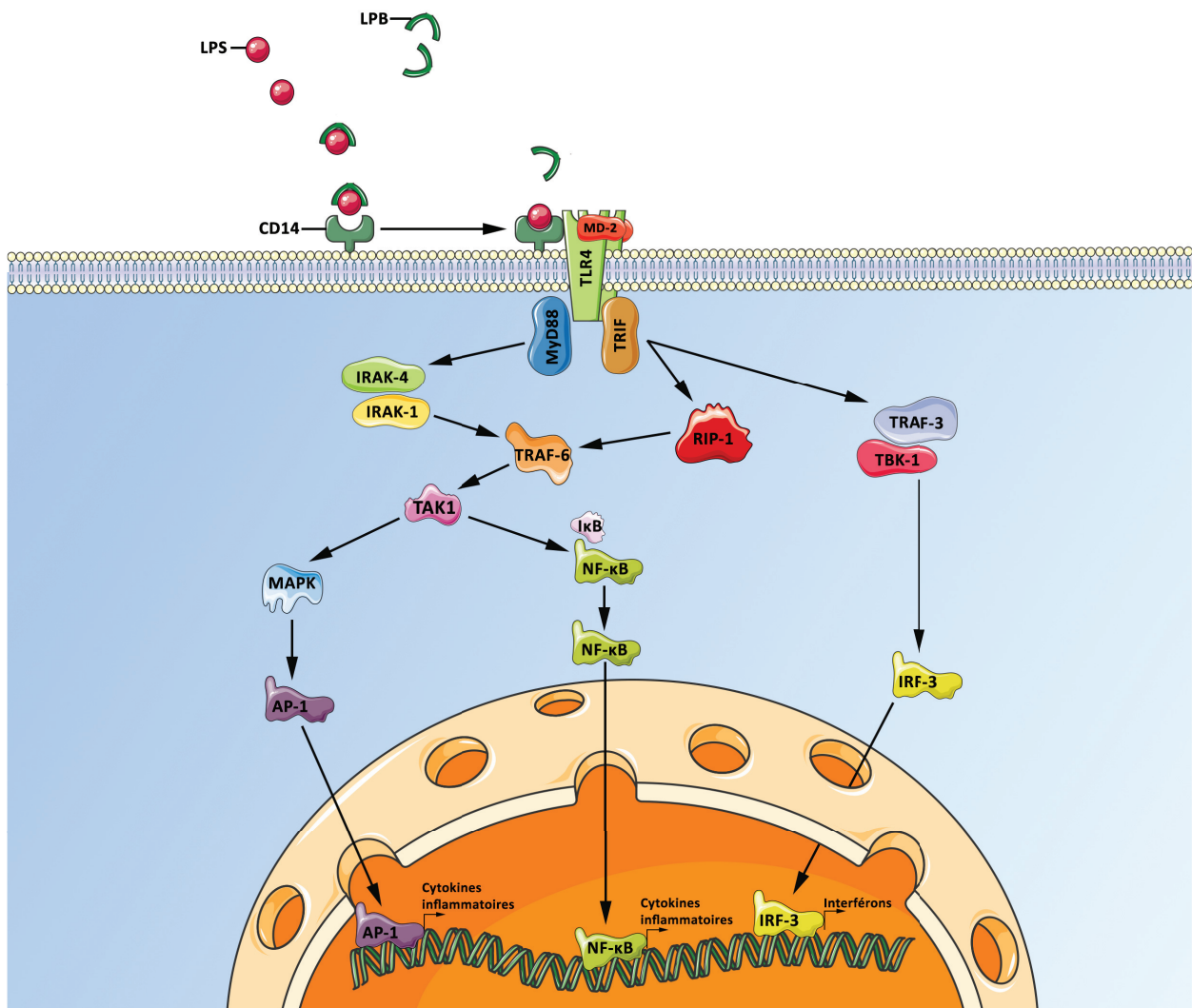
A ce jour, 4 grandes familles de PRR ont été décrites. Les récepteurs de type Toll (TLR) et les récepteurs aux lectines de types C (CLR) sont transmembranaires et surveillent le milieu extracellulaire et l'intérieur des endosomes. Au niveau intracellulaire, les récepteurs de type RIG-I (RLR) et les récepteurs de type NOD (NLR) sont les PRRs qui surveillent le cytosol (Figure 4).

## a. Les PRRs transmembranaires

### i. Les TLRs

Initialement découvert pour son rôle dans le développement embryonnaire de la drosophile (Hashimoto et al., 1988), il faut attendre 1996 pour que le rôle immunitaire de la protéine Toll soit identifié. En étudiant des mutants chez la drosophile, le laboratoire de J.A. Hoffman découvre que le gène codant pour la protéine Toll est responsable de la réponse immunitaire anti-fongique (Lemaitre et al., 1996). L'année suivante, des équipes découvrent un homologue de ce gène chez l'humain et identifient clairement les premiers récepteurs de l'immunité innée (Medzhitov et al., 1997; Poltorak et al., 1998). Ces découvertes ont récemment valu le prix nobel de médecine et de physiologie à J.A. Hoffman et B. Beutler en 2011. A terme, 13 TLRs ont été découverts chez les mammifères, 12 chez la souris mais seulement 10 chez l'homme (TLR 1 à 10)(O'Neill et al., 2013). Chez l'humain, les TLRs 1, 2, 4, 5, 6 et 10 se situent à la membrane plasmique des cellules tandis que les TLRs 3, 7, 8 et 9 se positionnent à la membrane des compartiments intracellulaires tels que les endosomes (Kawai and Akira, 2009). Les TLRs détectent des PAMPs pouvant provenir de nombreux pathogènes tels que les virus, bactéries, champignons et protozoaires (Uematsu and Akira, 2006).

Les TLRs sont des protéines transmembranaires qui partagent une homologie de structure. Leur partie externe est composée d'un domaine riche en répétition de leucine (Leucine-Rich Repeat, LRR) qui leur permet la reconnaissance spécifique d'un PAMP. Par exemple, le LRR de TLR5 permet une reconnaissance de la flagelline bactérienne. Ils possèdent en outre une région transmembranaire ainsi qu'une région cytoplasmique conservée composée d'un domaine Toll/IL-1 receptor (TIR). L'activation d'un récepteur par son ligand spécifique provoque une cascade de signalisation intracellulaire. Pour transmettre le signal, il existe 5 protéines adaptatrices capables de lier les domaines TIR des TLRs : MyD88, MAL, TRIF, TRAM et SARM (O'Neill and Bowie, 2007). Découvert à la fin des années 90 chez l'homme et la drosophile, MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) est un adaptateur central de la réponse immunitaire puisqu'il interagit avec tous les TLRs sauf TLR3 (Medzhitov et al., 1998; Tauszig-Delamasure et al., 2002). L'adaptateur TRIF (Toll-interleukin-1 receptor-domain-containing adapter-inducing IFN- $\beta$ ), initialement découverte grâce à un screening de protéines contenant un domaine TIR ainsi que par des expériences de double-hybride, active la réponse immunitaire sous l'activation des TLR3 et 4 (Hoebe et al., 2003; Oshiumi et al., 2003; Yamamoto et al., 2002, 2003). De manière générale, l'activation de MyD88 et/ou TRIF provoque une cascade de signalisation aboutissant à l'activation de facteurs de transcription tels que NF (Nuclear Factor)- $\kappa$ B, IRF3 (Interferon regulatory factor 3) ou AP1 (Activator Protein 1) qui induisent la production de cytokines pro-inflammatoires comme la pro-interleukine-1b $\beta$ , le TNF- $\alpha$  ou les IFN de type 1 (O'Neill et al., 2013).



**Figure 5 : Voie d'activation du récepteur TLR4 en réponse au LPS.**

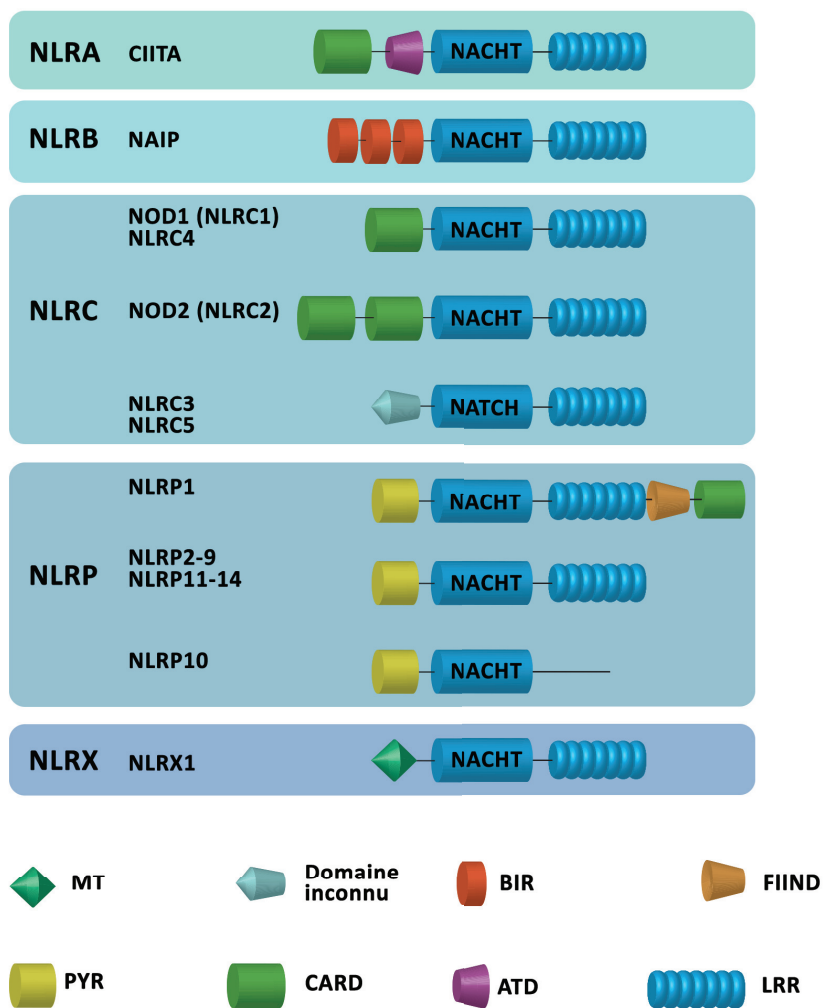
Le LPS présent dans le milieu extracellulaire peut être capté par le LBP favorisant sa reconnaissance par CD14 à la surface des cellules immunitaires. CD14 apporte alors le complexe LPS/LBP à TLR4/MD-2, provoquant son activation et son oligomérisation. Le domaine TIR de TLR4 permet le recrutement des protéines MyD88 et TRIF notamment. L'activation de MyD88 aboutit à la formation d'un complexe comprenant IRAK-4, IRAK-1 et TRAF-6. Ce complexe active les voies IKK et MAPK permettant la libération de NF- $\kappa$ B et l'activation de AP-1. Ces deux protéines sont des facteurs de transcriptions permettant la synthèse de cytokines telle que l'IL-1 $\beta$  ou l'IL-6. L'activation de TRIF aboutit également la libération de NF- $\kappa$ B via RIP-1. D'autre part, TRIF favorise la formation d'un complexe comprenant TRAF-3 et TBK-1 menant à l'activation du facteur de transcription IRF3 qui induit la synthèse d'interféron de type 1.

La détection du lipopolysaccharide (LPS) bactérien par le TLR4 et la cascade de signalisation qui en résulte sont particulièrement bien décrites dans la littérature. Le LPS Binding Protein (LBP) est une protéine soluble qui se lie directement au LPS (Wright et al., 1989) et favorise sa reconnaissance par CD14 à la surface des cellules immunitaires qui, à son tour, transfère le LPS vers le complexe TLR4/MD-2 induisant son activation (Wright et al., 1990) (Figure 5). Lorsqu'il reconnaît le LPS, TLR4 s'oligomérisse et recrute alors les protéines adaptatrices telles que MyD88 et TRIF via son domaine TIR (Poltorak et al., 1998). De manière générale, la signalisation sous l'activation de TLR4 est divisée en deux voies : MyD88 dépendante et MyD88 indépendante (ou TRIF dépendante) (Figure 5). MyD88 recrute et active la protéine kinase IRAK-4 (IL-1receptor-associated kinase-4) qui à son tour recrute IRAK-1. TRAF-6 (TNF-receptor-associated factor 6), suggérée comme la cible privilégiée de IRAK-1, forme un complexe moléculaire permettant enfin l'activation de TAK1 (TGF- $\beta$ -activated kinase 1) qui induit les voies des MAP (Mitogen-Activated Protein)-kinases et JNK (c-Jun N-terminal Kinases) ainsi que la libération du facteur NF- $\kappa$ B provoquant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (Lu et al., 2009; O'Neill and Bowie, 2007) (Figure 5). Pour la voie indépendante de MyD88, TRIF provoque également la libération du facteur NF- $\kappa$ B et l'activation de la voie des MAP kinases mais cette fois-ci via l'activation de RIP1 (Receptor-interacting protein 1)(Lu et al., 2009; Meylan et al., 2004) (Figure 5). Enfin, TRIF active le facteur de transcription IRF3 via sa liaison avec TRAF3 qui engage la protéine kinase TBK1 (TANK binding kinase 1) (Häcker et al., 2006) (Figure 5). Globalement, l'activation de TLR4 provoque la synthèse de cytokines pro-inflammatoires d'une part via MyD88 et d'IFN de type 1 d'autre part via TRIF. (Figure 5)

## ii. Les CLRs

Les récepteurs aux lectines de type C sont des récepteurs membranaires spécialisés dans la reconnaissance des hydrates de carbone qui entrent dans la composition de la paroi des champignons, des virus et des mycobactéries (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009). Parmi les CLRs les plus connus, on retrouve les Dectin-1 et -2 qui sont les récepteurs spécifiques du bêta-glucane et de l'alpha-mannose respectivement (Brown et al., 2002; McGreal et al., 2006). La reconnaissance d'un pathogène par un CLR conduit à son internalisation par endocytose, puis à sa dégradation pour aboutir à l'activation du système immunitaire adaptatif via la présentation d'antigène.

Outre la production de cytokines inflammatoires, des études récentes ont montré que la Dectin-1 et -2 étaient également capables d'activer NLRP3, un NLR cytosolique, et d'induire la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  (Drummond et al., 2011; Kankkunen et al., 2010; Sancho and Reis e Sousa, 2012).



**Figure 6 : Schéma récapitulatif des sous-familles des NLRs et de leur structure chez l'humain.**

Les NLRs sont composés de 5 sous-familles dont tous les membres possèdent un domaine NACHT central.

MT : Mitochondrial localization signal; BIR : Baculoviral Inhibition of apoptosis protein Repeat domain; FIIND : Function to find domain; PYD : Pyrin Domain; CARD : Caspase Activation and Recruitment Domain; ATD : Acidic Transactivation Domain; LRR : Leucine-Rich Repeat.

## b. Les PRRs cytosoliques

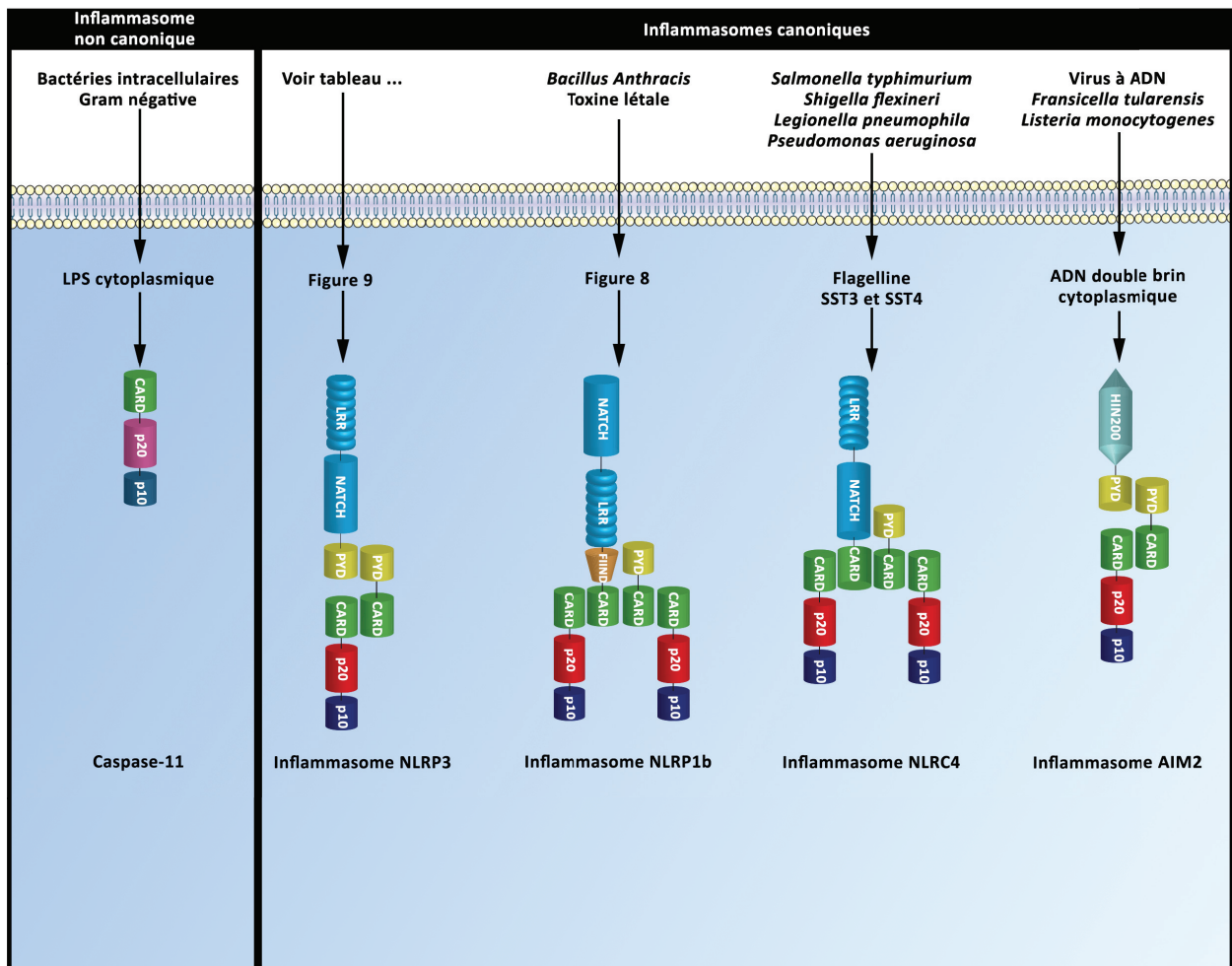
### i. Les RLRs et les senseurs de l'ADN

Dans cette catégorie de récepteurs, on distingue d'une part les senseurs d'ARN (Acide ribonucléique) et les senseurs d'ADN (Acide désoxyribonucléique).

MDA-5 (Melanoma Differentiation-Associated gene), RIG-I (Retinoic acid-Inducible Gene 1) et LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology) composent la famille des RLRs. RIG-I et MDA-5 possèdent une structure très proche avec en N-terminal deux domaines CARD (caspase recruiting domain), un domaine central DExD/H-box hélicase et enfin un domaine C-terminal (CTD) impliqué dans la reconnaissance de l'ARN (Loo and Gale, 2011). LGP2 diffère des deux récepteurs puisqu'il ne possède pas de domaine CARD à son extrémité N-terminale (Saito et al., 2007; Yoneyama et al., 2005). Spécialiste de la reconnaissance de l'ARN, RIG-I et MDA5 reconnaissent des variants d'ARN différents. RIG-I reconnaît préférentiellement des petits ARNs double brin (inférieur à 2kb) qui ont un groupe triphosphate en 5' (5'-ppp) tandis que MDA-5 détecte les ARNs double brin de longue taille. L'activation de RIG-I et MDA-5 par leur ligand respectif entraîne une cascade de signalisation médiée par la protéine mitochondriale MAVS (aussi connu sous le nom de CARDIF) et aboutissant à l'activation de facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B et IRF3 et à la synthèse d'IFN de type 1 et de cytokines inflammatoires (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Xu et al., 2005). Il est intéressant de noter qu'en sus de leur rôle primordial dans la détection des virus, les RLRs semblent également impliqués dans la détection de certaines bactéries intracellulaires telles que *Legionella pneumophila* (Onoguchi et al., 2011) ou *Listeria monocytogenes* (Abdullah et al., 2012). Ces données suggèrent que les RLRs sont, de manière plus générale, des senseurs de pathogènes intracellulaires.

DAI (DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors) est le premier senseur d'ADN cytosolique déclenchant la réponse immunitaire à avoir été identifié (Takaoka et al., 2007) mais reste aujourd'hui peu étudié dans la littérature. Lorsque DAI se lie à l'ADN double brin, il recrute la kinase TBK1 et le facteur de transcription IRF3 induisant alors la production d'IFN de type-1 et la réponse immunitaire anti-virale (Takaoka et al., 2007). Très récemment, cGAS (cyclic GMP-AMP Synthase) a été identifié comme un autre senseur d'ADN double brin cytosolique. Son mécanisme de signalisation est original puisque lorsqu'il détecte de l'ADN double brin cytosolique, il catalyse le second messager cGAMP (dinucléotide cyclique 2',5'-cGAMP) à partir d'ATP (Adénosine TriPhosphate) et de GTP (Guanosine TriPhosphate) (Ablasser et al., 2013). Le cGAMP ainsi synthétisé active la protéine STING (Stimulator of IFN Genes) et provoque la production d'IFN de type 1 (Tanaka and Chen, 2012). En utilisant des approches différentes, 4 groupes ont identifié un second senseur cytoplasmique de l'ADN double brin : AIM2 (Absent In Melanoma 2) impliqué dans la sécrétion d'IL-1 $\beta$  après détection d'ADN cytoplasmique (Bürckstümmer et al., 2009; Fer-





**Figure 7 : Signaux activateurs et structure des principaux inflammasomes canoniques et de l'inflammasome non-canonique chez la souris.**

Les inflammasomes NLRP1b, NLRC4, AIM2 et l'inflammasome non canonique sont activés par des PAMPs spécifiques (Voir leur description dans le texte pour plus d'informations). L'inflammasome NLRP3 peut être activés à la fois par des PAMPs et des DAMPs répertoriés dans le tableau 1.

nandes-Alnemri et al., 2009; Hornung et al., 2009; Roberts et al., 2009). Membre de la famille des protéines PYHIN (Pyrin and HIN domain), AIM2 lie l'ADN via son domaine C-terminal. L'activation d'AIM2 provoque la formation d'un inflammasome qui sera décrit dans la suite de ce chapitre.

## ii. Les NLRs

En terme d'évolution, la famille des NLRs est une très ancienne famille de récepteurs de l'immunité. Chez la plante, on trouve les protéines de résistances (R) qui ont pour homologue les NLRs chez les animaux. Il existe, chez l'humain, 22 NLRs qui possèdent tous un domaine central NOD (Nucleotide Oligomerization Domain ou NACHT pour NAIP, CIITA, HET-E et TP1) qui permet une interaction homotypique des récepteurs entre eux. Ils sont également composés d'une répétition de motifs LRR en C-terminal qui, comme chez les TLRs, est essentielle pour l'activation du récepteur. Les 22 NLRs humains diffèrent notamment par leur partie N-terminale qui permet la transduction du signal après l'activation du récepteur. Classés selon la caractéristique de ce domaine N-terminal, on retrouve 5 sous-familles de récepteurs dont les 2 principales sont les NLRC (NLR family CARD domain-containing family) et les NLRP (NACHT, LRR, and PYD (Pyrin Domain) domain-containing family) qui sont accompagnées de 3 autres sous-familles ne comprenant qu'un seul membre : NLRA, NLRB et NLRX (Figure 6).

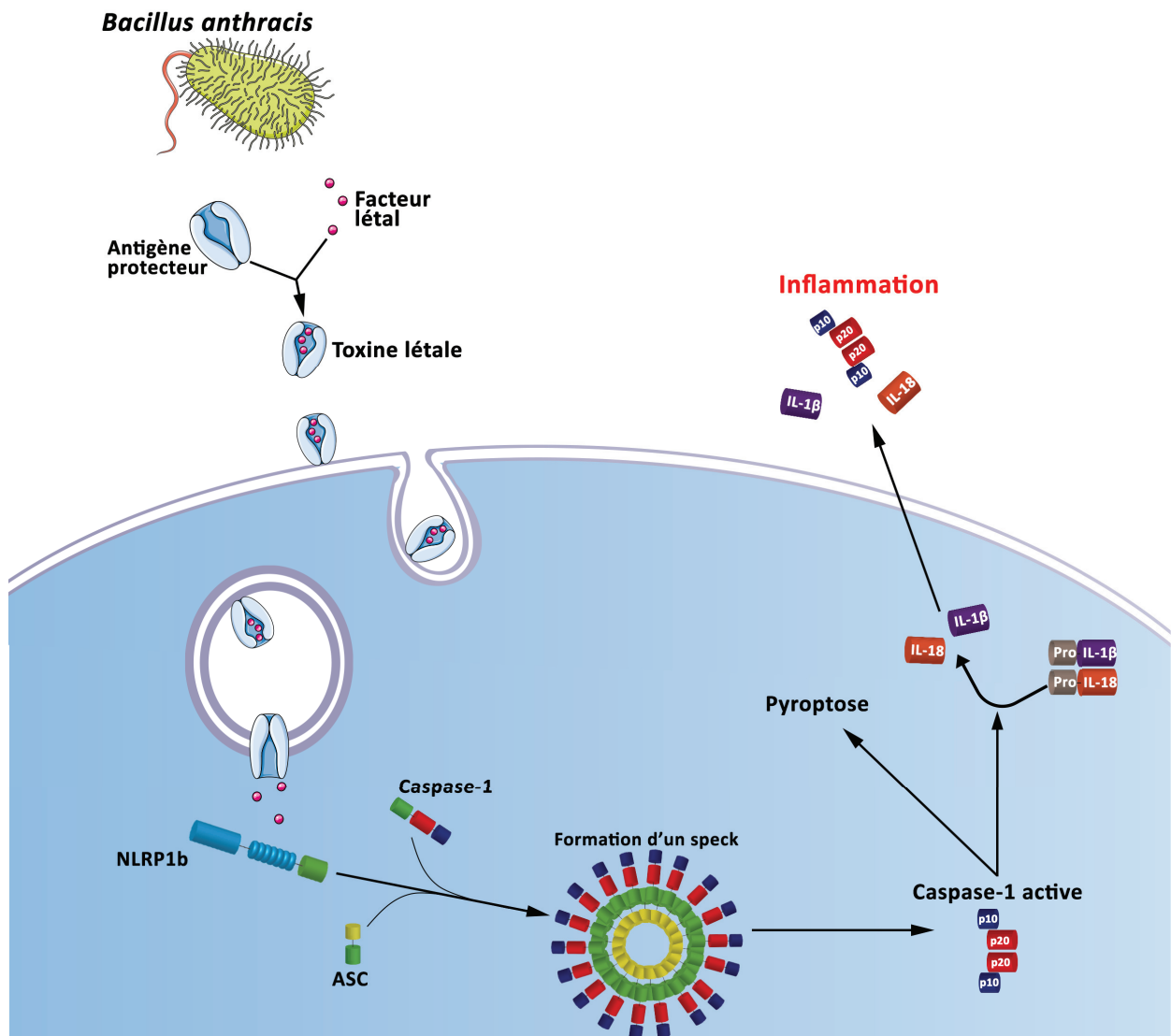
Les NLRCs, représentés par les protéines NOD1, NOD2 et NLRC4 notamment, ont en N-terminal un ou plusieurs domaines CARD (Figure 6). Ces domaines permettent à NOD1 et NOD2 une interaction directe avec des effecteurs tels que la kinase RIPK2 (Receptor-interacting protein kinase 2) via des interactions homotypiques CARD-CARD (Inohara et al., 1999). RIPK2 recrute alors et active la protéine TAK1 qui provoque la libération de NF- $\kappa$ B, via la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  (Inhibitor of NF- $\kappa$ B alpha) (Ogura et al., 2001), et l'activation de la voie des MAP kinases (Caruso et al., 2014). NOD1 et NOD2 reconnaissent par contact des motifs de peptidoglycanes (PGN) (Grimes et al., 2012; Laroui et al., 2011; Mo et al., 2012) qui composent la membrane des bactéries (Philpott et al., 2014).

La famille des NLRPs est composée de 14 membres et se caractérise par la présence d'un domaine PYD en N-terminale des récepteurs (Figure 6). Ce domaine PYD, de la famille des domaines Death Fold comme CARD, permet des interactions homotypiques notamment avec la protéine ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD).

Au delà de ces grandes familles, on retrouve NLRX1, seul membre de la sous-famille des NLRX, qui contient un domaine N-terminal lui permettant d'interagir avec la mitochondrie, NAIP, seul membre de la sous-famille NLRB, qui contient plusieurs domaines BIR (Baculoviral Inhibition of apoptosis protein Repeat domain), et CIITA (Class II transactivator), seul membre de la famille des NLRA, qui possède un domaine de trans-activation en N-terminal (Figure 6).

En 2002, la recherche sur le rôle des NLRs comme médiateurs de l'inflammation aboutit à





**Figure 8 : Activation de l'inflammasome NLRP1b par la toxine létale de *Bacillus anthracis* chez la souris.**

Le facteur létal et l'antigène protecteur sécrétés par *Bacillus anthracis* s'associent pour former la toxine létale. Capturer par un endosome, l'antigène protecteur permet la libération du facteur létal dans le cytosol provoquant ainsi l'activation du récepteur NLRP1b via un mécanisme encore mal compris. La formation de l'inflammasome NLRP1b aboutit au clivage de la caspase-1 qui provoque la maturation et la sécrétion des deux cytokines pro-inflammatoires : IL-1 $\beta$  et IL-18 ainsi que la mort des cellules par pyroptose.

la découverte d'un complexe multiprotéique appelé l'inflammasome. Cet inflammasome est à la base des recherches de notre équipe et sera décrit dans la suite de ce chapitre.

## **B. Une plateforme moléculaire : l'inflammasome**

Décrit pour la première fois par F. Martinon et J. Tschopp en 2002, l'inflammasome est considéré comme une plateforme cytosolique et multiprotéique aboutissant à l'activation de la caspase inflammatoire, caspase-1 (Martinon et al., 2002). Il est composé d'un récepteur de l'immunité innée, de la protéine adaptatrice ASC, et donc de la caspase-1. Alors que la famille des NLRPs est composée de 14 membres, seuls 5 d'entre eux ont été formellement identifiés comme étant capables de former un inflammasome, il s'agit de NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6 et NLRP12 (Agostini et al., 2004; Elinav et al., 2011b; Martinon et al., 2002; Minkiewicz et al., 2013; Vladimer et al., 2012). NAIP et NLRC4, deux autres NLRs sont également capables de former un inflammasome. Enfin, deux autres récepteurs IFI16 (Interferon gamma-inducible protein 16) et AIM2, membres des senseurs de l'ADN cytoplasmiques (ou AIM2-Like Receptors, ALR), peuvent également former un inflammasome en présence de leur ligand (Lamkanfi and Dixit, 2014) (Figure 7).

La caspase-1 est une protéase à cystéine qui, lorsqu'elle est activée, intervient dans le clivage de précurseurs de deux cytokines pro-inflammatoires : la pro-IL-1 $\beta$  et la pro-IL-18. La maturation des deux cytokines est suivie de leur sécrétion dans le milieu extracellulaire (Li et al., 1995). Outre le clivage et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, la caspase-1 induit également un type de mort cellulaire appelé pyroptose (Miao et al., 2011).

## **C. Les inflammasomes**

### **a. NLRP1**

#### **i. Humain/Souris**

Chez l'humain, la structure du récepteur NLRP1 diffère légèrement des autres NLRPs. Outre ses domaines PYD, NACHT et LRR que l'on retrouve dans toute la famille, NLRP1 possède également un domaine FIIND (Function to find) suivi d'un domaine CARD dans sa partie C-terminale. Si le rôle du domaine FIIND reste inconnu, la présence du domaine CARD suggère que NLRP1 pourrait interagir directement avec la caspase-1. Le muramyl dipeptide (MDP), un composant du peptidoglycane, induit un changement de conformation chez le NLRP1 humain qui lui permet d'activer directement la caspase-1. Si l'absence de ASC n'empêche pas l'activation de cet inflammasome in vitro, la présence de cet adaptateur améliore l'activation de la caspase-1 après activation de NLRP1 par le MDP (Faustin et al., 2007). Cependant, depuis ces premières observations, l'activation du récepteur NLRP1 humain par le MDP n'a pas été reproduit.

Au cours de l'évolution, le locus contenant le gène NLRP1 s'est dupliqué dans le génome

Activateur de l'inflammasome NLRP3	Voies d'activation impliquées	Références
<b>Micro-organismes (PAMPs)</b>		
<i>Candida Albicans</i>	Efflux de potassium, ROS	Gross et al. 2009, Joly S. et al. 2009
<i>Staphylococcus aureus</i>	Efflux de potassium, ROS	Mariathasan et al. 2006
<i>Listeria monocytogenes</i>	Rupture lysosomale, efflux de potassium	Meixenberger K et al. 2010
Adenovirus	Rupture lysosomale, ROS	Muruve et al. 2008, McGuire et al. 2011
Influenza A	Rupture lysosomale, ROS	Allen IC et al. 2009
Virus Sendai	Non défini	Kanneganti et al. 2006
Toxine bactérienne (Nigéricine)	Efflux de potassium, ROS	Mariathasan et al. 2006, Pétrilli et al. 2007 (a)
<b>Signaux de dangers endogènes (DAMPs)</b>		
ATP	Efflux de potassium, ROS	Mariathasan et al. 2006, Pétrilli et al. 2007 (a)
b-amyloïde	Rupture lysosomale	Halle A et al. 2008
Cristaux d'acide urique	Rupture lysosomale, efflux de potassium, ROS	Martinon et al. 2006, Pétrilli et al. 2007 (a)
Cristaux de cholestérol	Rupture lysosomale, efflux de potassium	Rajamäki K et al. 2010
<b>Facteurs environnementaux</b>		
Alum	Rupture lysosomale, ROS	Kool M et al. 2008
Amiante	Rupture lysosomale, ROS	Dostert C et al. 2008
Silice	ROS	Dostert C et al. 2008

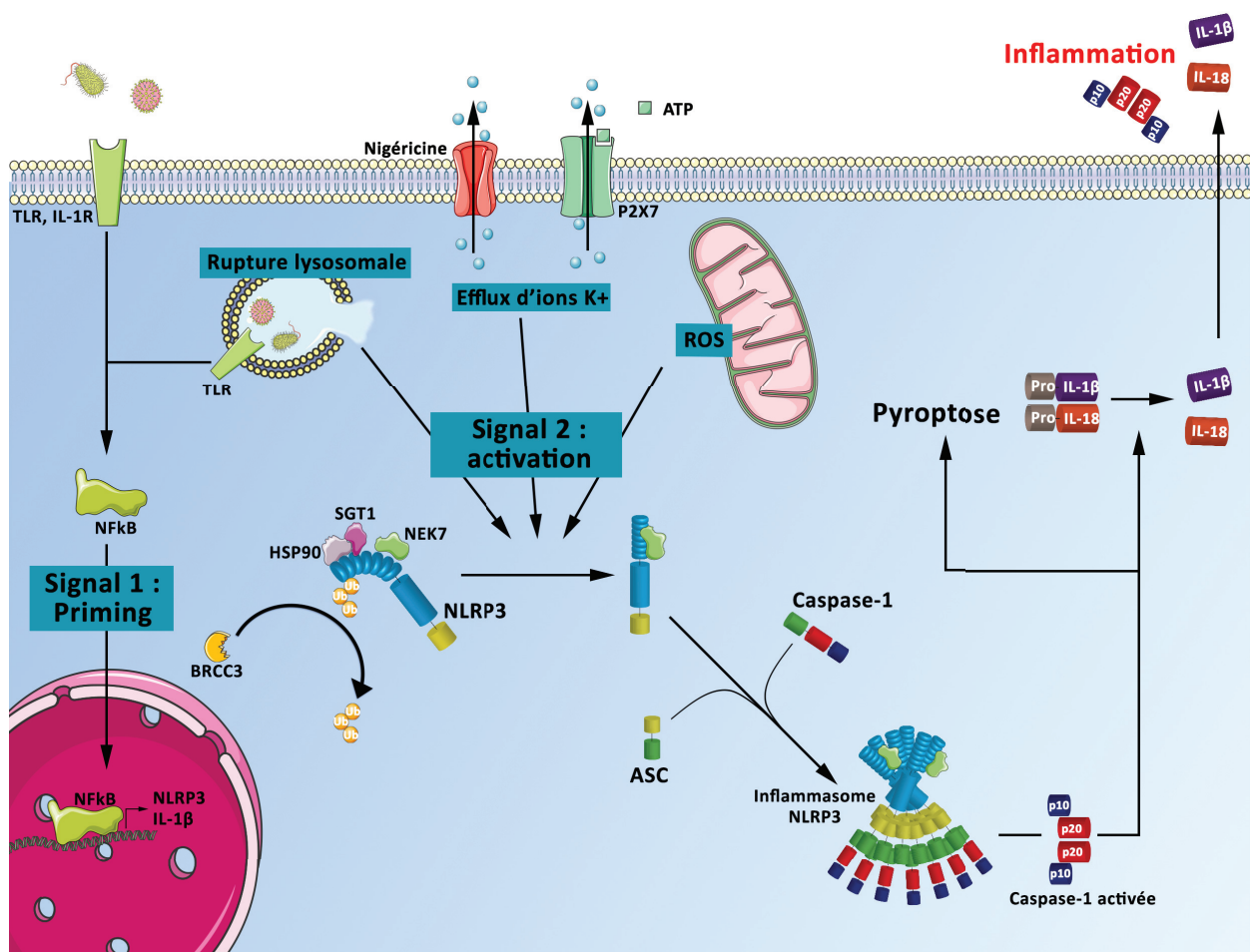
**Tableau 1 : Activateurs et voies d'activations de l'inflammasome NLRP3.**

murin et a fait émerger trois paralogues : NLRP1a, NLRP1b, NLRP1c. Parmi eux, NLRP1b a été identifié pour induire la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , d'IL-18 et la mort de macrophages de souris en réponse à la toxine létale (LT) de *Bacillus Anthracis* (Cordoba-Rodriguez et al., 2004). Cette sensibilité à la LT est observée uniquement dans certains fonds génétiques de souris (Boyden and Dietrich, 2006) exprimant un NLRP1b fonctionnel. En effet, il existe de nombreux variants de NLRP1b et seuls certains d'entre eux confèrent une sensibilité à la toxine létale de *bacillus anthracis* (Sastalla et al., 2013). De manière intéressante, le domaine PYD présent en N-terminal du NLRP1 humain est absent de la protéine NLRP1b chez la souris suggérant une interaction directe avec caspase-1 via le domaine CARD toujours présent en C-terminal (Figure 7). De nombreuses études démontrent que la formation de l'inflammasome NLRP1b par la LT dépend d'échanges ioniques entre le milieu intra- et extracellulaire suggérant un lien entre l'activation des inflammasomes NLRP1b et NLRP3 (Pétrilli et al., 2007a; Wickliffe et al., 2008a). A l'instar de NLRP1b, une forme mutée de NLRP1a est également capable de former un inflammasome et de provoquer une sécrétion d'IL-1 $\beta$  (Masters et al., 2012). NLRP1c est pour sa part peu connu.

## ii. Mécanisme d'activation de l'inflammasome NLRP1b

La toxine létale de *Bacillus Anthracis* est une toxine composée de deux protéines : le facteur létal et l'antigène protecteur. L'antigène protecteur se fixe à la surface des cellules et forme un pore permettant au facteur létal de pénétrer dans le cytosol (Figure 8). Le facteur létal est une protéase qui a la capacité de cliver et d'inactiver les kinases de la voie des MAP kinases (Turk, 2007). Cette fonction protéinase est également nécessaire à l'activation de NLRP1b, suggérant que le facteur létal n'est pas seulement un ligand de NLRP1b mais que NLRP1b détecte son activité protéinase (Hellmich et al., 2012; Levinsohn et al., 2012).

Un premier modèle, décrit par Boyden et Dietrich en 2006, propose un clivage direct de NLRP1b par le facteur létal qui aboutirait à son activation (Boyden and Dietrich, 2006). Ce modèle a été confirmé par de nombreuses études qui montrent que la toxine létale est capable de cliver la partie N-terminale de NLRP1b et que ce clivage est nécessaire et suffisant pour induire la formation de l'inflammasome, la sécrétion de cytokines et la pyroptose (Chavarría-Smith and Vance, 2013). D'un autre côté, d'autres études ont montré que des inhibiteurs du protéasome peuvent empêcher le clivage et l'activation de NLRP1b par le facteur létal. Ces études suggèrent alors que cette activation serait indirecte et passerait par le clivage d'un facteur inconnu recouvrant la partie N-terminale de NLRP1b (Squires et al., 2007; Wickliffe et al., 2008b).



**Figure 9 : Mécanisme de formation de l'inflammasome NLRP3 via un premier signal dit de «priming» et un second signal d'activation (inspiré de Bodnar-Wachtel, 2015, n° d'ordre 184-2015).**

L'activation d'un TLR ou de l'IL-1R permet de libérer le facteur de transcription NF-κB responsable de la synthèse d'IL-1β et de NLRP3 peu exprimés à l'état basal. Ce signal de priming permet également d'activer BRCC3 conduisant à la dé-ubiquitination de NLRP3, étape nécessaire à son activation.

Aujourd'hui, trois principaux signaux aboutissent à la formation de l'inflammasome NLRP3 :

- La libération de cathepsin B par rupture lysosomale.
- La fuite d'ion potassium via l'ouverture de pores dans la membrane plasmique.
- La synthèse de ROS provenant en majeure partie de la mitochondrie.

L'activation de NLRP3 aboutit à son oligomérisation et au recrutement de ASC et de la caspase-1 au sein d'un agrégat provoquant l'auto-protéolyse et l'activation de la caspase-1. Ainsi activée, la caspase-1 clive et induit la libération des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18 ainsi que la mort des cellules par pyroptose.

## b. NLRP3

### i. Description

L'inflammasome NLRP3 est l'un des inflammasomes les plus documentés. Découvert il y a maintenant 12 ans par le laboratoire de Jürg Tschopp (Agostini et al., 2004), il a encore accumulé plus de 600 publications sur l'année 2015.

Le rôle de l'inflammasome NLRP3 a d'abord été découvert dans les cellules immunitaires telles que les macrophages et les cellules dendritiques mais les recherches ont permis d'établir que d'autres types cellulaires expriment l'inflammasome NLRP3 et sont également capables de produire de l'IL-1 $\beta$  lorsqu'il est activé (Kummer et al., 2007; Watanabe et al., 2007).

La particularité de l'inflammasome NLRP3 est d'être impliqué dans la réponse immunitaire à un grand nombre de pathogènes, de signaux de dangers mais également de facteurs environnementaux (Cassel et al., 2009)(Tableau 1). La diversité des molécules pouvant activer NLRP3 suggère qu'elles ne se lient pas directement au récepteur mais qu'elles provoquent une cascade de signalisation aboutissant à la formation de l'inflammasome NLRP3. Parmi les activateurs de NLRP3, on retrouve un grand nombre de PAMPs issus de bactéries, de virus et de champignons (Tableau 1). En effet, de nombreuses études effectuées dans des cellules immunitaires myéloïdes telles que les macrophages ont permis de démontrer l'activation de NLRP3 par des toxines bactériennes, comme la nigéricine issue de *Streptomyces hygroscopicus* ou la listériolysine O issue de *Listeria monocytogenes* (Mariathasan et al., 2006), par l'ARN venant de bactéries (Kanneganti et al., 2006) ou de virus tel que le virus influenza A (Allen et al., 2009), ou même par la levure *Candida albicans* (Joly et al., 2009). Outre sa capacité à détecter des PAMPs, l'inflammasome NLRP3 peut également se former en réponse à divers signaux de dangers endogènes (DAMPs). En 2006, des études chez la souris ont permis de découvrir que les cristaux d'acide urique (MSU, Monosodium Urate Crystals) provoquent l'activation de l'inflammasome NLRP3. En effet, la sécrétion des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18 lors d'un traitement au MSU est inhibée en absence du récepteur NLRP3, de ASC ou de la caspase-1 (Martinon et al., 2006). Cette découverte a notamment permis de comprendre le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans les crises de goutte dues à une accumulation de cristaux d'acide urique au niveau des articulations et responsable d'une inflammation chronique (Martinon et al., 2006). La découverte du rôle de NLRP3 dans la détection d'autres agents endogènes tels que les cristaux de cholestérol (Duewell et al., 2010) ou la  $\beta$  amyloïde (Halle et al., 2008) a également permis de suggérer un rôle de l'inflammation dans des pathologies telles que l'athérosclérose ou la maladie d'Alzheimer (Duewell et al., 2010; Heneka et al., 2013). Enfin, l'ATP extracellulaire, potentiellement relargué par des cellules endommagées, active également l'inflammasome NLRP3 via la liaison au récepteur P2X7, un canal potassique, à la surface des cellules (Mariathasan et al., 2006). La dernière catégorie de molécules capables

d'activer le récepteur NLRP3 est composée de facteurs environnementaux tels que les cristaux de silice, l'amiante ou l'alum (Tableau 1). Les macrophages sont capables d'absorber ces particules, via phagocytose, mais leur incapacité à les dégrader provoque l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (Dostert et al., 2008; Hornung et al., 2008).

## ii. Un mécanisme d'activation en 2 temps

L'activation de l'inflammasome NLRP3 est un mécanisme qui s'effectue en 2 temps. NLRP3 étant peu exprimé à l'état basal dans les cellules, un premier signal dit de «priming» est nécessaire afin d'induire sa transcription, sa traduction ainsi qu'une étape de dé-ubiquitination essentielle à son activité (Juliana et al., 2012; Py et al., 2013)(Figure 9). Cette étape de priming est généralement réalisée par l'activation d'un PRR ou de certains récepteurs aux cytokines aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B comme décrit précédemment. Ce signal permet également d'induire la synthèse de la pro-IL-1 $\beta$ , l'un des substrats de la caspase-1, dont la transcription est régulée par le facteur NF- $\kappa$ B. Pour simuler cette étape de priming, les cellules immunitaires cultivées *in vitro* sont généralement stimulées avec du LPS, le ligand de TLR4 (Bauernfeind et al., 2009; Pétrilli et al., 2007a) (Figure 9). Prêtes à agir, les cellules peuvent alors être traitées avec un activateur de NLRP3.

Malgré le grand nombre d'agonistes de NLRP3 mis en évidence, son véritable ligand n'a pas encore été découvert et aujourd'hui, 3 modèles d'activation complémentaires et non exclusifs de l'inflammasome NLRP3 ont été proposés : l'efflux d'ions potassium (K<sup>+</sup>), la rupture lysosomale et la génération de ROS (Reactive Oxygen Species) (Figure 9).

L'efflux d'ions potassium est un mécanisme commun à de nombreux activateurs de l'inflammasome NLRP3. En effet, l'ATP extracellulaire se fixe et active le canal membranaire P2X7 aboutissant à une fuite d'ions et responsable d'une diminution des ions K<sup>+</sup> dans le cytosol des cellules (Ferrari et al., 2006) (Figure 9). D'autres activateurs tels que les toxines bactériennes, comme la nigéricine, forment de pores membranaires résultant également en la fuite d'ions K<sup>+</sup>. En effet, nos cellules maintiennent un gradient de concentration d'ion potassium entre le cytosol et le milieu extracellulaire. La concentration intracellulaire est plus forte que la concentration extracellulaire et est entretenue au moyen de pompes situées dans la membrane plasmique. Ainsi, en saturant le milieu extracellulaire en ions K<sup>+</sup> et ainsi en évitant l'efflux d'ions, V. Petrilli et collègues ont démontré que l'activation de l'inflammasome NLRP3 dépend d'un efflux de K<sup>+</sup> de la cellule (Pétrilli et al., 2007a).

Comme précisé précédemment, certains activateurs de NLRP3 sont de larges particules, telles que l'alum ou la silice, phagocytées par les cellules immunitaires. L'incapacité à dégrader ces facteurs provoquent une déstabilisation et une rupture des lysosomes provoquant une libération de la protéine lysosomale, la cathepsine B, dans le cytosol (Dowell et al., 2010; Hornung



et al., 2008) (Figure 9). La cathepsine B est une protéase qui a la capacité de se lier directement au récepteur NLRP3 provoquant son oligomérisation et l'activation de l'inflammasome (Bruchard et al., 2013).

Le dysfonctionnement des mitochondries est le principal générateur de ROS dans le cytosol des cellules. En cas de stress cellulaire en réponse au MSU, à la silice ou à l'ATP, la génération de ROS est nécessaire pour l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Dostert et al., 2008; Pétrilli et al., 2007b) (Figure 9). Zhou et collègues montrent qu'en réponse à de nombreux activateurs de l'inflammasome NLRP3, la génération de ROS provoque la libération de la protéine thioredoxin-interacting protein (TXNIP) qui peut alors se fixer et activer NLRP3 (Zhou et al., 2010). Outre TXNIP, des études ont montré que l'ADN mitochondrial oxydé, libéré dans le cytosol par les mitochondries au cours de l'apoptose, fixe NLRP3 et provoque l'activation de l'inflammasome (Shimada et al., 2012). Enfin, les derniers travaux effectués dans l'équipe de M. Karin ont permis de démontrer que les mitochondries endommagées sont responsables de l'activation de l'inflammasome NLRP3 via la génération de ROS (Zhong et al., 2016).

Contrairement aux expériences réalisées *in vitro*, les deux étapes d'activation de l'inflammasome *in vivo* sont probablement réalisées au même moment. En effet, l'injection de bactéries ou de signaux de dangers détectés par NLRP3 dans le péritoine de souris provoque une forte inflammation dépendante de l'activation de l'inflammasome (Martinon et al., 2006). Lors d'une infection par un pathogène, tel que *Listeria monocytogenes*, de nombreux PAMPs provoquent alors une activation, à la fois, des TLRs, responsables du priming, et de NLRP3 résultant en une activation de l'inflammasome.

### iii. Régulation de l'inflammasome NLRP3

En étudiant les relations entre les protéines R de la plante et les NLRs, A. Mayor et J. Tschopp ont montré que les récepteurs NLRP3 et NLRC4 sont maintenus dans un état conformationnel inactif à l'état basal grâce à HSP90 et SGT1 (Mayor et al., 2007) (Figure 9). Potentiellement identique pour tous les récepteurs, cet état maintient les protéines dans un état inactif et améliore leur activation. L'activation du récepteur via son domaine LRR provoque le retrait des protéines chaperonnes et induit son oligomérisation via son domaine NACHT. Outre le retrait de protéines chaperonnes, la protéine NLRP3 doit être déubiquitinée afin d'être capable de former l'inflammasome. En effet, l'absence de la déubiquitinase BRCC3 (BRCA1/BRCA2-containing complex 3) empêche l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Juliana et al., 2012; Py et al., 2013). L'expression de BRCC3 est régulée au niveau transcriptionnel par la voie des MAP kinases, induites par l'activation des TLRs (Boudreau et al., 2007) (Figure 9). Cette étape de déubiquitination aurait donc lieu en même temps que le signal de «priming» de NLRP3.

Dernièrement, trois équipes indépendantes ont démontré un rôle inattendu de la pro-

téine NEK7 (Never In Mitosis A ou NIMA-related kinase 7) dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Figure 9). En effet, l'absence de NEK7 dans des macrophages empêche l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse à divers stimuli (He et al., 2016; Schmid-Burgk et al., 2016; Shi et al., 2016). Connue pour son rôle indispensable au cours de la mitose, notamment via la formation du fuseau mitotique (Fry et al., 2012), ces travaux ont montré que NEK7, indépendamment de son activité kinase, interagit directement avec NLRP3 et favorise la formation de l'inflammasome (Figure 7).

#### iv. L'inflammasome NLRP3 non canonique

L'inflammasome non canonique est un mécanisme d'activation de l'inflammasome NLRP3 non conventionnel et nécessitant l'activation en amont de la caspase-11.

C'est en 2011 que l'équipe de Vishva M. Dixit a mis en évidence ce nouveau mécanisme d'activation pour l'inflammasome NLRP3. En effet, alors que les pathogènes intracellulaires tels que *Escherichia Coli* sont connus pour activer l'inflammasome NLRP3, les macrophages isolés de souris de souche 129 ne produisent pas d'IL-1 $\beta$  en réponse à ces pathogènes. Leur équipe a alors démontré que ce phénomène est lié à une mutation de la caspase-11 dans ce fond génétique de souris (Kayagaki et al., 2011). La caspase-11 est activée par de nombreux types de bactéries Gram-négatives qui infectent le cytosol des cellules (Broz et al., 2012; Case et al., 2013; Casson et al., 2013; Gurung et al., 2012; Rathinam et al., 2012) mais pas par des bactéries Gram-positives. Plus tard, d'autres équipes ont montré que le LPS présent dans la membrane des bactéries Gram-négatives lie directement la caspase-11 et l'active (Hagar et al., 2013; Kayagaki et al., 2013; Shi et al., 2014). Plus récemment et au moyen de la technologie CRISPR-Cas9, l'équipe de V.M. Dixit a démontré que la caspase-11 a pour substrat la Gasdermin D. Clivée par la caspase-11 en réponse au LPS intracellulaire, la Gasdermin D induit alors la pyroptose et active l'inflammasome NLRP3 aboutissant à l'activation de la caspase-1 et à la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  (Kayagaki et al., 2015).

#### c. AIM2

Le récepteur AIM2 fait partie des récepteurs d'ADN de la famille PYHIN et non des NLRs comme les autres protéines capables de former un inflammasome. La reconnaissance directe de l'ADN double brin cytosolique par AIM2 induit le recrutement de l'adaptateur ASC via une interaction homotypique des domaines PYD de AIM2 et ASC, la formation de l'inflammasome et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (Fernandes-Alnemri et al., 2009; Hornung et al., 2009). AIM2 est capable de détecter, à partir de 80 paires de bases, l'ADN double brin de bactéries telles que *Francisella Tularensis* ou *Listeria Monocytogenes*, de virus ou même synthétique Poly(dA:dT) sans distinction (Jin et al., 2012; Rathinam et al., 2010).

Récemment, deux études ont montré que l'absence de la DNase-II dans un modèle murin provoque une accumulation d'ADN dans le cytosol qui active AIM2 et induit la formation de

l'inflammasome (Baum et al., 2015; Jakobs et al., 2015). L'inflammation résultant de l'activation anormale d'AIM2 par l'ADN endogène provoque le développement d'arthrite chez la souris.

Indépendamment de l'inflammasome, AIM2 interagit directement avec DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) et empêche son activation à l'état basal dans la cellule. DNA-PK est un membre de la famille des PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) qui est impliqué dans l'activation d'Akt, un important activateur des voies de survie cellulaire. Ainsi, l'absence d'AIM2 dans un modèle de cancers du colon induit chez la souris provoque une plus forte activation d'Akt, favorisant l'apparition de tumeurs colorectales (Wilson et al., 2015). AIM2 participe donc à la lutte contre l'apparition de cellules tumorales en inhibant les voies de survie cellulaire.

#### d. NLRC4

La flagelline ainsi que certains systèmes de sécrétions bactériens sont capables d'activer un inflammasome dépendant du récepteur NLRC4 (Zhao et al., 2011). Plus précisément, les PAMPs bactériens responsables de la formation de l'inflammasome NLRC4 activent les récepteurs cytosoliques NAIP (NLR family of Apoptosis Inhibitory Proteins) qui recrutent et activent NLRC4. Chez la souris, NAIP5 reconnaît la flagelline bactérienne tandis que NAIP1 et 2 reconnaissent des composants du système de sécrétion de type 3 (T3SS) (Lightfield et al., 2008; Rayamajhi et al., 2013; Suzuki et al., 2014). Récemment l'inflammasome NLRC4 a pu être observé par cryo-microscopie électronique permettant d'en déduire ses étapes d'activation (Hu et al., 2015; Zhang et al., 2015). Dans un premier temps, NAIP reconnaît de manière spécifique un ligand de pathogène déclenchant alors une modification de sa conformation dans une forme «active». La forme active de NAIP rentre alors en contact avec NLRC4 provoquant également une modification de sa conformation. La protéine NLRC4 ainsi activée recrute de nouvelles molécules de NLRC4 jusqu'à former un disque induisant une oligomérisation des domaines CARD présents sur NLRC4. Ce regroupement de domaine CARD provoque le recrutement de la caspase-1 via des interactions homotypiques CARD-CARD, déclenche sa dimérisation, son autoprotéolyse et ainsi son activation (Hu et al., 2015; Zhang et al., 2015).

NLRC4 ne possédant pas de domaine PYD en N-terminal mais un domaine CARD, elle peut interagir directement avec la caspase-1. Cependant, comme pour l'inflammasome NLRP1, la présence ASC améliore grandement l'efficacité de cet inflammasome à produire de l'IL-1 $\beta$  et à induire la pyroptose (Broz et al., 2010; Mariathasan et al., 2004).

De manière intéressante, les études sur l'inflammasome NLRC4 dans les cellules épithéliales de l'intestin montrent que l'absence de NAIP ou de NLRC4 dans ces cellules provoque une sensibilité accrue à *Salmonella* mais que cette sensibilité serait indépendante de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  ou d'IL-18 et de la mort par pyroptose (Nordlander et al., 2014; Sellin et al., 2014). Ces recherches permettent d'envisager des rôles différents de l'inflammasome selon le type cellulaire

qui l'exprime.

#### e. Autres inflammasomes

Du fait de leur récente découverte, il reste probablement à découvrir d'autres récepteurs capables de former un inflammasome. Récemment, *Yersinia pestis*, la bactérie responsable de la peste, a été montrée comme étant un activateur d'un inflammasome dépendant du récepteur NLRP12 (Vladimer et al., 2012). Le récepteur NLRP6, exprimé dans les cellules immunitaires ou des cellules épithéliales, est également capable de former un inflammasome (Elinav et al., 2011b). L'absence de NLRP6 chez la souris provoque une modification de la composition de leur microbiote caractérisée par une augmentation de bactéries de la famille TM7 ou de *Prevotellaceae* et d'une diminution des *Lactobacillus* (Elinav et al., 2011b) suggérant un rôle de l'inflammasome dans la régulation du microbiote. De plus, les souris *NLRP6* KO sont plus sensibles et développent plus de tumeurs dans des modèles de colites induites par DSS (Dextran-sodium sulfate) (Chen et al., 2011; Elinav et al., 2011b; Normand et al., 2011).

Membre des récepteurs d'ADN comme AIM2, IFI16 détecte l'ADN viral ayant pénétré dans la cellule. En présence de son ligand, il est capable de former un inflammasome d'une part (Kerur et al., 2011) et d'induire les voies de production de l'IFN d'autre part (Unterholzner et al., 2010).

#### f. Inflammasomopathies

Outre les pathologies liées à une activation récurrente de l'inflammasome, telles que les crises de goutte, il existe également des pathologies familiales liées à des mutations ou des variants d'expression des récepteurs formant des inflammasomes. Chez l'humain, des variants du gène codant pour la protéine NLRP1 sont notamment responsables de l'apparition de vitiligo, une maladie inflammatoire chronique liée à la destruction des mélanocytes et à une dépigmentation de la peau (Jin et al., 2007).

Anciennement nommé *cryopyrin*, des mutations du gène *NLRP3* sont associées à trois types de Cryopyrinopathies, ou Cryopyrin-associated periodic syndroms (CAPS). On y retrouve le syndrome familial auto-inflammatoire au froid (FCAS) peu sévère, le syndrome de Muckle-Wells (MWS) de phénotype intermédiaire, et le syndrome chronique infantile neurologique cutané et articulaire (CINCA) très sévère. Découvertes avant même que NLRP3 soit identifié comme un récepteur menant à la formation d'un inflammasome, la majorité des mutations atteignent le NACHT de la protéine codé au niveau de l'exon 3 du gène NLRP3 (Hoffman et al., 2001). Les mutations à l'origine de ces syndromes inflammatoires causent l'activation constitutive de NLRP3 dans les monocytes et provoquent une production excessive d'IL-1 $\beta$  (Dowds et al., 2004). Alors que les traitements anti-inflammatoires à base de corticostéroïdes étaient peu efficaces, les traitements ciblant l'IL-1R ont participé à une diminution spectaculaire des symptômes chez les patients (Goldbach-Mansky et al., 2006; Hawkins et al., 2003).

## D. Les autres composants de l'inflammasome

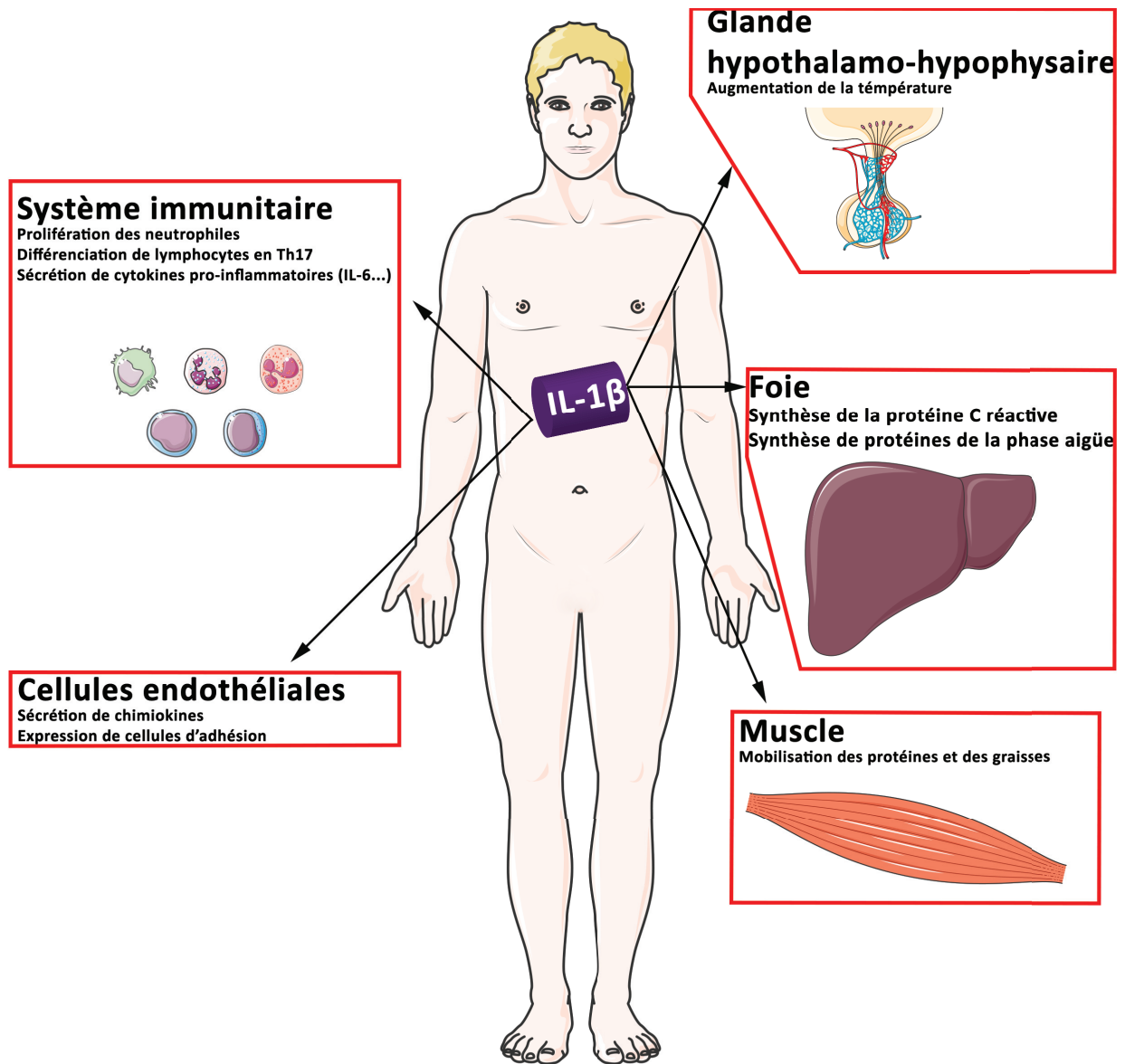
### a. L'adaptateur ASC

L'adaptateur ASC est une protéine de 22 kDa composée d'un domaine PYD N-terminal et d'un domaine CARD C-terminal dont la principale fonction est l'activation de la caspase-1 (Srinivasula et al., 2002).

Récemment, des études sur la structure des inflammasomes AIM2 et NLRP3 ont permis de démontrer que leur domaine PYD est capable d'induire la polymérisation de type prion du domaine PYD de l'adaptateur ASC (Cai et al., 2014; Lu et al., 2014). Cette polymérisation se caractérise par l'apparition d'un agrégat de protéine visualisable par immunofluorescence et cytométrie (Sester et al., 2015). Les filaments de ASC exposent alors à leur surface des domaines CARD permettant le recrutement de la forme entière de la caspase-1 via des interactions homotypiques de type CARD/CARD. De récentes recherches ont montré que des specks de ASC peuvent s'accumuler dans le microenvironnement de cellules mourant par pyroptose (Franklin et al., 2014). De manière intéressante, ces agrégats de ASC peuvent alors être phagocytés par des cellules immunitaires environnantes et, de par leur activité «prion», propager l'inflammation en activant la caspase-1 dans ces cellules.

### b. La caspase-1

La caspase-1 fût initialement découverte pour son rôle dans la maturation de la pro-IL-1 $\beta$  et nommée en conséquence IL-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE) à la fin des années 1980 (Black et al., 1989; Kostura et al., 1989). La caspase-1, sous sa forme entière de 45 kDa, possède un domaine CARD en N-terminal, un domaine contenant la longue sous-unité catalytique (p20), et un domaine court (p10) en C-terminal renfermant la petite sous-unité catalytique de l'enzyme. Ces 3 domaines sont séparés par des interdomaines de petite taille. Le recrutement de la forme entière de caspase-1 au sein du complexe de l'inflammasome permet son auto-activation et la formation d'un tétramère composé de 2 sous-unités p20 et 2 sous-unités p10 selon modèle de «proximity-induced dimerization» décrit en 2003 par Boatright et al. (Boatright and Salvesen, 2003). En 2010, Petr Broz et collègues ont montré que la forme longue de la caspase-1 est capable d'induire la pyroptose après l'activation de l'inflammasome NLRC4 par *S. Typhimurium* ou *L. Pneumophila* (Broz et al., 2010). En effet, la ré-expression d'une forme non clivable de la caspase-1 (mutée sur chacun de ses sites de clivage) dans des macrophages déficients pour la caspase-1 restaure la mort, mais faiblement la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , induite par l'activation de l'inflammasome NLRC4 via *S. Typhimurium* et *L. Pneumophila*, tandis que la ré-expression d'une forme catalytiquement inactive de la caspase-1 en est incapable (Broz et al., 2010). Durant mes travaux de thèse, nous avons affiné le modèle proposé par Petr Broz et étendu ce mode d'action



**Figure 10 : Rôles de l'IL-1 $\beta$  au sein de l'organisme.**

Sécrétée en présence d'un pathogène ou de signaux de dangers, l'IL-1 $\beta$  favorise le recrutement de cellules immunitaires via la stimulation des cellules endothéliales, la prolifération des cellules myéloïdes en général et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6.

Lors de sa diffusion, l'IL-1 $\beta$  augmente la température corporelle en agissant sur le complexe thermo-régulateur de la glande hypothalamo-hypophysaire. Elle agit également sur le foie, permettant la synthèse de protéines de réponse de la phase aigüe.

à l'inflammasome NLRP1b.

Outre l'activation des cytokines pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 et l'induction de la mort des cellules par pyroptose, de nombreux rôles pro-inflammatoires ont été décrits pour la caspase-1. La forme active de la caspase-1 est notamment responsable de l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B via de nombreux mécanismes : clivage de MAL (Myd88 Adapter-Like), activation de l'IL-1R via la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ , ou encore activation de la caspase-7 (Dinarello, 2009; Erener et al., 2012; Miggin et al., 2007).

De manière intéressante, la caspase-1 régule également des voies de signalisation anti-inflammatoire au sein de la cellule. En effet, son activité catalytique est responsable du clivage et de l'activation de l'IL-37, une cytokine connue pour son rôle anti-inflammatoire (Bulau et al., 2014; Nold et al., 2010). Une autre cytokine pro-inflammatoire de la famille des IL-1, l'IL-33, est clivée par la forme active de la caspase-1. Mais contrairement à la pro-IL-1 $\beta$  et la pro-IL-18, le clivage de l'IL-33 provoque son inactivation, démontrant un rôle anti-inflammatoire de la caspase-1 (Cayrol and Girard, 2009).

### **c. La caspase-8**

Outre son interaction avec la caspase-1, des études ont montré que la protéine ASC pouvait également interagir avec la caspase-8, une caspase initiatrice de la voie extrinsèque de l'apoptose (Masumoto et al., 1999, 2003). Contrairement aux interactions CARD-CARD entre la caspase-1 et ASC, la caspase-8 et ASC interagissent via leurs domaines DED (Death effector domain) et PYD respectivement (Masumoto et al., 1999, 2003; Vajjhala et al., 2015). Des recherches ont montré qu'en absence de la caspase-1, les inflammasomes NLRP3 et AIM2 sont capables d'activer la caspase-8 (Pierini et al., 2012; Sagulenko et al., 2013), ce qui aboutit à la mort cellulaire par apoptose et à la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (Antonopoulos et al., 2015).

## **E. Les fonctions biologiques régulaées par l'inflammasome**

### **a. L'IL-1 $\beta$**

La famille de l'interleukine-1 est un groupe de cytokines impliquées dans la défense de l'organisme contre des pathogènes. Elle est formée de 11 membres, 7 dont l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 sont des ligands de récepteurs, 3 sont des antagonistes de récepteurs et le dernier membre est une cytokine anti-inflammatoire.

L'IL-1 $\beta$  est une cytokine pro-inflammatoire peu exprimée à l'état basale dans les cellules immunitaires. Son expression peut notamment être induite par la stimulation des TLRs et elle est alors synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif (Weber et al., 2010). Au sein de la cellule, l'étape de maturation de l'IL-1 $\beta$  est médiée par l'inflammasome et la caspase-1 (Gross et al., 2012). Lorsqu'elle se retrouve dans le milieu extracellulaire, la pro-forme de l'IL-1 $\beta$  peut égale-



ment être activée par des protéases sécrétées par les neutrophiles telles que la protéinase 3, la granzyme A, l'élastase etc... (Guma et al., 2009; Joosten et al., 2009).

Le mécanisme aboutissant à la sécrétion de la pro-forme et de la forme active de l'IL-1 $\beta$  est encore mal compris. L'activation de la caspase-1 aboutissant à la mort de la cellule par pyroptose et à la libération du contenu intracellulaire, l'hypothèse la plus simple est que l'IL-1 $\beta$  est libérée de manière passive lors de la mort induite par la caspase-1. Cette hypothèse est soutenue par des études montrant que la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  est indissociable de la mort lors de l'activation de la caspase-1 via l'utilisation de techniques d'imagerie sur des cellules isolées (Cullen et al., 2015; Liu et al., 2014; Shirasaki et al., 2014). En revanche, deux récentes études montrent que l'activation de NLRP3 et NLRC4 dans les neutrophiles provoque la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  en absence de mort cellulaire (Chen et al., 2014; Karmakar et al., 2015). Enfin, d'autres données suggèrent que la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  est un mécanisme actif. En effet, la sécrétion d'IL-1 $\beta$  après activation de l'inflammasome semble intervenir en amont de la libération du contenu intracellulaire (Brough and Rothwell, 2007; Gross et al., 2012; Silveira and Zamboni, 2010). Bien que la libération d'IL-1 $\beta$  et la pyroptose induites par l'activation de la caspase-1 soient deux évènements ayant lieu simultanément, il semblerait qu'ils soient dissociables au moins dans certains types cellulaires.

Sécrétée dans le microenvironnement, la forme active de l'IL-1 $\beta$  se fixe à son récepteur, l'IL-1R, qui est composé d'un domaine TIR permettant d'enclencher les voies de l'inflammation via MyD88 et NF- $\kappa$ B comme décrit chez les TLRs (Weber et al., 2010). L'IL-1R est exprimé par de nombreux types cellulaires au sein de l'organisme. Selon le type cellulaire qui exprime son récepteur, l'IL-1 $\beta$  peut, entre autre, induire la fièvre via son action pyrogène sur le système nerveux central, augmenter la sécrétion de cytokines par les cellules immunitaires et induire l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales (ICAM) et vasculaires (VCAM) (Dinarello, 2009) favorisant ainsi le recrutement des cellules immunitaires sur le site de l'inflammation (Figure 10). Avec l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  régule l'expression des facteurs de transcriptions IRF4 et ROR $\gamma$ t au sein des lymphocytes T, favorisant leur différenciation en lymphocytes T helper 17 (Th17) (Chung, 2009).

L'IL-1Ra est l'antagoniste naturel de l'IL-1R (Dinarello, 1991). L'affinité de l'IL-1Ra pour l'IL-1R est plus forte que l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  lui permettant de bloquer la signalisation de ces deux cytokines (Dinarello and van der Meer, 2013). La forme recombinante de l'IL-1Ra, l'anakinra, est aujourd'hui utilisée pour traiter des maladies auto-inflammatoires telles que les cryopyrinopathies (Jesus and Goldbach-Mansky, 2014).

## **b. L'IL-18**

Contrairement à l'IL-1 $\beta$ , l'IL-18 ne nécessite pas de stimulus et se retrouve sous la forme d'un précurseur de manière constitutive dans les cellules. Elle a été observée dans les cellules im-

munitaires mais également dans les kératinocytes et les cellules épithéliales (Puren et al., 1999).

L'étape de maturation de l'IL-18 est également médiée par la caspase-1 et l'inflammasome et mène à sa libération dans le milieu extracellulaire. Sécrétée dans le microenvironnement, l'IL-18 est un inducteur important de l'IFN- $\gamma$  via son action sur les cellules NKs en combinaison avec d'autres cytokines telles que l'IL-12 ou l'IL-15 (Siegmond et al., 2001; Takeda et al., 1998). L'IL-18 binding protein (IL-18BP) est l'antagoniste naturel de l'IL-18. Sa forte affinité pour l'IL-18 lui permet de se fixer sur la cytokine et l'empêche d'activer son récepteur l'IL-18R (Novick et al., 2001).

### **c. La régulation d'autres cytokines**

En dehors de l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18, la caspase-1 est également capable de réguler l'activité de deux autres cytokines : l'IL-33 et l'IL-37. L'IL-33 est synthétisée sous une forme active localisée dans le noyau des cellules (Carriere et al., 2007) dont la fonction immunitaire dépend de sa sécrétion. La mort des cellules provoque la libération de l'IL-33 qui agit alors comme une alarmine en induisant l'inflammation via la liaison de son récepteur ST2 (Suppression of tumorigenicity 2) présent à la surface des cellules immunitaires (Schmitz et al., 2005). Toutefois, en cas de mort par apoptose, l'IL-33 est clivée par les caspase-3 et -7 provoquant alors son inactivation (Lüthi et al., 2009). La caspase-1 peut également cliver l'IL-33 au niveau du même résidu et réduit ainsi son activité (Cayrol and Girard, 2009).

L'IL-37 est une cytokine anti-inflammatoire peu exprimée à l'état basal et dont la synthèse est induite en réponse à la stimulation des TLR ou de l'IL-1R (Nold et al., 2010). Possédant un site de clivage de la caspase-1, l'IL-37 est toutefois synthétisée sous une forme entière active comme l'IL-33 (Kumar et al., 2002; Li et al., 2015). L'activation de l'inflammasome NLRP3 aboutit à la sécrétion de l'IL-37 surtout sous sa forme entière, caspase-1 ne semblant pas augmenter la sécrétion de la forme clivée de l'IL-37 (Bulau et al., 2014). La forme entière de l'IL-37 se fixe aux récepteurs IL-18Ra et SIGIRR provoquant une forte diminution de la synthèse de cytokines inflammatoires (Nold-Petry et al., 2015). Au sein de la cellule, l'IL-37 peut également migrer dans le noyau pour participer à la diminution de la transcription de cytokines inflammatoires telles que IL-6 ou TNF- $\alpha$  (Sharma et al., 2008). De manière intéressante, cette translocation nucléaire est dépendante du clivage de la forme longue de l'IL-37 par la caspase-1 (Bulau et al., 2014). Ces résultats apportent une fonction surprenante pour l'inflammasome et la caspase-1 dans la régulation de l'IL-37 et la diminution de la réponse inflammatoire.

### **d. La pyroptose**

La pyroptose fût décrite pour la première fois en 1992 lors de l'infection de macrophages par *Shigella flexneri* (Zychlinsky et al., 1992) et assimilée à une forme d'apoptose dépendante de la caspase-1. Il faut attendre 2001 pour le terme de pyroptose émerge. La pyroptose, venant de pyro – du grec feu, en référence à l'inflammation – et de ptose – du grec chute, en référence à

Mode de mort	Contrôlée
Mécanisme initiateur	DAMPs, infection - Activation de l'inflammasome
Signal intermédiaire	Dépendant de la caspase-1
Evènements terminaux	Lyse par insertion de la gasdermin D dans la membrane plasmique, formation de pores dans la membrane plasmique, gonflement du cytoplasme
Immunogénicité	++
Inflammation	Mort pro-inflammatoire
Relargage de DAMPs	HMGB1, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18
Exemple de mécanisme inhibiteur	Exposition au Z-Yvad-FMK, KO de la caspase-1

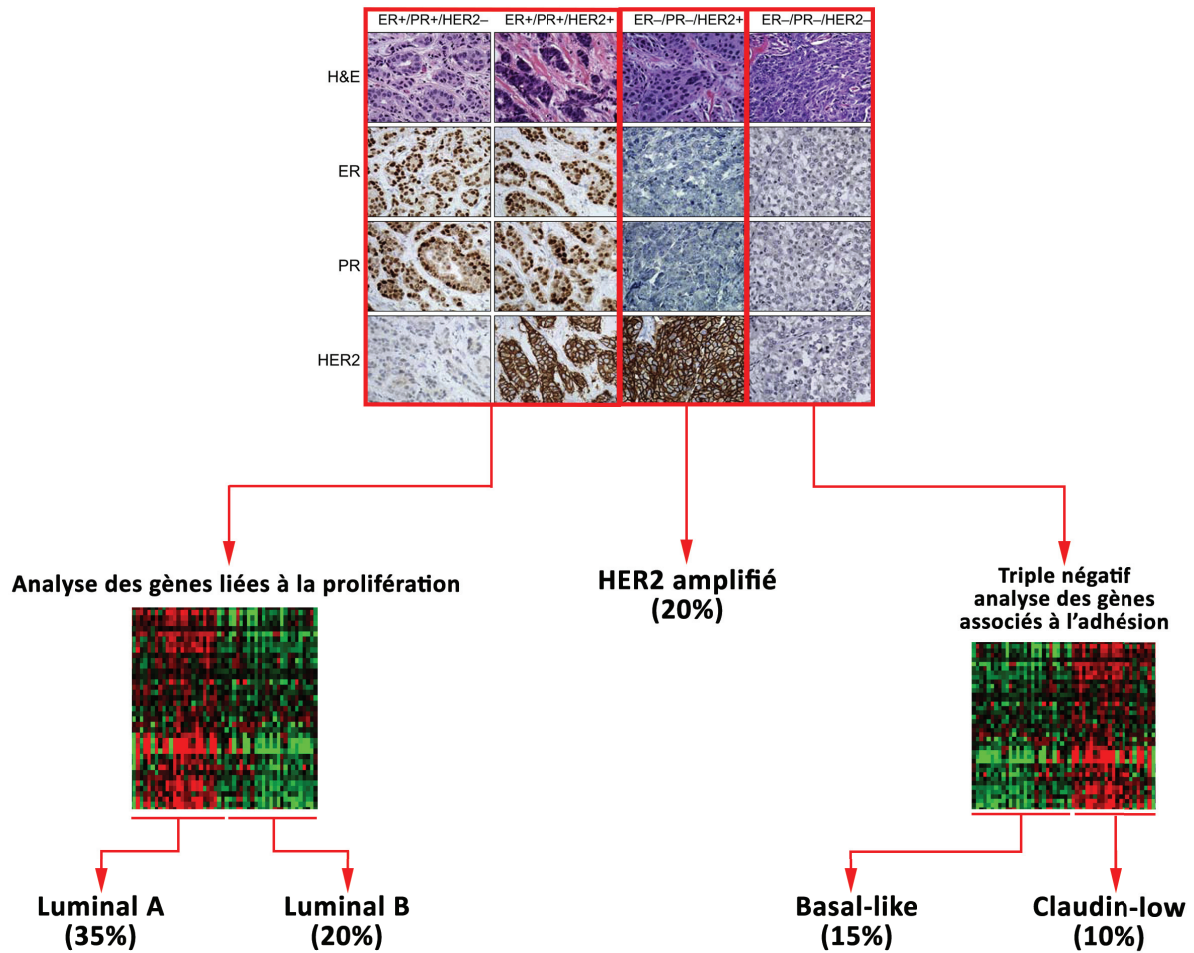
**Tableau 2 : Principales caractéristiques de la pyroptose.**

la mort cellulaire – est un type de mort programmée qui, contrairement à l'apoptose, induit une inflammation dans le tissu environnant (Cookson and Brennan, 2001). Quelques caractéristiques permettent tout de même de distinguer la pyroptose de l'apoptose (tableau 2). Tout d'abord, bien que la chromatine se condense, on n'observe pas de phénomène de pycnose dans le noyau des cellules en pyroptose (Watson et al., 2000). De plus, la pyroptose se caractérise également par la formation de pores dans la membrane provoquant d'une part l'entrée d'Annexin-V à l'intérieur de la cellule marquant les phosphatidyl-sérines et d'autre part la perméabilité des membranes aux marqueurs de mort cellulaire tels que le iodure de propidium (PI) (Edgeworth et al., 2002; Fink and Cookson, 2006). Enfin, les pores ouverts lors de la pyroptose provoquent un gonflement de la cellule conduisant à une rupture des membranes et au relargage du contenu du cytosol dans le microenvironnement de la cellule (Brennan and Cookson, 2000).

Bien que la pyroptose ait été observée *in vitro*, son rôle *in vivo* est resté longtemps très incertain. Finalement, en étudiant le rôle de NLRC4 et de la caspase-1 dans l'élimination de bactéries intracellulaires *in vivo*, Miao EA et collègues ont montré que la pyroptose de macrophages infectés par *Salmonella thyphimurium* exprimant la flagelline permettait une meilleure élimination des bactéries par les neutrophiles (Miao et al., 2010).

## **F. Conclusion du Chapitre 2**

Les récepteurs de l'immunité innée et en particulier l'inflammasome sont au cœur de la réponse immunitaire. C'est eux qui permettent la détection du pathogène ou du danger et qui enclenchent la réponse inflammatoire nécessaire à la réponse immunitaire conduisant au retour à l'état normal. D'un autre côté, le dysfonctionnement de ces récepteurs est responsable de multiples maladies auto-inflammatoires. Il existe également une pathologie particulière où le rôle de l'inflammation est encore mal compris. En effet, le cancer est une maladie où le système immunitaire et plus particulièrement l'inflammation peuvent avoir un rôle protecteur ou au contraire participer à la progression de la tumeur. Dans le chapitre suivant, nous aborderons le rôle de l'inflammation dans le cadre du cancer du sein.



**Figure 11 : Méthode de classification des cancers du sein basée sur des examens histologiques et de biologie moléculaire.**

L'analyse par immunohistochimie de l'expression des récepteurs hormonaux HER2, ER et PR permet de classer les cancers en trois types : Luminal, HER amplifié et triple négatif.

L'analyse du transcriptome de gènes liés à la prolifération cellulaire permet de distinguer les cancers de type luminal A ou luminal B. Parmi les cancers triple négatif, l'analyse de l'expression de gènes liés à l'adhésion permet de distinguer les cancers basal-like et claudin-low.

---

## Chapitre 3. Les cancers du sein et leur microenvironnement

---

### A. Épidémiologie du cancer du sein

Dans le monde, le cancer du sein représente à lui seul 25% des cancers dépistés chez la femme, ce qui en fait le cancer le plus fréquent dans cette population, et a causé la mort de plus de 522 000 personnes en 2012 (Ferlay et al., 2015). L'âge moyen du diagnostic du cancer du sein est de 63 ans tandis que la survie nette sur la période de 1989 à 2004 était de 86% à 5 ans et 76% à 10 ans. En France, au cours de l'année 2015, on estime à 54 062 le nombre de nouveaux cas pour 11 913 décès liés à la maladie. De manière générale, le taux d'incidence des cancers du sein a pratiquement doublé entre 1980 et 2005, passant de 56,3 à 97,8 pour 100 000 femmes tandis que la mortalité a continuellement baissé depuis 1990 (Belot et al., 2008). Cette évolution inverse de la mortalité et de l'incidence des cancers du sein s'explique d'une part par l'amélioration du diagnostic précoce liée au dépistage et d'autre part par l'amélioration des traitements thérapeutiques. Sur la dernière décennie, l'incidence a amorcé une baisse significative expliquée par la diminution de la prescription de traitements hormonaux substitutifs à la ménopause.

Il existe de nombreux facteurs qui peuvent influencer sur le risque de développer un cancer du sein. Outre l'âge, l'exposition aux hormones, la consommation de tabac, d'alcool et le surpoids, la recherche a mis en évidence un certain nombre de mutations génétiques impliquées dans 10% de cas de cancer du sein familiaux et qui ne seront pas traitées dans ce manuscrit.

### B. Classification des cancers du sein

Les cancers issus des cellules épithéliales (= carcinomes) de la glande mammaire (= adéno) représentent plus de 95% des cancers du sein. Au sein de ces adénocarcinomes, on distingue notamment les cancers canaux et les cancers lobulaires.

Les cancers canaux se développent à partir des cellules épithéliales des canaux galactophores qui servent normalement à évacuer le lait produit par la glande mammaire. Lorsque les cellules cancéreuses restent cantonnées au revêtement des canaux et qu'elles ne se sont pas propagées à l'extérieur jusqu'au tissu mammaire voisin, le cancer est considéré comme in situ. Les carcinomes canaux in situ (CCIS) sont les types de cancer du sein non infiltrant les plus courants. A ce stade, plus de 95% des femmes atteintes par ce cancer peuvent être traitées avec succès. Cependant, sans traitement, une femme atteinte d'un CCIS risque davantage de développer un carcinome canalaire infiltrant (CCI). Contrairement au CCIS, les cellules cancéreuses d'un CCI envahissent le tissu mammaire voisin et peuvent continuer à se propager et former des métastases aux ganglions lymphatiques puis dans d'autres parties du corps, le plus souvent vers les os, les poumons, le cerveau ou le foie. Les CCI représentent 80% des cancers du sein invasifs.

Les cancers lobulaires sont plus rares et, tout comme les cancers canaux, se présentent sous une forme in situ ou infiltrante. Dans le cas de carcinomes lobulaires in situ, les cellules tumorales s'accumulent dans les lobules du sein, c'est à dire les glandes qui produisent le lait, sans se propager aux autres tissus du sein. La forme invasive du carcinome lobulaire représente 10% des cancers du sein infiltrant et peut se propager (métastases) aux ganglions lymphatiques et dans le reste du corps.

Hormis les carcinomes canaux et lobulaires, il existe d'autres formes plus rare du cancer du sein : les carcinomes médullaires (1% des cancers du sein infiltrant), les carcinomes mucoïdes (2% des cancers du sein infiltrant), les carcinomes tubuleux (1 à 2% des cancers du sein infiltrant) et les carcinomes papillaires (1 à 2% des cancers du sein infiltrant).

### **a. Classification histologique**

Dans les années 1950, Bloom et Richardson ont proposé une classification histologique des cancers du sein (BLOOM and RICHARDSON, 1957) qui fut par la suite améliorée et adoptée de manière plus générale comme la classification de Scarff-Bloom-Richardson (SBR). Cette classification tient compte de trois critères : l'architecture de la tumeur (présence de tubes), l'atypie cytonucléaire (diversité des types de noyaux dans la lésion), et du nombre de cellules en mitose observées. L'addition de ces critères permet d'obtenir une classification sur 3 grades d'un adénocarcinome infiltrant. La classification TNM, proposée par le chirurgien français Pierre Denoix, permet de trier les cancers du sein selon la taille de la tumeur primitive (T), l'envahissement des ganglions par les cellules tumorales (N), et la présence ou non de métastase (M) (DENOIX, 1953; Harmer et al., 1970). Au delà de leur facteur pronostic, l'étude anatomopathologique des tumeurs du sein via ces différentes classifications permet au médecin d'établir une stratégie thérapeutique.

### **b. Classification moléculaire**

Au début des années 2000, le développement des techniques de séquençage a permis l'étude de l'expression des gènes permettant de regrouper les cancers du sein selon des caractéristiques moléculaires communes. Basées notamment sur l'expression des récepteurs aux oestrogènes et des cytokératines, Perou et collègues ont initialement identifié 4 types moléculaires de cancer du sein (Basal-like, HER2 amplifié, luminal et normal)(Perou et al., 2000). Les études suivantes ont permis d'affiner le classement en subdivisant la classe des cancers du sein de type luminal en luminal A et luminal B puis ont démontré que cette classification pouvait être utilisée à des fins pronostic (Sørlie et al., 2001)(Figure 11).



### **C. Traiter les cancers du sein**

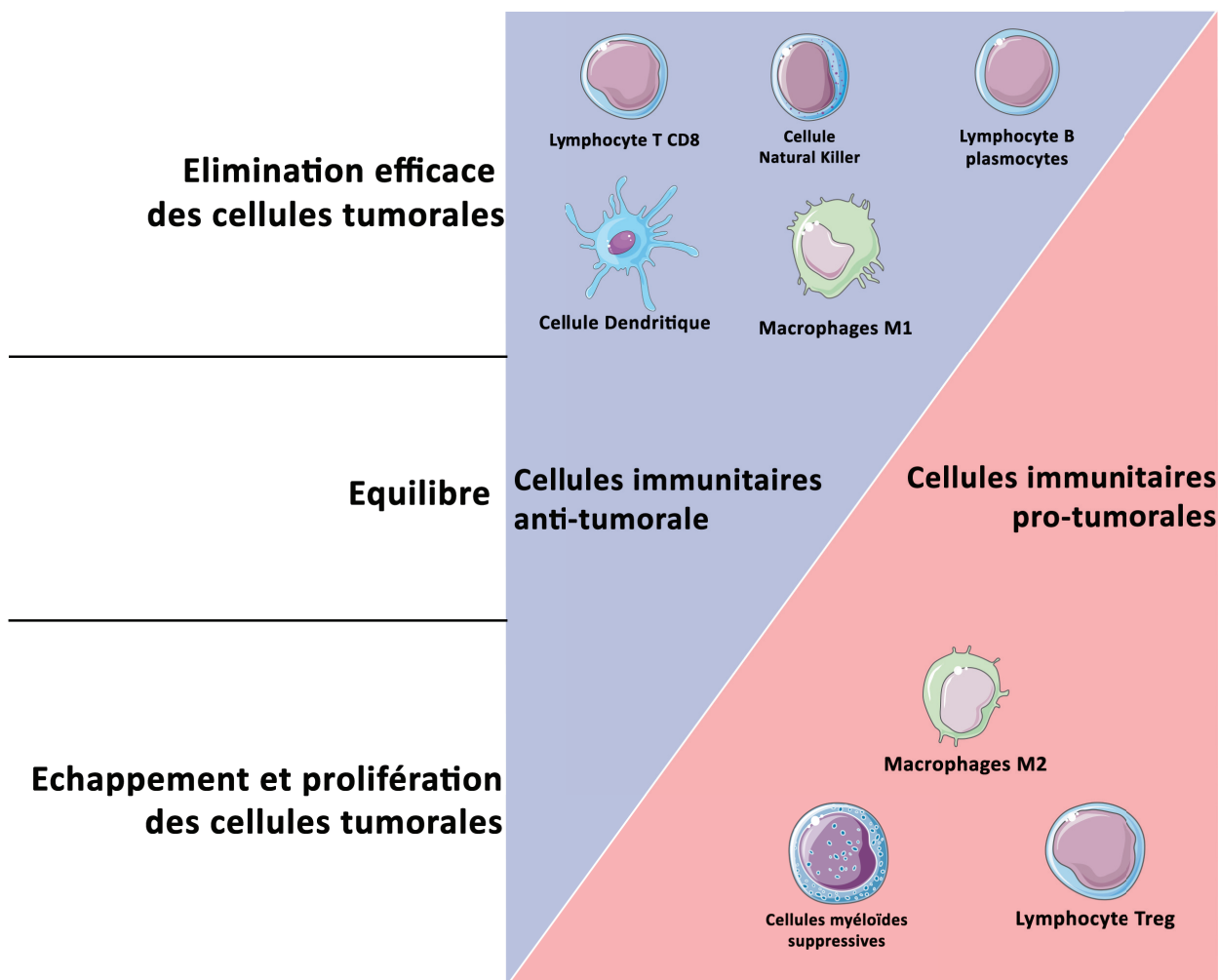
Le choix du traitement contre un cancer du sein dépend des résultats des divers examens de la tumeur et tient compte du grade histologique et du type moléculaire de la tumeur mais également de l'état de santé et des antécédents de la patiente. Les différents traitements utilisés aujourd'hui sont : la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie et la thérapie ciblée. Les études scientifiques sur ces différentes solutions ont permis de définir des associations de traitements permettant de lutter plus efficacement contre le cancer.

Le traitement des cancers du sein repose avant tout sur la chirurgie et l'ablation de la tumeur. Selon l'envahissement de la tumeur, l'acte peut se limiter à une tumorectomie (retrait de la tumeur sans déformation trop importante du sein) ou aller jusqu'à une ablation complète de la glande mammaire (mammectomie ou mastectomie). Une thérapie néo-adjuvante (précédant l'acte chirurgical) peut, dans certains cas, réduire suffisamment le volume tumoral et limiter la chirurgie au retrait de la tumeur sans mammectomie. Le retrait d'une tumeur mammaire par chirurgie est systématiquement associé à de la radiothérapie pour réduire les risques de récurrence.

L'amélioration du diagnostic et l'évolution des techniques de dépistage ont permis le développement de thérapies ciblant certains types moléculaires de cancers. C'est notamment le cas de l'hormonothérapie visant à priver les tumeurs de certaines hormones qui stimulent leur croissance. C'est également le cas des thérapies ciblées telles que le trastuzumab qui permet de traiter plus efficacement les tumeurs sur-exprimant le récepteur HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2). Le trastuzumab est un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur HER2. En se fixant au récepteur, l'anticorps empêche son activation et inhibe ainsi la prolifération des cellules tumorales qui en dépendent (Baselga et al., 2001; Sliwkowski et al., 1999). De plus, le trastuzumab est un fort médiateur de la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendantes (ADCC) permettant l'élimination des cellules exprimant le récepteur HER2 par les cellules NK (Baselga et al., 2001; Sliwkowski et al., 1999). Mais malgré l'amélioration des traitements des cancers du sein, de nombreuses patientes sont en échec thérapeutique et il reste important d'améliorer nos connaissances sur les cancers afin d'envisager de nouvelles perspectives thérapeutiques.

### **D. La réponse immunitaire face au développement tumoral**

Il existe un grand nombre de mécanismes protégeant notre corps du développement de cellules anormales. La réparation de l'ADN, le déclenchement de l'apoptose ou la sénescence sont autant de mécanismes intrinsèques à nos cellules qui les empêchent d'acquérir des propriétés tumorales. Cependant, l'accumulation de mutations successives dans les cellules déjà endommagées peut altérer les gènes contrôlant ces barrières. Un mécanisme de protection extrinsèque, le système immunitaire, chargé de la surveillance de l'organisme, contribue alors à l'élimination des cellules tumorales.



**Figure 12 : Caractéristiques pro ou anti-tumorales de certaines cellules immunitaires et concept d'«immuno-editing».**

L'immunosurveillance permettant l'éradication des cellules tumorales est réalisée en premier lieu par les cellules NK et les lymphocytes T CD8 via leur activité cytotoxique. Les cellules dendritiques, les macrophages M1 et les lymphocytes B participent également à cette lutte de manière positive.

Au cours de la progression tumorale, le recrutement de cellules immunitaires pro-tumorales provoque un état d'équilibre durant lequel ni les cellules tumorales ni le système immunitaire ne prennent le dessus.

Enfin, un fort recrutement de lymphocytes T régulateurs, de macrophages de types M2 et des cellules myéloïdes suppressives provoquent un échappement de la tumeur et à sa croissance incontrôlée.

L'immunothérapie cherche avant tout à rétablir une réponse immunitaire anti-tumorale efficace.

Bien qu'il soit aujourd'hui admis que notre système immunitaire nous protège contre l'apparition de cancers, l'immunogénicité des tumeurs a été longuement discutée à la fin du siècle dernier. En effet, notre système immunitaire est conçu pour détecter et éliminer les cellules et agents étrangers à notre organisme en évitant d'endommager nos propres cellules. Il était généralement admis que les cellules cancéreuses, provenant de notre propre corps, étaient, d'une certaine manière, indétectables par notre système immunitaire. De quelle manière les cellules cancéreuses peuvent-elles être identifiées par notre système immunitaire ? De quelle manière sont-elles éliminées et enfin comment échappent-elles à ce contrôle ? L'avancement de la recherche a apporté certaines réponses qui ont permis de découvrir le rôle de l'immunité dans le contrôle du développement tumoral mais également d'envisager une nouvelle approche thérapeutique : l'immunothérapie, qui s'est révélée très prometteuse dans certains types de cancers (Couzin-Frankel, 2013).

Toujours à la recherche de bio-marqueurs permettant d'anticiper l'évolution des lésions tumorales, l'analyse de la signature immunitaire des tumeurs peut servir de base pronostic comme cela a été décrit dans les tumeurs colorectales (Galon et al., 2006). De manière générale, les études montrent qu'une forte densité de lymphocytes T CD3+, T CD8+ cytotoxiques et de cellules T mémoires CD45RO+ est associée avec de meilleurs pronostics dans les cas de mélanomes, de cancers des ovaires, de cancers de la tête et du cou, de cancers du sein etc... (Fridman et al., 2012; Galon et al., 2013; Salgado et al., 2015).

#### **a. Les lymphocytes cytotoxiques face aux cellules tumorales mammaires**

En 1953, E.J. Foley met pour la première fois en évidence une réponse anti-tumorale dans un modèle de souris syngéniques (tumeurs et souris de même fond génétique)(FOLEY, 1953). Au cours de ses expériences, E.J. Foley a observé le rejet systématique d'une seconde greffe de cellules tumorales chez des animaux ayant préalablement subi l'ablation d'une première tumeur de même souche. Ces résultats suggèrent que l'animal a développé une sorte de «vaccination» aux cellules tumorales et ont permis de découvrir un rôle du système immunitaire dans le contrôle des cellules anormales dans notre corps. En 2001, basé sur un modèle d'induction de tumeurs via des agents chimiques, les travaux réalisés par V. Shankaran montrent définitivement que le développement de tumeurs chez des souris immuno-déficientes est plus rapide que chez des souris ayant un système immunitaire fonctionnel (Shankaran et al., 2001).

Les cellules présentatrices d'antigènes, telles que les cellules dendritiques, patrouillant dans les tissus, participent à cette réponse anti-tumorale. En effet, dès 1973, la découverte d'une cytotoxicité tumorale dépendante de l'activité d'anticorps dirigés contre les cellules tumorales du sein (Della Porta et al., 1973) ont permis de suggérer un rôle des cellules de l'immunité innée dans la présentation d'antigènes tumoraux. Plus tard, les premiers antigènes tumoraux ciblés par

les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (van der Bruggen et al., 1991) ont été découverts dans différents types de tumeurs et notamment dans les cancers du sein (Ercan et al., 2012). En effet, les mutations somatiques dans les cellules tumorales conduisent à la synthèse d'antigènes pouvant être pris en charge par le système immunitaire inné, et plus particulièrement par les cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques responsables de l'activation d'une réponse immunitaire adaptative (Kan et al., 2010; Purev et al., 2004; Sjöblom et al., 2006). Dans les cas de carcinome mammaire, la présence d'antigènes tumoraux et l'activation des cellules T CD8 cytotoxiques sont des facteurs de bon pronostic (Beckhove et al., 2004; Mahmoud et al., 2011).

#### **b. Les cellules NK dans les cancers du sein.**

De part leur rôle dans la détection des cellules anormales, les cellules NK sont au cœur de la réponse anti-tumorale (Figure 12). En effet, les cellules NK ont la capacité de prévenir l'apparition de cellules tumorales en induisant la mort de cellules infectées, endommagées ou stressées (Vivier et al., 2012). Dans des modèles d'apparition de tumeurs mammaires spontanées chez la souris, l'immunosurveillance réalisée par les cellules NK permet en effet de ralentir l'apparition de tumeurs (Crocchi et al., 2015, Gillgrass et al., 2015). De même, la croissance de cellules tumorales mammaires est accélérée dans un modèle de greffe dans un modèle de souris SCID (Severe combined immunodeficiency) en absence de cellules NK (Dewan et al., 2005). Dans ce même modèle, la présence de cellules NK permet également de réduire l'apparition de métastases suggérant un rôle des cellules NK dans le contrôle de la croissance de la tumeur primaire, d'une part, et de l'apparition de cellules métastatiques d'autre part (Dewan et al., 2007).

Chez l'humain, la présence des cellules NK dans le microenvironnement tumoral est liée à de meilleurs pronostics chez les patients atteints de cancer (Coca et al., 1997; Ishigami et al., 2000). De manière intéressante, la surexpression de gènes liés aux cellules NK et à l'induction d'une réponse immunitaire de type Th1 dans le microenvironnement tumoral mammaire sont des marqueurs de bons pronostics (Finak et al., 2008). De plus, les patientes présentant une surexpression des ligands activateurs du récepteur activateur NKG2D, tels que MIC-AB et ULBP-2, présentent également une chance de récurrence moins importante (de Kruijff et al., 2012). L'ensemble de ces données suggère donc fortement que les cellules NK sont au cœur de la réponse immunitaire contre les cellules tumorales mammaires.

Cependant, bien que les cellules NK soient particulièrement efficaces pour l'élimination des cellules tumorales, de nombreuses études ont montré que leur fonction était altérée au cours du développement des tumeurs mammaires (Mamessier et al., 2011a, 2011b, Amo et al., 2015). En effet, les cellules NK présentes dans le microenvironnement tumoral mammaire perdent l'expression de récepteurs activateurs tandis qu'elles sur-expriment des récepteurs inhibiteurs provoquant une perte dans la détection des cellules tumorales (Mamessier et al., 2011a,

2011b). En réalité, au sein du microenvironnement tumoral mammaire, les cellules NK sont la cible de nombreuses cellules immunosuppressives, telles que les cellules myéloïdes suppressives et les cellules T régulatrices, provoquant une diminution de leur capacité à détecter les cellules tumorales et favorisant alors l'échappement de ces cellules.

De nombreuses études proposent aujourd'hui des immunothérapies basées sur la restauration de l'activité cytotoxique des cellules NK contre les cellules tumorales (Chretien et al., 2014). Parmi ces stratégies, on peut citer le trastuzumab, présenté précédemment, qui favorise l'ADCC et l'activation des cellules NK (Wu et al., 2008).

### **c. Subversion et échappement**

Sous la pression du système immunitaire, les cellules tumorales mettent en place des mécanismes d'échappement faisant émerger le concept d'«immuno-editing» (Dunn et al., 2004; Mittal et al., 2014) (Figure 12). Ce concept met en avant trois phases d'évolution d'une masse tumorale :

- La phase d'élimination durant laquelle les cellules tumorales sont éliminées par le système immunitaire.
- La phase d'équilibre pendant laquelle la lésion tumorale est stable.
- La phase d'échappement qui apparaît lorsque les cellules tumorales ne subissent plus la pression du système immunitaire.

On distingue deux types de mécanismes d'échappement mis en place par les cellules tumorales. D'une part, les cellules peuvent réguler la présentation des antigènes à leur surface et ainsi empêcher la réponse adaptative de les cibler (Khong et al., 2004). En effet, l'instabilité génomique des cellules tumorales leur permet d'éteindre l'expression d'antigènes tumoraux, des ligands activateurs de NKG2D ou du MHCI. Ainsi «camouflées», il devient plus difficile aux cellules du système immunitaire inné et acquis de les détecter (Poschke et al., 2011). D'autre part, les cellules tumorales peuvent atténuer la réponse immunitaire en favorisant le recrutement de cellules immunosuppressives (Meloni et al., 2006), un mécanisme appelé immunosubversion. En effet, malgré l'activité anti-tumorale du système immunitaire, la présence de certaines cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral peut être associée à des mauvais pronostics chez les patientes (Figure 12).

Pour limiter les réponses inflammatoires et maintenir une tolérance immunitaire, le système immunitaire possède des cellules et des molécules spécifiques pouvant être détournées de leur rôle protecteur dans le contexte tumoral. Chez les patients atteints de cancers, on observe régulièrement l'accumulation de progéniteurs de cellules myéloïdes dans le sang et le microenvironnement tumoral (Almand et al., 2001) (Figure 12). Ces cellules, communément appelées cellules myéloïdes suppressives (MDSC), sont notamment connues pour réprimer l'activité des cel-

lules T et des cellules NK aboutissant à une diminution de la réponse anti-tumorale (Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Keskinov and Shurin, 2015). Chez la souris, on distingue deux sous-populations de MDSC, les MDSC granulocytiques caractérisées par l'expression des marqueurs CD11b<sup>+</sup>, Ly6G<sup>+</sup> et Ly6C<sup>mid</sup> et les MDSC monocytiques caractérisées par l'expression de CD11b<sup>+</sup>, Ly6G<sup>-</sup>, Ly6C<sup>high</sup> (Hestdal et al., 1991). En même temps qu'elles inhibent les cellules immunitaires anti-tumorales, les MDSC favorisent la prolifération d'une population de lymphocytes immosuppresseurs : les lymphocytes T régulateurs (Gabrilovich and Nagaraj, 2009) (Figure 12). Parmi les populations de lymphocytes, les lymphocytes Treg sont connus pour leur action immunosuppressive. Les Treg peuvent être identifiés par l'expression du marqueur CD4, du récepteur à l'interleukine 2 (CD25) et du facteur de transcription FoxP3. Impliqués dans le maintien de la tolérance immunitaire, les Treg inhibent la réponse immunitaire via la sécrétion de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ , des cytokines anti-inflammatoires, ou l'expression de CTLA-4, provoquant une diminution de l'activation des cellules dendritiques (Shevach et al. 2009). Les Treg peuvent se retrouver au sein des tumeurs et ainsi supprimer la réponse immunitaire anti-tumorale (Ghiringhelli et al., 2004). Leur présence dans le microenvironnement tumoral est associée à un facteur de mauvais pronostic (Gobert et al., 2009).

## **E. Inflammation et cancer du sein.**

### **a. L'inflammation à l'origine du cancer**

Nous savons aujourd'hui que les mutations germinales ne représentent que 5 à 10% des cas de cancer. En effet, la grande majorité des cancers est liée à l'apparition de mutations somatiques ou dus à des facteurs environnementaux. De plus, après de longues années de suspicions, de récentes études ont pu mettre en évidence qu'une inflammation chronique favorise l'apparition de cancers tels que les cancers du pancréas ou les cancers du colon (Coussens and Werb, 2002). On observe, par exemple, une prédisposition accrue au cancer du colon chez des personnes atteintes de la maladie de Crohn qui provoque une inflammation chronique de l'intestin (Strober et al., 2010). Le microenvironnement de la glande mammaire est aussi particulièrement sensible à l'inflammation. Chez les personnes atteintes d'obésité, on observe notamment une augmentation de cytokines pro-inflammatoires dans la circulation, telles que l'IL-6, responsable d'une augmentation de macrophages inflammatoire dans la glande mammaire (Sun et al., 2012). Ces personnes ont également une prédisposition à développer un cancer du sein ER positif, suggérant un rôle de l'inflammation dans le développement de ce type de cancer du sein. Le développement d'une inflammation chronique lors d'une infection augmente également le risque de développer un cancer. Les virus de l'hépatite B (HBV) et C (HCV), par exemple, provoquent une inflammation chronique du foie responsable de la majorité des cirrhoses et des cancers du foie

(Perz et al., 2006).

De manière intéressante, l'environnement inflammatoire peut provenir des cellules tumorales elles-même. En effet, certaines altérations génétiques conduisent à l'activation de voies de signalisation intracellulaire inflammatoires. La mutation de l'oncogène Ras conduit à l'activation de la voie des MAP kinases menant à la synthèse de cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-11 impliquées notamment dans l'angiogenèse et le recrutement de macrophages et de neutrophiles pro-inflammatoires (Sparmann and Bar-Sagi, 2004). D'autres oncogènes tels que B-Raf et Myc induisent également la synthèse de cytokines et chimiokines inflammatoires.

### **b. L'inflammation favorise la progression tumorale**

En plus d'être à l'origine de l'apparition des cellules tumorales, l'inflammation peut favoriser leur croissance. L'IL-6 est notamment connue pour activer la phosphorylation de STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) qui est un facteur souvent activé de manière constitutive dans les lignées de cancer du sein (Diaz et al., 2006). D'un autre côté, l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  sont connues pour activer le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Activé dans de nombreux types de cancers, NF- $\kappa$ B régule de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et l'inflammation (Shostak and Chariot, 2011). STAT3 et NF- $\kappa$ B étant notamment responsables de la synthèse de cytokines, telles que l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  respectivement, des boucles de rétro-contrôle positif se créent et induisent une inflammation chronique favorisant la croissance tumorale. En effet, l'inhibition de STAT3 dans des modèles de tumeurs mammaires murins permet l'élimination des cellules tumorales via la voie intrinsèque de l'apoptose (Kunigal et al., 2009).

Enfin, lors de la croissance tumorale, le microenvironnement s'appauvrit en oxygène. Lors d'un stress hypoxique, les cellules expriment fortement HIF1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor 1 alpha). En tant que facteur de transcription, HIF1 $\alpha$  régule l'expression de cytokines inflammatoires mais également du VEGF (Vascular endothelial growth factor), favorisant ainsi l'angiogenèse (Scholz and Taylor, 2013). L'angiogenèse permet de rétablir l'approvisionnement en oxygène des tumeurs. Cependant, si l'hypoxie perdure, les cellules peuvent mourir par nécrose et libérer leur contenu dans le microenvironnement. Ce type de mort induit également une réponse inflammatoire via le recrutement de cellules immunitaires sur le site de nécrose.

## **F. Conclusion du chapitre 3**

Le cancer n'est pas seulement le résultat de la croissance anarchique de cellules tumorales. En effet, à l'instant où l'on détecte les tumeurs, elles sont le plus souvent infiltrées par les cellules du système immunitaire. S'il est clair qu'au début, les cellules immunitaires aident à lutter contre le développement des cellules anormales, leur rôle est plus flou à mesure que la tumeur progresse. L'inflammation créée pour recruter les cellules immunitaires semble en contrepartie



favoriser la croissance des cellules tumorales. De même, on sait aujourd'hui que l'inflammation chronique est également la source de cancers.

---

## Chapitre 4. Inflammasome et cancer, amis ou ennemis ?

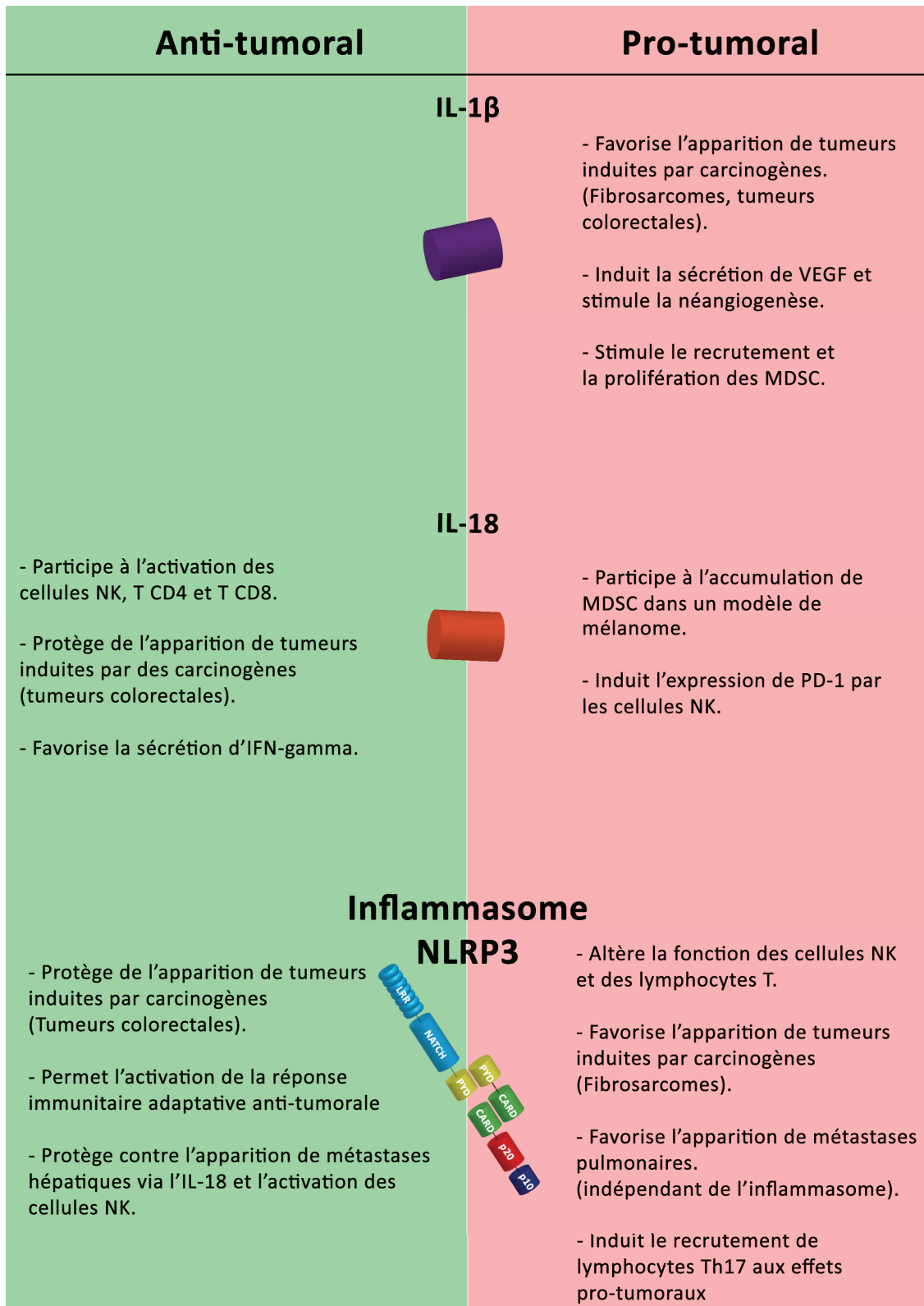
---

Dans les chapitres précédents, nous avons vu que le système immunitaire est un rempart face aux pathogènes mais également face l'apparition de cellules anormales. La détection de ces cellules passe notamment par l'activation des PRRs qui permettent de déclencher une réponse inflammatoire et l'activation des cellules de l'immunité innée et adaptative. Cependant, des études scientifiques prouvent également que cette réponse inflammatoire n'est pas seulement salvatrice mais qu'elle peut, dans certains cas, favoriser la croissance tumorale. Dans ce contexte, l'inflammasome peut agir comme un senseur de DAMPs et induire l'inflammation mais quel sera son effet sur le long terme ? Peut-il permettre l'éradication des tumeurs ou va-t-il favoriser leur progression ?

### A. Le rôle de l'IL-1 $\beta$ au cours de la progression tumorale

A l'instar d'autres cytokines, l'IL-1 $\beta$  est fréquemment surexprimée dans les cancers du sein par rapport aux tissus sains (Pantschenko et al., 2003). Comme nous l'avons vu précédemment, l'IL-1 $\beta$  est un acteur clé de la réponse inflammatoire. Dans le contexte du cancer, ses différentes fonctions peuvent être utilisées afin de promouvoir la croissance des cellules tumorales (Apte et al., 2006). En effet, si les mécanismes sous-jacents sont encore mal compris, de nombreuses études ont pu démontrer un rôle pro-tumoral de l'IL-1 $\beta$ . Dans un modèle d'induction de tumeurs par carcinogènes, Krelin et collègues ont démontré que l'IL-1 $\beta$  favorise l'apparition de fibrosarcomes (Krelin et al., 2007). Dans ce modèle, l'absence d'IL-1 $\beta$  provoque une diminution significative de la croissance tumorale ainsi qu'un faible recrutement de cellules immunitaires inflammatoires. La surexpression d'IL-1 $\beta$  dans des cellules de fibrosarcomes les rend également plus agressives (Song et al., 2003). Dans d'autres modèles, différentes études montrent que l'absence d'IL-1 $\beta$  réduit fortement l'invasion des cellules, via notamment une forte diminution de l'angiogenèse et une dérégulation du VEGF (Carmi et al., 2013; Voronov et al., 2003). Enfin, dans un modèle murin de croissance tumorale mammaire, via l'injection de cellules 4T1, l'absence de l'IL-1R provoque un retard de croissance des tumeurs primaires ainsi que de l'apparition de métastases (Bunt et al., 2007). Ce phénomène s'explique par une diminution du recrutement des MDSC sur le site tumoral en absence de signalisation de l'IL-1 $\beta$  (Figure 13). De plus, la surexpression de l'IL-1 $\beta$  par les cellules 4T1 favorise leur croissance et l'apparition de métastases (Bunt et al., 2006).

De manière intéressante, tandis que les cellules immunitaires sont les principales sources d'IL-1 $\beta$  dans notre corps, certaines cellules tumorales agressives sont également capables d'en produire (Okamoto et al., 2010; Singer et al., 2003).



**Figure 13 : Inflammasome et cancer, rôles décrits pour l'IL-1 $\beta$ , l'IL-18 et NLRP3**

Dans la littérature, la présence d'IL-1 $\beta$  dans le microenvironnement tumoral est régulièrement décrite comme un facteur de mauvais pronostic. Les études ont, pour la plupart, montrer un rôle pro-tumoral de l'IL-1 $\beta$  au cours de la progression tumorale dans de nombreux modèles murins.

Le rôle de l'IL-18 semble plus contrasté avec des rôles pro- ou anti-tumoraux selon les modèles.

Enfin, le rôle de NLRP3 et de l'inflammasome est également pro- ou anti-tumoral selon les modèles étudiés.

## B. Rôle de l'IL-18 au cours de la progression tumorale

L'IL-18 est généralement considérée comme une cytokine anti-tumorale. Dans un modèle murin de carcinomes induit par de l'azoxymethane (AOM) ou du DSS, les souris IL-18<sup>-/-</sup> ou IL-18R<sup>-/-</sup> développent plus de cancers colorectaux suggérant un rôle protecteur de l'IL-18 (Salcedo et al., 2010; Zaki et al., 2010). Dans ce modèle, l'absence d'IL-18 provoque une diminution de l'expression de l'IFN- $\gamma$  suggérant un rôle de l'IL-18 dans la réponse anti-tumorale médiée par les cellules NK et les cellules T cytotoxiques. D'un autre côté, l'administration d'IL-18 recombinante provoque une réduction de la croissance tumorale dans des modèles murins de mélanomes ou de sarcomes via l'activation des cellules NK et T CD4 (Nishio et al., 2008; Osaki et al., 1998). En présence de cytokines co-stimulatrices telles que l'IL-12, l'activité anti-tumorale de l'IL-18 est encore améliorée (Cho et al., 2000). En conséquence, des études cliniques ont débuté dans les années 2000 afin d'évaluer l'efficacité d'un traitement basé sur des injections d'IL-18 recombinantes. Seule, l'IL-18 est bien tolérée, induisant une lymphopénie à court terme, mais augmentant l'expression de CD69 et du récepteur FasL sur les lymphocytes T et les cellules NK (Robertson et al., 2006, 2008). L'effet sur les tumeurs est cependant limité et n'est pas beaucoup amélioré par l'injection de cytokines co-stimulatrices (Robertson et al., 2013) (Figure 13).

Toutefois, il est important de noter que certaines études suggèrent également un rôle pro-tumoral de l'IL-18 (Fabbi et al., 2015). L'injection d'IL-18 peut conduire dans certains cas à une accumulation de MDSC dans des modèles de mélanomes murins (Lim et al., 2014). L'IL-18 peut également conduire à l'expression de PD-1 (Programmed death 1) sur les cellules NK, réduisant alors leur pouvoir anti-métastatique (Terme et al., 2011, 2012). Dans ce modèle, l'injection de son inhibiteur naturel, l'IL-18BP, permet de restaurer l'activité des cellules NK et l'immunosurveillance (Figure 13).

## C. L'inflammasome NLRP3 dans le cancer

Le rôle de l'inflammasome dans le cancer est encore mal compris. Selon le modèle étudié et l'inflammasome étudié, il semble avoir tantôt un effet pro-tumoral tantôt un effet anti-tumoral (Terlizzi et al., 2014). Parmi eux, l'inflammasome NLRP3 n'échappe pas à cette règle et peu d'étude ont pu démontrer son rôle *in vivo*.

Dans un modèle de fibrosarcomes induits par carcinogènes ou de mélanome métastatique, NLRP3 altère l'activation des cellules NK et des lymphocytes T anti-tumoraux. En effet, les souris déficientes pour NLRP3 montrent une réduction de l'apparition de tumeurs et de métastases dans ces modèles (Chow et al., 2012). D'une part les souris déficientes pour NLRP3, l'IL-1R ou la caspase-1 développent moins de fibrosarcomes induits par méthylcholanthrène suggérant un rôle de l'inflammasome et de l'IL-1 $\beta$  dans l'apparition de tumeurs. D'autre part, dans différents modèles métastatiques, NLRP3 semble favoriser l'apparition de métastases via l'altération de la

réponse anti-tumorale des cellules NKs. Dans ce cas, l'effet est indépendant de l'inflammasome et de la sécrétion de cytokines (Chow et al., 2012). Plus récemment, M. Bruchard et collègues ont montré que l'inflammasome NLRP3 atténue l'effet anti-tumoral de 2 traitements chimio-thérapeutiques : la Gemcitabine et le 5-fluorouracil (Bruchard et al., 2013). Ces deux traitements éliminent efficacement les MDSC et provoquent, dans un premier temps, une diminution de la croissance tumorale grâce à la restauration de l'immunité. Cependant, il est fréquent d'observer un retour de la croissance tumorale malgré les traitements. En étudiant les mécanismes sous-jacents, M. Bruchard a montré que le 5-fluorouracil et la Gemcitabine provoquent, en plus de la mort, l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les MDSC. Ainsi sécrétée, l'IL-1 $\beta$  participe alors au recrutement de lymphocytes Th17 à fort potentiel immunosuppresseur. Ainsi, cette étude montre l'ambivalence des chimiothérapies et prône un rôle pro-tumoral pour l'inflammasome NLRP3 dans ce cas (Figure 13).

Comme précisé auparavant, NLRP3 peut également avoir un rôle anti-tumoral dans certains modèles de cancers. Dans un modèle de tumeurs colorectales induites par des carcinogènes, l'absence de NLRP3 favorise l'apparition de tumeurs suggérant un rôle anti-tumoral de NLRP3 (Allen et al., 2010; Du et al., 2016; Zaki et al., 2010). D'autre part, les équipes des professeurs G. Kroemer et L. Zitvogel ont démontré que l'activation de l'inflammasome NLRP3 au sein des cellules dendritiques provoque la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et induit une réponse immunitaire adaptative contre les cellules tumorales (Ghiringhelli et al., 2009). Dernièrement, l'équipe de M. Saleh a montré que les souris déficientes pour NLRP3 présentent un nombre de métastases hépatiques plus important que des souris contrôles dans un modèle d'injections de cellules tumorales dans la rate (Dupaul-Chicoine et al., 2015). Dans cette étude, NLRP3 permet la sécrétion d'IL-18 qui favorise la réponse anti-métastatique via l'activation des cellules NK (Figure 13).

Parmi les autres inflammasomes, les études montrent que NLRC4 induit une réponse inflammatoire favorisant l'apparition de tumeurs dans un modèle de tumeurs colorectales induites par carcinogène (Hu et al., 2010). Enfin, comme vu précédemment, en dehors de l'inflammasome, le récepteur AIM2 empêche le développement de tumeurs colorectales induites par carcinogènes via l'inhibition de la voie PI3K-Akt (Man et al., 2015; Wilson et al., 2015).

---

## Chapitre 5. Intérêt scientifique et problématique du projet de thèse

---

Au cours d'un premier projet de recherche, nous nous sommes intéressés aux interactions qui peuvent exister entre les différents récepteurs capables de former un inflammasome. Nous avons vu dans le second chapitre que l'activation de l'inflammasome NLRP3 était dépendante d'un efflux d'ion potassium (Pétrilli et al., 2007a) et qu'il était capable de l'empêcher en inhibant cet efflux par ajout d'ions K<sup>+</sup> dans le milieu extracellulaire. Des études ayant rapporté que l'inflammasome NLRP1b était également inhibé en présence de K<sup>+</sup> extracellulaire, nous avons voulu déterminer si NLRP3 contribuait à la formation de l'inflammasome NLRP1b.

De plus, la présence d'un domaine CARD au sein de récepteur NLRP1b suggère une interaction directe avec la caspase-1 sans nécessiter la présence de l'adaptateur ASC. Pourtant, des études montrent que l'absence de ASC réduit partiellement l'activité de l'inflammasome NLRP1 (Faustin et al., 2007). Nous avons donc entrepris de découvrir le rôle de ASC au sein de l'inflammasome NLRP1b.

L'objectif de ce premier projet fût de comprendre les relations qui pouvaient exister entre les récepteurs NLRP3 et NLRP1b ainsi que de déterminer le rôle de l'adaptateur ASC au cours de la formation de l'inflammasome NLRP1b.

L'inflammasome est un acteur essentiel du système immunitaire inné découvert récemment. Il fait l'objet de nombreuses publications mais il reste encore des zones d'ombre sur son fonctionnement dans certaines pathologies telles que le cancer. Dans cette introduction, nous avons vu que les études récentes démontrent une véritable dualité fonctionnelle de l'inflammasome selon le contexte tumoral. En effet, il n'y a, à ce jour, pas de consensus permettant de définir le rôle anti- ou pro-tumoral de l'inflammasome.

Les récentes études mettent en avant qu'une forte concentration d'IL-1 $\beta$  dans le microenvironnement de tumeurs mammaires est de mauvais pronostic pour les patientes (Bunt et al., 2007; Miller et al., 2000; Patschenko et al., 2003)(observations non publiées de l'équipe de C. Caux au CRCL). Ces données suggèrent donc que le complexe régulant l'activité de l'IL-1 $\beta$ , l'inflammasome, est activé et participe au développement tumoral mammaire. Au cours de mes quatre années de thèse, nous avons cherché à déterminer si l'IL-1 $\beta$  présente dans les tumeurs provenait de l'activation de l'inflammasome via l'étude de croissance tumorale dans des modèles murins déficients pour des composants de l'inflammasome tels que la caspase-1 et ASC. Outre la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , nous voulions déterminer l'impact de l'activation de l'inflammasome sur la croissance de cellules tumorales mammaires. De plus, parmi les différents récepteurs capables de former l'inflammasome, NLRP3 détecte un grand nombre de signaux de dangers que l'on peut

retrouver fréquemment dans le microenvironnement tumoral (ATP, acide urique). Sans nous arrêter à ASC et Caspase-1, nous avons cherché à déterminer le rôle du récepteur NLRP3 dans la croissance tumorale mammaire au sein de souris NLRP3 déficientes.

Comprendre le rôle de l'inflammasome durant la progression tumorale s'inscrit d'ailleurs pleinement dans le cadre de l'immunothérapie et la recherche de nouveaux traitements contre le cancer.







# **RÉSULTATS**

---

## Publication 1. La nécessité du clivage de la caspase-1 varie selon l'inflammasome activé.

---

### Base de l'étude

Les inflammasomes sont des plateformes moléculaires permettant l'activation de la caspase-1. L'inflammasome NLRP1b a été identifié comme un senseur de la toxine létale de *Bacillus Anthracis* dans les macrophages de souris BALB/c sensibles à cette toxine. En réponse à la toxine létale, l'inflammasome NLRP1b active la caspase-1 pour produire de l'IL-1 $\beta$  mature et induire la pyroptose. Ces deux processus sont connus pour être dépendants de l'autoprotéolyse de la caspase-1. Contrairement au récepteur NLRP1 humain, NLRP1b murin ne possède pas de domaine PYD en N-terminal suggérant que cet inflammasome ne requiert pas l'adaptateur ASC pour se former. De plus, l'activation de NLRP1b par la toxine létale est dépendante d'un efflux d'ion potassium qui est également nécessaire à la formation de l'inflammasome NLRP3. Nous avons donc cherché à déterminer si NLRP3 et ASC participent à la formation de l'inflammasome NLRP1b dans les cellules immunitaires myéloïdes telles que les macrophages et les cellules dendritiques de souris BALB/c.

### Modèle utilisé

Nous avons mis en culture des macrophages inflammatoires péritonéaux de souris BALB/c WT ou déficientes pour différents composants de l'inflammasome : NLRP3, ASC ou caspase-1. Outre ces macrophages inflammatoires, nous avons différencié les cellules souches de la moelle osseuse de ces mêmes souris en macrophages (Bone Marrow-Derived Macrophages) ou en cellules dendritiques (Bone Marrow derived Dendritic Cells). Ces cellules immunitaires ont ensuite été stimulées *in vitro* par des activateurs de NLRP3 et NLRP1b et l'activation de l'inflammasome a été analysée comme décrit dans le chapitre de méthode (Guey and Petrilli, 2016)(en annexe).

### Résultats

Dans un premier temps, nous avons montré que l'absence de NLRP3 n'altère pas la signalisation de NLRP1b. De manière surprenante, l'absence de ASC provoque la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et l'induction de la pyroptose en réponse à la toxine létale mais sans clivage de la caspase-1. En reconstituant des macrophages et des cellules dendritiques *caspase-1/caspase-11* KO avec une forme mutante non clivable de la caspase-1, nous avons démontré que la forme entière de la caspase-1 est capable d'induire la pyroptose et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  en réponse à la toxine létale alors qu'elle n'est pas fonctionnelle au sein de l'inflammasome NLRP3.

## **Conclusion**

L'ensemble de ces résultats montre que le clivage de la caspase-1 n'est pas indispensable à son activité et qu'il dépend avant tout du complexe dans lequel la caspase-1 est recrutée. En effet, alors que le clivage n'est pas nécessaire au sein de l'inflammasome NLRP1b pour induire la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et la pyroptose, il est indispensable lors de l'activation de l'inflammasome NLRP3.

# Caspase-1 autoproteolysis is differentially required for NLRP1b and NLRP3 inflammasome function

Baptiste Guey<sup>a,b,c,d</sup>, Mélanie Bodnar<sup>a,b,c,d</sup>, Serge N. Manié<sup>a,b,c,d</sup>, Aubry Tardivel<sup>e</sup>, and Virginie Petrilli<sup>a,b,c,d,1</sup>

<sup>a</sup>INSERM U1052, <sup>b</sup>CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France; <sup>c</sup>Université de Lyon, Université Lyon 1, F-69000 Lyon, France; <sup>d</sup>Centre Léon Bérard, F-69008 Lyon, France; and <sup>e</sup>Department of Biochemistry, University of Lausanne, CH-1066 Epalinges, Switzerland

Edited by Ruslan Medzhitov, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, and approved October 22, 2014 (received for review August 15, 2014)

**Inflammasomes are caspase-1-activating multiprotein complexes. The mouse nucleotide-binding domain and leucine rich repeat pyrin containing 1b (NLRP1b) inflammasome was identified as the sensor of *Bacillus anthracis* lethal toxin (LT) in mouse macrophages from sensitive strains such as BALB/c. Upon exposure to LT, the NLRP1b inflammasome activates caspase-1 to produce mature IL-1 $\beta$  and induce pyroptosis. Both processes are believed to depend on autoproteolyzed caspase-1. In contrast to human NLRP1, mouse NLRP1b lacks an N-terminal pyrin domain (PYD), indicating that the assembly of the NLRP1b inflammasome does not require the adaptor apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC). LT-induced NLRP1b inflammasome activation was shown to be impaired upon inhibition of potassium efflux, which is known to play a major role in NLRP3 inflammasome formation and ASC dimerization. We investigated whether NLRP3 and/or ASC were required for caspase-1 activation upon LT stimulation in the BALB/c background. The NLRP1b inflammasome activation was assessed in both macrophages and dendritic cells lacking either ASC or NLRP3. Upon LT treatment, the absence of NLRP3 did not alter the NLRP1b inflammasome activity. Surprisingly, the absence of ASC resulted in IL-1 $\beta$  cleavage and pyroptosis, despite the absence of caspase-1 autoproteolytic activity. By reconstituting *caspase-1/caspase-11*<sup>-/-</sup> cells with a noncleavable or catalytically inactive mutant version of caspase-1, we directly demonstrated that noncleavable caspase-1 is fully active in response to the NLRP1b activator LT, whereas it is nonfunctional in response to the NLRP3 activator nigericin. Taken together, these results establish variable requirements for caspase-1 cleavage depending on the pathogen and the responding NLR.**

interleukin-1beta | pyroptosis | lethal toxin | macrophage | dendritic cell

Anthrax is a zoonotic disease caused by the Gram-positive bacterium *Bacillus anthracis*. *B. anthracis* provokes a shock-like syndrome that can prove fatal to the host (1) and has recently gained notoriety as a potential bioterrorism agent. Anthrax pathogenicity relies on its ability to secrete three virulence proteins, which combine with each other to form two toxins. The protective antigen (PA) combines with the edema factor (EF) to form the edema toxin (2, 3). EF is an adenylate cyclase that causes edema of the infected tissue. The binary combination of PA with lethal factor (LF) gives rise to the most virulent factor, called lethal toxin (LT), responsible for the systemic symptoms and death of the infected animal. To escape the host immune response, LT impairs the host innate immunity by killing macrophages (4–6). The PA protein interacts with LF and binds to cell surface receptors, enabling endocytosis of the LT complex. In the acidic compartment, PA forms pores allowing the delivery of LF to the cytosol. LF is a zinc metalloprotease that was shown to cleave the N-terminal region of many MAP kinase kinases and to induce apoptosis of macrophages. LT also triggers pyroptosis through the formation of a caspase-1-activating platform, named “inflammasome” (6–8).

Inflammasomes are multiprotein complexes of the innate immune response that control caspase-1 activity and pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18 maturation. Most inflammasomes are composed of specific cytosolic pathogen recognition receptors (PRRs), as well as the apoptosis-associated speck-like protein containing

a caspase activation and recruitment domain (CARD) (ASC) adaptor protein that enables the recruitment and activation of the caspase-1 protease. Once caspase-1 is oligomerized within an inflammasome platform, the enzyme undergoes autoproteolysis to form heterodimers of active caspase-1 (9–12). In the mouse, at least five distinct inflammasomes have been described, distinguished by the PRR that induces the complex formation. The PRRs capable of participating in inflammasome platform formation are either members of the nod-like receptor (NLR) family (e.g., NLRP1, NLRP3, or NLRC4) or of the PYrin and HIN (PYHIN) family (e.g., AIM2) (13, 14). ASC is composed of a pyrin domain (PYD) and a caspase activation and recruitment domain (CARD). ASC interacts with a PYD-containing PRR via its PYD domain and recruits the CARD domain of caspase-1 via its CARD domain. Thus, ASC is essential to the formation of the inflammasome by receptors such as NLRP3 or AIM2 (15–18). However, its presence is dispensable for NLRC4, which contains a CARD in place of a PYD, allowing direct interaction with the CARD domain of caspase-1 (19, 20).

Past studies have determined that certain mouse strains are more sensitive than others to LT cytotoxicity, and genetic studies identified *NLRP1b* as the factor conferring mouse strain susceptibility to anthrax LT (21). The mouse genome contains three different *NLRP1* isoforms (*a*, *b*, and *c*) and a functional NLRP1b was found to be expressed by the mouse strains sensitive to LT (e.g., BALB/c or 129 background). Expression of NLRP1b was shown to mediate IL-1 $\beta$  release and caspase-1-mediated cell death in response to LT (7, 21, 22). Mouse NLRP1b differs structurally from human NLRP1 in that it lacks the N-terminal PYD (23). The absence of the PYD suggests that NLRP1b can directly engage caspase-1 without a requirement for ASC.

## Significance

**In the context of the nucleotide-binding domain and leucine rich repeat pyrin containing 1b (NLRP1b) inflammasome activation by anthrax lethal toxin, we reveal a new role for full-length caspase-1. We directly demonstrate that the caspase-1 45-kDa zymogen is able to process pro-IL-1 $\beta$  and to induce pyroptosis, and that apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD is dispensable for the activity of the NLRP1b inflammasome. This is in contrast to the NLRP3 inflammasome activity, which is inhibited in the absence of caspase-1 autoproteolysis. Our data, which highlight differential requirements for caspase-1 autoproteolysis in NLRP1b and NLRP3 inflammasome function, may have implications for pathogen recognition and response.**

Author contributions: B.G. and V.P. designed research; B.G., M.B., A.T., and V.P. performed research; S.N.M. contributed new reagents/analytic tools; B.G. and V.P. analyzed data; and B.G. and V.P. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed. Email: virginie.petrilli@lyon.unicancer.fr.

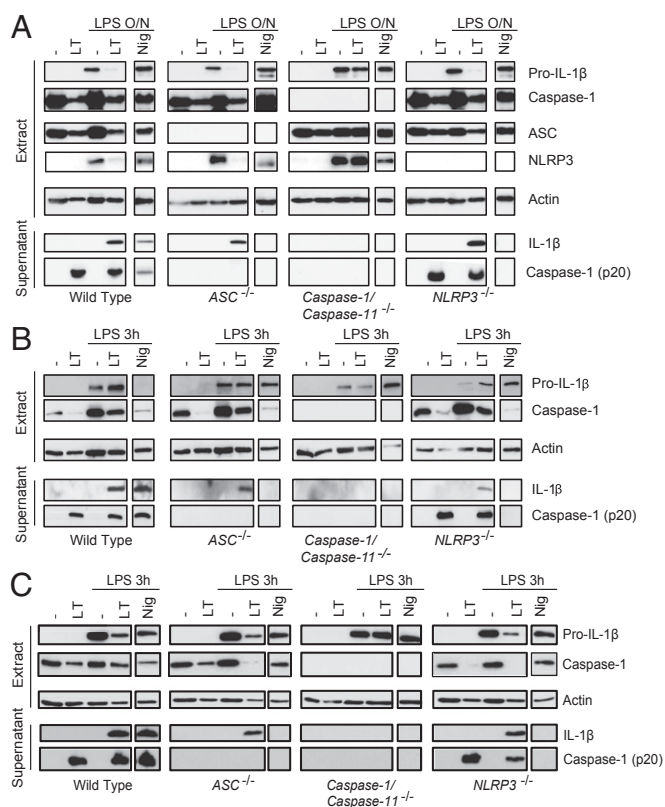
This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1415756111/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1415756111/-DCSupplemental).

However, studies dissecting the mechanism of NLRC4 inflammasome activation demonstrated that ASC is required for the amplification of caspase-1 autoprocessing and IL-1 $\beta$  secretion but not for pyroptosis (19, 20). Cell lysis mediated by LT was shown to be dependent on sodium and potassium fluxes (24), and high extracellular potassium inhibited IL-1 $\beta$  secretion upon LT treatment, suggesting a role for the NLRP3 inflammasome in LT sensing (22, 25). Therefore, we investigated whether NLRP3 and/or ASC were required for caspase-1 activation in response to LT. The *NLRP3*, *ASC*, and *caspase-1* mouse knockout strains were backcrossed into the BALB/c background and the response of macrophages and dendritic cells (DCs) to LT intoxication was studied. Our data reveal that (i) in response to LT, ASC is dispensable for caspase-1 activation, but uncleavable caspase-1 is fully active; and (ii) upon activation of the NLRP3 inflammasome, uncleavable caspase-1 is inactive.

## Results

**Secretion of Mature IL-1 $\beta$  in Response to LT Is Independent of the NLRP3 Inflammasome in Murine Macrophages.** In response to LT, NLRP1b is activated to form an inflammasome, resulting in caspase-1 activation. To study whether ASC and/or NLRP3 were also required to activate caspase-1 in response to LT, we isolated peritoneal macrophages and differentiated macrophages from bone marrow progenitors (BMDMs) from BALB/c WT, *caspase-1/caspase-11*<sup>-/-</sup>, *ASC*<sup>-/-</sup>, or *NLRP3*-deficient mice. In mouse macrophages, lipopolysaccharide (LPS) is used as the priming signal, also called signal 1 that is necessary to induce the expression of the caspase-1 substrate, pro-IL-1 $\beta$ , and to increase the amount of NLRP3. The cells were then incubated with LT for 6 h and inflammasome activation was monitored by assessing the secretion of mature IL-1 $\beta$  and cleaved caspase-1. As expected, LT induced secretion of mature IL-1 $\beta$  and cleaved caspase-1 (p20) in the supernatant of primed WT cells (Fig. 1 A and B). Secretion of IL-18 was also significantly increased upon LT treatment (Fig. S1A). In nonprimed macrophages, the level of cleaved caspase-1 secreted into the supernatant was similar to that under priming conditions (Fig. 1 A and B). Upon LT treatment, *NLRP3*<sup>-/-</sup> macrophages secreted a similar amount of IL-1 $\beta$ , IL-18, and cleaved caspase-1 to WT cells, demonstrating that NLRP3 was dispensable for NLRP1b inflammasome activation (Fig. 1 and Fig. S1A). LT treatment triggered significant IL-1 $\beta$  maturation in the cell supernatants of *ASC*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages and BMDMs, suggesting that ASC was not required for NLRP1b inflammasome formation to induce IL-1 $\beta$  maturation (Fig. 1 A and B). Intriguingly, in the absence of ASC, cleaved caspase-1 was not detected in the cell supernatant of either peritoneal macrophages or BMDMs, whether the cells were primed or not. Similarly, cleaved caspase-1 was not detected in the *ASC*<sup>-/-</sup> cell lysates, suggesting that caspase-1 did not undergo autoproteolysis (Fig. S1B). As previously described, IL-1 $\beta$  and caspase-1 p20 secretions were abolished in *NLRP3*<sup>-/-</sup> and *ASC*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages and BMDMs in response to the NLRP3 activator nigericin (15). Finally, primed *caspase-1/caspase-11*<sup>-/-</sup> macrophages treated with LT did not produce mature IL-1 $\beta$ , demonstrating that caspase-1 is the effector of NLRP1b activation.

**LT Induces IL-1 $\beta$  Maturation in the Absence of Caspase-1 Cleavage in *ASC*<sup>-/-</sup> Bone Marrow Derived Dendritic Cells.** To determine whether the phenotype observed in mouse macrophages was conserved in mouse DC, bone marrow dendritic cells (BMDCs) from WT, *ASC*<sup>-/-</sup>, *NLRP3*<sup>-/-</sup>, and *caspase-1/caspase-11*-deficient mice were generated and exposed to LT. WT BMDCs released a similar amount of cleaved caspase-1 into the cell supernatant whether or not the cells were exposed to a priming signal; however, only LPS-primed cells secreted a large amount of mature IL-1 $\beta$  (Fig. 1C). As expected, *caspase-1/caspase-11*<sup>-/-</sup> BMDCs primed with LPS did not produce active IL-1 $\beta$  (Fig. 1C). In *NLRP3*<sup>-/-</sup>

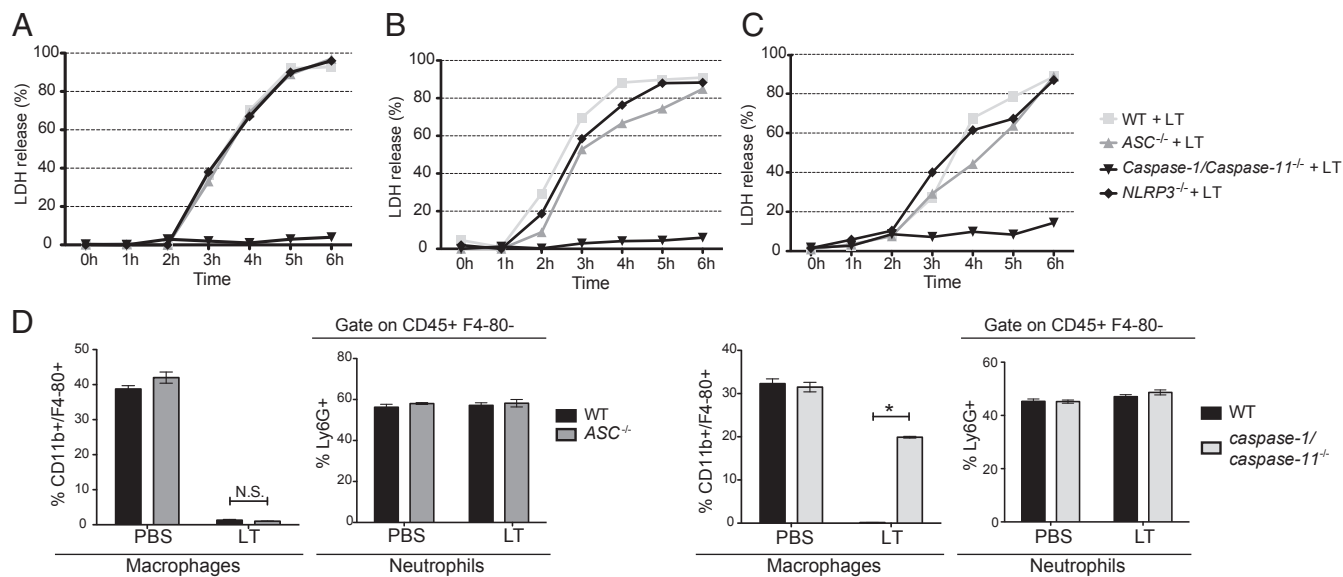


**Fig. 1.** LT induces IL-1 $\beta$  secretion but not caspase-1 autoprocessing in *ASC*-deficient macrophages and BMDCs. Nonprimed or LPS-primed mouse peritoneal macrophages (A) or BMDMs (B) or BMDCs (C) of indicated genotypes were treated with *B. anthracis* lethal toxin (LT, 0.5  $\mu$ g/mL, 6 h) or nigericin (Nig, 10  $\mu$ M, 2 h) or left untreated (-); caspase-1 and IL-1 $\beta$  cleavage, and ASC and NLRP3 protein levels were assessed by Western blot. Actin was used as a loading control. These results were replicated three times independently.

BMDCs, LT induced similar levels of caspase-1 activation to WT cells, as illustrated by the amount of p20 subunit secreted into the cell supernatant. Furthermore, in the presence of LPS + LT, *NLRP3*<sup>-/-</sup> cells efficiently secreted IL-1 $\beta$ , demonstrating that NLRP3 does not participate in NLRP1b inflammasome formation in response to LT (Fig. 1C). *ASC*<sup>-/-</sup> BMDCs stimulated with LT did not secrete processed caspase-1 as illustrated by the absence of p20 in the cell supernatant, regardless of the presence of a priming signal. As observed in macrophages, when the cells were primed with LPS, mature IL-1 $\beta$  was secreted despite the lack of processed caspase-1 in the cell supernatant (Fig. 1C). Thus, the absence of ASC in primed BMDCs prevents caspase-1 autoprocessing but does not affect the pro-IL-1 $\beta$  maturation and secretion (Fig. 1C and Fig. S1C). As described earlier, the absence of NLRP3 and ASC abolished the IL-1 $\beta$  production in response to nigericin treatment.

**LT-Induced Pyroptosis Is Independent of NLRP3 and ASC.** In addition to its role in IL-1 $\beta$  maturation, LT is a potent inducer of pyroptosis, a caspase-1-dependent cell death (21). To address the question of whether ASC and NLRP3 are required for LT-induced pyroptosis, peritoneal macrophages isolated from WT, *caspase-1/caspase-11*<sup>-/-</sup>, *ASC*<sup>-/-</sup>, and *NLRP3*<sup>-/-</sup> mice, were treated with LT and cell death was monitored over 6 h. As shown in Fig. 2A, when exposed to LT, WT macrophages died rapidly, beginning at 2 h posttreatment and reaching more than 90% cell death by 6 h. *ASC*<sup>-/-</sup> and *NLRP3*<sup>-/-</sup> cells were as sensitive as WT cells to LT-induced pyroptosis, indicating that neither ASC nor NLRP3 participated in LT-induced cell death. LT

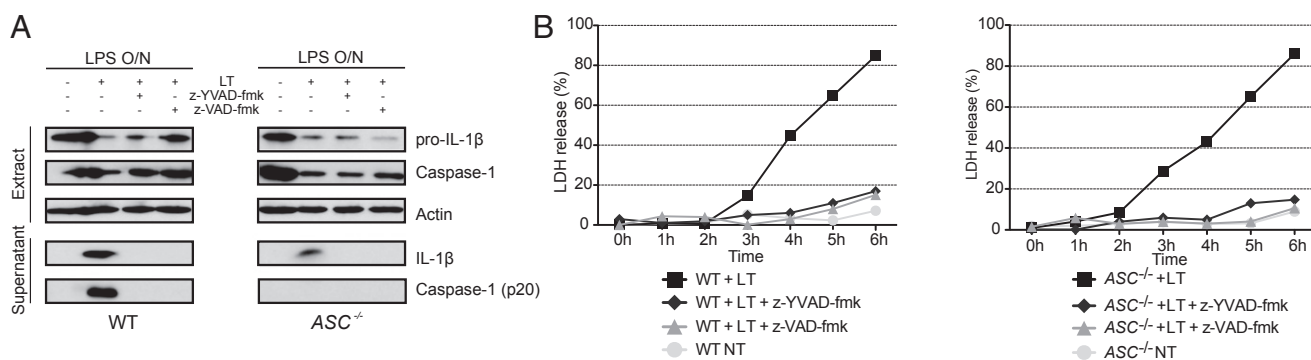




**Fig. 2.** ASC and NLRP3 are dispensable for LT-induced cell death. LPS-primed mouse peritoneal macrophages (A) or BMDMs (B) or BMDCs (C) of indicated genotypes were treated with LT (0.5  $\mu$ g/mL) for 6 h. Cell death was measured by cytotoxic assay (lactate dehydrogenase, LDH release) upon LT treatment over a time course of 6 h. Quantification by flow cytometry of peritoneal macrophages and neutrophils in the peritoneum of WT and *ASC*<sup>-/-</sup> mice (Left) or WT and *Caspase-1/Caspase-11*<sup>-/-</sup> mice (Right) injected with PBS or LT for 3 h is shown (D). Data represent mean  $\pm$  SEM \**P* < 0.01 (Mann-Whitney test) (N.S., nonsignificant).

intoxication was easily visible 2 h posttreatment by phase contrast microscopy as illustrated by the presence of bright blebs on sensitive cells (Fig. S2A). As described previously in the literature, *Caspase-1/Caspase-11*<sup>-/-</sup> macrophages were fully protected from pyroptosis and showed no morphological signs of intoxication (Fig. 2A and Fig. S2A) (21). Similar experiments were carried out in BMDMs (Fig. 2B) and BMDCs (Fig. 2C), and, as described for peritoneal macrophages, ASC and NLRP3 were not required for the pyroptosis triggered by LT. The absence of caspase-1 protected both BMDMs and BMDCs from death. Next, an in vivo model was used to assess in situ the macrophage sensitivity to LT intoxication. Thioglycollate-treated animals were injected intraperitoneally on day 3 with LT and euthanized 3 h later to quantify the number of macrophages present in the peritoneal cavity. As observed in vitro, LT induced the death of peritoneal macrophages in vivo of WT and *ASC*<sup>-/-</sup> mice, whereas peritoneal macrophages of *Caspase-1/Caspase-11*<sup>-/-</sup> mice were mostly not affected, but did not induce the death of neutrophils (Fig. 2D and Fig. S2B).

**Uncleaved Caspase-1 Is Able to Induce Pyroptosis and IL-1 $\beta$  Maturation upon LT Stimulation.** Altogether, these observations suggest that caspase-1 may be fully active in its 45-kDa form and in the absence of autoprocessing. To clarify whether caspase-1 activity is involved in IL-1 $\beta$  secretion and pyroptosis in *ASC*<sup>-/-</sup> cells, WT and *ASC*<sup>-/-</sup> macrophages were pretreated with carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone (z-VAD-fmk), a pan-caspase inhibitor, or Z-Tyr-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone (z-YVAD-fmk), a caspase-1-specific inhibitor, before the addition of the toxin. In WT cells, z-VAD-fmk and z-YVAD-fmk completely inhibited both the NLRP3 inflammasome activity in response to nigericin, and the NLRP1b inflammasome activity upon LT treatment, as illustrated by the absence of mature IL-1 $\beta$  and cleaved caspase-1 in the cell supernatants (Fig. 3A). LT-induced IL-18 secretion was also reduced (Fig. S3A). Similarly, in *ASC*<sup>-/-</sup> cells incubated with LT, a complete inhibition of IL-1 $\beta$  and IL-18 secretion was observed in the presence of z-VAD-fmk or z-YVAD-fmk. Both caspase inhibitors protected WT and *ASC*<sup>-/-</sup> macrophages from LT intoxication (Fig. 3B). These results indirectly suggest that caspase-1 is enzymatically active in *ASC*<sup>-/-</sup> cells



**Fig. 3.** LT-induced cell death and IL-1 $\beta$  secretion rely on caspase-1 catalytic activity in ASC-deficient cells. LPS-primed mouse peritoneal macrophages were treated or not (–, NT) with LT (0.5  $\mu$ g/mL) in the presence or absence of the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk (50  $\mu$ M) or caspase-1 inhibitor z-YVAD-fmk (50  $\mu$ M) for 6 h. Protein expression was assessed by Western blot (A) and cell death was determined by measuring the LDH released in cell supernatants (B). Peritoneal macrophages were isolated from WT or *ASC*<sup>-/-</sup> mice.

despite its inability to undergo autoproteolysis. *Caspase-1/caspase-11*<sup>-/-</sup> BMDMs were reconstituted with retroviruses expressing either WT or different mutant forms of caspase-1 to directly and definitively establish whether, in response to LT, noncleaved caspase-1 is capable of triggering IL-1 $\beta$  and IL-18 maturation and secretion and pyroptosis. Caspase-1 was expressed at similar levels using WT caspase-1, caspase-1 DEAD (mutated at the catalytic site), and uncleavable caspase-1 C71 (catalytically active but mutated in all processing sites) (Fig. 4A) (20). Transduction of *caspase-1/caspase-11*-deficient cells with WT caspase-1-expressing plasmid restored LT sensitivity, as assessed by cell death (Fig. 4B). Furthermore, the expression of WT caspase-1 resulted in the secretion of IL-1 $\beta$  and IL-18 and autoprocessed caspase-1 upon LT and nigericin treatments (Fig. 4A and Fig. S3B). As expected, cells reconstituted with the enzyme-dead version did not produce any active IL-1 $\beta$  in response to LT or to nigericin and were not sensitive to LT intoxication. Interestingly, the expression of the uncleavable C71 caspase-1 mutant was able to restore pyroptosis and the production of mature IL-1 $\beta$  and IL-18, demonstrating that the caspase-1 45 kDa is fully active in response to LT treatment (Fig. 4A and Fig. S3B). As described for BMDMs, the transduction of *caspase-1/caspase-11*-deficient BMDCs with the uncleavable C71 caspase-1 mutant restored both IL-1 $\beta$  secretion and pyroptosis in response to LT (Fig. 4C and D). Notably, in both BMDMs and BMDCs, C71 caspase-1 did not restore nigericin-induced cleavage and secretion of IL-1 $\beta$ , suggesting different mechanisms of caspase-1 activation in the NLRP1b and NLRP3 inflammasomes (Fig. 4A and C).

**LT Induces Speck Formation in WT and Caspase-1/Caspase-11<sup>-/-</sup> Cells.**

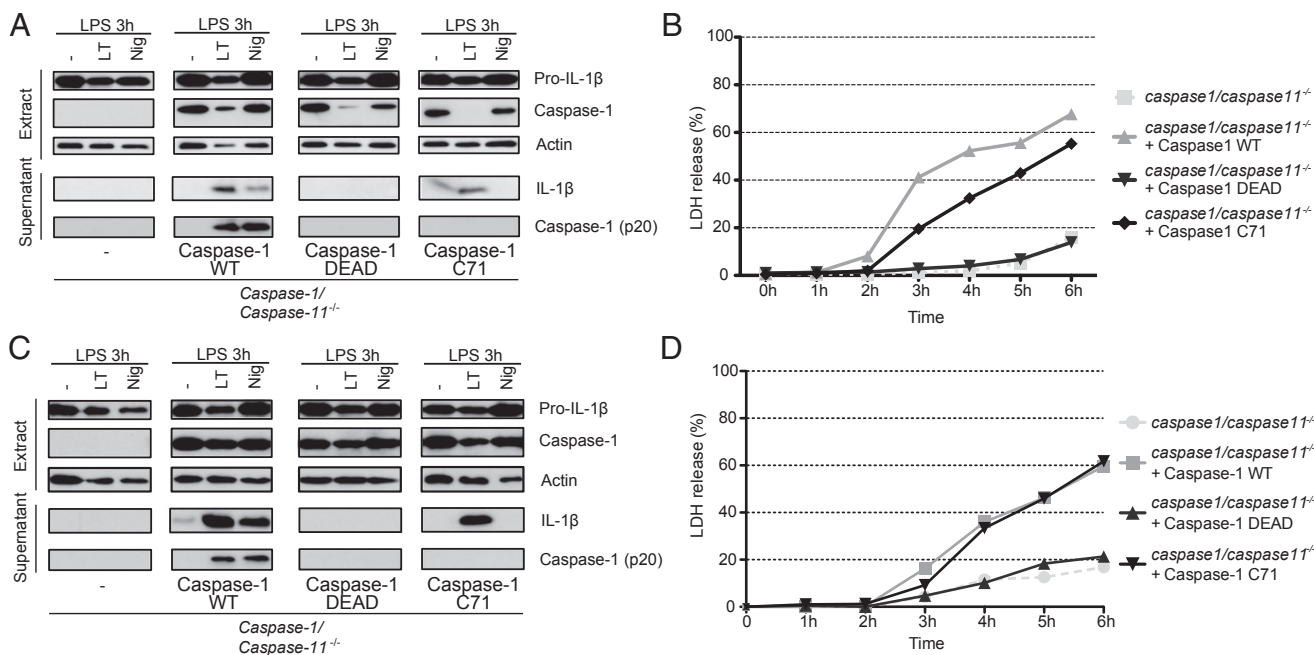
Upon inflammasome activation, ASC assembles into a large multimeric structure called a “speck” detectable by immunofluorescence as a single perinuclear focus (26, 27). The polymerized ASC recruits and dimerizes caspase-1 within the specks, allowing caspase-1 activation by autoproteolysis of the enzyme (27). Recently, efficient cytokine production was associated with autoproteolysis of caspase-1 within specks upon NLRC4 inflammasome

activation (20). LT treatment of macrophages induced caspase-1 cleavage and secretion, suggesting active ASC speck formation. We therefore wondered whether the sensing of LT by the NLRP1b inflammasome could induce ASC speck formation. In WT macrophages treated with LT, ASC specks were detected 2 h posttreatment by immunofluorescence (Fig. 5A). At the same time point, caspase-1 was also found to form a perinuclear focus (Fig. 5B). Colabeling of ASC and caspase-1 clearly demonstrated that foci of caspase-1 were localized in very close proximity to ASC specks (Fig. 5C). In the absence of caspase-1, ASC was still able to form a speck (Fig. 5A). However, when ASC was absent from the cells, no caspase-1 focus was detected, suggesting that ASC specks recruit caspase-1 to the foci in response to LT (Fig. 5B).

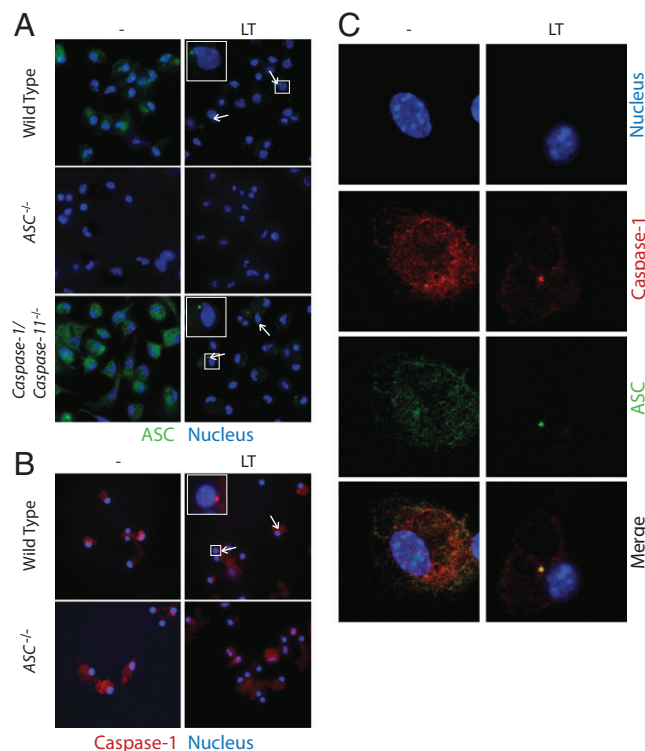
**Discussion**

In mouse macrophages of sensitive strains, LT triggers the formation of the NLRP1b inflammasome, culminating in pyroptosis and in the secretion of mature IL-1 $\beta$  and active caspase-1 (7, 21). We and others could inhibit NLRP1b inflammasome activity by adding extracellular potassium to the culture medium (Fig. S4) (22, 25), suggesting a role for NLRP3 and/or ASC in the formation of the NLRP1b inflammasome. To study whether these proteins contribute to LT detection by the NLRP1b inflammasome, we examined the role of NLRP3, ASC, and caspase-1 in response to LT intoxication in both macrophages and DCs in the mouse BALB/c background.

The data presented here show that LT induces similar levels of autoprocessed caspase-1 in primed and nonprimed cells (Figs. 1 and 2), suggesting that the assembly of the NLRP1b inflammasome does not require any upstream Toll-like receptors (TLRs) signaling (signal 1) for optimal activation. This mode of activation differs from the NLRP3 inflammasome activation. Although the NLRP3 inflammasome can form and activate caspase-1 without an additional signal, studies showed that the TLR priming signal significantly increases the amount of NLRP3 protein and therefore the amount of caspase-1 activated within the inflammasome platform (28, 29).



**Fig. 4.** Caspase-1 autoproteolysis is not required to induce cell death nor to induce IL-1 $\beta$  cleavage and secretion upon LT treatment. LPS-primed BMDMs (A and B) or BMDCs (C and D) from *caspase-1/caspase-11*<sup>-/-</sup> mice, transduced or not (-) with the indicated *caspase-1* constructs were treated with LT (0.5  $\mu$ g/mL) for 6 h or with nigericin (Nig, 10  $\mu$ M) for 2 h or left untreated (-). Protein expression was assessed by Western blot (A and C), LDH release was measured in cell supernatants of LT-treated cells (B and D).



**Fig. 5.** LT induces ASC speck formation in a caspase-1-independent manner. LPS-primed peritoneal macrophages were treated with LT (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or not (-) for 2 h. Cells were then fixed in 2% (wt/vol) paraformaldehyde and immunostained for ASC (green, A) or caspase-1 (red, B). Confocal microscopy sequential imaging of ASC immunostaining (green) and caspase-1 immunostaining (red) was performed on LPS-primed macrophages treated or not (-) with LT (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (C). Hoechst (blue) was used to stain nuclei.

However, our results show that NLRP3 is not required for IL-1 $\beta$  maturation and pyroptosis in response to LT in mouse macrophages and in BMDCs. As such, our results extend those of Kovarova et al. who described that NLRP3 is dispensable for NLRP1b inflammasome activation in macrophages of 129 background mice (30). Using *ASC*-deficient macrophages and BMDCs, we observed that upon LT stimulation, IL-1 $\beta$  secretion and pyroptosis proceeded normally despite the absence of caspase-1 autoproteolysis (Figs. 1 and 2). As described in the literature, *caspase-1/caspase-11*<sup>-/-</sup> macrophages and DCs were fully protected from death and did not secrete any IL-1 $\beta$ . With regard to macrophage cell death, cells were as sensitive *in vivo* as *in vitro*; *ASC*<sup>-/-</sup> macrophages died in response to LT treatment, whereas *caspase-1/caspase-11*<sup>-/-</sup> macrophages were protected (Fig. 2D). Intriguingly, whereas *ASC*<sup>-/-</sup> cells secreted a similar level of IL-1 $\beta$  to WT cells, we were not able to detect any cleaved caspase-1 (p20) in the cell supernatants. However, IL-1 $\beta$  production was dependent on caspase-1 activity, as IL-1 $\beta$  secretion was inhibited by the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk and by the caspase-1 inhibitor z-YVAD-fmk (Fig. 3A). Similarly, pyroptosis was inhibited in *ASC*<sup>-/-</sup> cells with both caspase inhibitors (Fig. 3B). Our results suggest that in response to LT and in the absence of ASC, caspase-1 zymogen (p45) is active despite its inability to undergo autoproteolysis.

Caspase-1 belongs to the family of initiator caspases, which includes caspase-8, -9, and -2. Initiator caspases are found in the cell cytosol as monomeric zymogens with little activity (31). Their activation is thought to follow the proximity-induced dimerization model (32, 33). Local increase in caspase-1 zymogen through dimerization increases the catalytic activity required to initiate its own activation by autoproteolysis. Once proteolysed, the caspase-1

p20 and p10 subunits assemble into enzymatically active p20/p10 dimers that cleave caspase-1 substrates such as pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18 (9, 10). Inflammasomes form the molecular platforms that allow caspase-1 dimerization, activation, and autoproteolysis (11). Our data indicate a possible role for the zymogen form of caspase-1 in IL-1 $\beta$  processing and pyroptosis in *ASC*-deficient cells. A study by Broz et al. suggested that specific inflammasome receptors had distinct molecular platforms with distinct modes of activation of caspase-1 depending on the presence of ASC (20). Inflammasomes with a PRR containing a CARD domain, such as NLRC4, form large specks in the presence of ASC, where caspase-1 is autoproteolysed and cleaves pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18. A second type of NLRC4 inflammasome platform that functions independently of ASC, activates caspase-1 through CARD-CARD interactions without inducing its autoproteolysis activity. This platform controls caspase-1-induced pyroptosis (20). A similar mode of action was proposed for the CARD-containing NLRP1b receptor. However, our study demonstrates another mechanism of activation. In the absence of ASC and caspase-1 autoproteolysis, the NLRP1b inflammasome was still capable of inducing both cytokine maturation and cell death. In addition, by reconstituting *caspase-1/caspase-11*-deficient BMDMs and BMDCs with a vector expressing the uncleavable C71 or the enzyme dead caspase-1 mutant, we showed that uncleavable caspase-1 promoted IL-1 $\beta$  secretion and pyroptosis in response to LT (Fig. 4). The efficient reconstitution of *caspase-1/caspase-11*-deficient cells with WT caspase-1 excluded a role for caspase-11 in response to LT.

While preparing this paper, a study by Van Opdenbosch et al. reported observations similar to ours in C57BL/6 mice expressing a *NLRP1b* transgene (34). They described IL-1 $\beta$  cleavage and pyroptosis in *ASC*<sup>-/-</sup> macrophages. However, their work, which also suggested that uncleaved caspase-1 is active in *ASC*<sup>-/-</sup> macrophages, was largely based on the use of a caspase-1 inhibitor, which, like most pharmacological inhibitors, may lack complete selectivity. In the work presented here, we sought to overcome this limitation and, by reconstituting caspase-1 knockout cells expressing endogenous NLRP1b with different caspase-1 mutant constructs, we directly and definitively demonstrated for the first time to our knowledge that the uncleavable version of caspase-1 accomplishes efficient IL-1 $\beta$  maturation and pyroptosis upon LT stimulation.

Our work suggests that the NLRP1b-caspase-1 interaction through their CARD domains confers a structural change allowing full-length caspase-1 to become activated. The NLRP1b inflammasome may function like the apoptosome (Fig. S5). A recent biochemical analysis reported that the electrostatic surface charges of hNLRP1 and caspase-1 CARDs share similarities with the surfaces of Apaf-1 and caspase-9 CARDs (35). Caspase-9 was shown to be active in its full-length form when oligomerized within the apoptosome in the absence of autoproteolysis (36, 37). Further biochemical experiments are required to understand how full-length caspase-1 is activated within the NLRP1b inflammasome.

In addition, we show that the C71 uncleavable mutant was not effective in response to the NLRP3 inflammasome activator nigericin despite the presence of ASC. This result implies that the NLRP3 inflammasome fully relies on caspase-1 autoproteolysis for activity. The NLRP3 inflammasome requires the presence of ASC to activate caspase-1. Indeed, it has been widely described that in response to NLRP3 activators, the IL-1 $\beta$  secretion is abolished and the pyroptosis is strongly impaired in *ASC*<sup>-/-</sup> macrophages (16, 19). NLRP3 bearing only a PYD and no CARD domain requires ASC, containing both a PYD and a CARD, to recruit caspase-1 and to form an inflammasome. Caspase-1 is then autoproteolysed and activated within specks. Thus, NLRP1b and NLRP3 inflammasomes differentially activate caspase-1.

Our study also shows that in WT cells treated with LT, ASC specks are formed and foci of caspase-1 colocalized with the specks (Fig. 5). In the absence of ASC, the foci of caspase-1 are



not detected, whereas in the absence of caspase-1, ASC specks are still formed. In response to LT, ASC specks are most likely responsible for the autoproteolysis of caspase-1 as previously described for other inflammasomes (20, 27). Recent studies demonstrated that ASC PYD and MAVS CARD domains function like prion domains by inducing polymerization of the PYD and CARD domains (38). Our results suggest that the NLRP1b CARD domain is not able to induce polymerization of caspase-1 because no focus was detected in the absence of ASC. However, ASC speck formation is most likely dependent on the NLRP1b CARD domain. ASC polymerization was shown to be dependent on low intracellular potassium concentration (27). ASC assembly and the NLRP3 inflammasome activation are inhibited by increasing the extracellular potassium concentration above 90 mM (25, 27). Despite the inhibitory effect of extracellular potassium addition on the NLRP1b inflammasome activation by LT, caspase-1 activity was not dependent on its autoproteolysis within the ASC speck. Low intracellular potassium may be required for NLRP1b and caspase-1 interaction. Indeed, it has previously been demonstrated that the apoptosome assembly is sensitive to potassium concentration (39). The NLRP1b inflammasome can efficiently activate caspase-1 in the absence of ASC and in the absence of caspase-1 autoproteolysis. It is therefore tempting to speculate that ASC may have additional functions yet to be described. Similarly, caspase-1 autoproteolysis appears not to be critical for its activity. Thus, it remains to be elucidated why caspase-1 autoproteolyzes in WT cells in response to LT and whether the autoproteolysis is associated with unknown function.

In conclusion, our data, which highlight differential requirements for caspase-1 autoproteolysis in NLRP1b and NLRP3 inflammasome function, may have implications for pathogen recognition and response.

1. Banks DJ, Ward SC, Bradley KA (2006) New insights into the functions of anthrax toxin. *Expert Rev Mol Med* 8(7):1–18.
2. Bradley KA, Mogridge J, Mourez M, Collier RJ, Young JA (2001) Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* 414(6860):225–229.
3. Moayeri M, Leppla SH (2004) The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 7(1):19–24.
4. Alileche A, Serfass ER, Muehlbauer SM, Porcelli SA, Brojtsch J (2005) Anthrax lethal toxin-mediated killing of human and murine dendritic cells impairs the adaptive immune response. *PLoS Pathog* 1(2):e19.
5. Agrawal A, et al. (2003) Impairment of dendritic cells and adaptive immunity by anthrax lethal toxin. *Nature* 424(6946):329–334.
6. Park JM, Greten FR, Li Z-W, Karin M (2002) Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science* 297(5589):2048–2051.
7. Cordoba-Rodriguez R, Fang H, Lankford CSR, Frucht DM (2004) Anthrax lethal toxin rapidly activates caspase-1/ICE and induces extracellular release of interleukin (IL)-1beta and IL-18. *J Biol Chem* 279(20):20563–20566.
8. Duesbery NS, et al. (1998) Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science* 280(5364):734–737.
9. Elliott JM, Rouge L, Wiesmann C, Scheer JM (2009) Crystal structure of procaspase-1 zymogen domain reveals insight into inflammatory caspase autoactivation. *J Biol Chem* 284(10):6546–6553.
10. Walker NP, et al. (1994) Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: A (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer. *Cell* 78(2):343–352.
11. Martinon F, Burns K, Tschopp J (2002) The inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-1beta. *Mol Cell* 10(2):417–426.
12. Thornberry NA, et al. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356(6372):768–774.
13. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R (2012) Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481(7381):278–286.
14. Schroder K, Tschopp J (2010) The inflammasomes. *Cell* 140(6):821–832.
15. Mariathasan S, et al. (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440(7081):228–232.
16. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440(7081):237–241.
17. Muruve DA, et al. (2008) The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 452:103–7.
18. Hornung V, et al. (2009) AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458(7237):514–518.
19. Mariathasan S, et al. (2004) Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430(6996):213–218.
20. Broz P, von Moltke J, Jones JW, Vance RE, Monack DM (2010) Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe* 8(6):471–483.

## Materials and Methods

**Reagents.** Nigericin (N7143) and KCl (P9541) from Sigma, ultra-pure LPS (*Escherichia coli* 0111:B4) from Invivogen, anthrax lethal factor (batch 1692A1B), and protective antigen (batch 17117A1B) from List Biological Laboratories. z-VVAD-fmk and z-VAD-fmk are from Bachem.

**Mice.** NLRP3<sup>-/-</sup> mice were obtained from J. Tschopp (16), ASC<sup>-/-</sup> mice from V. M. Dixit (19), and caspase-1<sup>-/-</sup> mice from R. A. Flavell (40). The three transgenic strains were backcrossed in BALB/c/Ola background for at least nine generations. WT animals were littermates from the *caspase-1/caspase-11<sup>-/-</sup>*, *ASC<sup>-/-</sup>*, or *NLRP3<sup>-/-</sup>* colonies. Animals were housed in individually ventilated cages under specific pathogen-free conditions, and studies were conducted under protocols in accordance with the animal care guidelines of the European Union laws and were validated by the local Animal Ethic Evaluation Committee (CECCAPP).

**Infection.** For transduction of primary bone marrow cells, retroviral particles were generated using Phoenix-Eco packaging cells and used to transduce bone marrow cells at day 2 and day 3 during cell differentiation as described by Broz et al. (20). Cells were stimulated after 7 d of differentiation as described above. pMSC2.2-expressing vectors for caspase-1 wild type, caspase-1 DEAD, and caspase-1 C71 were obtained from P. Broz.

**ACKNOWLEDGMENTS.** We thank V. M. Dixit (Genentech) for the ASC<sup>-/-</sup> mice; the late J. Tschopp (University of Lausanne) for the NLRP3<sup>-/-</sup> mice; R. A. Flavell (Yale School of Medicine) for the *caspase-1/caspase-11<sup>-/-</sup>* mice; Peter Broz (Basel University) for the gift of caspase-1-expressing vectors; T. Renno, S. Kabani, F. Martinon, and N. Rahim for critical reading of the manuscript; and C. Vanbelle and the Plateforme d'Expérimentation Animale en Cancérologie (AniCan) facility for technical help. This work was supported by the Institut Thématique Multi-Organismes (ITMO) Cancer and Ligue contre le Cancer comité de l'Ain. M.B. is supported by the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT). A.T. is supported by the Association "Institute for Arthritis Research" (aIAR).

21. Boyden ED, Dietrich WF (2006) Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet* 38(2):240–244.
22. Wickliffe KE, Leppla SH, Moayeri M (2008) Anthrax lethal toxin-induced inflammasome formation and caspase-1 activation are late events dependent on ion fluxes and the proteasome. *Cell Microbiol* 10(2):332–343.
23. Martinon F, Gaide O, Pétrilli V, Mayor A, Tschopp J (2007) NALP inflammasomes: A central role in innate immunity. *Semin Immunopathol* 29(3):213–229.
24. Hanna PC, Kochi S, Collier RJ (1992) Biochemical and physiological changes induced by anthrax lethal toxin in J774 macrophage-like cells. *Mol Biol Cell* 3(11):1269–1277.
25. Pétrilli V, et al. (2007) Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 14(9):1583–1589.
26. Richards N, et al. (2001) Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC-induced apoptosis. *J Biol Chem* 276(42):39320–39329.
27. Fernandes-Alnemri T, et al. (2007) The pyroptosome: A supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ* 14(9):1590–1604.
28. Guarda G, et al. (2011) Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *J Immunol* 186(4):2529–2534.
29. Bauernfeind FG, et al. (2009) Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 183(2):787–791.
30. Kovarova M, et al. (2012) NLRP1-dependent pyroptosis leads to acute lung injury and morbidity in mice. *J Immunol* 189(4):2006–2016.
31. Renucci M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS (2001) Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(25):14250–14255.
32. Boatright KM, et al. (2003) A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 11(2):529–541.
33. Shi Y (2004) Caspase activation: Revisiting the induced proximity model. *Cell* 117(7):855–858.
34. Van Oudenbosch N, et al. (2014) Activation of the NLRP1b inflammasome independently of ASC-mediated caspase-1 autoproteolysis and speck formation. *Nat Commun* 5:3209.
35. Jin T, Curry J, Smith P, Jiang J, Xiao TS (2013) Structure of the NLRP1 caspase recruitment domain suggests potential mechanisms for its association with procaspase-1. *Proteins* 81(7):1266–1270.
36. Chao Y, et al. (2005) Engineering a dimeric caspase-9: A re-evaluation of the induced proximity model for caspase activation. *PLoS Biol* 3(6):e183.
37. Rodríguez J, Lazebnik Y (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 13(24):3179–3184.
38. Cai X, et al. (2014) Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. *Cell* 156(6):1207–1222.
39. Cain K, Langlais C, Sun XM, Brown DG, Cohen GM (2001) Physiological concentrations of K<sup>+</sup> inhibit cytochrome c-dependent formation of the apoptosome. *J Biol Chem* 276(45):41985–41990.
40. Kuida K, et al. (1995) Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267(5206):2000–2003.

# Supporting Information

Guey et al. 10.1073/pnas.1415756111

## SI Materials and Methods

**Cell Preparation.** Peritoneal macrophages were obtained by injecting 8- to 12-wk-old mice of indicated genotypes i.p. with 10% (wt/vol) thioglycollate solution, followed by peritoneal lavage after 3 d. Macrophages were plated at a density of  $10^6$  cells in 12-well dishes and nonadherent cells were removed after 2 h. Cells were cultured in DMEM complemented with 10% (vol/vol) FBS, 1 mM sodium pyruvate, 100 IU/mL penicillin/streptomycin, and 2 mM L-glutamine. For in vivo study, mice were injected i.p. with 1  $\mu$ g/g body weight of lethal toxin 3 h before peritoneal lavage.

BMDMs were generated by differentiation of mouse bone marrow cells in DMEM supplemented with 20% (vol/vol) L929 supernatant, 10% (vol/vol) FBS, 1% penicillin/streptomycin for 2 d in nonadherent Petri dishes. BMDM progenitors were seeded in 6- or 12-well plates and differentiated for 5 additional days.

BMDCs were generated by growing mouse bone marrow cells in RPMI medium supplemented with 10% (vol/vol) FBS, 1 mM sodium pyruvate, 1 mM nonessential amino acids, 1% penicillin/streptomycin, and 30 ng/mL GM-CSF for 7 d.

Mouse peritoneal macrophages were primed overnight with 500 ng/mL ultra-pure LPS. BMDMs and BMDCs were primed for 3 h with 500 ng/mL ultra-pure LPS. Cells were stimulated in OptiMEM (Life Technologies) for 6 h with LT (500 ng/mL LF and 500 ng/mL PA), for 2 h with 10  $\mu$ M nigericin, or for 30 min with 5 mM ATP. z-YVAD-fmk and z-VAD-fmk were used at 50  $\mu$ M, KCl was used at 90 mM, and each molecule was added 30 min before stimulation. IL-18 ELISA was purchased from MBL International.

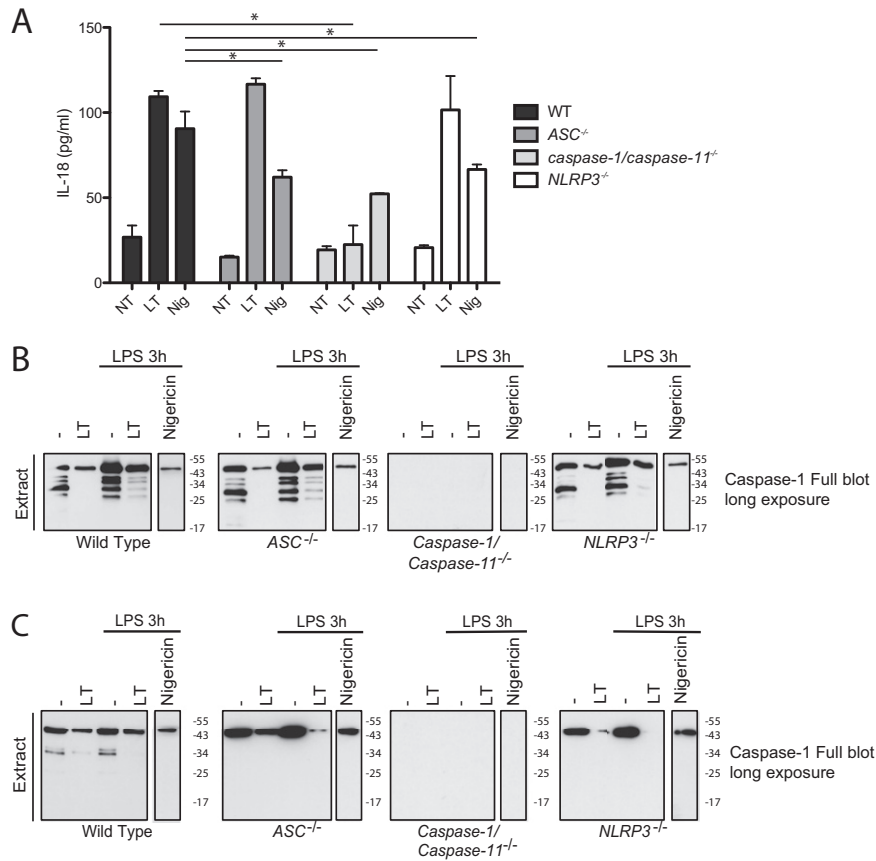
**Western Blotting.** For intracellular protein extraction, cells were washed with PBS and detached by incubation with 6 mM PBS-EDTA followed by scraping. Cell pellets were lysed in RIPA buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 0.03% SDS, 0.005% Triton X-100, 5 mM EDTA, 2 mM sodium orthovanadate, and protease inhibitor mixture (Roche). For supernatant protein extraction, cell supernatants were collected and subjected to protein precipitation using a classical methanol/chloroform protocol. Protein extracts were separated on SDS/PAGE [8% or 15% (vol/vol)] gels. Gels were transferred onto nitrocellulose membranes (GE Health-

care) for immunoblotting with the following antibodies: anti-ASC (AL177, 1:2,000) from Enzo Life Sciences, anti-mouse IL-1 $\beta$  (IL-1F2, 1:1,000) from R&D Systems, anti-NLRP3 (Cryo-2, 1:500) and anti-mouse caspase-1 (Casper-1, 1:500) from Adipogen. The antibody against mouse actin (clone C4, 1:50,000) was purchased from ICN-MP Biomedicals.

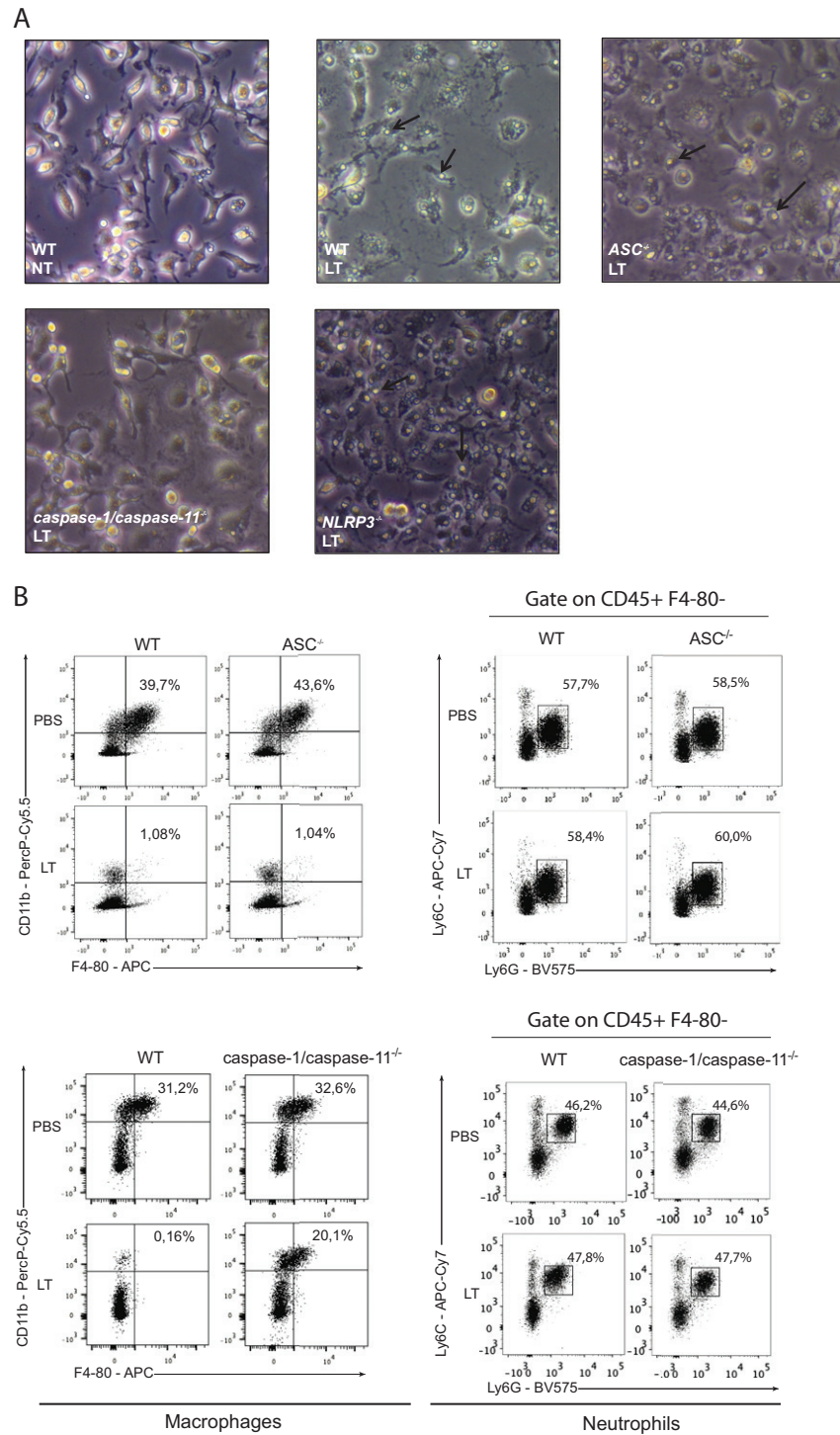
**Flow Cytometry.** Peritoneal macrophages were washed in FACS buffer [PBS supplemented with 2 mM EDTA and 5% (vol/vol) FBS] and incubated for 5 min with purified anti-mouse CD16/32 FcBlocks (93; Biolegend). Cells were stained with Alexa-Fluor 700-conjugated anti-CD45 (30-F11; Biolegend), PerCP/Cy5.5-conjugated anti-CD11b (M1/70; Biolegend), Brilliant Violet 570-conjugated anti-Ly-6G (1A8; Biolegend), APC-conjugated anti-F4/80 (BM8; eBioscience) antibodies, Zombie Aqua Fixable Viability (Biolegend), and fixed in 2% paraformaldehyde. Data were collected on a LSR II Fortessa (BD Bioscience) and analyzed using FlowJo software.

**Immunofluorescence.** Peritoneal macrophages were plated on sterile glass coverslips and fixed with PBS-PFA 2% (wt/vol) for 5 min at room temperature. Cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS and then blocked in PBS and 3% (vol/vol) FBS for 30 min. The following antibodies were diluted in PBS-FBS 3% and applied to the coverslips for 1 h at room temperature: anti-ASC (1:200, AL177) and anti-mouse caspase-1 (1:100, Casper-1). The cells were then incubated with Alexa-Fluor 555-conjugated anti-mouse (1:500; Life Technologies) or Alexa-Fluor 488-conjugated anti-rabbit (1:500; Life Technologies) antibodies for 30 min at room temperature and in Hoechst (500 ng/mL in PBS) for 5 min. Fluorescence microscopy pictures were taken using a Nikon Eclipse Ni-E microscope and confocal pictures using a Zeiss LSM 780.

**LDH Release Assay.** LDH was measured in cell supernatant using CytoTox 96 (nonradioactive cytotoxicity assay; Promega). To normalize for spontaneous lysis, the percentage of LDH release was calculated as recommended by the manufacturer:  $[(\text{LDH treated}) - (\text{LDH untreated})] / [(\text{LDH total lysis}) - (\text{LDH untreated})] \times 100$ .

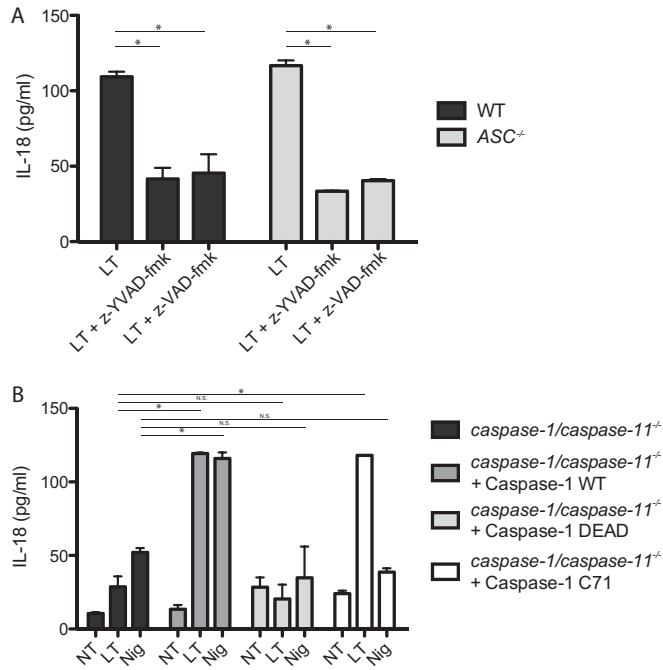


**Fig. S1.** IL-18 secretion relies on caspase-1 but not on ASC and NLRP3 in response to lethal toxin. IL-18 in supernatants of peritoneal macrophages primed overnight with LPS (500 ng/mL) and treated with *B. anthracis* lethal toxin (0.5  $\mu$ g/mL, 6 h), or nigericin (10  $\mu$ M, 2 h) or left untreated (NT) were assessed by ELISA (A). Data represent mean  $\pm$  SEM \* $P$  < 0.05 (Mann-Whitney test). Uncropped caspase-1 immunoblots of the cell extracts presented in Fig. 1B (BMDMs) (B) and Fig. 1C (BMDCs) (C) showing no retention of caspase-1 p20 within ASC<sup>-/-</sup> cells.

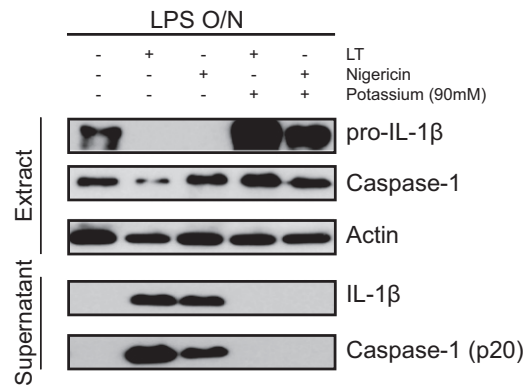


**Fig. S2.** Morphology of LT intoxicated macrophages. Phase-contrast microscopy (200 $\times$ ) pictures of peritoneal macrophages of indicated genotype after 2-h incubation with lethal toxin (0.5  $\mu$ g/mL) or untreated (NT). Arrows indicate signs of intoxication (A). Representative dot plots illustrating the gating of macrophages and neutrophils in the peritoneal lavages of WT, ASC<sup>-/-</sup>, or caspase-1/caspase-11<sup>-/-</sup> mice injected with PBS or LT (B).

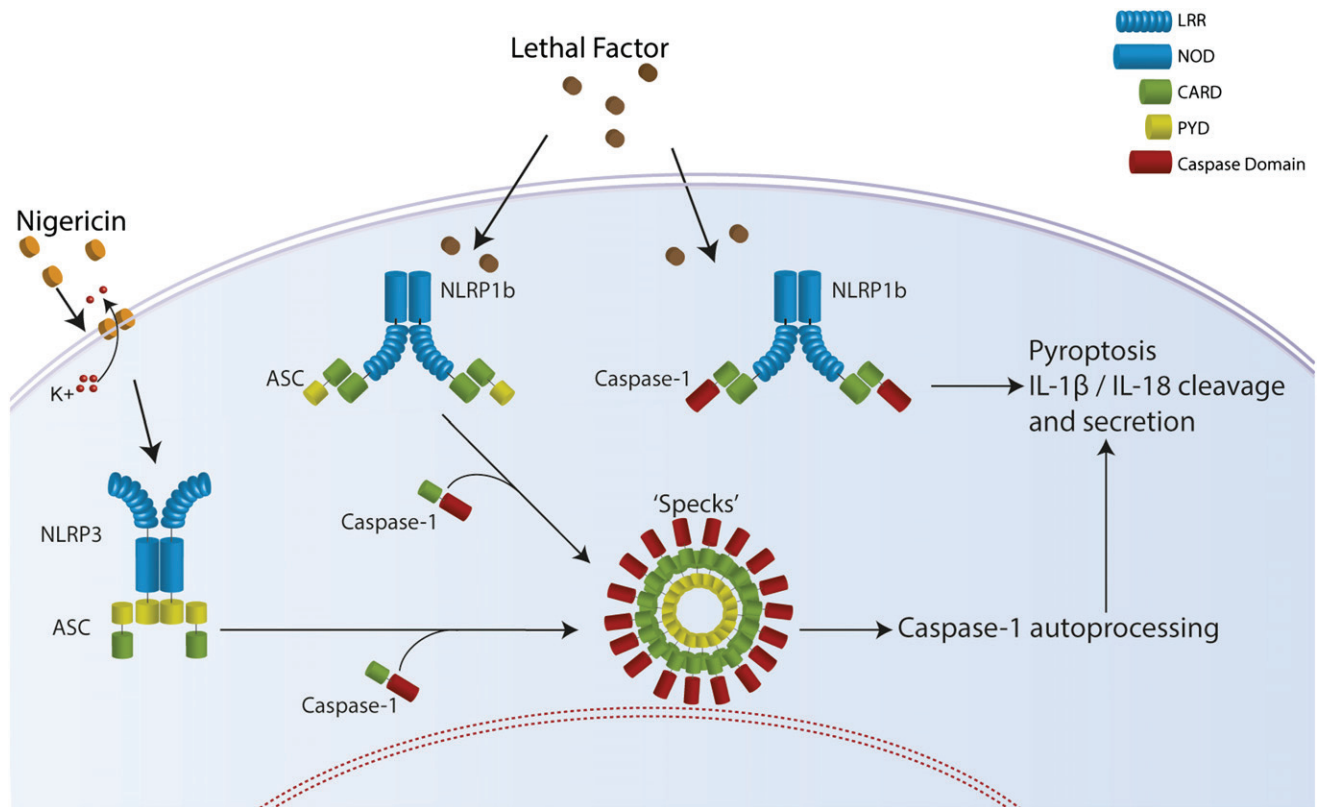




**Fig. S3.** Noncleavable caspase-1 processes IL-18 upon LT treatment. IL-18 was measured by ELISA in the supernatant of LPS-primed peritoneal macrophages treated with LT (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 6 h) in the presence or absence of z-YVAD-fmk (50  $\mu\text{M}$ ) or z-VAD-fmk (50  $\mu\text{M}$ ) for 6 h (A). BMDMs from *caspase-1/caspase-11<sup>-/-</sup>* mice, expressing the indicated *caspase-1* constructs, and LPS-primed (500 ng/mL, 3 h) were treated with LT (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 6 h or with nigericin (Nig, 10  $\mu\text{M}$ ) for 2 h or left untreated (NT) (B). IL-18 in supernatant was assessed by ELISA. Data represent mean  $\pm$  SEM \* $P < 0.05$  (Mann-Whitney test) (N.S., nonsignificant).



**Fig. S4.** Extracellular potassium inhibits NLRP1b inflammasome activation. LPS-primed mouse peritoneal macrophages were treated with LT (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 6 h or with nigericin (10  $\mu\text{M}$ ) for 2 h or not (-) in presence (+) or absence (-) of 90 mM potassium.



**Fig. S5.** Schematic representation of the different modes of caspase-1 activation by the NLRP1b and NLRP3 inflammasomes. The NLRP3 inflammasome fully relies on ASC to recruit and to induce caspase-1 activation through autoprocessing. The NLRP1b inflammasome can induce caspase-1 autoproteolysis and activation in an ASC-dependent manner. In the absence of ASC, NLRP1b oligomerization induces caspase-1 activation independently of its autoproteolysis.



---

## Publication 2. L'inflammasome favorise la croissance tumorale en modulant l'activité des cellules NK

---

### Base de l'étude

La présence de l'IL-1 $\beta$  dans le microenvironnement tumoral mammaire est un corrélé avec un mauvais pronostic chez les patients. Régulée par le complexe de l'inflammasome, nous avons voulu déterminer le rôle de l'inflammasome dans la modulation de l'IL-1 $\beta$  et plus globalement sur la croissance tumorale mammaire.

### Modèle utilisé

Nous avons utilisé un modèle de tumeurs syngéniques basé sur l'injection orthotopique des cellules tumorales 4T1 dans la glande mammaire de souris BALB/c WT ou déficientes pour les composants de l'inflammasome NLRP3.

Les cellules 4T1 sont issues d'un clone d'une tumeur spontanée de la glande mammaire de souris BALB/cF3H (Miller et al., 1983) et sont relativement proches, en terme de prolifération et de pouvoir métastatique, des tumeurs du sein triples négatives humaines de grade III (Mi et al., 2004; Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 1998). Injectées dans la glande mammaire, les cellules 4T1 migrent rapidement via la circulation sanguine vers de nombreux organes et forment des métastases dans les poumons, le cœur, les os, le cerveau et le foie (Aslakson and Miller, 1992).

Bien que peu immunogéniques (Morecki et al., 1998), les cellules 4T1 peuvent induire une réponse anti-tumorale chez l'hôte. En effet, en présence de cellules 4T1 irradiées, les cellules dendritiques s'activent et présentent des antigènes provenant des cellules tumorales (Coveney et al., 1997). *In vivo*, la croissance des 4T1 et l'apparition de métastase peuvent être retardées via l'injection d'IL-12 améliorant l'activité cytotoxique des cellules NK et donc la réponse anti-tumorale (Rakhmilevich et al., 2000; Shi et al., 2004).

De manière intéressante, la croissance des cellules 4T1 est fortement liée au microenvironnement inflammatoire qu'elles induisent. Source de CCL5 notamment, les cellules 4T1 provoquent un remodelage tissulaire important et réduisent l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8 (Adler et al., 2003; Lv et al., 2013; Robinson et al., 2003). En sécrétant du GM-CSF et du G-CSF, les 4T1 provoquent également la prolifération des cellules myéloïdes aboutissant à une splénomégalie et la présence de granulocytes immatures dans le sang (DuPre' and Hunter, 2007). De plus, l'expression ectopique d'IL-1 $\beta$  dans les cellules 4T1 augmente la présence de cellules myéloïdes suppressives favorisant ainsi la croissance de la tumeur et l'apparition de métastases (Bunt et al., 2006). Enfin, l'absence de l'IL-1R dans le microenvironnement provoque une réduction de la croissance des cellules 4T1 liée à une diminution du recrutement des MDSC (Bunt et

al., 2007) démontrant l'importance de l'inflammation dans le développement des cellules 4T1 *in vivo*.

## Résultats

Dans le manuscrit présenté ci-après, nous avons montré que l'absence de la caspase-1 et de ASC dans le microenvironnement tumoral provoque un retard de croissance des cellules 4T1 *in vivo*. Basé sur l'étude de la croissance des cellules tumorales dans des souris chimériques, nous avons montré que l'absence de la caspase-1 dans les cellules immunitaires est responsable du retard de la croissance tumorale.

L'analyse des cellules immunitaires ayant infiltrées le microenvironnement tumoral a révélé que l'absence de ASC et caspase-1 provoque un plus faible recrutement de neutrophiles, souvent décrit comme des cellules myéloïdes suppressives, mais surtout une augmentation de l'infiltration de cellules NK. Les cellules NK sont particulièrement efficaces pour éliminer les cellules anormales. Nous avons montré que les cellules NK provenant des tumeurs des souris caspase-1 déficientes ont un phénotype plus « activé » comparé aux cellules NK des tumeurs de souris WT. Enfin, les cellules NK du microenvironnement tumoral des souris *caspase-1* KO sont plus sensibles et sécrètent plus d'interféron-gamma en réponse à différents stimuli que les cellules NK du microenvironnement tumoral de souris WT.

Alors que nous supposions que l'inflammasome NLRP3 pourrait avoir un rôle dans la croissance des cellules tumorales 4T1, l'absence du récepteur NLRP3 n'a eu aucun impact sur la croissance des cellules 4T1 suggérant qu'un autre inflammasome favorise la croissance tumorale.

## Conclusion

Dans notre étude, nous avons montré que l'inflammasome participe à la croissance des cellules tumorales mammaires en provoquant une diminution de la réponse anti-tumorale des cellules NK. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence le récepteur impliqué dans le soutien de la croissance tumorale ni le rôle des cytokines régulées par l'inflammasome dans ce modèle.

## Note

*L'article présenté ci-après est en cours d'écriture et reflète uniquement les résultats obtenus à l'heure actuelle. Nous envisageons notamment d'étudier le rôle de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 dans notre modèle avant de le soumettre pour publication.*

# **Inflammasome facilitates mammary tumor growth by modulating the functions of NK cells.**

Baptiste Guey<sup>1</sup>, Mélanie Bodnar-Wachtel<sup>1</sup>, Christine Varela<sup>1</sup>, Annabelle Drouillard<sup>2</sup>, Sabine Hacot<sup>1</sup>, Thierry Walzer<sup>2</sup> and Virginie Petrilli<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052, CNRS UMR5286, Université de Lyon, Université Lyon 1, Centre Léon Bérard, F-69000 Lyon, FRANCE.

<sup>2</sup> Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U111 – CNRS UMR5308, Université de Lyon, ENS de Lyon, Université Lyon 1, 21 Avenue Tony Garnier, 69365 Lyon Cedex 07, FRANCE.

Corresponding author :

Virginie Petrilli

Email : virginie.petrilli@lyon.unicancer.fr

## **Abstract**

Upon sensing of Danger Associated Molecular Patterns (DAMPs) or Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs), specific innate immune receptors like NLRP proteins trigger inflammasome assembly by recruiting the adaptor protein ASC and the enzyme caspase-1. These multi-protein complexes control the maturation and the secretion of the IL-1 $\beta$  and the IL-18, two major pro-inflammatory cytokines. Interestingly, several studies reported the presence of IL-1 $\beta$  within the microenvironment of mammary tumors, suggesting the activation of an inflammasome within tumors. However, the role of the inflammasome during tumor growth is poorly understood and currently controversial. We therefore addressed whether the activation of the inflammasome supports mammary tumor growth. Based on orthotopic injection of a syngeneic triple negative cancer mice model, our results demonstrate that the inflammasome supports tumor growth *in vivo*. Moreover, The absence of ASC or caspase-1 improved the recruitment and the activation of natural killer (NK) cells within tumor microenvironment.

In summary, our work identifies a novel role for the inflammasome in supporting mammary tumor growth by modulating the NK cell recruitment and activity. These results suggest that inflammasome inhibition could be a putative target for the treatment against breast cancer.

Keywords: Caspase-1; ASC; Inflammasome; Inflammation; Cancer; 4T1

## Introduction

Many tumours are infiltrated with immune cells that are either involved in the immune surveillance or are manipulated by the tumor cell to support their growth (1). Tumor microenvironment displays an immune signature that is strongly related to prognosis of cancer patients depending on pro- or anti-tumoral roles of the immune infiltrate (2–5). Several studies showed that the inflammation taking place within tumors promotes tumor progression by different means like angiogenesis stimulation or anti-tumoral immune response down-regulation (6,7). Thus inflammation is a potent inducer of tumoral characteristic and is now considered as an enabling characteristic of cancer (8). Within an injured tissue, innate immune cells sense Pathogen- or danger-associated molecular patterns (PAMPs, DAMPs) using germline-encoded pattern recognition receptors (PRRs) that can drive inflammation to restore homeostasis. Among PRRs, intracellular sensors, including some nod-like receptors (NLRs) and HIN200 (hematopoietic interferon-inducible nuclear antigens with 200 amino acid repeats) family proteins, operate by forming a multiprotein complex named inflammasome. Besides innate immune receptors, inflammasomes are composed of the adaptor protein ASC (Associated Speck-like containing a CARD protein) and of the cysteine protease caspase-1 (9). Once activated through the inflammasome formation, caspase-1 cleaves and activates two major pro-inflammatory cytokines: the pro-IL-1 $\beta$  and the pro-IL-18 and drive an inflammatory cell death known as pyroptosis (10).

In the context of cancer, the role of the inflammasome is controversial as it can promote anti-tumoral responses but can also favor tumor progression. For instance, *NLRP3*-, *NLRC4*-, *NLRP6*- or even *caspase-1*-deficient mice are more sensitive to colon carcinoma induced by DSS-AOM treatment suggesting a protective role for the inflammasome against tumor formation in the colon (11–13). In this context, the protective role of the inflammasome is mediated by the production of IL-18, which is involved in the epithelial barrier integrity maintenance in the intestine. In contrast, through the release of IL-1 $\beta$ , the NLRP3 inflammasome has been shown to favor myeloid-derived suppressor cells recruitment within the tumor microenvironment that suppress NK and T-cell activity in mouse models of carcinogen-induced sarcoma or metastatic melanoma (14). As they are expressed by various cell types, inflammasome components role in cancer is also tissue-specific. For instance, in a carcinogen-induced skin cancer model, ASC depletion in keratinocyte facilitates tumor development whereas in myeloid cells it impairs it (15). At last, chemotherapeutic treatment results in the release of cytosolic molecules, such as ATP, by dying cells into the



microenvironment (16), which can mediate the activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells and lead to IL-1 $\beta$  secretion. In this particular condition, IL-1 $\beta$  drives anti-tumoral response by enhancing the adaptive immunity through the activation of antigen presenting cells (APC) (17,18).

In breast cancer, the presence of IL-1 $\beta$  within the tumor microenvironment is frequently associated with poor prognosis suggesting that IL-1 $\beta$  favors tumor progression rather than it activates the anti-tumor immune response and that the inflammasome may have a role during mammary tumor development (19–22). Nevertheless, while studies describe a pro-tumorigenic role for IL-1 $\beta$ , the impact of the inflammasome activation on breast cancer progression remains unclear.

Here we addressed the role of the inflammasome during mammary tumor progression by studying the growth of 4T1 mammary tumor cells in presence or absence of different inflammasome components. We reveal that both caspase-1 and ASC, two major proteins of the inflammasome complex, promotes the growth of 4T1 cells through the down-regulation of anti-tumoral response. Indeed, we show that the absence of caspase-1 in the hematopoietic lineage enhances the recruitment and the activity of NK cells that participate to tumor growth impairment. Altogether, our data suggest that the inflammasome impairs NK cell activity against tumor and favors tumor progression.

## Methods

### Mouse tumor cell lines

4T1 cells were cultured in RPMI medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS (Life technologies), 1% (v/v) penicillin/streptomycin, 1% (v/v) L-Glutamine and 25uM 2-Mercaptoethanol at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. All cell lines were proved mycoplasma free (MycoAlert Mycoplasma detection kit, Lonza). All cell lines were proved mouse infectious agent free by (Taqman<sup>®</sup> PCR testing of mouse essential panel, Charles River)

### Mice

*NLRP3*<sup>-/-</sup> mice were obtained from J. Tschopp (Martinon 2006), *ASC*<sup>-/-</sup> mice from V. M. Dixit (Mariathasan 2004), and *caspase-1/caspase-11*<sup>-/-</sup> mice from R. A. Flavell (Kuida 1995). *Caspase-1/caspase-1*<sup>-/-</sup> mice are designated as *caspase-1*<sup>-/-</sup> mice throughout the article. The three transgenic strains were backcrossed into BALB/c/Ola background for at least nine generations. WT animals were littermates from the *caspase-1/caspase-11*<sup>-/-</sup>, *ASC*<sup>-/-</sup>, or *NLRP3*<sup>-/-</sup> colonies or imported from Harlan and hosted in the same cages with KO animals. Animals were housed in individually ventilated cages under specific pathogen-free conditions, and studies were conducted under protocols in accordance with the animal care guidelines of the European Union laws and were validated by the local Animal Ethic Evaluation Committee (CECCAPP).

### Tumor growth assays

4T1 tumor cells were injected orthotopically in the mammary fat pad. Growth of the primary tumors was monitored with a digital caliper measurement and expressed as a tumor volume. Mice were sacrificed when tumors size reached 1000mm<sup>3</sup>.

### Cell suspensions from spleens or tumors

Spleen isolated from mice were crushed and filtered through 40-micron filter and resuspended in FACS buffer (PBS supplemented with 0,5% (vol/vol) FBS, 2mM EDTA). Red blood cells are lysed in 5mL of erythrocytes lysis buffer (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA) during 5 minutes. After a PBS wash, cells were then resuspended in FACS buffer.

7 or 14 days post-injection, tumors isolated from mice were cut in small pieces and incubated with 5mL of DMEM supplemented with DNase 0,02mg/mL (Sigma D4513) – Collagenase 1mg/mL (Sigma C2674) for 30 minutes at 37°C. Digested tumors were then filtered through 40-micron filter and re-suspended in FACS buffer (PBS supplemented with 0,5% (vol/vol) FBS, 2mM EDTA) and filtered again two times. Red blood cells are lysed in 5mL of erythrocytes lysis buffer during 5 minutes. After a PBS wash, cells were then resuspended in FACS buffer.

### **Flow cytometry**

Cell suspensions from spleens or from tumors were washed in FACS buffer (PBS supplemented with 2 mM EDTA and 5% (v/v) FBS) and incubated for 5 min with purified anti-mouse CD16/32 FcBlocks (93; Biolegend). Cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies (Supplementary Table S1) at 4°C for 20 minutes. Without intracellular staining conditions, cells were washed twice in FACS buffer, fixed in PBS 2% paraformaldehyde and stored in FACS buffer before analysis. For intracellular staining, cells were incubated with Cytofix/Cytoperm fixation/permeabilization kit (554714, BD Bioscience) for 20 minutes on ice. Cells were washed with PermWash buffer and stained with fluorochrome-conjugated antibodies diluted (Supplementary Table S1) in permwash buffer for 30 minutes on ice. Cells were again washed in permwash buffer and keep at 4°C before analysis. Data were collected on a LSR II Fortessa (BD Bioscience) and analyzed using FlowJo software.

### **Bone Marrow Stem Cell transfer**

Bones of mice hind legs were removed and placed in RPMI supplemented with 5% (v/v) FBS. Bones were immersed in bath of 70% (v/v) ethanol and rinsed in PBS. Epiphyses of each bone were cut and the bone marrow was flushed with 5ml of RPMI supplemented. CD3 cells were then depleted according to CD3ε MicroBead Kit (Miltenyi biotec).  $10^6$  cells in PBS supplemented with 0,1% Penicillin/streptomycin were re-injected I.V. in lethally irradiated mice.

### **NK cell depletion**

Mice were injected I.V. (in the retro-orbital sinus) with 50  $\mu$ L of the Ultra-LEAF™ Purified anti-Asialo-GM1 (clone: Poly21460, Biolegend) antibody 1 day prior to the tumor cell injection. In order to maintain NK cell depletion during tumor growth, mice were injected I.V. every 10 days.

### **NK activation**

$3 \cdot 10^6$  Splenic lymphocytes or tumor suspension were prepared in complete medium (RPMI + glutamax, 10% SVF, 1% Penicillin/streptomycin, 10mM HEPES, 1mM Sodium-pyruvate, 50uM b-mercaptoethanol) and incubated for 4 hour with cytokines (recombinant mouse IL-12 (preprotech, 200-12) (Final concentration: 100ng/mL) and recombinant mouse IL-18 (R&D, B004-5) (Final concentration: 20ng/mL)) or on antibody-coated plates (anti-NKp46 (29A1; BD Biosciences), anti-Ly49D (4E5; BD Biosciences), anti-NKG2D (CX5; BD Biosciences), and GolgiStop (BD Biosciences) in the presence of anti-CD107a (2B6; BD Biosciences)) or co-cultured with Yac-1 or 4T1 cells.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis of each experiment was done using Prism software. Nonparametric Mann-Whitney U test were used to compare tumor progression and immune cell analysis.

### **Cell cycle analysis (Supp methods)**

4T1 cells were treated with different amount of IL-1 $\beta$  (25 ng/mL, 50 ng/mL) overnight at 37°C in an incubator 5% CO<sub>2</sub>. The following day, 4T1 cells were incubated two hours with 20mM BrdU (Final Dilution 1/1000). All cells are recovered by trypsin 5 minutes at 37°C. 1 million of cells are transferred in each wells of a 96 wells plate and centrifuged. Cell pellet are suspended in 100  $\mu$ L of cold 70% ethanol for 20 minutes at room temperature. Cells are then rinsed and incubated in 100  $\mu$ L of HCl 3N for 20 minutes at room temperature. Cells are then rinsed and incubated in 100  $\mu$ L of borax 0,1 M for 3 minutes at room temperature. After washing, cells are incubated 15 minutes at room temperature with 15  $\mu$ L of anti-BrdU-FITC antibody. Cells are then rinsed and suspended in a PI buffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,5, plus PI 25  $\mu$ g/ml, plus RNase 0,25 mg/ml). Data were collected on a FACS Calibur and analyzed using FlowJo software.

### **Western Blotting (Supp methods)**

Cell protein extracts were obtained and analyzed as described in Guey et al. (23).

## Results

### **The absence of a functional inflammasome impairs mammary tumor growth in mice.**

To address if the inflammasome supports tumor progression *in vivo*, 4T1 mammary tumor cells were injected in the mammary fat pad of WT, *caspase-1* knockout (KO) and ASC KO BALB/c mice, and tumor growth was followed over time. While the inoculation of the tumor cells in WT BALB/c mice resulted in a large tumor formation within 30 days, the absence of caspase-1 or ASC from the host impaired considerably their growth (Figure 1A). These results suggest that an inflammasome supports tumor growth. As previously described, NLRP3 is an innate immune receptors which senses Danger Associated Molecular Patterns (DAMPs). To investigate whether the NLRP3 inflammasome is responsible for the delayed tumor growth in this model, 4T1 tumor cells were inoculated in NLRP3 deficient mice. The tumor growth was similar in WT and *NLRP3* KO mice indicating that the NLRP3 inflammasome is not supporting the 4T1 growth *in vivo* (Supplementary figure 1A).

Caspase-1 expression is not restricted to immune cells as it was described to be also expressed by many different cell types such as epithelial cells or adipocytes (24,25). To study whether the hematopoietic compartment was involved in the tumor growth control, chimeric mice were generated. Lethally irradiated WT and *caspase-1* KO mice received intravenous injection of bone marrow progenitors isolated from *caspase-1* KO and WT mice respectively. 4T1 cell growth was impaired in WT chimeric mice compared with *caspase-1* KO chimeric mice (Figure 1B). Thus, the absence of caspase-1 in the hematopoietic cell lineage is responsible for the tumor growth delay (Figure 1B) suggesting that caspase-1 expressing immune cells supports tumor growth.

### **The inflammasome modulates the tumor immune infiltrate**

The inflammasome is a major player of the innate immunity and controls the production of IL-1 $\beta$  and IL-18, which are both involved in the recruitment and activation of immune cells. To investigate whether the recruitment of immune cells by tumor cells relies on the inflammasome, we analyzed the tumor immune infiltrate at days 7 and 14 post-injection in WT, ASC and caspase-1 deficient mice. Different myeloid cell subtypes were analyzed by flow cytometry. Our analysis showed that the absence of caspase-1 or ASC resulted in a decrease in Ly6G<sup>high</sup> neutrophils recruitment compared with WT at both time points (Figure 2A and supplementary figure 2A). Macrophage, eosinophil or dendritic cell recruitment was not affected by the absence of caspase-1 or ASC in the tumor microenvironment (Figure 2A).

Although the 4T1 tumor progression was similar in *NLRP3* deficient and WT mice, less neutrophils were recruited in the *NLRP3* KO mammary tumor (Supplementary figure 1B). Thus, the impaired neutrophils infiltration within the tumor microenvironment did not correlate with the delayed tumor growth.

We further investigated the tumor infiltration by lymphoid cells in the different mouse backgrounds. No significant difference in CD4 or CD8 T lymphocytes recruitment was observed between WT and inflammasome deficient mice at D7 and D14 post-injection (Figure 2A and Supplementary figure 2A). Little B cells infiltrated the tumors. Interestingly, NK cells were recruited to the tumor microenvironment, and significantly more NK cells were detected in the tumor implanted in *caspase-1* and *ASC* KO mice at both D7 and D14 (Figure 2A and Supplementary figure 2A). Of note, no difference in the NK cell recruitment in *NLRP3*-deficient tumor bearing mice as compared to WT mice was observed, suggesting a role for NK cells in the control of tumor growth in *caspase-1* and *ASC* KO mice (Supplementary figure 1B).

Splenic analysis of the tumor-bearing mice revealed a high concentration of neutrophils in WT and inflammasome KO mice, but no difference within the different immune populations was observed (Figure 2B and Supplementary figure 2B).

### **Caspase-1 deficiency improves NK cells function in tumor-bearing mice.**

NK cells are able to control tumor growth by killing abnormal cells (26). To address whether NK cells were responsible for the tumor growth delay in the inflammasome deficient mice, *caspase-1* KO and WT mice were depleted for NK cell. Mice were either injected intravenously with PBS or with NK cell depleting antibody (Anti-Asialo GM1) and then inoculated with 4T1 cells. NK cell depletion abolished the delayed in 4T1 tumor growth in *caspase-1* deficient mice demonstrating the important role of NK cells in mammary tumor growth control (Figure 3A).

We then wondered whether caspase-1 expression within the immune compartment infiltrating the mammary tumor could modify the phenotype of NK cells. As shown in figure 3B, NK cells infiltrating the 4T1 tumors isolated from *caspase-1* KO were larger (FSC) than NK cells infiltrating the mammary tumors of WT mice, a feature associated with the activation status. Furthermore, they expressed higher levels of NKG2D, Granzyme B (GZB), CD69 and CD98 (Figure 3B) previously described as markers of NK cell activation (27). However, splenic NK cells from tumor bearing mice showed similar phenotype in WT and *caspase-1* deficient

tumor-bearing mice (Figure 3B) suggesting that tumor microenvironment directly impact NK cell phenotype.

In addition, we investigated the function of NK cells infiltrating the mammary tumors of WT or caspase-1 deficient mice. To that extend, we incubated the tumor cell suspension with a combination of IL-12+IL-18 cytokines, or with antibodies against activating receptor (NKp46, Ly49D, NKG2D) or with different cell lines (YAC-1, 4T1). Interestingly, NK cells from *caspase-1* KO tumor mice showed an increased expression of IFN- $\gamma$  following activation with these different stimulations compared to NK cells from WT tumor-bearing mice (Figure 3C) suggesting that caspase-1 absence from the tumor immune microenvironment improve NK cell activation.



## Discussion

Many tumors are known to induce an inflammatory milieu. The tumor microenvironment is composed of various immune cells that secrete several cytokines and chemokines and create an inflammatory response to the tumor. IL-1 $\beta$  is major pro-inflammatory cytokines that is observed in mammary tumor microenvironment (19). Moreover, in several studies, IL-1 $\beta$  was shown to directly supports tumor growth and metastasis emergence (21,28). Since, the inflammasome is the major pathway controlling IL-1 $\beta$  production, we speculated that it could be activated in the microenvironment of breast tumors to drive tumor progression. To study whether the inflammasome contributes to mammary tumor growth *in vivo*, we took advantage of the 4T1 mammary cancer cell model. The 4T1 model is used as a model for triple negative cancer and its growth was shown to rely on IL-1 $\beta$  (29,30). We therefore investigated the ability of 4T1 cells to form mammary tumor *in vivo* in host deficient in major inflammasome components.

The data presented here show that the absence of two major inflammasome components impairs the 4T1 tumor growth. Indeed, in *ASC* KO and *caspase-1* KO mice, the tumor cell growth was delayed compared to WT mice suggesting that *ASC* and *caspase-1* promote tumor progression. Moreover, our results in bone marrow chimeric mice demonstrated that *caspase-1* expressing immune-cells promote mammary tumor progression. Altogether, these data show that immune cells, which express inflammasome component, display a pro-tumoral role.

Several inflammasome platforms are described depending on the receptor that forms the complex. Necrotic cell death occurs during tumor progression releasing DAMPs, such as ATP or uric acid, in the tumor microenvironment that could activate the NLRP3 inflammasome. We thus investigated whether NLRP3 modulate 4T1 tumor growth. Unexpectedly, tumor growth was similar whether NLRP3 was present or absent from the tumor microenvironment suggesting the involvement of another PRR. Indeed, other innate immune receptors such as AIM2 or NLRC4 can form inflammasome platform. AIM2 being a DNA sensor, it could be involved in the sensing of free DNA released by dying cells (31). Indeed, in other pathological conditions AIM2 was shown to be activated by free DNA (32). At last, activation of several inflammasomes in the tumor microenvironment through different signal may promote mammary tumor growth.

While the absence of *ASC* and *caspase-1* did not modify the spleen immune cell population compared with WT spleen in tumor-bearing mice, our observations show that it directly affected the tumor innate immune infiltrate. Indeed, neutrophils were less recruited in the

tumor microenvironment of *caspase-1* and *ASC*-KO mice. Interestingly, several studies have described Ly6G<sup>+</sup> neutrophil tumor infiltrating cells as myeloid-derived suppressor cell (MDSC) population, due to their ability to down-regulate immune response in cancer (33,34). Moreover, some studies showed that IL-1 $\beta$ -expressing 4T1 cells induce the proliferation of MDSC and impair NK cell function against tumors (21,28,30). Interestingly, despite the fact that the absence of NLRP3 did not modify the rate of tumor growth *in vivo*, we observed a lower recruitment of neutrophils in *NLRP3*-KO, *ASC* KO and *caspase-1* KO mice demonstrating that the NLRP3 inflammasome promotes neutrophils recruitment within the microenvironment without impairing tumor progression. While previous studies indicate that MDSC promote primary and metastatic 4T1 tumor progression (29), and that reducing their recruitment in the tumor microenvironment limits 4T1 tumor growth (21,35), our data showed that a decreased neutrophil recruitment is not sufficient to impair 4T1 development in *NLRP3* KO mice suggesting a role for another cell type in promoting the tumor growth.

In addition to its role on MDSC recruitment, IL-1 $\beta$  can act on several mechanisms such as angiogenesis or cytokine production that could affect tumor growth and its role in our model remains to be completely uncovered. Whereas 4T1 cells respond to IL-1 $\beta$  stimulation, as illustrated by the I $\kappa$ B $\alpha$  degradation (supplementary figure 3A), this cytokine had no impact on 4T1 cell growth *in vitro* neither on MHCI expression excluding a direct role of IL-1 $\beta$  on 4T1 cell proliferation or targeting *in vivo* (Supplementary figure 3B and C).

On the other hand, it is well established that NK cell drives an anti-tumoral response (36) and their presence is associated with good prognosis in several types of cancer (37,38). Consistent with these observations, our results highlighted a stronger recruitment of NK cells in the mammary tumor microenvironment of *ASC* KO and *caspase-1* KO mice compared with WT and *NLRP3* KO mice suggesting that the increased number in NK cells detected within tumor lead to the delayed tumor growth in *ASC* and *caspase-1*-deficient mice (figure 3A). Our data show that NK cell depletion facilitates 4T1 growth in the inflammasome-deficient mice and impairs the delayed tumor growth observed in *caspase-1* KO mice. Thus, NK cells control the mammary tumor growth. Furthermore, the phenotypic characterization of NK cells infiltrating the mammary tumors revealed that NK cells from *caspase-1*-deficient mice were more activated and responded better to NK activators than NK cells from mammary tumors of WT

described in non-small cell lung cancer (NSCLC) models (39,40). Altogether, our data indicate that caspase-1, and by extension the inflammasome, impairs NK cell anti-tumoral activity. In the context of cancer, NK cells are the targets of multiple direct and indirect tumor escape mechanisms (26). For instance, MDSC are able to suppress NK cell cytotoxicity, IFN- $\gamma$  production or even NKG2D expression through membrane-bound TGF- $\beta$ 1 (41). Otherwise, while IL-18 cytokine is known to activate NK cells and to be protective in colorectal cancer models (42,43), Terme M et al. showed that IL-18 is able to increase PD-1 expression on NK cells resulting in a decrease of their anti-tumor response (44). Thus, our results suggest that the inflammasome, and potentially IL-18, rather than promoting an efficient NK cells anti-tumoral response, down-regulate NK cell anti-tumoral response. Nevertheless, IL-18 role in our model remain to be demonstrated in *IL-18* KO mice or mice treated with IL-18 inhibitors.

To conclude, our study highlights a new role for the inflammasome in promoting mammary tumor progression by impairing NK cell anti-tumor functions and suggest that inflammasome should be an interesting target to use in therapy against breast cancer progression.

## **Disclosure of Potential Conflicts of Interest**

The authors declare no conflict of interest.

## **Authors' Contributions**

B.G. and V.P. designed research; B.G., M.B., C.V., A.D., S.H., and V.P. performed research; T.W. contributed new reagents/analytic tools; B.G., T.W. and V.P. analyzed data; and B.G. and V.P. wrote the paper.

## **Grant Support**

This work was supported by the Ligue contre le Cancer comité de l'Ain. B.G. is supported by the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank V. M. Dixit (Genentech) for the *ASC*<sup>-/-</sup> mice; the late J. Tschopp (University of Lausanne) for the *NLRP3*<sup>-/-</sup> mice; R. A. Flavell (Yale School of Medicine) for the *caspase-1/caspase-11*<sup>-/-</sup> mice; the Plateforme d'Expérimentation Animale en Cancérologie (AniCan) facility for technical help.

## References

1. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* [Internet]. 2001;410:1107–11.
2. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2012;12:298–306.
3. Nagalla S, Chou JW, Willingham MC, Ruiz J, Vaughn JP, Dubey P, et al. Interactions between immunity, proliferation and molecular subtype in breast cancer prognosis. *Genome Biol* [Internet]. 2013;14:R34.
4. Giraldo NA, Becht E, Remark R, Damotte D, Sautès-Fridman C, Fridman WH. The immune contexture of primary and metastatic human tumours. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2014;27:8–15.
5. Fridman W-H, Dieu-Nosjean M-C, Pagès F, Cremer I, Damotte D, Sautès-Fridman C, et al. The immune microenvironment of human tumors: general significance and clinical impact. *Cancer Microenviron* [Internet]. 2013;6:117–22.
6. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* [Internet]. 420:860–7.
7. Shalapour S, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *J Clin Invest* [Internet]. 2015;125:3347–55.
8. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144:646–74.
9. Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. The inflammasome: an integrated view. *Immunol Rev* [Internet]. 2011;243:136–51.
10. Winkler S, Rösen-Wolff A. Caspase-1: an integral regulator of innate immunity. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2015;37:419–27.
11. Allen IC, TeKippe EM, Woodford R-MT, Uronis JM, Holl EK, Rogers AB, et al. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med* [Internet]. 2010;207:1045–56.
12. Hu B, Elinav E, Huber S, Booth CJ, Strowig T, Jin C, et al. Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010;107:21635–40.
13. Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaiss CA, Booth CJ, et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* [Internet]. 2011;145:745–57.
14. Chow MT, Sceneay J, Paget C, Wong CSF, Duret H, Tschopp J, et al. NLRP3 suppresses NK cell-mediated responses to carcinogen-induced tumors and metastases. *Cancer Res* [Internet]. 2012;72:5721–32.
15. Drexler SK, Bonsignore L, Masin M, Tardivel A, Jackstadt R, Hermeking H, et al. Tissue-specific opposing functions of the inflammasome adaptor ASC in the regulation of epithelial skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012;109:18384–9.
16. Martins I, Tesniere A, Kepp O, Michaud M, Schlemmer F, Senovilla L, et al. Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle* [Internet]. 2009;8:3723–8.
17. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 $\beta$ -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* [Internet]. 2009;15:1170–8.
18. Iyer SS, Pulsikens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK, et al. Necrotic cells trigger

- a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009;106:20388–93.
19. Miller LJ, Kurtzman SH, Anderson K, Wang Y, Stankus M, Renna M, et al. Interleukin-1 family expression in human breast cancer: interleukin-1 receptor antagonist. *Cancer Invest* [Internet]. 2000;18:293–302.
  20. Pantschenko AG, Pushkar I, Anderson KH, Wang Y, Miller LJ, Kurtzman SH, et al. The interleukin-1 family of cytokines and receptors in human breast cancer: implications for tumor progression. *Int J Oncol* [Internet]. 2003;23:269–84.
  21. Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res* [Internet]. 2007;67:10019–26.
  22. Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, et al. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res* [Internet]. 2011;71:2455–65.
  23. Guey B, Petrilli V. Assessing caspase-1 activation. In: Springer, editor. *Methods Mol Biol* (in print). 2016.
  24. Yazdi AS, Drexler SK, Tschopp J. The role of the inflammasome in nonmyeloid cells. *J Clin Immunol* [Internet]. 2010;30:623–7.
  25. Stienstra R, Joosten LAB, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SAA, et al. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab* [Internet]. 2010;12:593–605.
  26. Roberti MP, Mordoh J, Levy EM. Biological role of NK cells and immunotherapeutic approaches in breast cancer. *Front Immunol* [Internet]. 2012;3:375.
  27. Cichocki F, Miller JS, Anderson SK, Bryceson YT. Epigenetic regulation of NK cell differentiation and effector functions. *Front Immunol* [Internet]. 2013;4:55.
  28. Tu S, Bhagat G, Cui G, Takaishi S, Kurt-Jones EA, Rickman B, et al. Overexpression of interleukin-1 $\beta$  induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell* [Internet]. 2008;14:408–19.
  29. Bunt SK, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *J Immunol* [Internet]. 2006;176:284–90.
  30. Elkabets M, Ribeiro VSG, Dinarello CA, Ostrand-Rosenberg S, Di Santo JP, Apte RN, et al. IL-1 $\beta$  regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *Eur J Immunol* [Internet]. 2010;40:3347–57.
  31. Schattgen SA, Gao G, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA. Cutting Edge: DNA in the Lung Microenvironment during Influenza Virus Infection Tempers Inflammation by Engaging the DNA Sensor AIM2. *J Immunol* [Internet]. 2016;196:29–33.
  32. Jakobs C, Perner S, Hornung V. AIM2 Drives Joint Inflammation in a Self-DNA Triggered Model of Chronic Polyarthritis. *PLoS One* [Internet]. 2015;10:e0131702.
  33. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2012;12:253–68.
  34. Keskinov AA, Shurin MR. Myeloid regulatory cells in tumor spreading and metastasis. *Immunobiology* [Internet]. 2015;220:236–42.
  35. Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* [Internet]. 2007;67:4507–13.

36. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2012;12:239–52.
37. Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jiménez R, Chillón MJ, Jareño J, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* [Internet]. 2002;35:23–8.
38. Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, et al. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* [Internet]. 1997;79:2320–8.
39. Cremer I, Fridman WH, Sautès-Fridman C. Tumor microenvironment in NSCLC suppresses NK cells function. *Oncoimmunology* [Internet]. 2012;1:244–6.
40. Mamessier E, Sylvain A, Bertucci F, Castellano R, Finetti P, Houvenaeghel G, et al. Human breast tumor cells induce self-tolerance mechanisms to avoid NKG2D-mediated and DNAM-mediated NK cell recognition. *Cancer Res* [Internet]. 2011;71:6621–32.
41. Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* [Internet]. 2009;182:240–9.
42. Salcedo R, Worschech A, Cardone M, Jones Y, Gyulai Z, Dai R-M, et al. MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *J Exp Med* [Internet]. 2010;207:1625–36.
43. Zaki MH, Vogel P, Body-Malapel M, Lamkanfi M, Kanneganti T-D. IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. *J Immunol* [Internet]. 2010;185:4912–20.
44. Terme M, Ullrich E, Aymeric L, Meinhardt K, Desbois M, Delahaye N, et al. IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2011;71:5393–9.



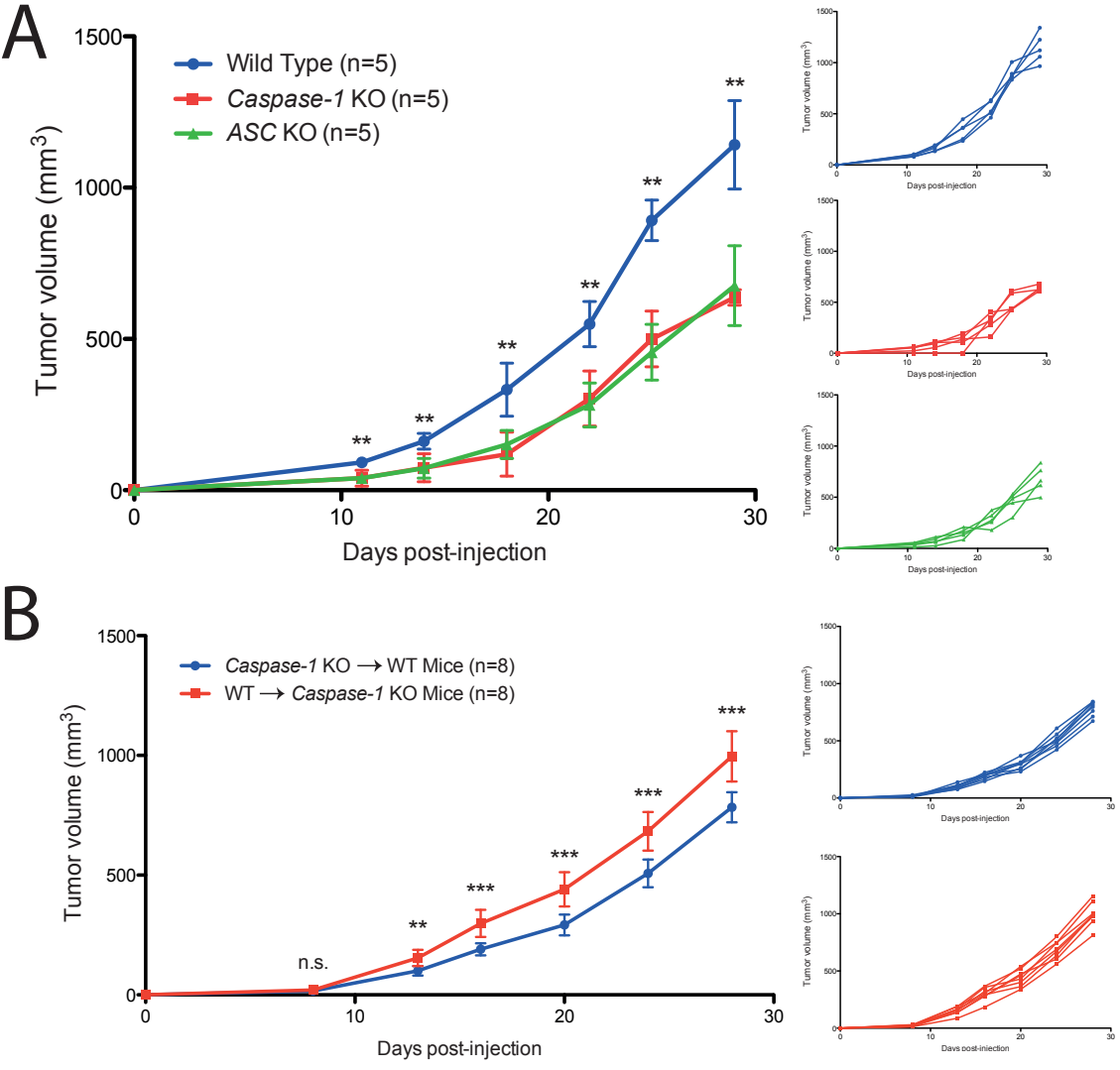
## Figure Legends:

**Figure 1 Lack of caspase-1 and ASC expression in immune cells reduce 4T1 tumor growth in BALB/c mice.** Tumor growth of 4T1 cells in indicated mice genotype (Wild Type mice: blue curve, *caspase-1/caspase-11* KO: red curve; ASC KO: green curve) was measured over 30 days (A). Average curves are detailed on the right. Tumor growth of 4T1 cells in indicated chimeric mice was measured over 30 days (Wild Type hematopoietic chimeric mice: blue curve; *Caspase-1/caspase-11* KO hematopoietic chimeric mice: red curve) (B). Average curves are detailed on the right. Data represent mean +/- SEM \*\*P<0,01 \*\*\*P<0,001 (Mann Whitney test) (n.s., non significant).

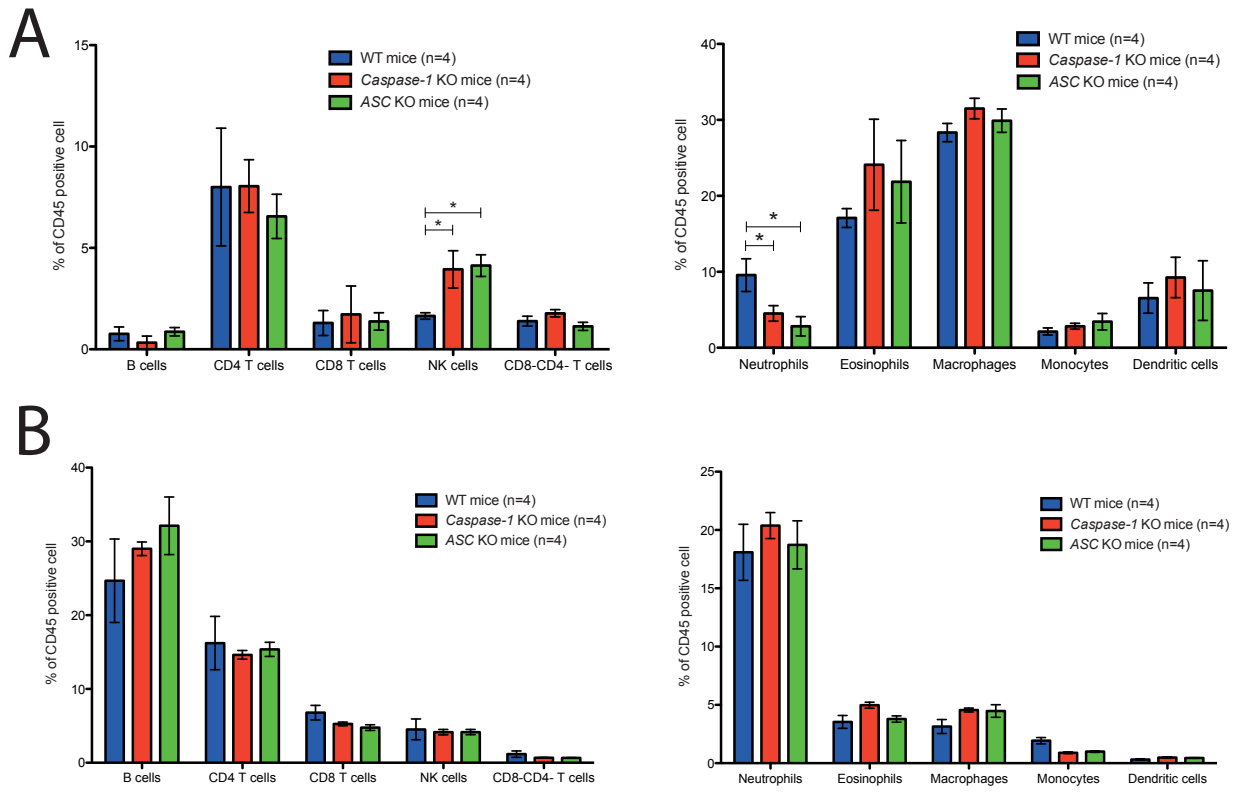
**Figure 2 Caspase-1 or ASC deficiencies modify immune infiltrate within tumor microenvironment 7 days post-injection.** Tumor microenvironment (A) and spleen (B) immune composing of indicated mice genotype at day 7 post-injection was analyzed by flow cytometry. Wild type mice: blue; *caspase-1/caspase-11* KO mice: red; ASC KO mice: Green. Lymphoid and myeloid cells were individually analyzed within CD45 positive cells. Data represent mean +/- SEM \*P<0,05 (Mann Whitney test).

**Figure 3 NK cells drive anti-tumor response and impair tumor growth in *caspase-1/caspase-11*-KO mice.** Tumor growth of 4T1 cells was measured in mice of indicated genotype and treated or not with anti-Asialo GM1 antibody during 24 days (Wild Type mice untreated: blue curve; Wild Type mice treated with anti-asialo GM1 antibody: dark blue curve; *caspase-1/caspase-11* KO mice untreated: red curve; *caspase-1/caspase-11* KO mice treated with anti-asialo GM1 antibody: dark red curve) (A). Average curves are detailed on the right. NK cells phenotype from spleen or tumor was analyzed by flow cytometry (B). Tumor cell extracts of indicated mice genotype were cultured in presence of cytokines (IL-12/18), antibodies (NKp46, Ly49D, NKG2D) or tumor cells (YAC-1, 4T1) and NK cells IFN- $\gamma$  production was measured by flow cytometry (C). Wild Type mice: blue; *caspase-1/caspase-11* KO mice: red. Data represent mean +/- SEM \*P<0,05 \*\*P<0,01 (Mann Whitney test) (n.s., non significant).

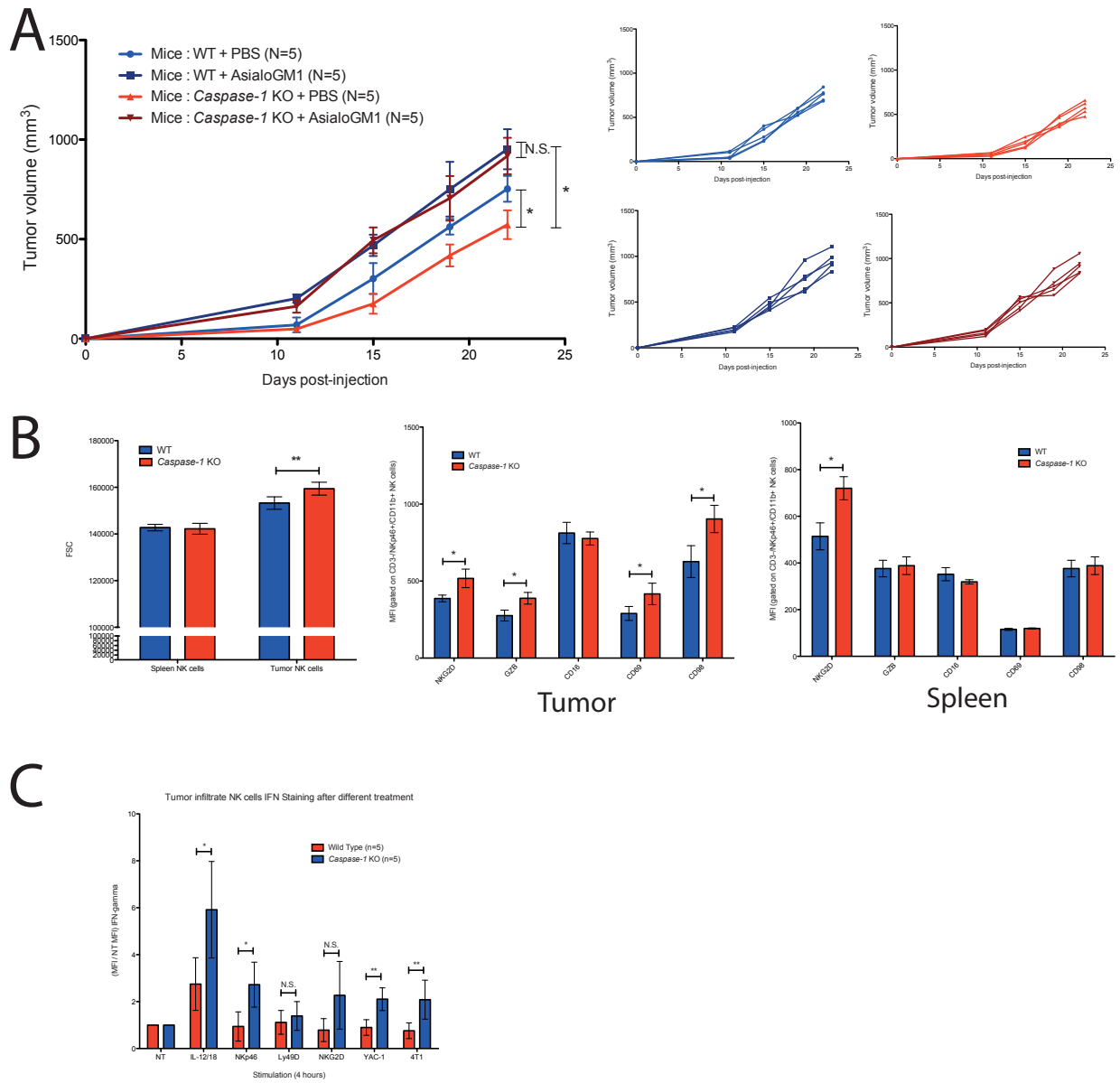
Guey B. et al, Figure 1



# Guey B. et al, Figure 2



Guey B. et al, Figure 3



## Supplementary figure and table legend

### Supplementary table 1 – Inventory of fluorochrome conjugated-antibodies used for cytometry analysis

**Supplementary figure 1 Lack of NLRP3 expression has no impact on 4T1 tumor growth in BALB/c mice but modify immune infiltrate within tumor microenvironment.** Tumor growth of 4T1 cells in indicated mice genotype was measured over 30 days (A). Immune infiltrate within the tumor microenvironment of indicated mice genotype was analyzed by flow cytometry (B). Lymphoid and myeloid cells were individually analyzed. Data represent mean +/- SEM \*P<0,05 \*\*P<0,01 (Mann Whitney test) (n.s., non significant).

**Supplementary figure 2 Caspase-1 or ASC deficiencies modify immune infiltrate within tumor microenvironment 14 days post-injection.** Tumor microenvironment (A) and spleen (B) immune composing of indicated mice genotype at day 14 post-injection was analyzed by flow cytometry. Wild type mice: blue; *caspase-1/caspase-11* KO mice: red; ASC KO mice: Green. Lymphoid and myeloid cells were individually analyzed within CD45 positive cells. Data represent mean +/- SEM \*P<0,05 (Mann Whitney test).

**Supplementary figure 3 IL-1 $\beta$  induces I $\kappa$ B degradation in 4T1 cells without affecting MHCI expression or cell proliferation *in vitro*.** 4T1 cells were incubated with recombinant IL-1 $\beta$ . I $\kappa$ B expression in cell extracts was analyzed by western blotting (A). Using BrdU/PI staining, cell cycle of 4T1 cells was analyzed by flow cytometry (B). 4T1 cell expression of MHC class I after IL-1 $\beta$  treatments was analyzed by flow cytometry (C).

## Guey B. et al, Supplementary table 1

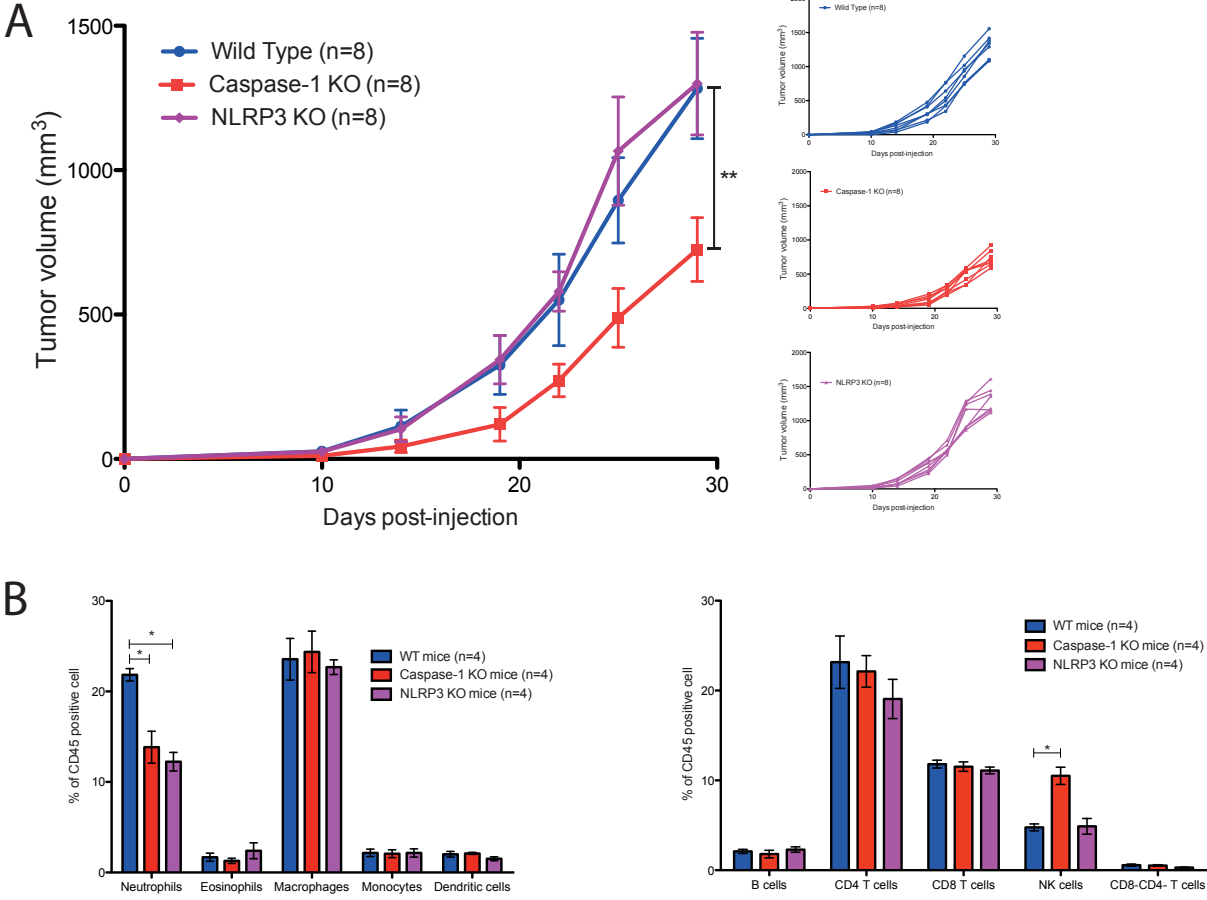
### Extracellular staining

Antigen	Clone	Conjugate	Ref/Supplier
CD11b	M1/70	PerCP-Cy5.5	101228 Biolegend
CD11c	N418	Brilliant Violet 605	117333 Biolegend
CD16	275003	APC	FAB19601A, R&D
CD19	6D5	Brilliant Violet 605	115540 Biolegend
CD3	17A2	APC/Cy7	100222 Biolegend
CD4	RM4-5	PerCP-Cy5.5	550954 BD Biosciences
CD45	30-F11	Alexa Fluor 700	B191240 Biolegend
CD64	X54-5/7.1	APC	139306 Biolegend
CD69	H1.2F3	Alexa Fluor 488	104516 Biolegend
CD8	53-6.7	PE	100708 Biolegend
CD98	RL388	PE	120981 eBioscience
F480	BM8	Alexa Fluor 488	123120 Biolegend
I-A/I-E	M5/114.15.2	Brilliant Violet 421	107631 Biolegend
KLRG1	2F1	PE-Cy7	25-5893-82, eBioscience
Ly6C	AL-21	APC/Cy7	560596 BD Biosciences
Ly6G	1A8	Brilliant Violet 570	127629 Biolegend
NKG2D	CX5	PE	12-5882, eBioscience
NKp46	29A1.4	APC	137608 Biolegend
SiglecF	E50-2440	PE	552126 BD Biosciences
CD27	LG.3A10	Brilliant Violet 605	563365, BD Biosciences
CD122	TM-b1	PerCP-eFluor 710	46-1222, eBioscience

### intracellular staining

Antigen	Clone	Conjugate	Ref/Supplier
Eomes	Dan11mag	eF660	50-4875, eBioscience
Granzyme B	GB12	PE	MHGB04, Invitrogen
IFN-Gamma	XMG1.2	PE	554412, BD Biosciences
T-bet	eBio4B10	PE-Cy7	25-5825-80, eBioscience

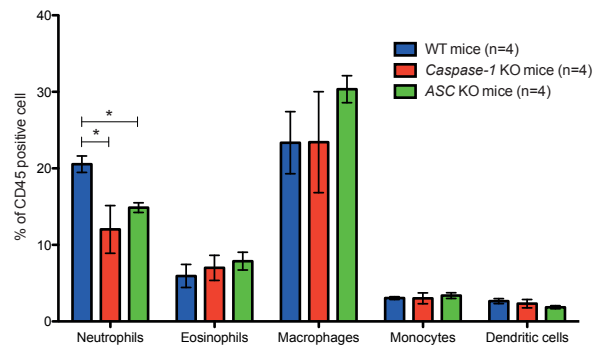
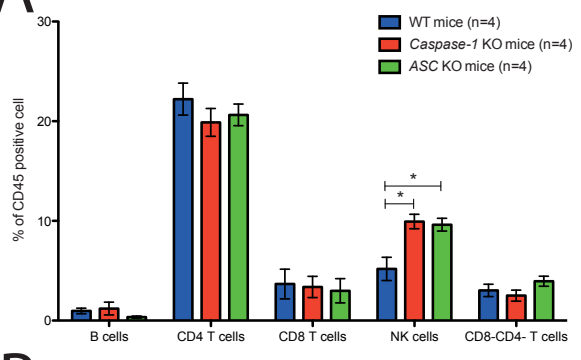
Guey B. et al, Supplementary figure 1



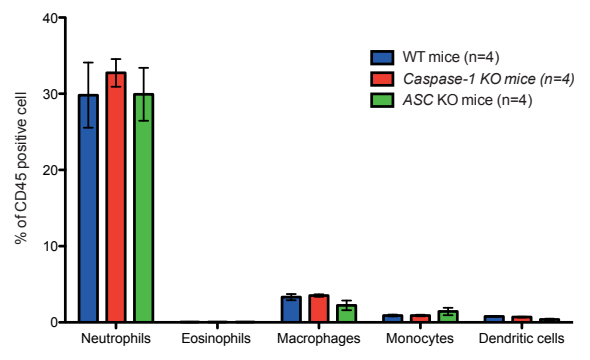
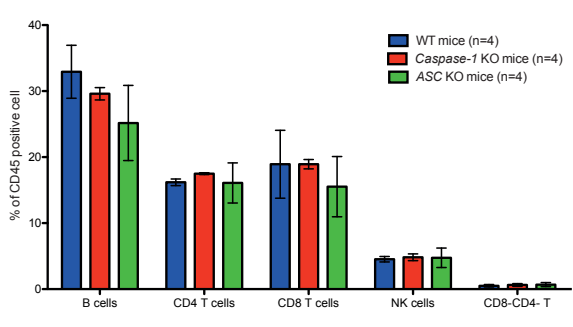


# Guey B. et al, Supplementary Figure 2

## A

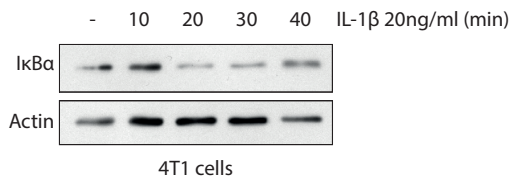


## B

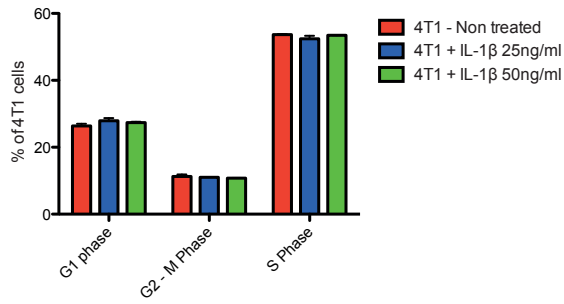


Guey B. et al, Supplementary figure 3

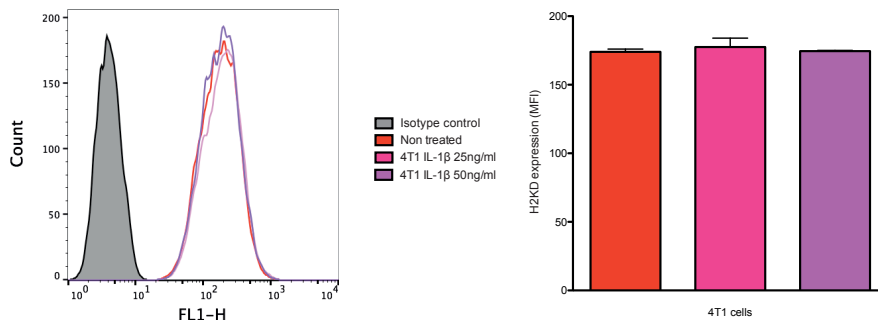
A



B



C





# **DISCUSSION**

---

## Chapitre 1. Mise en avant d'une auto-protéolyse de la caspase-1 différente selon les inflammasomes activés.

---

### A. Les inflammasomes NLRP3 et NLRP1b fonctionnent indépendamment l'un de l'autre

Bien qu'étant des senseurs de PAMPs/DAMPs très différents, des études ont montré que la capacité à former un inflammasome par les récepteurs NLRP1b et NLRP3, chez la souris, est liée à un efflux de potassium (Pétrilli et al., 2007a; Wickliffe et al., 2008a). Ces données suggèrent une potentielle interaction entre les récepteurs aboutissant à la formation d'un inflammasome fonctionnel.

En accord avec des données récoltées dans des souris de fond génétique 129S6 (Kovarova et al., 2012), nous avons montré que les inflammasomes NLRP3 et NLRP1b fonctionnent de manière indépendante dans 3 types de cellules immunitaires distincts chez la souris BALB/c. Le traitement des macrophages et des cellules dendritiques déficientes pour NLRP3 par la toxine létale de *Bacillus anthracis*, ne modifie ni la sécrétion d'IL-1 $\beta$  ni la sensibilité des cellules à la pyroptose. De façon originale, nos résultats montrent que le priming, pourtant indispensable au fonctionnement de l'inflammasome NLRP3, n'est pas nécessaire pour l'activation de l'inflammasome NLRP1b, comme le montre les quantités de caspase-1 sécrétées hors de la cellule lors de traitement à la toxine létale en absence de priming.

Le mode d'activation de l'inflammasome NLRP1b est encore débattu dans la littérature. Les 2 modèles proposés, du clivage ou de la dégradation par le protéasome d'une partie du récepteur, ne semblent pas conciliables. De plus, il est intéressant de noter que la réduction d'ATP intracellulaire est également capable d'induire une sécrétion d'IL-1 $\beta$  dépendante de l'inflammasome NLRP1b dans un modèle de surexpression dans le fibroblaste (Liao and Mogridge, 2013). Le mécanisme d'activation est alors totalement indépendant du clivage de NLRP1b mais partiellement dépendant de la production de ROS suggérant que les mécanismes d'activation de NLRP1b par la toxine létale d'une part et de la baisse d'ATP intracellulaire d'autre part sont différents. Le mécanisme clé permettant de comprendre l'activation du récepteur NLRP1b pourrait être lié à l'efflux d'ion potassique et l'étude du clivage de NLRP1b en fonction de la concentration extracellulaire en ion K<sup>+</sup> permettrait certainement de comprendre l'impact de ce flux sur la formation de l'inflammasome. En effet, il est possible d'imaginer un modèle dans lequel la modification de la conformation du domaine CARD, dépendante d'un efflux d'ions potassiques, de NLRP1b provoque le recrutement de la caspase-1 et son activation.

## **B. L'autoprotéolyse de la caspase-1 n'est pas indispensable à son activité et dépend du complexe moléculaire qui la recrute.**

Les études précédentes ont largement démontré l'importance du clivage de la caspase-1 pour son activation (Ayala et al., 1994; Martinon et al., 2002). Pourtant, nos résultats montrent que la forme non-clivée de la caspase-1 peut être catalytiquement active au sein du complexe de l'inflammasome NLRP1b. En effet, contrairement à l'inflammasome NLRP3 qui requiert l'autoclivage de la caspase-1 afin d'induire la pyroptose et la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , la forme mutée non clivable de la caspase-1 peut induire ces deux voies en réponse à la toxine létale de *Bacillus anthracis*. En 2010, une étude par P. Broz a suggéré que les modes d'activations de la caspase-1 pouvaient différer selon les inflammasomes et la présence de la protéine adaptatrice ASC (Broz et al., 2010). Les récepteurs contenant un domaine CARD, tels que NLRC4, ont la capacité de former un inflammasome en présence et en absence de l'adaptateur ASC. La présence de ASC provoque l'apparition d'un speck au sein duquel la caspase-1 est auto-protéolysée induisant le clivage de la pro-IL-1 $\beta$ , tandis que son absence induit une interaction directe entre les domaines CARD des récepteurs et de la caspase-1 et ne provoque pas son auto-protéolyse. Dans cette étude, P. Broz montre également que cette plateforme, indépendante de ASC et du clivage de la caspase-1, est capable d'induire la pyroptose mais peu de clivage de cytokine (Broz et al., 2010). Notre étude décrit donc un nouveau modèle selon lequel la forme zymogène de la caspase-1, au sein de l'inflammasome NLRP1b, est capable d'induire la pyroptose mais également le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  et de la pro-IL-18. Ce modèle a été confirmé par une étude menée dans des macrophages de souris C57BL/6 sur-exprimant le récepteur NLRP1b (Van Opendenbosch et al., 2014).

De manière intéressante, une récente étude de la structure biochimique de l'inflammasome NLRP1b a permis de mettre en évidence une similarité entre les domaines CARDs de caspase-1 et NLRP1b avec les domaines CARDs de Apaf-1 et caspase-9 (Jin et al., 2013). Apaf-1 et la caspase-9 forment un complexe nommé apoptosome connu pour son rôle dans le déclenchement d'une mort cellulaire par apoptose. Lors de la formation de ce complexe, les études ont montré que la caspase-9 est active sous sa forme entière en absence de toute auto-protéolyse (Chao et al., 2005; Rodriguez and Lazebnik, 1999). L'ensemble de ces données suggère un mécanisme semblable entre la formation de l'apoptosome et de l'inflammasome NLRP1b permettant d'activer les caspases effectrices en absence de leur auto-protéolyse. De plus amples expériences seront nécessaires pour déterminer par quel mécanisme la caspase-1 peut être active sous sa forme entière.

## **C. L'adaptateur ASC forme une plateforme pour amplifier l'inflammation**

Une autre donnée intéressante de notre étude est le rôle de ASC au sein des différents inflammasomes. Comme décrit dans d'autres études, nos résultats montrent que les macrophages

de souris ASC KO traités avec la nigéricine, un activateur de l'inflammasome NLRP3, ne sécrètent pas d'IL-1 $\beta$  ni ne meurent par pyroptose. En revanche, nos expériences démontrent que l'absence de la protéine adaptatrice ASC conduit à une pyroptose et à la sécrétion d'IL-1 $\beta$  en absence du clivage de la caspase-1 en réponse à la toxine létale. De plus, la formation d'un speck de caspase-1 en réponse à la toxine létale est dépendante de la présence de ASC. Ensemble, ces données suggèrent donc que le clivage de la caspase-1, lorsqu'elle est recrutée au sein d'un speck, est indispensable à son activité. Afin de démontrer l'indépendance de l'activité de la caspase-1 vis-à-vis de l'adaptateur ASC au sein de l'inflammasome NLRP1b, nous souhaitons traiter des macrophages issus de souris double-KO (*caspase-1/ASC* KO) et reconstitués avec les différentes formes de la caspase-1, avec la toxine létale. Ces résultats permettront de comprendre définitivement le rôle de ASC au sein de l'inflammasome NLRP1b.

En plus de son domaine CARD permettant une interaction avec la caspase-1, l'adaptateur ASC est une protéine dont le domaine PYD a des propriétés de type Prion. En effet, la modification de la conformation de ce domaine conduit à une réaction en chaîne provoquant l'agglomération de la protéine ASC et à la formation du speck (Cai et al., 2014). De manière intéressante, la formation de ce speck est localisée en périphérie du noyau et peut être sécrétée par la cellule par un mécanisme mal compris souvent relié à la mort des cellules (Baroja-Mazo et al., 2014; Franklin et al., 2014). Cette sécrétion de ASC ne semble pas être un mécanisme anodin mais permettrait la diffusion du signal d'inflammation aux cellules alentours. En effet, la protéine ASC peut être phagocytée par les cellules immunitaires patrouillant alentours et provoquer l'agglomération et l'activation de la caspase-1 en absence d'autres signaux activateurs de l'inflammasome (Baroja-Mazo et al., 2014; Franklin et al., 2014). La caspase-1 est recrutée dans cet agrégat protéique via des interactions homotypiques de son domaine CARD avec celui de ASC. L'ensemble de ces données suggère que le clivage de la caspase-1 est nécessaire et lui permet de se «libérer» de l'agrégat afin d'induire le clivage et la sécrétion des cytokines et la pyroptose. D'un autre côté, l'importance du clivage de la caspase-1 peut être lié à une activité qui reste à découvrir.



---

## Chapitre 2. Rôle de l'inflammasome au cours de la progression tumorale mammaire

---

L'inflammasome est un complexe moléculaire impliqué dans la détection de PAMPs et de DAMPs et régulant la réponse inflammatoire via l'activation de la caspase-1 déclenchant le clivage et la sécrétion de deux cytokines pro-inflammatoires : la pro-IL-1 $\beta$  et la pro-IL-18 (Schroder and Tschopp, 2010). Cytokines clés de la réponse inflammatoire, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 ont un rôle moins bien défini dans le cancer. Selon les conditions, ces deux cytokines peuvent avoir des rôles aussi bien pro-tumoraux (Carmi et al., 2013; Voronov et al., 2003) qu'anti-tumoraux (Salcedo et al., 2010; Zaki et al., 2010) décrits dans l'introduction de ce manuscrit.

L'inflammation est un phénomène fréquemment observé dans le cancer et se reflète par la présence de cytokines et de cellules inflammatoires dans le microenvironnement tumoral (Hannan and Weinberg, 2011). Parmi ces cytokines, de nombreuses études ont pu détecter la présence d'IL-1 $\beta$  dans le microenvironnement tumoral mammaire, suggérant que l'inflammasome est activé au sein de ces tumeurs (Pantschenko et al., 2003). De plus, la présence d'IL-1 $\beta$  dans le microenvironnement est associée à un mauvais pronostic d'évolution du cancer (Bunt et al., 2007; Dirat et al., 2011; Miller et al., 2000; Pantschenko et al., 2003). Partant de ces observations, la seconde partie des résultats présentés dans ce manuscrit a permis de définir le rôle de l'inflammasome au cours de la progression tumorale mammaire.

### A. Un rôle pour l'inflammasome, oui, mais pour quel inflammasome ?

Nos résultats obtenus dans un modèle de greffes syngéniques et orthotopiques de cellules tumorales ont montré que l'absence de la caspase-1 et de ASC, deux protéines majeures de l'inflammasome, réduit la croissance des cellules tumorales mammaires suggérant un rôle pour l'inflammasome dans le soutien de la croissance tumorale (figure 14).

La présence de nombreux DAMPs dans le microenvironnement tumoral, tels que l'ATP sécrété par les cellules endommagées, permettait d'envisager l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules immunitaires infiltrant la tumeur. Néanmoins, nos expériences n'ont pas mis en évidence de rôle du récepteur NLRP3 et suggèrent que, dans notre modèle, un autre récepteur, capable de former l'inflammasome, favorise la croissance des cellules tumorales mammaires.

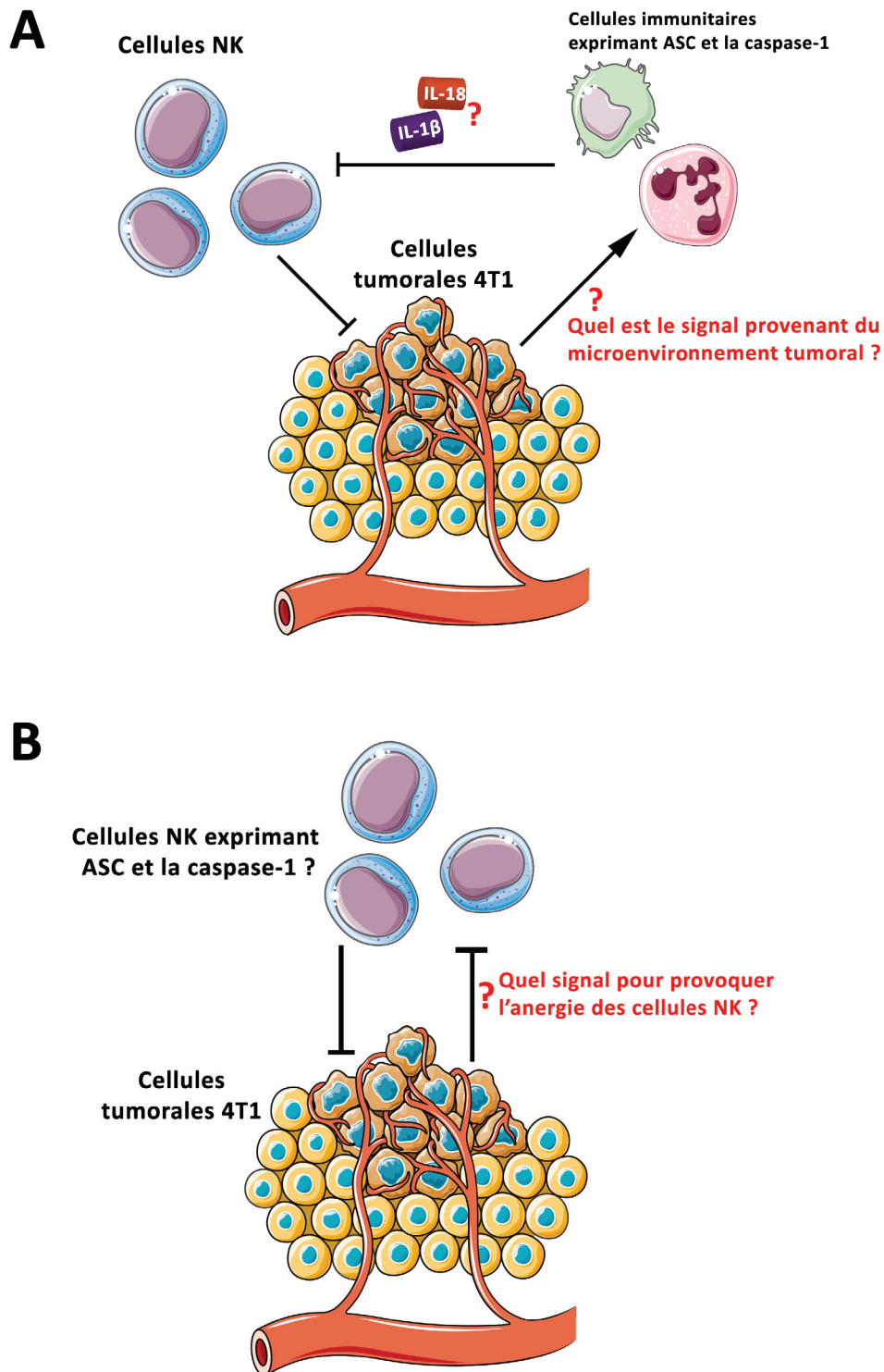
Parmi ces autres récepteurs de l'immunité, le récepteur AIM2 détecte l'ADN présent dans le cytosol et conduit à la formation de l'inflammasome (Bürckstümmer et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2009; Hornung et al., 2009). Exprimé par de nombreux types cellulaires, AIM2 est notamment connu pour empêcher le développement de cancers du colon indépendamment de l'inflammasome (Wilson et al., 2015). En effet, l'absence d'AIM2, dans des modèles

murins de cancers induits, augmente le nombre de polypes et le risque de cancers colorectaux (Wilson et al., 2015). D'autre part, les études sur AIM2 l'associent également à une détection endogène de l'ADN aboutissant à la mort des cellules anormales (Chen et al., 2006; Liu et al., 2015). Son rôle au sein des cellules immunitaires au cours de la progression tumorale reste obscur. Cependant, l'ADN relargué par les cellules endommagées au sein de la tumeur peut conduire à la formation de l'inflammasome AIM2 au sein des cellules immunitaires aboutissant à l'activation de la caspase-1 (Jakobs et al., 2015; Schattgen et al., 2016) qui, dans notre cas, pourrait participer au soutien de la croissance tumorale mammaire. L'étude de la croissance tumorale des cellules 4T1 au sein de souris BALB/c déficientes pour AIM2 permettrait de déterminer le rôle de cet inflammasome dans notre modèle. Les souris *AIM2* KO sous fond BALB/c n'existant pas à notre connaissance, il faut dans un premier temps les dériver sous ce fond génétique.

Le récepteur NLRC4 est peu probablement impliqué dans le phénotype que nous observons. Comme AIM2, NLRC4 est notamment connu pour son rôle protecteur dans le cas d'apparition de cancers colorectaux chez la souris lorsqu'il est exprimé par les cellules épithéliales (Hu et al., 2010). De plus NLRC4 est connu pour détecter des PAMPs associés aux systèmes de sécrétions des bactéries et non à des DAMPs (Vance, 2015). Enfin, l'inflammasome NLRC4 possède un domaine CARD permettant une interaction directe avec la caspase-1 qui suggère un rôle moins important de ASC dans la formation de cet inflammasome. L'ensemble de nos données et les connaissances actuelles sur NLRC4 écartent pour l'instant un rôle de ce récepteur dans le soutien de la croissance tumorale mammaire.

L'inflammasome NLRP1b pourrait présenter un intérêt particulier dans ce modèle de croissance tumoral. En effet, comme précisé dans la partie précédente, NLRP1b peut être activé lors d'une diminution trop importante de l'ATP intracellulaire, un phénomène qui peut se produire en absence d'oxygène, empêchant la phosphorylation oxydative, ou lors d'une privation en glucose (Chavarría-Smith and Vance, 2015). La diminution de la concentration en oxygène ou en glucose dans le microenvironnement peut être la conséquence d'une croissance excessive observée au cours de la progression tumorale, permettant de suggérer l'activation de l'inflammasome NLRP1b dans les cellules immunitaires infiltrantes. Cependant, comme nous l'avons montré précédemment dans notre étude sur NLRP1b, l'activation de l'inflammasome NLRP1b n'est pas dépendante de ASC *in vivo*, ce qui ne permet donc pas d'expliquer l'impact de l'absence de ASC sur la croissance des cellules 4T1. L'étude de la croissance des cellules 4T1 dans des souris BALB/c déficientes pour NLRP1b permettrait néanmoins de déterminer avec précision le rôle de cet inflammasome dans le soutien de la croissance tumorale mammaire.

Enfin, un rôle pour le récepteur NLRP3 n'est pas totalement à écarter dans notre modèle. En effet, son activité pourrait être suppléée par un autre récepteur tel que AIM2. La progression tumorale provoque l'apparition de nombreux DAMPs dans le microenvironnement qui peuvent



**Figure 14 : Modèles suggérés de soutien de la croissance tumorale par l'inflammasome**

(A) La croissance des cellules 4T1 dans la glande mammaire est ralentie par l'activité anti-tumorale des cellules NK. Via l'activation de l'inflammasome dans les cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement, la sécrétion de cytokines provoque une modification de l'activité des cellules NK, favorisant ainsi la croissance tumorale. Dans ce modèle, il reste à déterminer quel inflammasome est responsable de l'activation de la caspase-1 dans les cellules immunitaires ainsi que le rôle des cytokines régulées par l'inflammasome (entre autres IL-1 $\beta$  et IL-18).

(B) Un second modèle d'activation peut être imaginé dans lequel l'inflammasome pourrait être directement activé dans les cellules NK provoquant leur anergie vis à vis des cellules tumorales.

activer différents inflammasomes connus et même encore inconnus. Il est donc possible qu'un phénomène de redondance nous empêche de comprendre le rôle du récepteur NLRP3 dans le soutien de la croissance tumorale mammaire (Figure 14).

## **B. De quelle manière l'inflammasome régule-t-il l'activité immunitaire anti-tumorale ?**

### **a. Quelles sont les cellules à l'origine de l'activation de l'inflammasome ?**

Comme nous l'avons vu précédemment, l'inflammasome et ses composants sont exprimés par de nombreux types cellulaires. Au sein de la glande mammaire par exemple, les cellules épithéliales mais également les adipocytes peuvent exprimer la caspase-1 et induire le clivage de l'IL-1 $\beta$  (Dirat et al., 2011). Dans le cadre du cancer du sein, les adipocytes en contact avec des cellules tumorales produisent une grande quantité de cytokines telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  (Dirat et al., 2011). De plus, la co-culture d'adipocytes et des cellules tumorales 4T1 stimulent le potentiel métastatique des 4T1 *in vivo*. Pour déterminer quel compartiment cellulaire exprimant l'inflammasome est responsable du retard de la croissance tumorale chez les souris *caspase-1* KO, nous avons donc étudié la croissance tumorale au sein de souris chimériques pour leur système hématopoïétique. Les résultats de nos expériences ont permis de conclure que l'absence de la caspase-1 dans les cellules du système hématopoïétique, réduit la croissance des cellules 4T1 *in vivo*. Cette observation nous permet d'éliminer les cellules épithéliales et les adipocytes comme source de l'activation de la caspase-1 et montre que l'inflammasome, exprimé par les cellules immunitaires, favorise la croissance des cellules tumorales mammaires (figure 14).

En revanche, la caspase-1 est exprimée par de nombreux types de cellules immunitaires (Mankan et al., 2012; Miao et al., 2011; Osuka et al., 2012; Winkler and Rösen-Wolff, 2015). Il est donc difficile de spéculer sur le type cellulaire responsable du soutien de la croissance tumorale. Les études de F. Ghiringhelli ont permis de montrer que l'activation de l'inflammasome dans les cellules dendritiques favorisent la réponse anti-tumorale après des traitements chimio thérapeutiques (Ghiringhelli F et al. 2009). D'autres travaux du même groupe ont également montré que l'activation de l'inflammasome dans les cellules myéloïdes suppressives après un autre type de traitement chimio thérapeutique provoque la libération d'IL-1 $\beta$  qui, en agissant sur les lymphocytes T CD4, induit la production d'IL-17 et favorise ainsi l'angiogenèse et la croissance tumorale (Bruchard M et al 2012). Selon le type de cellules immunitaires qui exprime l'inflammasome, il semble donc qu'il puisse avoir un rôle pro- ou anti-tumoral. En rapprochant ces données de la littérature à nos expériences, on peut supposer que le soutien de la croissance tumorale soit lié à l'activation de l'inflammasome dans des cellules telles que les MDSC.

### **b. Les MDSC perturbent-elles la réponse anti-tumorale en présence de l'inflamma-**

## some ?

Au cours de l'étude du microenvironnement tumoral, nous avons observé une modification du recrutement de neutrophiles dans les tumeurs des souris *caspase-1* et *ASC KO*. Ces cellules, caractérisées par une forte expression de Ly6G, sont particulièrement moins recrutées dans le microenvironnement tumoral en absence de *caspase-1*, *ASC* mais également de *NLRP3*.

Bien que nous n'ayons pas étudié leurs caractéristiques *in vitro*, il est tentant de rapprocher ces cellules des cellules myéloïdes suppressives (MDSC) fréquemment retrouvées dans le microenvironnement tumoral. Considérées comme des cellules n'ayant pas totalement terminé leur différenciation, les MDSC peuvent inhiber la réponse anti-tumorale et favoriser la croissance des cellules cancéreuses de diverses manières. D'une part, les MDSC sont capables d'exprimer simultanément *NOS2* et *ARG1* permettant d'induire l'anergie des cellules T CD8 et NK, leur apoptose et même d'altérer la reconnaissance du MHC I par le TCR (Gallina et al., 2006; Nagaraj and Gabrilovich, 2007; Ochoa et al., 2007). D'autre part, les MDSC stimulent l'angiogenèse via la sécrétion de nombreuses molécules telles que le VEGF et MMP-9 (Yang et al., 2004) favorisant ainsi l'oxygénation de la tumeur et son invasion (Du et al., 2008; Sevko and Umansky, 2013). Enfin, l'exposition à la membrane du TGF- $\beta$ 1 par les MDSC provoque une baisse de la cytotoxicité, de l'expression de *NKG2D* et de la production d'IFN- $\gamma$  des cellules NK (Li et al., 2009).

De nombreuses études ont montré que l'IL-1 $\beta$  joue un rôle dans la prolifération et le recrutement des MDSC sur le site tumoral (Bunt et al., 2007; Elkabets et al., 2010; Tu et al., 2008). Plus précisément, les MDSC sont recrutées de manière moins importante au sein de tumeurs de souris *NLRP3 KO* par rapport à des souris WT (van Deventer et al., 2010). Dans une étude de tumeurs mammaires, S.K. Bunt et collègues ont également montré que la surexpression d'IL-1 $\beta$  par les cellules 4T1 favorise le recrutement de MDSC dans les tumeurs qui soutiennent la progression tumorale (Bunt et al., 2007). De la même manière, nos données suggèrent que l'inflammasome, via *ASC*, la *caspase-1* et *NLRP3*, favorise le recrutement des MDSC, potentiellement via la sécrétion d'IL-1 $\beta$ . Il est toutefois important de noter que la diminution du recrutement des MDSC n'est pas suffisante pour provoquer une réduction de la croissance tumorale dans notre modèle. En effet, alors qu'elle corrèle avec une diminution de la croissance tumorale mammaire dans les souris *caspase-1* et *ASC KO*, la diminution du recrutement des MDSC dans les souris *NLRP3 KO* n'a pas d'impact sur la croissance des cellules 4T1 par rapport aux souris WT. Il semblerait donc que la présence ou l'absence des MDSC au sein du microenvironnement tumoral ne soit pas directement liée à la réduction de la croissance tumorale observée dans les souris *caspase-1* et *ASC KO* dans notre étude. Cependant et afin de comprendre le rôle des MDSC dans notre modèle, il serait intéressant d'observer la croissance tumorale au sein de souris, de différents génotypes, dans lesquelles cette population cellulaire aura été éliminée préalablement via l'utilisation d'anticorps déplétant (anti-Ly6G).

Outre leur impact sur la tumeur primaire, les MDSC sont également décrits pour favoriser l'apparition de métastases, notamment pulmonaires (Bunt et al., 2006; Chow et al., 2012). Le modèle 4T1 provoquant l'apparition de métastases pulmonaires, il sera intéressant d'observer le nombre de métastases présentes chez les souris WT ou déficientes pour l'inflammasome.

### **c. L'inflammasome inhibe l'activité anti-tumorale des cellules NK**

En ciblant les cellules anormales de notre organisme pour les éliminer par des mécanismes décrits dans l'introduction de ce manuscrit, les cellules NK ont un très fort potentiel anti-tumoral (Vivier et al., 2012). La présence de cellules NK dans le microenvironnement est également un facteur de bon pronostic dans les cancers du poumon (Villegas et al., 2002), colorectaux (Coca et al., 1997) ou même du sein (Emens, 2012).

Au cours de la progression tumorale des cellules 4T1, les cellules NK participent à la réponse immunitaire anti-tumorale comme nous l'avons observé via l'injection d'anticorps déplétant. Nous avons également observé une augmentation significative du nombre de cellules NK dans le microenvironnement tumoral en absence de la caspase-1 et de ASC, corrélant avec une diminution de la croissance des cellules tumorales. De plus, la déplétion des cellules NK, par injection d'anticorps dans les souris *caspase-1* KO, supprime le retard de croissance des cellules 4T1 observé auparavant dans ces souris par rapport aux souris WT. Enfin, alors que l'absence de NLRP3 provoque une diminution du recrutement des MDSC, les tumeurs des souris *NLRP3* KO ne présentent pas d'augmentation de cellules NK permettant d'envisager un rôle des NK dans le ralentissement de la croissance tumorale observée chez les souris *ASC* et *caspase-1* KO. La modulation du nombre de cellules NK au sein des tumeurs des différents génotypes de souris peut être due à une modification de leur recrutement, à un effet sur leur prolifération ou encore à une diminution de leur mortalité. La prostaglandine E2 (PGE2) est un médiateur important de l'inflammation fréquemment observé dans le microenvironnement tumoral mammaire (Schrey and Patel, 1995) et dont la synthèse peut notamment être régulée par l'IL-1 $\beta$  (Hou et al., 2011; Pang and Knox, 1997). De manière intéressante, la PGE2 favorise la croissance de tumeurs mammaires via le recrutement de MDSC (Sinha et al., 2007) et provoque également l'arrêt de la prolifération et l'apoptose des cellules NK dans le cas de cancers gastriques (Li et al., 2016). De manière plus générale, la PGE2 est un inhibiteur de l'activité cytotoxique des cellules NK (Kalinski, 2012). Dans notre modèle, l'inflammasome pourrait, via la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ , induire la production de PGE2 responsable de la mort des cellules NK dont la prolifération et la survie seraient restaurées par l'absence d'un des composants de l'inflammasome dans les souris *ASC* et *caspase-1* KO.

En plus de l'augmentation de leur recrutement, l'étude de différents marqueurs des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs nous a permis de montrer que l'absence de la caspase-1 et de ASC favorise l'expression de marqueurs d'activation par les cellules NK tels que NKG2D, la



granzyme B ou CD98. L'ensemble de ces données suggère donc que l'inflammasome, indépendamment du récepteur NLRP3, perturbe l'activation et le recrutement des cellules NK dans le microenvironnement tumoral mammaire et favorise ainsi la croissance des cellules 4T1.

Chez l'humain, il est intéressant de noter que le microenvironnement tumoral provoque une modification de l'activité des cellules NK. Par exemple, les cellules NK infiltrant les cancers pulmonaires non à petites cellules (NSCLC) ont un phénotype altéré et présentent une moins bonne capacité à sécréter de l'IFN- $\gamma$  ainsi qu'une dégranulation défectueuse (Cremer et al., 2012; Platonova et al., 2011). De la même manière, les cellules NK présentes dans le microenvironnement de cancer du sein exhibent un plus faible marquage des récepteurs activateurs tels que NKG2D ou NKp30 et une augmentation de l'expression de récepteurs inhibiteurs tels que NKG2A (Mamessier et al., 2011a, 2011b). Ces données tendent à montrer que le microenvironnement tumoral modifie le fonctionnement biologique des cellules NK et inhibe leur activité anti-tumorale (Figure 14A). Les mécanismes provoquant cette modification sont encore mal compris et nos résultats permettent de proposer l'inflammasome comme un régulateur négatif de l'activité des cellules NK dans le microenvironnement tumoral mammaire. En effet, nous montrons que, plus qu'une simple modification du recrutement des cellules NK, l'absence de la caspase-1 provoque également une amélioration du phénotype anti-tumoral des cellules NK avec une meilleure sécrétion de l'IFN- $\gamma$  en réponse à divers stimuli *in vitro*.

Il reste cependant à comprendre de quelle manière ASC, la caspase-1 ou l'inflammasome en général, perturbent le fonctionnement des cellules NK dans le microenvironnement tumoral. Comme précisé précédemment, les MDSC participent à la croissance tumorale en inhibant l'activité anti-tumorales des lymphocytes T et des cellules NK. L'observation du phénotype des cellules NK dans les différents génotypes de souris déplétées pour les MDSC nous permettra de comprendre le rôle des MDSC dans l'inhibition de l'activité anti-tumorale des cellules NK dans notre modèle.

D'un autre côté, il existe également des études suggérant un rôle pro-tumoral pour l'IL-18, une cytokine régulée par l'inflammasome, qui s'accorderait avec nos observations. En effet, dans des études de modèles de cancers murins, l'IL-18 accroit l'expression de PD-1, un récepteur inhibiteur, par les cellules NK provoquant une baisse de la réponse anti-tumorale (Terme et al., 2011). L'inhibition de l'IL-18 via l'IL-18BP ou des mécanismes de silencing permet de restaurer, dans ce cas, l'immunosurveillance et la réponse anti-tumorale médiée par les cellules NK (Terme et al., 2012). Dans notre modèle, l'absence de la caspase-1 pourrait provoquer une diminution de l'IL-18 dans le microenvironnement tumoral et ainsi diminuer leur expression de PD-1.

Des données dans le cancer du poumon chez l'humain montrent que la perte de récepteurs à la surface des cellules NK, recrutées dans le microenvironnement tumoral, n'est pas liée à une diminution de la transcription et de l'ARNm de ces récepteurs (Gillard-Bocquet et al., 2013),

suggérant un rôle du microenvironnement dans la modification de la localisation des récepteurs au sein des cellules NK. De la même manière, nous pourrions déterminer si l'absence de la caspase-1 provoque une modification de la transcription des récepteurs activateurs ou une modification de leur localisation au sein de la cellule.

Enfin, une dernière hypothèse est envisageable selon laquelle les cellules NK, elles-mêmes, exprimeraient les composants de l'inflammasome et que leur activation en leur sein provoquerait une modification de leur activité en régulant la localisation des récepteurs activateurs au sein de la cellule, en modifiant leur programme transcriptionnel ou même en induisant leur mort par pyroptose (figure 14B). A ce jour, seule l'équipe de J.A. Lederer a publié des études montrant l'activation de l'inflammasome NLRP3 au sein de cellules NK via cytométrie en flux (Osuka et al., 2012; Stoecklein et al., 2015).

### **C. Quel facteur, régulé par l'inflammasome, favorise la progression tumorale mammaire ?**

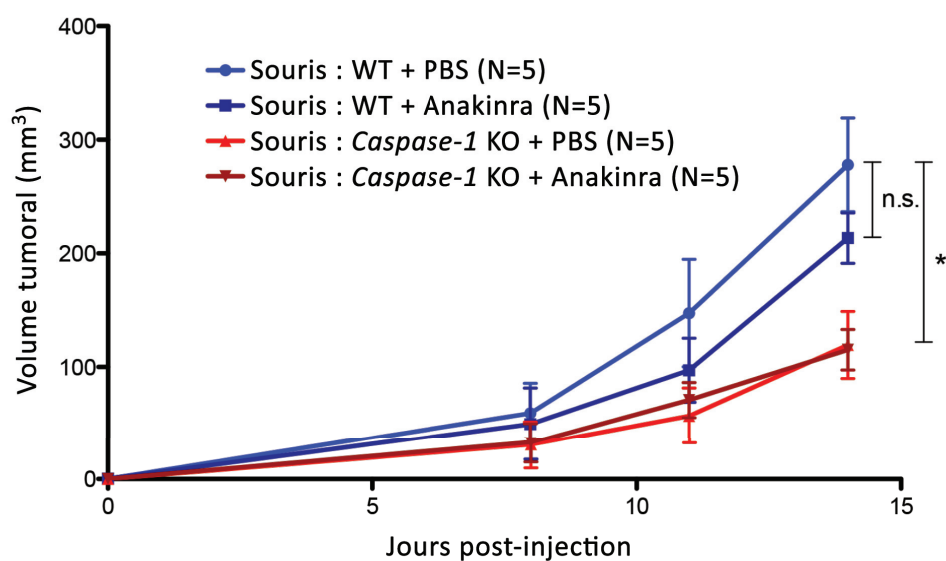
Si l'absence des composants de l'inflammasome favorise la progression tumorale mammaire dans notre étude, nous n'avons pas pu mettre en évidence son rôle dans la sécrétion de cytokines dans le microenvironnement. En effet, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 étant synthétisées sous la forme de précurseurs inactifs, il est nécessaire d'avoir des techniques permettant de distinguer les deux formes (actives et inactives) des cytokines. Les tests ELISA utilisables sur les surnageants de tumeurs au laboratoire ne permettent pas de distinguer ces deux formes de protéine et donc de connaître l'état d'activation de ces deux cytokines dans le microenvironnement des tumeurs 4T1.

#### **a. L'IL-1 $\beta$ favorise-t-elle la croissance tumorale des cellules 4T1 en présence de la caspase-1 ?**

Dans le contexte du cancer du sein, l'IL-1 $\beta$  est régulièrement associée à des rôles pro-tumoraux. Considérée comme un facteur de mauvais pronostic lorsqu'elle est fortement exprimée dans différents types de cancers (Lewis et al., 2006), de nombreuses études montrent que l'utilisation de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 permet de réduire l'apparition de métastases dans différents modèles de tumeurs murines (Chirivi et al., 1993; Elkabets et al., 2010; Vidal-Vanaclocha et al., 1994).

Les résultats obtenus lors de nos expériences laissent également entrevoir un rôle de l'IL-1 $\beta$  dans la croissance tumorale mammaire. Plus précisément, l'IL-1 $\beta$  sécrétée par les cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement tumorale pourrait favoriser la croissance des cellules tumorales par de nombreux mécanismes tels que l'angiogenèse ou la sécrétion de cytokines. En 2010, une étude de M. Elkabets montre que la présence d'IL-1 $\beta$  au sein de tumeurs mammaires provoque l'accumulation de progéniteurs myéloïdes, considérés comme des MDSC, dans le microenvironnement tumoral (Elkabets et al., 2010). En concordance avec ces résultats,





**Figure 15 : L'injection d'Anakinra n'influe pas la croissance des cellules tumorales 4T1**

Suivi de la croissance des cellules 4T1 injectées dans la glande mammaire de souris WT ou *caspase-1* KO traitées avec la forme recombinante de l'IL-1Ra (Anakinra) ou du PBS (PBS). Moyenne et déviation standard. \* $p < 0,05$  (Test statistique non paramétrique de Mann-Whitney), n.s. = non significatif

notre étude du microenvironnement tumoral dans des souris *caspase-1*, *ASC* et *NLRP3* KO montre une diminution du recrutement de cellules Ly6G positives, considéré comme un marqueur des MDSC. Pourtant, comme nous l'avons vu auparavant, cette diminution n'est pas suffisante pour réduire la croissance des cellules 4T1.

Afin de définitivement démontrer le rôle de l'IL-1 $\beta$  dans notre modèle, nous avons tenté d'étudier la croissance des cellules tumorales 4T1 au sein de souris traitées avec l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra, Anakinra). Les injections répétées (tous les 2 jours) de l'IL-1Ra n'ont pas eu d'effet significatif sur la croissance des cellules 4T1 (Figure 15). Cependant, le métabolisme de l'IL-1Ra au sein des souris étant très rapide, il est possible que l'absence d'effet soit due à une inefficacité de notre traitement sur l'inhibition de l'IL-1.

Pour conclure définitivement sur le rôle de l'IL-1 $\beta$  dans notre modèle, nous étudierons la croissance des cellules 4T1 dans des souris IL-1R-déficientes ou traitées avec des anticorps bloquant de l'IL-1 $\beta$ .

#### **b. Un rôle pour l'IL-18 dans la progression tumorale mammaire ?**

Outre l'IL-1 $\beta$ , le complexe de l'inflammasome régule également l'activité de l'IL-18, une autre cytokine pro-inflammatoire. Comme pour l'IL-1 $\beta$ , nos résultats suggèrent qu'une diminution de sécrétion de l'IL-18 dans le microenvironnement tumoral permet un meilleur contrôle de la croissance des cellules 4T1. Pour le déterminer, nous souhaitons mettre en place des tests de croissances de cellules 4T1 au sein de souris traitées avec l'IL-18 Binding Protein (IL-18BP), un inhibiteur naturel de l'IL-18.

D'abord considérée comme une cytokine anti-tumorale via son action sur les cellules NK et la production d'IFN- $\gamma$ , le rôle de l'IL-18 dans le cancer est aujourd'hui plus contrasté. De nombreuses études montrent que l'IL-18 protège contre l'apparition de tumeurs dans des modèles murins de tumeurs induites par des carcinogènes. De plus, par rapport aux souris WT, les souris *NLRP3*, *ASC* ou *caspase-1* déficientes sont plus sensibles aux carcinogènes et l'injection d'IL-18 recombinante permet de réduire l'apparition de tumeurs dans ces souris démontrant que le rôle de l'IL-18 est, dans ce cas, médié par l'inflammasome (Salcedo et al., 2010; Zaki et al., 2010). Via l'activation des cellules NK, l'IL-18 protège de l'apparition de métastase dans un modèle métastatique de mélanome (Nishio et al., 2008).

Cependant, l'IL-18 peut, comme l'IL-1 $\beta$ , favoriser le recrutement de cellules myéloïdes suppressives, capable d'inhiber l'activité cytotoxique des cellules T CD8 *in vitro*, au sein de tumeurs sous-cutanées (Lim et al., 2014). De plus, dans un contexte d'apparition de métastase hépatique, l'IL-18 favorise l'expression de molécules d'adhésion, telles que VCAM1, par les cellules endothéliales et participe à l'apparition de métastases (Vidal-Vanaclocha et al., 2000). Enfin, comme nous l'avons vu auparavant, l'IL-18 induit l'expression de PD-1 à la surface des cellules NK

provoquant une baisse de leur activité anti-tumorale (Terme et al., 2011). On peut imaginer un mécanisme selon lequel la sécrétion d'IL-18, médiée par l'inflammasome, inhibe l'activité cytotoxique des NK via une surexpression de PD-1. Cette hypothèse peut être simplement testée via l'analyse de PD-1 à la surface des cellules NK par cytométrie en flux dans les différents génotypes de souris.

### **c. Un rôle pour d'autres cytokines et mécanismes régulés par l'inflammasome ?**

Outre la caspase-1, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 peuvent également être clivées par d'autres protéases dans le microenvironnement (Coeshott C et al. 1999, Sugawara S et al. 1999, Dinarello CA 2009). Si on écarte un rôle de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 dans notre modèle, on peut se pencher alors sur les autres fonctions connues de la caspase-1 comme le clivage de l'IL-33 ou la pyroptose.

Peu étudiée dans le cadre du cancer, la pyroptose est une mort cellulaire inflammatoire permettant l'élimination de pathogènes (Jorgensen and Miao, 2015). Elle survient en réponse à l'activation de l'inflammasome et de la caspase-1 et provoque la libération de nombreux facteurs pro-inflammatoires comme des cytokines et chimiokines mais également de DAMPs tels que l'ATP ou HMGB1 (Inoue and Tani, 2014). Dans un contexte de tumeurs induites par carcinogènes, la pyroptose, provoquée par l'activation de divers inflammasomes, permettrait d'induire une mort cellulaire autonome et une inflammation favorisant le retour à l'homéostasie tissulaire (Allen et al., 2010; Elinav et al., 2011b; Hu et al., 2010). Ces études prêtent donc un rôle anti-tumoral à la pyroptose. Pourtant, le contexte inflammatoire créé par ce type de mort cellulaire est considéré comme un phénomène favorisant la croissance tumorale. Le rôle de la pyroptose dans la croissance tumorale est donc peut-être lié aux cellules qui meurent par ce mécanisme. D'un côté, la mort autonome par pyroptose des cellules anormales peut-être salvatrice et induire une réponse immunitaire anti-tumorale. D'un autre côté, dans notre modèle, la mort par pyroptose de cellules immunitaires ayant détectées des DAMPs présents dans le microenvironnement pourrait être délétère et favoriser la croissance des cellules tumorales.

L'IL-33 est une cytokine pro-inflammatoire dont le clivage par la caspase-1, contrairement à l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18, conduit à son inhibition (Cayrol and Girard, 2009). Dans le cancer, le rôle de l'IL-33 est encore mal compris, tantôt pro-tumoral, tantôt anti-tumoral (Lu et al., 2016). Cependant, il est intéressant de noter que son récepteur ST2 est exprimé à la surface des cellules NK (Bourgeois et al., 2009) et qu'il induit leur activation et leur prolifération en présence d'IL-33 (Gao et al., 2013; Nabekura et al., 2015). De plus, l'expression transgénique ou l'injection d'IL-33 recombinante réduit l'apparition de métastases dans des modèles d'injections de cellules issues de mélanomes ou de carcinomes pulmonaires notamment via l'activation des cellules NK (Gao et al., 2013). Dans notre étude, l'absence de la caspase-1 ou de ASC pourrait favoriser la sécrétion d'IL-33 active et non clivée, favorisant ainsi la prolifération des cellules NK et stimulant leur acti-

tivité anti-tumorale.

#### **D. Un rôle de l'inflammasome dépendant ou indépendant du modèle 4T1 ?**

Les cellules 4T1 sont un modèle de tumeur proche des cancers triple négatifs, basal-like, de haut grade chez l'humain (Mi et al., 2004; Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 1998). Leur dépendance vis-à-vis de certaines cellules immunitaires et du microenvironnement inflammatoire pour se développer nous a fortement encouragé à les utiliser pour en faire notre modèle d'étude principal. Bien entendu, nous avons envisagé l'utilisation d'autres modèles de tumeurs afin de pouvoir élargir le rôle de l'inflammasome à un contrôle global de la croissance tumorale mammaire.

Les cellules 67NR partagent la même origine que les cellules 4T1 et sont donc également des cellules tumorales isolées d'une tumeur spontanée de la glande mammaire de souris BALB/cfC3H (Miller et al., 1983). Bien que la croissance des cellules 67NR *in vivo* soit semblable à celle des 4T1, les 67NR ne quittent pas le site de la tumeur primaire et n'ont pas la capacité de former des métastases (Aslakson and Miller, 1992). Nous envisageons donc d'étudier la croissance des cellules 67NR dans les souris *ASC* et *caspase-1* KO pour déterminer le rôle de l'inflammasome dans leur croissance.

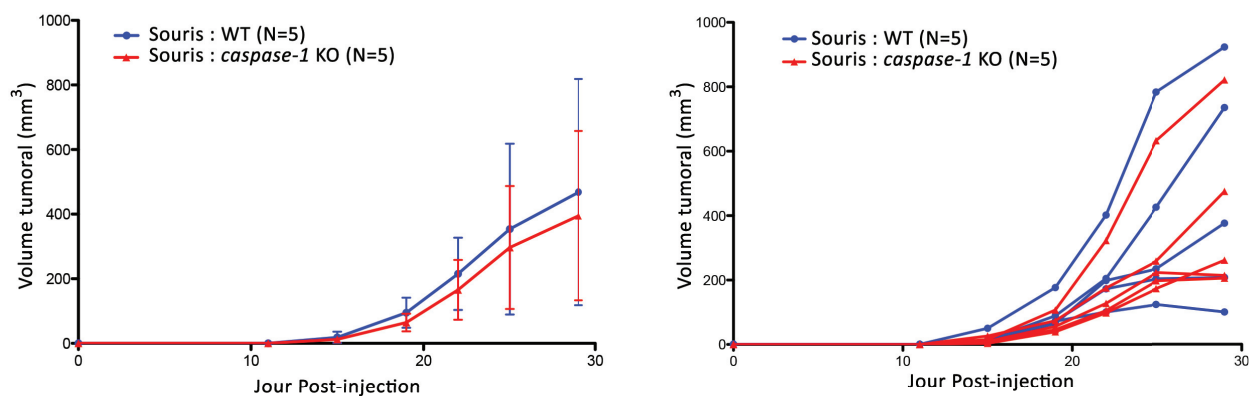
Afin de changer également de fond génétique de souris, nous avons étudié la croissance des cellules EO771, une lignée d'adénocarcinome mammaire de souris C57BL/6 (CASEY et al., 1951) dans les souris C57BL/6. Injectées dans la glande mammaire de souris C57BL/6, les cellules EO771 provoquent l'apparition de tumeurs de hauts grades comme les cellules 4T1 ou 67NR du fond BALB/c (Johnstone et al., 2015). Les résultats préliminaires obtenus avec ce modèle n'ont pas permis de mettre en évidence un rôle pour la caspase-1 dans la croissance tumorale au sein de souris WT ou caspase-1 déficientes (Figure 16). Cependant, le protocole d'injection des cellules EO771 doit être affiné afin d'obtenir des croissances tumorales similaires au sein des groupes de souris. En effet, malgré l'utilisation de protocoles issus de la littérature, nous avons obtenus une grande disparité de croissance au sein de souris d'un même groupe suggérant que nos conditions d'injection sont inadéquates.

#### **E. L'inflammasome comme cible thérapeutique ?**

Il existe déjà des drogues utilisées dans le traitement de maladies impliquant l'inflammasome. Le traitement des crises de goutte ou de cryopyrinopathie se fait par l'injection d'Anakinra, la molécule antagoniste du récepteur de l'IL-1 ou d'anticorps bloquant l'IL-1 $\beta$  (Jesus and Goldbach-Mansky, 2014). La forme recombinante de l'IL-18BP permet de bloquer l'activité de l'IL-18 *in vivo* également (Dinarello and van der Meer, 2013). Enfin, il existe également de petites molécules testées actuellement qui permettrait de bloquer l'activation de la caspase-1 et donc d'inhiber l'activation de l'inflammasome. Outre les cytokines, de nouvelles molécules permettent

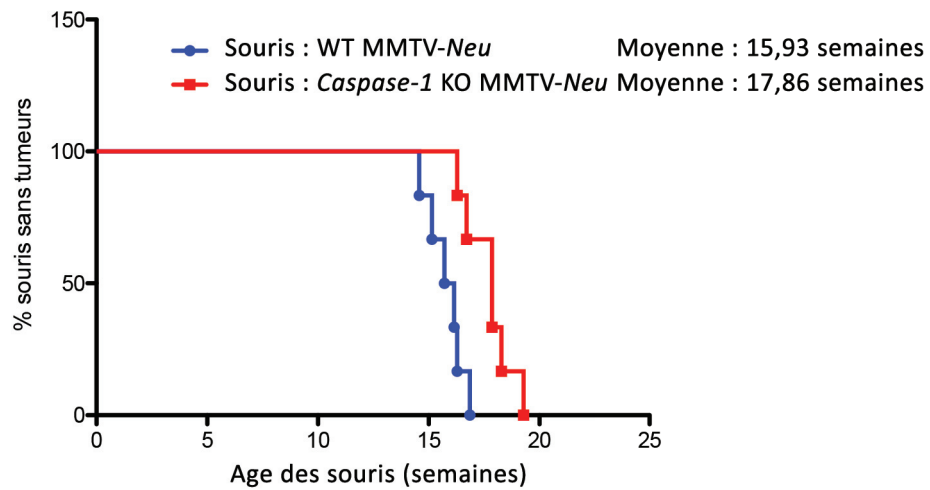
d'inhiber l'activation de certains inflammasomes de manière plus ou moins spécifique. Le glyburide, par exemple, est une petite molécule utilisée actuellement dans le traitement du diabète de type 2 qui permet d'empêcher spécifiquement l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Lamkanfi et al., 2009).

Au terme de nos recherches se pose la question d'utiliser ces données pour définir l'inflammasome comme une cible thérapeutique potentielle dans le cas de traitement contre le cancer. Si nos données mettent en avant un rôle de l'inflammasome dans la progression tumorale, il nous reste à déterminer le rôle exact de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 dans notre modèle. Bloquer l'activation de la caspase-1 afin de réduire la croissance tumorale mammaire pourrait donc être une piste à approcher mais qui demeure néanmoins à discuter. En effet, lorsque l'on analyse l'ensemble des études sur l'inflammasome dans le contexte tumoral, elles démontrent un rôle plus contrasté, parfois pro-tumoral parfois anti-tumoral de l'inflammasome et de ses cytokines. L'utilisation de thérapies ciblant l'inflammasome sera donc dépendante de notre capacité à discerner les bénéfices et les désavantages du traitement selon le contexte tumoral.



**Figure 16 : La croissance des cellules EO771 est identique dans les souris WT ou *caspase-1* KO**

Suivi de la croissance des cellules EO771 injectées dans la glande mammaire de souris C57BL/6 WT ou *caspase-1* KO. A gauche : moyenne et déviation standard. A droite : suivi de chaque animal.



**Figure 17 : Courbe de survie d'un modèle de souris développant des tumeurs spontanées de la glande mammaire (Souris BALB/c MMTV-*Neu*).**

L'apparition de tumeurs mammaires est observée chez des souris WT et *caspase-1* KO. Une masse mesurant plus de 3mm dans sa plus grande longueur est considérée comme une tumeur.

---

## Chapitre 3. Conséquence de la suppression de l'inflammasome dans un modèle de tumeurs spontanées de la glande mammaire

---

Les expériences sur la croissance des cellules 4T1 au sein de la glande mammaire des souris BALB/c répondent partiellement au rôle de l'inflammasome dans le développement tumoral mammaire. En effet, en choisissant d'étudier un modèle d'injection orthotopique, nous savions que les résultats obtenus nous permettraient uniquement de comprendre le rôle de l'inflammasome dans le microenvironnement tumoral et son impact direct sur la croissance des cellules mais pas sur l'apparition de la tumeur en elle-même.

Pour déterminer le rôle de l'inflammasome dans l'apparition de tumeurs mammaires, nous avons alors importé un modèle de tumeurs spontanées de la glande mammaire sous fond génétique BALB/c. Dans ce modèle l'oncogène *neu* muté de rat est sous le contrôle du promoteur MMTV exclusivement exprimé dans les cellules de la glande mammaire (Boggio et al., 1998). Dans un premier temps, nous avons observé l'apparition de tumeurs dans ce modèle dans des souris WT ou *caspase-1* KO. De manière intéressante, l'absence de caspase-1 ralentit l'apparition de tumeurs dans ce modèle (Figure 17) suggérant un rôle de la caspase-1 dans l'induction de tumeurs mammaires.

Basés sur l'expression d'un oncogène dans les cellules épithéliales de la glande mammaire, les résultats provenant de ce modèle vont pour l'instant à l'encontre des résultats de modèles de cancers du colon induits par carcinogènes. Alors que l'inflammasome protège de l'apparition de tumeurs colorectales, il semblerait qu'il favorise l'apparition de tumeurs mammaires.

Bien entendu, ces résultats préliminaires devront être validés dans des souris invalidées pour d'autres composants de l'inflammasome.





---

# CONCLUSION

---

Au cours de mes quatre années de thèse, j'ai étudié deux mécanismes de l'inflammasome totalement différents impliqués d'une part dans la réponse aux pathogènes et d'autre part dans la croissance tumorale.

Dans un premier temps, je me suis intéressé à la réponse de macrophages issus de différents génotypes de souris aux activateurs des inflammasomes NLRP3 et NLRP1b. De manière intéressante, nous montrons que le clivage de la caspase-1 n'est pas indispensable à la sécrétion de cytokines et à l'induction de la pyroptose en réponse à l'activation de l'inflammasome NLRP1b par la toxine létale de *Bacillus anthracis*. En revanche, ce clivage est indispensable pour le fonctionnement de l'inflammasome NLRP3 démontrant que la nécessité du clivage de la caspase-1 varie en fonction du pathogène et du récepteur impliqué dans la formation de l'inflammasome. Ces résultats permettent d'approfondir nos connaissances sur le fonctionnement de l'inflammasome et apportent une meilleure compréhension des mécanismes de détection des pathogènes.

Responsable de la maturation et de la sécrétion des deux cytokines inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-18, l'inflammasome est un complexe clé de l'immunité innée. Au cours de la tumorigenèse, de nombreuses études prêtent un rôle pro- ou anti-tumoral à l'inflammasome selon le contexte tumoral. Dans un second projet, je me suis donc intéressé au rôle de l'inflammasome au cours de la progression tumorale mammaire.

Les résultats obtenus au cours de cette étude révèlent que l'absence de deux composants majeurs de l'inflammasome : la caspase-1 et ASC, provoque une diminution de la croissance des cellules tumorales. De plus, la présence de la caspase-1 dans les cellules immunitaires recrutées au sein du microenvironnement tumoral provoque une diminution du recrutement et de l'activité des cellules NK. Toutefois, nous n'avons pas pu déterminer quel inflammasome est responsable du soutien du développement tumoral. D'un point de vue fondamental, les résultats de ce projet ont permis de découvrir un rôle pour l'inflammasome dans la régulation de la réponse anti-tumorale. Au sein de tumeurs mammaires, son activité provoque une diminution de l'activité anti-tumorale des cellules NK favorisant ainsi la progression des cellules tumorales mammaires.

En permettant de comprendre le rôle pro-tumoral de l'inflammasome, cette étude permet de mieux appréhender les mécanismes responsables de la reprogrammation du système immunitaire au sein des tumeurs. En outre, elle permet d'envisager une nouvelle approche en immunothérapie qui permettrait de restaurer l'activité anti-tumorale des cellules NK en ciblant les mécanismes de l'inflammasome.



---

## MATERIEL ET METHODES SUPPLEMENTAIRES

---

### *Souris :*

Les souris MMTV-Neu de fond génétique BALB/c obtenues du laboratoire du Prof. Federica Cavallo et les souris caspase-1 obtenues du laboratoire du Pr. Richard A. Flavell ont été croisées afin d'obtenir des souris *caspase-1/caspase-11<sup>-/-</sup> MMTV-Neu<sup>+</sup>* et *caspase-1/caspase-11<sup>+/+</sup> MMTV-Neu<sup>+</sup>*. L'apparition de tumeurs est surveillée dans les glandes mammaires trois fois par semaine dès le sevrage des souris femelles. Une masse dont le plus grand des diamètres excède 3mm est considérée comme une tumeur.

### *Injection d'Anakinra :*

Une solution d'anakinra diluée dans du PBS est réalisée à 4mg/mL. Un jour avant l'injection des cellules 4T1, la souris sont traitées en IP avec 20mg/g d'Anakinra (volume = 5 \* poids de la souris en mg). Les traitements sont effectués ensuite tous les 2 jours en IP. Comme pour les autres expériences de croissance tumorale, 10 000 cellules 4T1 (100 µL) sont injectées dans la glande mammaire et le suivi des tumeurs est effectué par mesure au pied à coulisse.

### *Culture cellulaire :*

Les cellules EO771 sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal inactivé, 1% (v/v) glutamax, 1% (v/v) pénicilline/streptomycine dans un incubateur à 5% CO<sub>2</sub> et 37°C. Avant injection, les cellules sont systématiquement testées pour la présence de mycoplasmes (MycoAlert Mycoplasma detection kit, Lonza). Les lignées sont aussi saines de tout agents infectieux murins (Taqman PCR testing of mouse essential panel, Charles River).

### *Injections des cellules EO771 :*

Les cellules EO771 sont récoltées et reprises dans du PBS à 2.10<sup>6</sup> cellules/mL. 100 µL de cette solution sont injectées directement dans la glande mammaire de souris C57Bl/6 WT ou *caspase-1* KO. La croissance des cellules est suivie par mesure au pied à coulisse. Les souris sont sacrifiées lorsque la tumeur atteint 1000mm<sup>3</sup>.

---

## REFERENCES

---

### A

- Abdullah, Z., Schlee, M., Roth, S., Mraheil, M.A., Barchet, W., Böttcher, J., Hain, T., Geiger, S., Hayakawa, Y., Fritz, J.H., et al. (2012). RIG-I detects infection with live *Listeria* by sensing secreted bacterial nucleic acids. *EMBO J.* 31, 4153–4164.
- Ablasser, A., Goldeck, M., Cavlar, T., Deimling, T., Witte, G., Röhl, I., Hopfner, K.-P., Ludwig, J., and Hornung, V. (2013). cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* 498, 380–384.
- Adler, E.P., Lemken, C.A., Katchen, N.S., and Kurt, R.A. (2003). A dual role for tumor-derived chemokine RANTES (CCL5). *Immunol. Lett.* 90, 187–194.
- Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M.F., Hawkins, P.N., and Tschopp, J. (2004). NALP3 forms an IL-1 $\beta$ -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20, 319–325.
- Allen, I.C., Scull, M.A., Moore, C.B., Holl, E.K., McElvania-TeKippe, E., Taxman, D.J., Guthrie, E.H., Pickles, R.J., and Ting, J.P.-Y. (2009). The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* 30, 556–565.
- Allen, I.C., TeKippe, E.M., Woodford, R.-M.T., Uronis, J.M., Holl, E.K., Rogers, A.B., Herfarth, H.H., Jobin, C., and Ting, J.P.-Y. (2010). The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J. Exp. Med.* 207, 1045–1056.
- Almand, B., Clark, J.I., Nikitina, E., van Beynen, J., English, N.R., Knight, S.C., Carbone, D.P., and Gabrilovich, D.I. (2001). Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J. Immunol.* 166, 678–689.
- Amo, L., Tamayo-Orbegozo, E., Maruri, N., Buqué, A., Solaun, M., Riñón, M., Arrieta, A., and Larucea, S. (2015). Podocalyxin-like protein 1 functions as an immunomodulatory molecule in breast cancer cells. *Cancer Lett.* 368, 26–35.
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D., and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 459–489.
- Anegón, I., Cuturi, M.C., Trinchieri, G., and Perussia, B. (1988). Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 167, 452–472.
- Antonopoulos, C., Russo, H.M., El Sanadi, C., Martin, B.N., Li, X., Kaiser, W.J., Mocarski, E.S., and Dubyak, G.R. (2015). Caspase-8 as an Effector and Regulator of NLRP3 Inflammasome Signaling. *J. Biol. Chem.* 290, 20167–20184.
- Apte, R.N., Dotan, S., Elkabets, M., White, M.R., Reich, E., Carmi, Y., Song, X., Dvozkin, T., Krelin, Y., and Voronov, E. (2006). The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev.* 25, 387–408.
- Aslakson, C.J., and Miller, F.R. (1992). Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 52, 1399–1405.
- Ayala, J.M., Yamin, T.T., Egger, L.A., Chin, J., Kostura, M.J., and Miller, D.K. (1994). IL-1 $\beta$ -converting enzyme is present in monocytic cells as an inactive 45-kDa precursor. *J. Immunol.* 153, 2592–2599.

## B

---

- Baroja-Mazo, A., Martín-Sánchez, F., Gomez, A.I., Martínez, C.M., Amores-Iniesta, J., Compan, V., Barberà-Cremades, M., Yagüe, J., Ruiz-Ortiz, E., Antón, J., et al. (2014). The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat. Immunol.* 15, 738–748.
- Baselga, J., Albanell, J., Molina, M.A., and Arribas, J. (2001). Mechanism of action of trastuzumab and scientific update. *Semin. Oncol.* 28, 4–11.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727–729.
- Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., et al. (2009). Cutting edge: NF- $\kappa$ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol.* 183, 787–791.
- Baum, R., Sharma, S., Carpenter, S., Li, Q.-Z., Busto, P., Fitzgerald, K.A., Marshak-Rothstein, A., and Gravalles, E.M. (2015). Cutting edge: AIM2 and endosomal TLRs differentially regulate arthritis and autoantibody production in DNase II-deficient mice. *J. Immunol.* 194, 873–877.
- Beckhove, P., Feuerer, M., Dolenc, M., Schuetz, F., Choi, C., Sommerfeldt, N., Schwendemann, J., Ehlert, K., Altevogt, P., Bastert, G., et al. (2004). Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors. *J. Clin. Invest.* 114, 67–76.
- Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., Jouglu, E., Benhamou, E., Delafosse, P., Guizard, A.-V., Molinié, F., Danzon, A., Bara, S., et al. (2008). Cancer incidence and mortality in France over the period 1980–2005. *Rev. Epidemiol. Sante Publique* 56, 159–175.
- Black, R.A., Kronheim, S.R., Merriam, J.E., March, C.J., and Hopp, T.P. (1989). A pre-aspartate-specific protease from human leukocytes that cleaves pro-interleukin-1 beta. *J. Biol. Chem.* 264, 5323–5326.
- Bodnar-Wachtel, M. (2015). Etude du rôle de NLRP3 dans la tumorigenèse pulmonaire. Thèse de doctorat en biologie, n° d'ordre 184-2015, Université Claude Bernard Lyon 1.
- BLOOM, H.J., and RICHARDSON, W.W. (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br. J. Cancer* 11, 359–377.
- Boatright, K.M., and Salvesen, G.S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 725–731.
- Boggio, K., Nicoletti, G., Di Carlo, E., Cavallo, F., Landuzzi, L., Melani, C., Giovarelli, M., Rossi, I., Nanni, P., De Giovanni, C., et al. (1998). Interleukin 12-mediated prevention of spontaneous mammary adenocarcinomas in two lines of Her-2/neu transgenic mice. *J. Exp. Med.* 188, 589–596.
- Boudreau, H.E., Broustas, C.G., Gokhale, P.C., Kumar, D., Mewani, R.R., Rone, J.D., Haddad, B.R., and Kasid, U. (2007). Expression of BRCC3, a novel cell cycle regulated molecule, is associated with increased phospho-ERK and cell proliferation. *Int. J. Mol. Med.* 19, 29–39.
- Bourgeois, E., Van, L.P., Samson, M., Diem, S., Barra, A., Roga, S., Gombert, J.-M., Schneider, E., Dy, M., Gourdy, P., et al. (2009). The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN- $\gamma$  production. *Eur. J. Immunol.* 39, 1046–1055.
- Boyden, E.D., and Dietrich, W.F. (2006). Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat. Genet.* 38, 240–244.

- Brennan, M.A., and Cookson, B.T. (2000). Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol. Microbiol.* 38, 31–40.
- Brough, D., and Rothwell, N.J. (2007). Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1 $\beta$  is cytosolic and precedes cell death. *J. Cell Sci.* 120, 772–781.
- Brown, G.D., Taylor, P.R., Reid, D.M., Willment, J.A., Williams, D.L., Martinez-Pomares, L., Wong, S.Y.C., and Gordon, S. (2002). Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* 196, 407–412.
- Broz, P., von Moltke, J., Jones, J.W., Vance, R.E., and Monack, D.M. (2010). Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe* 8, 471–483.
- Broz, P., Ruby, T., Belhocine, K., Bouley, D.M., Kayagaki, N., Dixit, V.M., and Monack, D.M. (2012). Caspase-11 increases susceptibility to Salmonella infection in the absence of caspase-1. *Nature* 490, 288–291.
- Bruchard, M., Mignot, G., Derangère, V., Chalmin, F., Chevriaux, A., Végran, F., Boireau, W., Simon, B., Ryffel, B., Connat, J.L., et al. (2013). Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat. Med.* 19, 57–64.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643–1647.
- Bulau, A.-M., Nold, M.F., Li, S., Nold-Petry, C.A., Fink, M., Mansell, A., Schwerd, T., Hong, J., Rubartelli, A., Dinarello, C.A., et al. (2014). Role of caspase-1 in nuclear translocation of IL-37, release of the cytokine, and IL-37 inhibition of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2650–2655.
- Bunt, S.K., Sinha, P., Clements, V.K., Leips, J., and Ostrand-Rosenberg, S. (2006). Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *J. Immunol.* 176, 284–290.
- Bunt, S.K., Yang, L., Sinha, P., Clements, V.K., Leips, J., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res.* 67, 10019–10026.
- Bürckstümmer, T., Baumann, C., Blüml, S., Dixit, E., Dürnberger, G., Jahn, H., Planyavsky, M., Bilban, M., Colinge, J., Bennett, K.L., et al. (2009). An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat. Immunol.* 10, 266–272.

## C

---

- Cai, X., Chen, J., Xu, H., Liu, S., Jiang, Q.-X., Halfmann, R., and Chen, Z.J. (2014). Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. *Cell* 156, 1207–1222.
- Carmi, Y., Dotan, S., Rider, P., Kaplanov, I., White, M.R., Baron, R., Abutbul, S., Huszar, M., Dinarello, C.A., Apte, R.N., et al. (2013). The role of IL-1 $\beta$  in the early tumor cell-induced angiogenic response. *J. Immunol.* 190, 3500–3509.
- Carriere, V., Roussel, L., Ortega, N., Lacorre, D.-A., Americh, L., Aguilar, L., Bouche, G., and Girard, J.-P. (2007). IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 282–287.

- Caruso, R., Warner, N., Inohara, N., and Núñez, G. (2014). NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity* 41, 898–908.
- Case, C.L., Kohler, L.J., Lima, J.B., Strowig, T., de Zoete, M.R., Flavell, R.A., Zamboni, D.S., and Roy, C.R. (2013). Caspase-11 stimulates rapid flagellin-independent pyroptosis in response to *Legionella pneumophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1851–1856.
- CASEY, A.E., LASTER, W.R., and ROSS, G.L. (1951). Sustained enhanced growth of carcinoma EO771 in C57 black mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 77, 358–362.
- Cassel, S.L., Joly, S., and Sutterwala, F.S. (2009). The NLRP3 inflammasome: a sensor of immune danger signals. *Semin. Immunol.* 21, 194–198.
- Casson, C.N., Copenhaver, A.M., Zwack, E.E., Nguyen, H.T., Strowig, T., Javdan, B., Bradley, W.P., Fung, T.C., Flavell, R.A., Brodsky, I.E., et al. (2013). Caspase-11 activation in response to bacterial secretion systems that access the host cytosol. *PLoS Pathog.* 9, e1003400.
- Cayrol, C., and Girard, J.-P. (2009). The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 9021–9026.
- Chao, Y., Shiozaki, E.N., Srinivasula, S.M., Rigotti, D.J., Fairman, R., and Shi, Y. (2005). Engineering a dimeric caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for caspase activation. *PLoS Biol.* 3, e183.
- Chavarría-Smith, J., and Vance, R.E. (2013). Direct proteolytic cleavage of NLRP1B is necessary and sufficient for inflammasome activation by anthrax lethal factor. *PLoS Pathog.* 9, e1003452.
- Chavarría-Smith, J., and Vance, R.E. (2015). The NLRP1 inflammasomes. *Immunol. Rev.* 265, 22–34.
- Chávez-Galán, L., Arenas-Del Angel, M.C., Zenteno, E., Chávez, R., and Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell. Mol. Immunol.* 6, 15–25.
- Chen, G.Y., Liu, M., Wang, F., Bertin, J., and Núñez, G. (2011). A functional role for Nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis. *J. Immunol.* 186, 7187–7194.
- Chen, I.-F., Ou-Yang, F., Hung, J.-Y., Liu, J.-C., Wang, H., Wang, S.-C., Hou, M.-F., Hortobagyi, G.N., and Hung, M.-C. (2006). AIM2 suppresses human breast cancer cell proliferation in vitro and mammary tumor growth in a mouse model. *Mol. Cancer Ther.* 5, 1–7.
- Chen, K.W., Groß, C.J., Sotomayor, F.V., Stacey, K.J., Tschopp, J., Sweet, M.J., and Schroder, K. (2014). The neutrophil NLRC4 inflammasome selectively promotes IL-1 $\beta$  maturation without pyroptosis during acute *Salmonella* challenge. *Cell Rep.* 8, 570–582.
- Chirivi, R.G., Garofalo, A., Padura, I.M., Mantovani, A., and Giavazzi, R. (1993). Interleukin 1 receptor antagonist inhibits the augmentation of metastasis induced by interleukin 1 or lipopolysaccharide in a human melanoma/nude mouse system. *Cancer Res.* 53, 5051–5054.
- Cho, D., Kim, T.G., Lee, W., Hwang, Y.I., Cho, H.I., Han, H., Kwon, O., Kim, D., Park, H., and Houh, D. (2000). Interleukin-18 and the costimulatory molecule B7-1 have a synergistic anti-tumor effect on murine melanoma; implication of combined immunotherapy for poorly immunogenic malignancy. *J. Invest. Dermatol.* 114, 928–934.
- Chow, M.T., Sceneay, J., Paget, C., Wong, C.S.F., Duret, H., Tschopp, J., Möller, A., and Smyth, M.J. (2012). NLRP3 suppresses NK cell-mediated responses to carcinogen-induced tumors and metastases. *Cancer Res.* 72, 5721–5732.
- Chung, Y., Chang, S.H., Martinez, G.J., Yang, X.O., Nurieva, R., Kang, H.S., Ma, K., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., Dong, C. (2009) Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by



Interleukin-1 Signaling. *Immunity* 30, 4, 576-587.

- Chretien, A.-S., Le Roy, A., Vey, N., Prebet, T., Blaise, D., Fauriat, C., and Olive, D. (2014). Cancer-Induced Alterations of NK-Mediated Target Recognition: Current and Investigational Pharmacological Strategies Aiming at Restoring NK-Mediated Anti-Tumor Activity. *Front. Immunol.* 5, 122.
- Coca, S., Perez-Piqueras, J., Martinez, D., Colmenarejo, A., Saez, M.A., Vallejo, C., Martos, J.A., and Moreno, M. (1997). The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 79, 2320–2328.
- Cookson, B.T., and Brennan, M.A. (2001). Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol.* 9, 113–114.
- Cordoba-Rodriguez, R., Fang, H., Lankford, C.S.R., and Frucht, D.M. (2004). Anthrax lethal toxin rapidly activates caspase-1/ICE and induces extracellular release of interleukin (IL)-1beta and IL-18. *J. Biol. Chem.* 279, 20563–20566.
- Cosman, D., Müllberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., and Chalupny, N.J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14, 123–133.
- Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867.
- Couzin-Frankel, J. (2013). Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* 342, 1432–1433.
- Coveney, E., Wheatley, G.H., and Lyerly, H.K. (1997). Active immunization using dendritic cells mixed with tumor cells inhibits the growth of primary breast cancer. *Surgery* 122, 228–234.
- Cremer, I., Fridman, W.H., and Sautès-Fridman, C. (2012). Tumor microenvironment in NSCLC suppresses NK cells function. *Oncoimmunology* 1, 244–246.
- Croci, S., Nanni, P., Palladini, A., Nicoletti, G., Grosso, V., Benegiamo, G., Landuzzi, L., Lamolinara, A., Ianzano, M.L., Ranieri, D., et al. (2015). Interleukin-15 is required for immunosurveillance and immunoprevention of HER2/neu-driven mammary carcinogenesis. *Breast Cancer Res.* 17, 70.
- Cullen, S.P., Kearney, C.J., Clancy, D.M., and Martin, S.J. (2015). Diverse Activators of the NLRP3 Inflammasome Promote IL-1 $\beta$  Secretion by Triggering Necrosis. *Cell Rep.* 11, 1535–1548.

## D

---

- DENOIX, P.F. (1953). [Nomenclature and classification of cancers based on an atlas]. *Acta Unio Int. Contra Cancrum* 9, 769–771.
- van Deventer, H.W., Burgents, J.E., Wu, Q.P., Woodford, R.-M.T., Brickey, W.J., Allen, I.C., McElvania-Tekippe, E., Serody, J.S., and Ting, J.P.-Y. (2010). The inflammasome component NLRP3 impairs antitumor vaccine by enhancing the accumulation of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 70, 10161–10169.
- Dewan, M.Z., Terunuma, H., Ahmed, S., Ohba, K., Takada, M., Tanaka, Y., Toi, M., and Yamamoto, N. (2005). Natural killer cells in breast cancer cell growth and metastasis in SCID mice. *Bio-med. Pharmacother. = Biomédecine Pharmacothérapie* 59 Suppl 2, S375–S379.
- Dewan, M.Z., Terunuma, H., Takada, M., Tanaka, Y., Abe, H., Sata, T., Toi, M., and Yamamoto, N. (2007). Role of natural killer cells in hormone-independent rapid tumor formation and spontaneous metastasis of breast cancer cells in vivo. *Breast Cancer Res. Treat.* 104, 267–275.



- Diaz, N., Minton, S., Cox, C., Bowman, T., Gritsko, T., Garcia, R., Eweis, I., Wloch, M., Livingston, S., Seijo, E., et al. (2006). Activation of stat3 in primary tumors from high-risk breast cancer patients is associated with elevated levels of activated SRC and survivin expression. *Clin. Cancer Res.* 12, 20–28.
- Dinarello, C.A. (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77, 1627–1652.
- Dinarello, C.A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 519–550.
- Dinarello, C.A., and van der Meer, J.W.M. (2013). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin. Immunol.* 25, 469–484.
- Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y.Y., Meulle, A., Salles, B., Le Gonidec, S., et al. (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res.* 71, 2455–2465.
- Dostert, C., Pétrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B.T., and Tschopp, J. (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320, 674–677.
- Dowds, T.A., Masumoto, J., Zhu, L., Inohara, N., and Núñez, G. (2004). Cryopyrin-induced interleukin 1beta secretion in monocytic cells: enhanced activity of disease-associated mutants and requirement for ASC. *J. Biol. Chem.* 279, 21924–21928.
- Drummond, R.A., Saijo, S., Iwakura, Y., and Brown, G.D. (2011). The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. *Eur. J. Immunol.* 41, 276–281.
- Du, Q., Wang, Q., Fan, H., Wang, J., Liu, X., Wang, H., Wang, Y., and Hu, R. (2016). Dietary cholesterol promotes AOM-induced colorectal cancer through activating the NLRP3 inflammasome. *Biochem. Pharmacol.* 105, 42–54.
- Du, R., Lu, K. V., Petritsch, C., Liu, P., Ganss, R., Passequé, E., Song, H., Vandenberg, S., Johnson, R.S., Werb, Z., et al. (2008). HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 13, 206–220.
- Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nuñez, G., Schnurr, M., et al. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464, 1357–1361.
- Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137–148.
- Dupaul-Chicoine, J., Arabzadeh, A., Dagenais, M., Douglas, T., Champagne, C., Morizot, A., Rodrigue-Gervais, I.G., Breton, V., Colpitts, S.L., Beauchemin, N., et al. (2015). The Nlrp3 Inflammasome Suppresses Colorectal Cancer Metastatic Growth in the Liver by Promoting Natural Killer Cell Tumoricidal Activity. *Immunity* 43, 751–763.
- DuPre', S.A., and Hunter, K.W. (2007). Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. *Exp. Mol. Pathol.* 82, 12–24.

## E

---

- Edgeworth, J.D., Spencer, J., Phalipon, A., Griffin, G.E., and Sansonetti, P.J. (2002). Cytotoxicity and interleukin-1beta processing following *Shigella flexneri* infection of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 32, 1464–1471.

- Elinav, E., Strowig, T., Henao-Mejia, J., and Flavell, R.A. (2011a). Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. *Immunity* 34, 665–679.
- Elinav, E., Strowig, T., Kau, A.L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C.A., Booth, C.J., Peaper, D.R., Bertin, J., Eisenbarth, S.C., Gordon, J.I., et al. (2011b). NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 145, 745–757.
- Elkabets, M., Ribeiro, V.S.G., Dinarello, C.A., Ostrand-Rosenberg, S., Di Santo, J.P., Apte, R.N., and Vosshenrich, C.A.J. (2010). IL-1 $\beta$  regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *Eur. J. Immunol.* 40, 3347–3357.
- Emens, L.A. (2012). Breast cancer immunobiology driving immunotherapy: vaccines and immune checkpoint blockade. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 12, 1597–1611.
- Ercan, C., van Diest, P.J., van der Ende, B., Hinrichs, J., Bult, P., Buerger, H., van der Wall, E., and Derksen, P.W.B. (2012). p53 mutations in classic and pleomorphic invasive lobular carcinoma of the breast. *Cell. Oncol. (Dordr).* 35, 111–118.
- Erener, S., Pétrilli, V., Kassner, I., Minotti, R., Castillo, R., Santoro, R., Hassa, P.O., Tschopp, J., and Hottiger, M.O. (2012). Inflammasome-activated caspase 7 cleaves PARP1 to enhance the expression of a subset of NF- $\kappa$ B target genes. *Mol. Cell* 46, 200–211.

## F

---

- Fabbi, M., Carbotti, G., and Ferrini, S. (2015). Context-dependent role of IL-18 in cancer biology and counter-regulation by IL-18BP. *J. Leukoc. Biol.* 97, 665–675.
- Faustin, B., Lartigue, L., Bruey, J.-M., Luciano, F., Sergienko, E., Bailly-Maitre, B., Volkmann, N., Hanein, D., Rouiller, I., and Reed, J.C. (2007). Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol. Cell* 25, 713–724.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136, E359–E386.
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.-W., Datta, P., Wu, J., and Alnemri, E.S. (2009). AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458, 509–513.
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R.M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., and Di Virgilio, F. (2006). The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J. Immunol.* 176, 3877–3883.
- Finak, G., Bertos, N., Pepin, F., Sadekova, S., Souleimanova, M., Zhao, H., Chen, H., Omeroglu, G., Meterissian, S., Omeroglu, A., et al. (2008). Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat. Med.* 14, 518–527.
- Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2006). Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell. Microbiol.* 8, 1812–1825.
- Flannagan, R.S., Jaumouillé, V., and Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol.* 7, 61–98.
- FOLEY, E.J. (1953). Attempts to induce immunity against mammary adenocarcinoma in inbred mice. *Cancer Res.* 13, 578–580.
- Franklin, B.S., Bossaller, L., De Nardo, D., Ratter, J.M., Stutz, A., Engels, G., Brenker, C., Nordhoff, M., Mirandola, S.R., Al-Amoudi, A., et al. (2014). The adaptor ASC has extracellular and “prionoid” activities that propagate inflammation. *Nat. Immunol.* 15, 727–737.

- Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 12, 298–306.
- Fry, A.M., O'Regan, L., Sabir, S.R., and Bayliss, R. (2012). Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases. *J. Cell Sci.* 125, 4423–4433.

## G

---

- Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 162–174.
- Gallina, G., Dolcetti, L., Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Colombo, M.P., Basso, G., Brombacher, F., Borrello, I., Zanovello, P., et al. (2006). Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J. Clin. Invest.* 116, 2777–2790.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960–1964.
- Galon, J., Angell, H.K., Bedognetti, D., and Marincola, F.M. (2013). The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity* 39, 11–26.
- Gao, K., Li, X., Zhang, L., Bai, L., Dong, W., Gao, K., Shi, G., Xia, X., Wu, L., and Zhang, L. (2013). Transgenic expression of IL-33 activates CD8(+) T cells and NK cells and inhibits tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Lett.* 335, 463–471.
- Geijtenbeek, T.B.H., and Gringhuis, S.I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 465–479.
- Ghiringhelli, F., Larmonier, N., Schmitt, E., Parcellier, A., Cathelin, D., Garrido, C., Chauffert, B., Solary, E., Bonnotte, B., and Martin, F. (2004). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur. J. Immunol.* 34, 336–344.
- Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., et al. (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* 15, 1170–1178.
- Gilfillan, S., Chan, C.J., Cella, M., Haynes, N.M., Rapaport, A.S., Boles, K.S., Andrews, D.M., Smyth, M.J., and Colonna, M. (2008). DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *J. Exp. Med.* 205, 2965–2973.
- Gillard-Bocquet, M., Caer, C., Cagnard, N., Crozet, L., Perez, M., Fridman, W.H., Sautès-Fridman, C., and Cremer, I. (2013). Lung tumor microenvironment induces specific gene expression signature in intratumoral NK cells. *Front. Immunol.* 4, 19.
- Gillgrass, A.E., Chew, M. V, Krneta, T., and Ashkar, A.A. (2015). Overexpression of IL-15 promotes tumor destruction via NK1.1+ cells in a spontaneous breast cancer model. *BMC Cancer* 15, 293.
- Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., Biota, C., Doffin, A.C., Durand, I., Olive, D., et al. (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* 69, 2000–2009.
- Goldbach-Mansky, R., Dailey, N.J., Canna, S.W., Gelabert, A., Jones, J., Rubin, B.I., Kim, H.J., Brewer, C., Zalewski, C., Wiggs, E., et al. (2006). Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1beta inhibition. *N. Engl. J. Med.* 355, 581–592.

- Grimes, C.L., Ariyananda, L.D.Z., Melnyk, J.E., and O'Shea, E.K. (2012). The innate immune protein Nod2 binds directly to MDP, a bacterial cell wall fragment. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 13535–13537.
- Gross, O., Poeck, H., Bscheider, M., Dostert, C., Hanneschläger, N., Endres, S., Hartmann, G., Tardivel, A., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., et al. (2009). Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 459, 433–436.
- Gross, O., Yazdi, A.S., Thomas, C.J., Masin, M., Heinz, L.X., Guarda, G., Quadroni, M., Drexler, S.K., and Tschopp, J. (2012). Inflammasome activators induce interleukin-1 $\alpha$  secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity* 36, 388–400.
- Guey, B., and Petrilli, V. (2016). Assessing caspase-1 activation. In *Methods in Molecular Biology* (in Print), Springer, ed.
- Guma, M., Ronacher, L., Liu-Bryan, R., Takai, S., Karin, M., and Corr, M. (2009). Caspase 1-independent activation of interleukin-1 $\beta$  in neutrophil-predominant inflammation. *Arthritis Rheum.* 60, 3642–3650.
- Gurung, P., Malireddi, R.K.S., Anand, P.K., Demon, D., Vande Walle, L., Liu, Z., Vogel, P., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2012). Toll or interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$  (TRIF)-mediated caspase-11 protease production integrates Toll-like receptor 4 (TLR4) protein- and Nlrp3 inflammasome-mediated host defense against enteropathogens. *J. Biol. Chem.* 287, 34474–34483.

## H

---

- Häcker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L.-C., Wang, G.G., Kamps, M.P., Raz, E., Wagner, H., Häcker, G., et al. (2006). Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439, 204–207.
- Hagar, J.A., Powell, D.A., Aachoui, Y., Ernst, R.K., and Miao, E.A. (2013). Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science* 341, 1250–1253.
- Halle, A., Hornung, V., Petzold, G.C., Stewart, C.R., Monks, B.G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Moore, K.J., and Golenbock, D.T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- $\beta$ . *Nat. Immunol.* 9, 857–865.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Harmer, M., Denoix, P., and Hamperl, H. (1970). The TNM-system. *Aktuelle Probl. Chir.* 14, 25–36.
- Hashimoto, C., Hudson, K.L., and Anderson, K. V (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269–279.
- Hawkins, P.N., Lachmann, H.J., and McDermott, M.F. (2003). Interleukin-1-receptor antagonist in the Muckle-Wells syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348, 2583–2584.
- He, Y., Zeng, M.Y., Yang, D., Motro, B., and Núñez, G. (2016). NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* 530, 354–357.
- Hellmich, K.A., Levinsohn, J.L., Fattah, R., Newman, Z.L., Maier, N., Sastalla, I., Liu, S., Leppla, S.H., and Moayeri, M. (2012). Anthrax lethal factor cleaves mouse nlrp1b in both toxin-sensitive and toxin-resistant macrophages. *PLoS One* 7, e49741.

- Heneka, M.T., Kummer, M.P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T.-C., et al. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 493, 674–678.
- Hestdal, K., Ruscetti, F.W., Ihle, J.N., Jacobsen, S.E., Dubois, C.M., Kopp, W.C., Longo, D.L., and Keller, J.R. (1991). Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J. Immunol.* 147, 22–28.
- Hoebe, K., Janssen, E.M., Kim, S.O., Alexopoulou, L., Flavell, R.A., Han, J., and Beutler, B. (2003). Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat. Immunol.* 4, 1223–1229.
- Hoffman, H.M., Mueller, J.L., Broide, D.H., Wanderer, A.A., and Kolodner, R.D. (2001). Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat. Genet.* 29, 301–305.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A., and Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* 9, 847–856.
- Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D.R., Latz, E., and Fitzgerald, K.A. (2009). AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458, 514–518.
- Hou, Z., Falcone, D.J., Subbaramaiah, K., and Dannenberg, A.J. (2011). Macrophages induce COX-2 expression in breast cancer cells: role of IL-1 $\beta$  autoamplification. *Carcinogenesis* 32, 695–702.
- Hu, B., Elinav, E., Huber, S., Booth, C.J., Strowig, T., Jin, C., Eisenbarth, S.C., and Flavell, R.A. (2010). Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 21635–21640.
- Hu, Z., Zhou, Q., Zhang, C., Fan, S., Cheng, W., Zhao, Y., Shao, F., Wang, H.-W., Sui, S.-F., and Chai, J. (2015). Structural and biochemical basis for induced self-propagation of NLRC4. *Science* 350, 399–404.
- Hudspeth, K., Silva-Santos, B., and Mavilio, D. (2013). Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. *Front. Immunol.* 4, 69.
- 
- Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J., et al. (1999). Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.* 274, 14560–14567.
- Inoue, H., and Tani, K. (2014). Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. *Cell Death Differ.* 21, 39–49.
- Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Xiangming, C., Iwashige, H., Aridome, K., Hokita, S., and Aikou, T. (2000). Clinical impact of intratumoral natural killer cell and dendritic cell infiltration in gastric cancer. *Cancer Lett.* 159, 103–108.
- Italiani, P., and Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.* 5, 514.
- Ivarsson, M.A., Michaëlsson, J., and Fauriat, C. (2014). Activating killer cell Ig-like receptors in health and disease. *Front. Immunol.* 5, 184.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune sys-

tem. *Nat. Immunol.* 16, 343–353.

## J

---

- Jakobs, C., Perner, S., and Hornung, V. (2015). AIM2 Drives Joint Inflammation in a Self-DNA Triggered Model of Chronic Polyarthritis. *PLoS One* 10, e0131702.
- Jamieson, A.M., Diefenbach, A., McMahon, C.W., Xiong, N., Carlyle, J.R., and Raulet, D.H. (2002). The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 17, 19–29.
- Jesus, A.A., and Goldbach-Mansky, R. (2014). IL-1 blockade in autoinflammatory syndromes. *Annu. Rev. Med.* 65, 223–244.
- Jin, T., Perry, A., Jiang, J., Smith, P., Curry, J.A., Unterholzner, L., Jiang, Z., Horvath, G., Rathinam, V.A., Johnstone, R.W., et al. (2012). Structures of the HIN domain:DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. *Immunity* 36, 561–571.
- Jin, T., Curry, J., Smith, P., Jiang, J., and Xiao, T.S. (2013). Structure of the NLRP1 caspase recruitment domain suggests potential mechanisms for its association with procaspase-1. *Proteins* 81, 1266–1270.
- Jin, Y., Mailloux, C.M., Gowan, K., Riccardi, S.L., LaBerge, G., Bennett, D.C., Fain, P.R., and Spritz, R.A. (2007). NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N. Engl. J. Med.* 356, 1216–1225.
- Johnstone, C.N., Smith, Y.E., Cao, Y., Burrows, A.D., Cross, R.S.N., Ling, X., Redvers, R.P., Doherty, J.P., Eckhardt, B.L., Natoli, A.L., et al. (2015). Functional and molecular characterisation of EO771.LMB tumours, a new C57BL/6-mouse-derived model of spontaneously metastatic mammary cancer. *Dis. Model. Mech.* 8, 237–251.
- Joly, S., Ma, N., Sadler, J.J., Soll, D.R., Cassel, S.L., and Sutterwala, F.S. (2009). Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. *J. Immunol.* 183, 3578–3581.
- Joosten, L.A.B., Netea, M.G., Fantuzzi, G., Koenders, M.I., Helsen, M.M.A., Sparrer, H., Pham, C.T., van der Meer, J.W.M., Dinarello, C.A., and van den Berg, W.B. (2009). Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1beta. *Arthritis Rheum.* 60, 3651–3662.
- Jorgensen, I., and Miao, E.A. (2015). Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunol. Rev.* 265, 130–142.
- Juliana, C., Fernandes-Alnemri, T., Kang, S., Farias, A., Qin, F., and Alnemri, E.S. (2012). Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J. Biol. Chem.* 287, 36617–36622.

## K

---

- Kalinski, P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J. Immunol.* 188, 21–28.
- Kan, Z., Jaiswal, B.S., Stinson, J., Janakiraman, V., Bhatt, D., Stern, H.M., Yue, P., Haverty, P.M., Bourgon, R., Zheng, J., et al. (2010). Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* 466, 869–873.
- Kankkunen, P., Teirilä, L., Rintahaka, J., Alenius, H., Wolff, H., and Matikainen, S. (2010). (1,3)-be-



- ta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J. Immunol.* 184, 6335–6342.
- Kanneganti, T.-D., Ozören, N., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J.-H., Franchi, L., Whitfield, J., Barchet, W., Colonna, M., Vandenabeele, P., et al. (2006). Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 440, 233–236.
- Karmakar, M., Katsnelson, M., Malak, H.A., Greene, N.G., Howell, S.J., Hise, A.G., Camilli, A., Kadioglu, A., Dubyak, G.R., and Pearlman, E. (2015). Neutrophil IL-1 $\beta$  processing induced by pneumolysin is mediated by the NLRP3/ASC inflammasome and caspase-1 activation and is dependent on K<sup>+</sup> efflux. *J. Immunol.* 194, 1763–1775.
- Karmakar, M., Katsnelson, M.A., Dubyak, G.R., and Pearlman, E. (2016). Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  secretion in response to ATP. *Nat. Commun.* 7, 10555.
- Kawai, T., and Akira, S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* 21, 317–337.
- Kawai, T., and Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34, 637–650.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* 6, 981–988.
- Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., Vande Walle, L., Louie, S., Dong, J., Newton, K., Qu, Y., Liu, J., Heldens, S., et al. (2011). Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 479, 117–121.
- Kayagaki, N., Wong, M.T., Stowe, I.B., Ramani, S.R., Gonzalez, L.C., Akashi-Takamura, S., Miyake, K., Zhang, J., Lee, W.P., Muszyński, A., et al. (2013). Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* 341, 1246–1249.
- Kayagaki, N., Stowe, I.B., Lee, B.L., O'Rourke, K., Anderson, K., Warming, S., Cuellar, T., Haley, B., Roose-Girma, M., Phung, Q.T., et al. (2015). Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* 526, 666–671.
- Kerur, N., Veettil, M.V., Sharma-Walia, N., Bottero, V., Sadagopan, S., Otageri, P., and Chandran, B. (2011). IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell Host Microbe* 9, 363–375.
- Keskinov, A.A., and Shurin, M.R. (2015). Myeloid regulatory cells in tumor spreading and metastasis. *Immunobiology* 220, 236–242.
- Khong, H.T., Wang, Q.J., and Rosenberg, S.A. (2004). Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression. *J. Immunother.* 27, 184–190.
- Kool, M., Pétrilli, V., De Smedt, T., Rolaz, A., Hammad, H., van Nimwegen, M., Bergen, I.M., Castillo, R., Lambrecht, B.N., and Tschopp, J. (2008). Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J. Immunol.* 181, 3755–3759.
- Kostura, M.J., Tocci, M.J., Limjuco, G., Chin, J., Cameron, P., Hillman, A.G., Chartrain, N.A., and Schmidt, J.A. (1989). Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5227–5231.

- Kovarova, M., Hesker, P.R., Jania, L., Nguyen, M., Snouwaert, J.N., Xiang, Z., Lommatzsch, S.E., Huang, M.T., Ting, J.P.-Y., and Koller, B.H. (2012). NLRP1-dependent pyroptosis leads to acute lung injury and morbidity in mice. *J. Immunol.* 189, 2006–2016.
- Krelin, Y., Voronov, E., Dotan, S., Elkabets, M., Reich, E., Fogel, M., Huszar, M., Iwakura, Y., Segal, S., Dinarello, C.A., et al. (2007). Interleukin-1beta-driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors. *Cancer Res.* 67, 1062–1071.
- de Kruijf, E.M., Sajet, A., van Nes, J.G.H., Putter, H., Smit, V.T.H.B.M., Eagle, R.A., Jafferji, I., Trowsdale, J., Liefers, G.J., van de Velde, C.J.H., et al. (2012). NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. *BMC Cancer* 12, 24.
- Kumar, S., Hanning, C.R., Brigham-Burke, M.R., Rieman, D.J., Lehr, R., Khandekar, S., Kirkpatrick, R.B., Scott, G.F., Lee, J.C., Lynch, F.J., et al. (2002). Interleukin-1F7B (IL-1H4/IL-1F7) is processed by caspase-1 and mature IL-1F7B binds to the IL-18 receptor but does not induce IFN-gamma production. *Cytokine* 18, 61–71.
- Kummer, J.A., Broekhuizen, R., Everett, H., Agostini, L., Kuijk, L., Martinon, F., van Bruggen, R., and Tschopp, J. (2007). Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J. Histochem. Cytochem.* 55, 443–452.
- Kunigal, S., Lakka, S.S., Sodadasu, P.K., Estes, N., and Rao, J.S. (2009). Stat3-siRNA induces Fas-mediated apoptosis in vitro and in vivo in breast cancer. *Int. J. Oncol.* 34, 1209–1220.

## L

---

- Lamkanfi, M., and Dixit, V.M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157, 1013–1022.
- Lamkanfi, M., Mueller, J.L., Vitari, A.C., Misaghi, S., Fedorova, A., Deshayes, K., Lee, W.P., Hoffman, H.M., and Dixit, V.M. (2009). Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J. Cell Biol.* 187, 61–70.
- Laroui, H., Yan, Y., Narui, Y., Ingersoll, S.A., Ayyadurai, S., Charania, M.A., Zhou, F., Wang, B., Salaita, K., Sitaraman, S. V, et al. (2011). L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-meso-diaminopimelic acid (DAP) interacts directly with leucine-rich region domain of nucleotide-binding oligomerization domain 1, increasing phosphorylation activity of receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 and its interacti. *J. Biol. Chem.* 286, 31003–31013.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973–983.
- Levinsohn, J.L., Newman, Z.L., Hellmich, K.A., Fattah, R., Getz, M.A., Liu, S., Sastalla, I., Leppla, S.H., and Moayeri, M. (2012). Anthrax lethal factor cleavage of Nlrp1 is required for activation of the inflammasome. *PLoS Pathog.* 8, e1002638.
- Lewis, A.M., Varghese, S., Xu, H., and Alexander, H.R. (2006). Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J. Transl. Med.* 4, 48.
- Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M., and Cao, X. (2009). Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J. Immunol.* 182, 240–249.



- Li, P., Allen, H., Banerjee, S., Franklin, S., Herzog, L., Johnston, C., McDowell, J., Paskind, M., Rodman, L., and Salfeld, J. (1995). Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* 80, 401–411.
- Li, S., Neff, C.P., Barber, K., Hong, J., Luo, Y., Azam, T., Palmer, B.E., Fujita, M., Garlanda, C., Mantovani, A., et al. (2015). Extracellular forms of IL-37 inhibit innate inflammation in vitro and in vivo but require the IL-1 family decoy receptor IL-1R8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 2497–2502.
- Li, T., Zhang, Q., Jiang, Y., Yu, J., Hu, Y., Mou, T., Chen, G., and Li, G. (2016). Gastric cancer cells inhibit natural killer cell proliferation and induce apoptosis via prostaglandin E2. *Oncoimmunology* 5, e1069936.
- Liao, K.-C., and Mogridge, J. (2013). Activation of the Nlrp1b inflammasome by reduction of cytosolic ATP. *Infect. Immun.* 81, 570–579.
- Lightfield, K.L., Persson, J., Brubaker, S.W., Witte, C.E., von Moltke, J., Dunipace, E.A., Henry, T., Sun, Y.-H., Cado, D., Dietrich, W.F., et al. (2008). Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat. Immunol.* 9, 1171–1178.
- Lim, H.X., Hong, H.-J., Cho, D., and Kim, T.S. (2014). IL-18 enhances immunosuppressive responses by promoting differentiation into monocytic myeloid-derived suppressor cells. *J. Immunol.* 193, 5453–5460.
- Liu, T., Yamaguchi, Y., Shirasaki, Y., Shikada, K., Yamagishi, M., Hoshino, K., Kaisho, T., Takemoto, K., Suzuki, T., Kuranaga, E., et al. (2014). Single-cell imaging of caspase-1 dynamics reveals an all-or-none inflammasome signaling response. *Cell Rep.* 8, 974–982.
- Liu, Z.-Y., Yi, J., and Liu, F.-E. (2015). The molecular mechanism of breast cancer cell apoptosis induction by absent in melanoma (AIM2). *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 14750–14758.
- Long, E.O., Kim, H.S., Liu, D., Peterson, M.E., and Rajagopalan, S. (2013). Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 227–258.
- Loo, Y.-M., and Gale, M. (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 34, 680–692.
- Lu, A., Magupalli, V.G., Ruan, J., Yin, Q., Atianand, M.K., Vos, M.R., Schröder, G.F., Fitzgerald, K.A., Wu, H., and Egelman, E.H. (2014). Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell* 156, 1193–1206.
- Lu, B., Yang, M., and Wang, Q. (2016). Interleukin-33 in tumorigenesis, tumor immune evasion, and cancer immunotherapy. *J. Mol. Med. (Berl)*. 94, 535–543.
- Lu, Y.-C., Kim, I., Lye, E., Shen, F., Suzuki, N., Suzuki, S., Gerondakis, S., Akira, S., Gaffen, S.L., Yeh, W.-C., et al. (2009). Differential role for c-Rel and C/EBPbeta/delta in TLR-mediated induction of proinflammatory cytokines. *J. Immunol.* 182, 7212–7221.
- Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., and Xia, B. (2012). CD4+T cells: differentiation and functions. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 925135.
- Lüthi, A.U., Cullen, S.P., McNeela, E.A., Duriez, P.J., Afonina, I.S., Sheridan, C., Brumatti, G., Taylor, R.C., Kersse, K., Vandenabeele, P., et al. (2009). Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 31, 84–98.
- Lv, D., Zhang, Y., Kim, H.-J., Zhang, L., and Ma, X. (2013). CCL5 as a potential immunotherapeutic target in triple-negative breast cancer. *Cell. Mol. Immunol.* 10, 303–310.

## M

- Magri, G., Muntasell, A., Romo, N., Sáez-Borderías, A., Pende, D., Geraghty, D.E., Hengel, H., Angulo, A., Moretta, A., and López-Botet, M. (2011). NKp46 and DNAM-1 NK-cell receptors drive the response to human cytomegalovirus-infected myeloid dendritic cells overcoming viral immune evasion strategies. *Blood* 117, 848–856.
- Mahmoud, S.M.A., Paish, E.C., Powe, D.G., Macmillan, R.D., Grainge, M.J., Lee, A.H.S., Ellis, I.O., and Green, A.R. (2011). Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 29, 1949–1955.
- Mamessier, E., Sylvain, A., Thibault, M.-L., Houvenaeghel, G., Jacquemier, J., Castellano, R., Gonçalves, A., André, P., Romagné, F., Thibault, G., et al. (2011a). Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J. Clin. Invest.* 121, 3609–3622.
- Mamessier, E., Sylvain, A., Bertucci, F., Castellano, R., Finetti, P., Houvenaeghel, G., Charaffe-Jaufret, E., Birnbaum, D., Moretta, A., and Olive, D. (2011b). Human breast tumor cells induce self-tolerance mechanisms to avoid NKG2D-mediated and DNAM-mediated NK cell recognition. *Cancer Res.* 71, 6621–6632.
- Man, S.M., Zhu, Q., Zhu, L., Liu, Z., Karki, R., Malik, A., Sharma, D., Li, L., Malireddi, R.K.S., Gurung, P., et al. (2015). Critical Role for the DNA Sensor AIM2 in Stem Cell Proliferation and Cancer. *Cell* 162, 45–58.
- Mankan, A.K., Dau, T., Jenne, D., and Hornung, V. (2012). The NLRP3/ASC/Caspase-1 axis regulates IL-1 $\beta$  processing in neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 42, 710–715.
- Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D.M., Vucic, D., French, D.M., Lee, W.P., Roose-Girma, M., Erickson, S., and Dixit, V.M. (2004). Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430, 213–218.
- Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W.P., Weinrauch, Y., Monack, D.M., and Dixit, V.M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440, 228–232.
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell* 10, 417–426.
- Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., and Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440, 237–241.
- Masters, S.L., Gerlic, M., Metcalf, D., Preston, S., Pellegrini, M., O'Donnell, J.A., McArthur, K., Baldwin, T.M., Chevrier, S., Nowell, C.J., et al. (2012). NLRP1 inflammasome activation induces pyroptosis of hematopoietic progenitor cells. *Immunity* 37, 1009–1023.
- Masumoto, J., Taniguchi, S., Ayukawa, K., Sarvotham, H., Kishino, T., Niikawa, N., Hidaka, E., Katsuyama, T., Higuchi, T., and Sagara, J. (1999). ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 274, 33835–33838.
- Masumoto, J., Dowds, T.A., Schaner, P., Chen, F.F., Ogura, Y., Li, M., Zhu, L., Katsuyama, T., Sagara, J., Taniguchi, S., et al. (2003). ASC is an activating adaptor for NF-kappa B and caspase-8-dependent apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 69–73.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 991–1045.
- Mayor, A., Martinon, F., De Smedt, T., Pétrilli, V., and Tschopp, J. (2007). A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses.

Nat. Immunol. 8, 497–503.

McGreal, E.P., Rosas, M., Brown, G.D., Zamze, S., Wong, S.Y.C., Gordon, S., Martinez-Pomares, L., and Taylor, P.R. (2006). The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. *Glycobiology* 16, 422–430.

McGuire, K.A., Barlan, A.U., Griffin, T.M., and Wiethoff, C.M. (2011). Adenovirus type 5 rupture of lysosomes leads to cathepsin B-dependent mitochondrial stress and production of reactive oxygen species. *J. Virol.* 85, 10806–10813.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., and Janeway, C.A. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* 2, 253–258.

Meixenberger, K., Pache, F., Eitel, J., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Slevogt, H., N'Guessan, P., Witzenzrath, M., Netea, M.G., Chakraborty, T., et al. (2010). *Listeria monocytogenes*-infected human peripheral blood mononuclear cells produce IL-1 $\beta$ , depending on listeriolysin O and NLRP3. *J. Immunol.* 184, 922–930.

Meloni, F., Morosini, M., Solari, N., Passadore, I., Nascimbene, C., Novo, M., Ferrari, M., Cosentino, M., Marino, F., Pozzi, E., et al. (2006). Foxp3 expressing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma. *Hum. Immunol.* 67, 1–12.

van der Merwe, P.A., and Dushek, O. (2011). Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 47–55.

Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M., and Tschopp, J. (2004). RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF- $\kappa$ B activation. *Nat. Immunol.* 5, 503–507.

Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437, 1167–1172.

Mi, Z., Guo, H., Wai, P.Y., Gao, C., Wei, J., and Kuo, P.C. (2004). Differential osteopontin expression in phenotypically distinct subclones of murine breast cancer cells mediates metastatic behavior. *J. Biol. Chem.* 279, 46659–46667.

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

Miao, E.A., Rajan, J. V, and Aderem, A. (2011). Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol. Rev.* 243, 206–214.

Miggin, S.M., Pålsson-McDermott, E., Dunne, A., Jefferies, C., Pinteaux, E., Banahan, K., Murphy, C., Moynagh, P., Yamamoto, M., Akira, S., et al. (2007). NF- $\kappa$ B activation by the Toll-IL-1 receptor domain protein MyD88 adapter-like is regulated by caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3372–3377.

Miller, F.R., Miller, B.E., and Heppner, G.H. (1983). Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability. *Invasion Metastasis* 3, 22–31.

- Miller, L.J., Kurtzman, S.H., Anderson, K., Wang, Y., Stankus, M., Renna, M., Lindquist, R., Barrows, G., and Kreutzer, D.L. (2000). Interleukin-1 family expression in human breast cancer: interleukin-1 receptor antagonist. *Cancer Invest.* 18, 293–302.
- Minkiewicz, J., de Rivero Vaccari, J.P., and Keane, R.W. (2013). Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia* 61, 1113–1121.
- Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2014). New insights into cancer immunoeediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Curr. Opin. Immunol.* 27, 16–25.
- Mo, J., Boyle, J.P., Howard, C.B., Monie, T.P., Davis, B.K., and Duncan, J.A. (2012). Pathogen sensing by nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2) is mediated by direct binding to muramyl dipeptide and ATP. *J. Biol. Chem.* 287, 23057–23067.
- Morecki, S., Yacovlev, L., and Slavin, S. (1998). Effect of indomethacin on tumorigenicity and immunity induction in a murine model of mammary carcinoma. *Int. J. Cancer* 75, 894–899.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., and Janeway, C.A. (2012). *Janeway's Immunobiology* (Garland Science).
- Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 723–737.
- Muruve, D.A., Pétrilli, V., Zaiss, A.K., White, L.R., Clark, S.A., Ross, P.J., Parks, R.J., and Tschopp, J. (2008). The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 452, 103–107.

## N

---

- Nabekura, T., Girard, J.-P., and Lanier, L.L. (2015). IL-33 receptor ST2 amplifies the expansion of NK cells and enhances host defense during mouse cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* 194, 5948–5952.
- Nagaraj, S., and Gabrilovich, D.I. (2007). Myeloid-derived suppressor cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 601, 213–223.
- Nishikado, H., Mukai, K., Kawano, Y., Minegishi, Y., and Karasuyama, H. (2011). NK cell-depleting anti-asialo GM1 antibody exhibits a lethal off-target effect on basophils in vivo. *J. Immunol.* 186, 5766–5771.
- Nishio, S., Yamada, N., Ohyama, H., Yamanegi, K., Nakasho, K., Hata, M., Nakamura, Y., Fukunaga, S., Futani, H., Yoshiya, S., et al. (2008). Enhanced suppression of pulmonary metastasis of malignant melanoma cells by combined administration of alpha-galactosylceramide and interleukin-18. *Cancer Sci.* 99, 113–120.
- Nold, M.F., Nold-Petry, C.A., Zepp, J.A., Palmer, B.E., Bufler, P., and Dinarello, C.A. (2010). IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat. Immunol.* 11, 1014–1022.
- Nold-Petry, C.A., Lo, C.Y., Rudloff, I., Elgass, K.D., Li, S., Gantier, M.P., Lotz-Havla, A.S., Gersting, S.W., Cho, S.X., Lao, J.C., et al. (2015). IL-37 requires the receptors IL-18R $\alpha$  and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction. *Nat. Immunol.* 16, 354–365.
- Nordlander, S., Pott, J., and Maloy, K.J. (2014). NLR4 expression in intestinal epithelial cells mediates protection against an enteric pathogen. *Mucosal Immunol.* 7, 775–785.
- Normand, S., Delanoye-Crespin, A., Bressenot, A., Huot, L., Grandjean, T., Peyrin-Biroulet, L., Le-

moine, Y., Hot, D., and Chamaillard, M. (2011). Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9601–9606.

Novick, D., Schwartsburd, B., Pinkus, R., Suissa, D., Belzer, I., Sthoeger, Z., Keane, W.F., Chvatchko, Y., Kim, S.H., Fantuzzi, G., et al. (2001). A novel IL-18BP ELISA shows elevated serum IL-18BP in sepsis and extensive decrease of free IL-18. *Cytokine* 14, 334–342.

Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., and Corcoran, L.M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 160–171.

## O

---

O’Neill, L.A.J., and Bowie, A.G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 353–364.

O’Neill, L.A.J., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 453–460.

Ochoa, A.C., Zea, A.H., Hernandez, C., and Rodriguez, P.C. (2007). Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 13, 721s – 726s.

Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S., and Nunez, G. (2001). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 276, 4812–4818.

Okamoto, M., Liu, W., Luo, Y., Tanaka, A., Cai, X., Norris, D.A., Dinarello, C.A., and Fujita, M. (2010). Constitutively active inflammasome in human melanoma cells mediating autoinflammation via caspase-1 processing and secretion of interleukin-1beta. *J. Biol. Chem.* 285, 6477–6488.

Onoguchi, K., Yoneyama, M., and Fujita, T. (2011). Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors. *J. Interferon Cytokine Res.* 31, 27–31.

Van Opdenbosch, N., Gurung, P., Vande Walle, L., Fossoul, A., Kanneganti, T.-D., and Lamkanfi, M. (2014). Activation of the NLRP1b inflammasome independently of ASC-mediated caspase-1 autoproteolysis and speck formation. *Nat. Commun.* 5, 3209.

Osaki, T., Péron, J.M., Cai, Q., Okamura, H., Robbins, P.D., Kurimoto, M., Lotze, M.T., and Tahara, H. (1998). IFN-gamma-inducing factor/IL-18 administration mediates IFN-gamma- and IL-12-independent antitumor effects. *J. Immunol.* 160, 1742–1749.

Oshiumi, H., Sasai, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M., and Seya, T. (2003). TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J. Biol. Chem.* 278, 49751–49762.

Osuka, A., Hanschen, M., Stoecklein, V., and Lederer, J.A. (2012). A protective role for inflammasome activation following injury. *Shock* 37, 47–55.

## P

---

Pang, L., and Knox, A.J. (1997). Effect of interleukin-1 beta, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma on the induction of cyclo-oxygenase-2 in cultured human airway smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 121, 579–587.

Pantschenko, A.G., Pushkar, I., Anderson, K.H., Wang, Y., Miller, L.J., Kurtzman, S.H., Barrows, G., and Kreutzer, D.L. (2003). The interleukin-1 family of cytokines and receptors in human breast cancer: implications for tumor progression. *Int. J. Oncol.* 23, 269–284.



- Pegram, H.J., Andrews, D.M., Smyth, M.J., Darcy, P.K., and Kershaw, M.H. (2011). Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol. Cell Biol.* 89, 216–224.
- Perou, C.M., Sørli, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752.
- Perussia, B., Starr, S., Abraham, S., Fanning, V., and Trinchieri, G. (1983). Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. *J. Immunol.* 130, 2133–2141.
- Perz, J.F., Armstrong, G.L., Farrington, L.A., Hutin, Y.J.F., and Bell, B.P. (2006). The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J. Hepatol.* 45, 529–538.
- Pétrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., and Tschopp, J. (2007a). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ.* 14, 1583–1589.
- Pétrilli, V., Dostert, C., Muruve, D.A., and Tschopp, J. (2007b). The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 615–622.
- Philpott, D.J., Sorbara, M.T., Robertson, S.J., Croitoru, K., and Girardin, S.E. (2014). NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 9–23.
- Pieper, K., Grimbacher, B., and Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 959–971.
- Pierini, R., Juruj, C., Perret, M., Jones, C.L., Mangeot, P., Weiss, D.S., and Henry, T. (2012). AIM2/ASC triggers caspase-8-dependent apoptosis in Francisella-infected caspase-1-deficient macrophages. *Cell Death Differ.* 19, 1709–1721.
- Platonova, S., Cherfils-Vicini, J., Damotte, D., Crozet, L., Vieillard, V., Validire, P., André, P., Dieu-Nosjean, M.-C., Alifano, M., Régnard, J.-F., et al. (2011). Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res.* 71, 5412–5422.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., et al. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085–2088.
- Della Porta, G., Canevari, S., and Fossati, G. (1973). Immune responses to tumour and embryo cells in patients with mammary carcinoma. *Br. J. Cancer. Suppl.* 1, 103–107.
- Poschke, I., Mougiakakos, D., and Kiessling, R. (2011). Camouflage and sabotage: tumor escape from the immune system. *Cancer Immunol. Immunother.* 60, 1161–1171.
- Pradeu, T., and Cooper, E.L. (2012). The danger theory: 20 years later. *Front. Immunol.* 3, 287.
- Pulaski, B.A., and Ostrand-Rosenberg, S. (1998). Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines. *Cancer Res.* 58, 1486–1493.
- Puren, A.J., Fantuzzi, G., and Dinarello, C.A. (1999). Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2256–2261.
- Purev, E., Cai, D., Miller, E., Swoboda, R., Mayer, T., Klein-Szanto, A., Marincola, F.M., Mick, R., Otvos, L., Wunner, W., et al. (2004). Immune responses of breast cancer patients to mutated epidermal growth factor receptor (EGF-RvIII, Delta EGF-R, and de2-7 EGF-R). *J. Immunol.* 173,

6472–6480.

Py, B.F., Kim, M.-S., Vakifahmetoglu-Norberg, H., and Yuan, J. (2013). Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Mol. Cell* 49, 331–338.

## R

---

Rajamäki, K., Lappalainen, J., Oörni, K., Välimäki, E., Matikainen, S., Kovanen, P.T., and Eklund, K.K. (2010). Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One* 5, e11765.

Rakhmilevich, A.L., Janssen, K., Hao, Z., Sondel, P.M., and Yang, N.S. (2000). Interleukin-12 gene therapy of a weakly immunogenic mouse mammary carcinoma results in reduction of spontaneous lung metastases via a T-cell-independent mechanism. *Cancer Gene Ther.* 7, 826–838.

Randolph, G.J., Angeli, V., and Swartz, M.A. (2005). Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 617–628.

Rathinam, V.A.K., Jiang, Z., Waggoner, S.N., Sharma, S., Cole, L.E., Waggoner, L., Vanaja, S.K., Monks, B.G., Ganesan, S., Latz, E., et al. (2010). The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat. Immunol.* 11, 395–402.

Rathinam, V.A.K., Vanaja, S.K., Waggoner, L., Sokolovska, A., Becker, C., Stuart, L.M., Leong, J.M., and Fitzgerald, K.A. (2012). TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. *Cell* 150, 606–619.

Rayamajhi, M., Zak, D.E., Chavarria-Smith, J., Vance, R.E., and Miao, E.A. (2013). Cutting edge: Mouse NAIP1 detects the type III secretion system needle protein. *J. Immunol.* 191, 3986–3989.

Roberts, T.L., Idris, A., Dunn, J.A., Kelly, G.M., Burnton, C.M., Hodgson, S., Hardy, L.L., Garceau, V., Sweet, M.J., Ross, I.L., et al. (2009). HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* 323, 1057–1060.

Robertson, M.J., Mier, J.W., Logan, T., Atkins, M., Koon, H., Koch, K.M., Kathman, S., Pandite, L.N., Oei, C., Kirby, L.C., et al. (2006). Clinical and biological effects of recombinant human interleukin-18 administered by intravenous infusion to patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.* 12, 4265–4273.

Robertson, M.J., Kirkwood, J.M., Logan, T.F., Koch, K.M., Kathman, S., Kirby, L.C., Bell, W.N., Thurmond, L.M., Weisenbach, J., and Dar, M.M. (2008). A dose-escalation study of recombinant human interleukin-18 using two different schedules of administration in patients with cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 3462–3469.

Robertson, M.J., Kline, J., Struemper, H., Koch, K.M., Bauman, J.W., Gardner, O.S., Murray, S.C., Germaschewski, F., Weisenbach, J., Jonak, Z., et al. (2013). A dose-escalation study of recombinant human interleukin-18 in combination with rituximab in patients with non-Hodgkin lymphoma. *J. Immunother.* 36, 331–341.

Robinson, S.C., Scott, K.A., Wilson, J.L., Thompson, R.G., Proudfoot, A.E.I., and Balkwill, F.R. (2003). A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth. *Cancer Res.* 63, 8360–8365.

Rodriguez, J., and Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 13, 3179–3184.

## S

---

- Sagulenko, V., Thygesen, S.J., Sester, D.P., Idris, A., Cridland, J.A., Vajjhala, P.R., Roberts, T.L., Schroder, K., Vince, J.E., Hill, J.M., et al. (2013). AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC. *Cell Death Differ.* 20, 1149–1160.
- Saito, T., Hirai, R., Loo, Y.-M., Owen, D., Johnson, C.L., Sinha, S.C., Akira, S., Fujita, T., and Gale, M. (2007). Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 582–587.
- Salcedo, R., Worschech, A., Cardone, M., Jones, Y., Gyulai, Z., Dai, R.-M., Wang, E., Ma, W., Haines, D., O’Hugin, C., et al. (2010). MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *J. Exp. Med.* 207, 1625–1636.
- Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., Wienert, S., Van den Eynden, G., Baehner, F.L., Penault-Llorca, F., et al. (2015). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann. Oncol.* 26, 259–271.
- Sancho, D., and Reis e Sousa, C. (2012). Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 491–529.
- Sastalla, I., Crown, D., Masters, S.L., McKenzie, A., Leppla, S.H., and Moayeri, M. (2013). Transcriptional analysis of the three Nlrp1 paralogs in mice. *BMC Genomics* 14, 188.
- Schattgen, S.A., Gao, G., Kurt-Jones, E.A., and Fitzgerald, K.A. (2016). Cutting Edge: DNA in the Lung Microenvironment during Influenza Virus Infection Tempers Inflammation by Engaging the DNA Sensor AIM2. *J. Immunol.* 196, 29–33.
- Schmid-Burgk, J.L., Chauhan, D., Schmidt, T., Ebert, T.S., Reinhardt, J., Endl, E., and Hornung, V. (2016). A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential Component of NLRP3 Inflammasome Activation. *J. Biol. Chem.* 291, 103–109.
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., et al. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23, 479–490.
- Scholz, C.C., and Taylor, C.T. (2013). Targeting the HIF pathway in inflammation and immunity. *Curr. Opin. Pharmacol.* 13, 646–653.
- Schrey, M.P., and Patel, K. V (1995). Prostaglandin E2 production and metabolism in human breast cancer cells and breast fibroblasts. Regulation by inflammatory mediators. *Br. J. Cancer* 72, 1412–1419.
- Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell* 140, 821–832.
- Segal, A.W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 197–223.
- Segura, E., and Villadangos, J.A. (2009). Antigen presentation by dendritic cells in vivo. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 105–110.
- Sellin, M.E., Müller, A.A., Felmy, B., Dolowschiak, T., Diard, M., Tardivel, A., Maslowski, K.M., and Hardt, W.-D. (2014). Epithelium-intrinsic NAIP/NLRC4 inflammasome drives infected enterocyte expulsion to restrict Salmonella replication in the intestinal mucosa. *Cell Host Microbe* 16, 237–248.
- Serbina, N. V, Jia, T., Hohl, T.M., and Pamer, E.G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 421–452.



- Sester, D.P., Thygesen, S.J., Sagulenko, V., Vajjhala, P.R., Cridland, J.A., Vitak, N., Chen, K.W., Osborne, G.W., Schroder, K., and Stacey, K.J. (2015). A novel flow cytometric method to assess inflammasome formation. *J. Immunol.* 194, 455–462.
- Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.-K., and Chen, Z.J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- $\kappa$ B and IRF 3. *Cell* 122, 669–682.
- Sevko, A., and Umansky, V. (2013). Myeloid-derived suppressor cells interact with tumors in terms of myelopoiesis, tumorigenesis and immunosuppression: thick as thieves. *J. Cancer* 4, 3–11.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107–1111.
- Sharma, S., Kulk, N., Nold, M.F., Gräf, R., Kim, S.-H., Reinhardt, D., Dinarello, C.A., and Bufler, P. (2008). The IL-1 family member 7b translocates to the nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines. *J. Immunol.* 180, 5477–5482.
- Shi, H., Wang, Y., Li, X., Zhan, X., Tang, M., Fina, M., Su, L., Pratt, D., Bu, C.H., Hildebrand, S., et al. (2016). NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nat. Immunol.* 17, 250–258.
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, Y., Gao, W., Ding, J., Li, P., Hu, L., and Shao, F. (2014). Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* 514, 187–192.
- Shi, X., Cao, S., Mitsuhashi, M., Xiang, Z., and Ma, X. (2004). Genome-wide analysis of molecular changes in IL-12-induced control of mammary carcinoma via IFN- $\gamma$ -independent mechanisms. *J. Immunol.* 172, 4111–4122.
- Shimada, K., Crother, T.R., Karlin, J., Dagvadorj, J., Chiba, N., Chen, S., Ramanujan, V.K., Wolf, A.J., Vergnes, L., Ojcius, D.M., et al. (2012). Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* 36, 401–414.
- Shirasaki, Y., Yamagishi, M., Suzuki, N., Izawa, K., Nakahara, A., Mizuno, J., Shoji, S., Heike, T., Harada, Y., Nishikomori, R., et al. (2014). Real-time single-cell imaging of protein secretion. *Sci. Rep.* 4, 4736.
- Shostak, K., and Chariot, A. (2011). NF- $\kappa$ B, stem cells and breast cancer: the links get stronger. *Breast Cancer Res.* 13, 214.
- Siegmund, B., Fantuzzi, G., Rieder, F., Gamboni-Robertson, F., Lehr, H.A., Hartmann, G., Dinarello, C.A., Endres, S., and Eigler, A. (2001). Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281, R1264–R1273.
- Silveira, T.N., and Zamboni, D.S. (2010). Pore formation triggered by *Legionella* spp. is an Nlrc4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis. *Infect. Immun.* 78, 1403–1413.
- Singer, C.F., Kronsteiner, N., Hudelist, G., Marton, E., Walter, I., Kubista, M., Czerwenka, K., Schreiber, M., Seifert, M., and Kubista, E. (2003). Interleukin 1 system and sex steroid receptor expression in human breast cancer: interleukin 1 $\alpha$  protein secretion is correlated with malignant phenotype. *Clin. Cancer Res.* 9, 4877–4883.
- Sinha, P., Clements, V.K., Fulton, A.M., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 67, 4507–4513.

- Sjöblom, T., Jones, S., Wood, L.D., Parsons, D.W., Lin, J., Barber, T.D., Mandelker, D., Leary, R.J., Ptak, J., Silliman, N., et al. (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314, 268–274.
- Sliwkowski, M.X., Lofgren, J.A., Lewis, G.D., Hotaling, T.E., Fendly, B.M., and Fox, J.A. (1999). Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin. Oncol.* 26, 60–70.
- Song, X., Voronov, E., Dvorkin, T., Fima, E., Cagnano, E., Benharroch, D., Shendler, Y., Bjorkdahl, O., Segal, S., Dinarello, C.A., et al. (2003). Differential effects of IL-1 alpha and IL-1 beta on tumorigenicity patterns and invasiveness. *J. Immunol.* 171, 6448–6456.
- Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10869–10874.
- Sparmann, A., and Bar-Sagi, D. (2004). Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* 6, 447–458.
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2013). Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 145–149.
- Squires, R.C., Muehlbauer, S.M., and Brojatsch, J. (2007). Proteasomes control caspase-1 activation in anthrax lethal toxin-mediated cell killing. *J. Biol. Chem.* 282, 34260–34267.
- Srinivasula, S.M., Poyet, J.-L., Razmara, M., Datta, P., Zhang, Z., and Alnemri, E.S. (2002). The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J. Biol. Chem.* 277, 21119–21122.
- Steinle, A., Li, P., Morris, D.L., Groh, V., Lanier, L.L., Strong, R.K., and Spies, T. (2001). Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 53, 279–287.
- Stoecklein, V.M., Osuka, A., Ishikawa, S., Lederer, M.R., Wanke-Jellinek, L., and Lederer, J.A. (2015). Radiation exposure induces inflammasome pathway activation in immune cells. *J. Immunol.* 194, 1178–1189.
- Stone, K.D., Prussin, C., and Metcalfe, D.D. (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S73–S80.
- Strober, W., Zhang, F., Kitani, A., Fuss, I., and Fichtner-Feigl, S. (2010). Proinflammatory cytokines underlying the inflammation of Crohn’s disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 26, 310–317.
- Sun, X., Casbas-Hernandez, P., Bigelow, C., Makowski, L., Joseph Jerry, D., Smith Schneider, S., and Troester, M.A. (2012). Normal breast tissue of obese women is enriched for macrophage markers and macrophage-associated gene expression. *Breast Cancer Res. Treat.* 131, 1003–1012.
- Suzuki, S., Franchi, L., He, Y., Muñoz-Planillo, R., Mimuro, H., Suzuki, T., Sasakawa, C., and Núñez, G. (2014). Shigella type III secretion protein MxiI is recognized by Naip2 to induce Nlr4 inflammasome activation independently of Pkcδ. *PLoS Pathog.* 10, e1003926.

## T

---

- Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M.K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., et al. (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448, 501–505.
- Takeda, K., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., Adachi, O., Yoshida, N., Kishimoto, T., Okamura, H., Nakani-

- shi, K., and Akira, S. (1998). Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* 8, 383–390.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805–820.
- Tanaka, Y., and Chen, Z.J. (2012). STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci. Signal.* 5, ra20.
- Tauszig-Delamasure, S., Bilak, H., Capovilla, M., Hoffmann, J.A., and Imler, J.-L. (2002). *Drosophila* MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections. *Nat. Immunol.* 3, 91–97.
- Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.-H., Brown, G.D., and Gordon, S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 901–944.
- Tecchio, C., Micheletti, A., and Cassatella, M.A. (2014). Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front. Immunol.* 5, 508.
- Terlizzi, M., Casolaro, V., Pinto, A., and Sorrentino, R. (2014). Inflammasome: cancer’s friend or foe? *Pharmacol. Ther.* 143, 24–33.
- Terme, M., Ullrich, E., Aymeric, L., Meinhardt, K., Desbois, M., Delahaye, N., Viaud, S., Ryffel, B., Yagita, H., Kaplanski, G., et al. (2011). IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. *Cancer Res.* 71, 5393–5399.
- Terme, M., Ullrich, E., Aymeric, L., Meinhardt, K., Coudert, J.D., Desbois, M., Ghiringhelli, F., Viaud, S., Ryffel, B., Yagita, H., et al. (2012). Cancer-induced immunosuppression: IL-18-elicited immunoablative NK cells. *Cancer Res.* 72, 2757–2767.
- Tu, S., Bhagat, G., Cui, G., Takaishi, S., Kurt-Jones, E.A., Rickman, B., Betz, K.S., Penz-Oesterreicher, M., Bjorkdahl, O., Fox, J.G., et al. (2008). Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell* 14, 408–419.
- Turk, B.E. (2007). Manipulation of host signalling pathways by anthrax toxins. *Biochem. J.* 402, 405–417.

## U

---

- Uematsu, S., and Akira, S. (2006). Toll-like receptors and innate immunity. *J. Mol. Med. (Berl).* 84, 712–725.
- Unterholzner, L., Keating, S.E., Baran, M., Horan, K.A., Jensen, S.B., Sharma, S., Sirois, C.M., Jin, T., Latz, E., Xiao, T.S., et al. (2010). IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat. Immunol.* 11, 997–1004.

## V

---

- Vajjhala, P.R., Lu, A., Brown, D.L., Pang, S.W., Sagulenko, V., Sester, D.P., Cridland, S.O., Hill, J.M., Schroder, K., Stow, J.L., et al. (2015). The Inflammasome Adaptor ASC Induces Procaspace-8 Death Effector Domain Filaments. *J. Biol. Chem.* 290, 29217–29230.
- Vance, R.E. (2015). The NAIP/NLRC4 inflammasomes. *Curr. Opin. Immunol.* 32, 84–89.
- Vidal-Vanaclocha, F., Amézaga, C., Asumendi, A., Kaplanski, G., and Dinarello, C.A. (1994). Interleukin-1 receptor blockade reduces the number and size of murine B16 melanoma hepatic metastases. *Cancer Res.* 54, 2667–2672.

- Vidal-Vanaclocha, F., Fantuzzi, G., Mendoza, L., Fuentes, A.M., Anasagasti, M.J., Martín, J., Carrascal, T., Walsh, P., Reznikov, L.L., Kim, S.H., et al. (2000). IL-18 regulates IL-1beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 734–739.
- Villegas, F.R., Coca, S., Villarrubia, V.G., Jiménez, R., Chillón, M.J., Jareño, J., Zuñil, M., and Callol, L. (2002). Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 35, 23–28.
- Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., and Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 239–252.
- Vladimer, G.I., Weng, D., Paquette, S.W.M., Vanaja, S.K., Rathinam, V.A.K., Aune, M.H., Conlon, J.E., Burbage, J.J., Proulx, M.K., Liu, Q., et al. (2012). The NLRP12 inflammasome recognizes *Yersinia pestis*. *Immunity* 37, 96–107.
- Voronov, E., Shouval, D.S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C.A., and Apte, R.N. (2003). IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2645–2650.

## W

---

- Watanabe, H., Gaide, O., Pétrilli, V., Martinon, F., Contassot, E., Roques, S., Kummer, J.A., Tschopp, J., and French, L.E. (2007). Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 127, 1956–1963.
- Watson, P.R., Gautier, A. V, Paulin, S.M., Bland, A.P., Jones, P.W., and Wallis, T.S. (2000). *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Dublin can lyse macrophages by a mechanism distinct from apoptosis. *Infect. Immun.* 68, 3744–3747.
- Weber, A., Wasiliew, P., and Kracht, M. (2010). Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci. Signal.* 3, cm1.
- Wickliffe, K.E., Leppla, S.H., and Moayeri, M. (2008a). Anthrax lethal toxin-induced inflammasome formation and caspase-1 activation are late events dependent on ion fluxes and the proteasome. *Cell. Microbiol.* 10, 332–343.
- Wickliffe, K.E., Leppla, S.H., and Moayeri, M. (2008b). Killing of macrophages by anthrax lethal toxin: involvement of the N-end rule pathway. *Cell. Microbiol.* 10, 1352–1362.
- Wilson, J.E., Petrucelli, A.S., Chen, L., Koblansky, A.A., Truax, A.D., Oyama, Y., Rogers, A.B., Brickey, W.J., Wang, Y., Schneider, M., et al. (2015). Inflammasome-independent role of AIM2 in suppressing colon tumorigenesis via DNA-PK and Akt. *Nat. Med.* 21, 906–913.
- Winkler, S., and Rösen-Wolff, A. (2015). Caspase-1: an integral regulator of innate immunity. *Semin. Immunopathol.* 37, 419–427.
- Wright, S.D., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., and Ramos, R.A. (1989). Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* 170, 1231–1241.
- Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., and Mathison, J.C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249, 1431–1433.
- Wu, L., Adams, M., Carter, T., Chen, R., Muller, G., Stirling, D., Schafer, P., and Bartlett, J.B. (2008). lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells. *Clin. Cancer Res.* 14, 4650–4657.

## X

---

Xu, L.-G., Wang, Y.-Y., Han, K.-J., Li, L.-Y., Zhai, Z., and Shu, H.-B. (2005). VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol. Cell* 19, 727–740.

## Y

---

Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* 169, 6668–6672.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., et al. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640–643.

Yang, L., DeBusk, L.M., Fukuda, K., Fingleton, B., Green-Jarvis, B., Shyr, Y., Matrisian, L.M., Carbone, D.P., and Lin, P.C. (2004). Expansion of myeloid immune suppressor Gr<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 6, 409–421.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.-M., Gale, M., Akira, S., et al. (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J. Immunol.* 175, 2851–2858.

## Z

---

Zaki, M.H., Vogel, P., Body-Malapel, M., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2010). IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. *J. Immunol.* 185, 4912–4920.

Zhang, L., Chen, S., Ruan, J., Wu, J., Tong, A.B., Yin, Q., Li, Y., David, L., Lu, A., Wang, W.L., et al. (2015). Cryo-EM structure of the activated NAIP2-NLRC4 inflammasome reveals nucleated polymerization. *Science* 350, 404–409.

Zhao, Y., Yang, J., Shi, J., Gong, Y.-N., Lu, Q., Xu, H., Liu, L., and Shao, F. (2011). The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* 477, 596–600.

Zhong, Z., Umemura, A., Sanchez-Lopez, E., Liang, S., Shalpour, S., Wong, J., He, F., Boassa, D., Perkins, G., Ali, S.R., et al. (2016). NF- $\kappa$ B Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria. *Cell* 164, 896–910.

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

Zychlinsky, A., Prevost, M.C., and Sansonetti, P.J. (1992). *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 358, 167–169.



# **ANNEXES**





---

## Annexe 1 : Assessing Caspase-1 Activation

---

Ce chapitre de méthode est à paraître dans le livre NLR Protein dans la série de Methods in Molecular Biology chez Springer.

Dans cet article de méthode, nous détaillons les protocoles permettant de détecter l'activation de l'inflammasome in vitro via l'analyse par Western Blot de la sécrétion de la forme clivée de la caspase-1 et de l'IL-1 $\beta$  notamment. Nous expliquons également une méthode simple pour déterminer le taux de cellules mortes par pyroptose lors de l'activation de l'inflammasome.

# Assessing Caspase-1 Activation

Baptiste Guey <sup>1,2,3,4</sup>

Virginie Petrilli <sup>1,2,3,4,5,\*</sup>

Email [virginie.petrilli@lyon.unicancer.fr](mailto:virginie.petrilli@lyon.unicancer.fr)

<sup>1</sup> INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

<sup>2</sup> CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France  
AQ1

<sup>3</sup> Université de Lyon, Lyon, France

<sup>4</sup> Centre Léon Bérard, Lyon, France

 <sup>5</sup> [remove this affiliation](#) . Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 28 rue Laennec, 69008 Lyon, France

## Abstract

The caspase-1 enzymatic activity plays a major role in the innate immune response as it regulates the maturation of two major proinflammatory cytokines, the interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) and IL-18. In this chapter, we describe the technique of Western blot to assess caspase-1 activation. This method provides multiple information within one experiment. It allows the detection of both unprocessed and processed caspase-1 and substrates.

## Keywords

Western blot  
Inflammasome  
Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ )  
Caspase-1

## 1. Introduction

Caspase-1 is an enzyme belonging to a family of cysteine proteases that cleave their substrates after an aspartic acid residue. Like apoptotic initiator caspases (e.g., caspase-8 or caspase-9), it is an apical caspase synthesized as a zymogen. Caspase-1 consists of three main domains, a Caspase Activation and Recruitment Domain (CARD) at the N-terminus of the protein followed by two catalytic subunits, the p20 and the p10 (Fig. 1). As an initiator caspase, caspase-1 gets activated within a multi-protein complex, named the “inflammasome.” The inflammasome acts as a molecular platform inducing the zymogen dimerization to initiate caspase-1 activation by autoproteolysis. The freed subunits assemble into dimers of p20/p10 to form the active caspase-1 [1, 2]. The best-characterized substrates of caspase-1 are the proinflammatory cytokines, the pro-interleukin-1 $\beta$  (pro-IL-1 $\beta$ ) and pro-IL-18. Their cleavage by caspase-1 results in the production and secretion of the biologically active cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18. Of note, upon inflammasome activation, the p20/p10 dimers of caspase-1 are secreted together with the mature substrates. This is the reason why cell supernatants are analyzed by Western blot.

### Fig. 1

Schematic representation of the full length caspase-1, size 45 kDa, and of the active dimers



Inflammasomes are major actors of the innate immune response. They are expressed by myeloid cells such as macrophages and dendritic cells, but also by epithelial cells such as keratinocytes or intestinal cells. Different cytosolic pattern recognition receptors such as nucleotide-binding domain and leucine rich repeat pyrin containing 1 (NLRP1), NLRP3, NLRC4, and absent in melanoma 2 (AIM2) are able to trigger the assembly of an inflammasome upon sensing of specific pathogen-associated molecular pattern (PAMP) or danger-associated molecular pattern (DAMP). The NLRP3 receptor is able to detect a wide range of DAMP, e.g., extracellular ATP and monosodium urate crystals, and PAMP, e.g., *Staphylococcus aureus*, influenza virus, adenovirus and bacterial toxins such as nigericin. The mouse NLRP1b is activated by the lethal toxin of *Bacillus anthracis*, while the NLRC4 detects bacteria like *Salmonella* or *Shigella* [ 3 ]. Inflammasome activation is often associated with a specific form of cell death dependent on caspase-1 activity called pyroptosis.

A convenient method to monitor caspase-1 activation is the detection of the autoproteolysis of the protein using the technique of Western blotting. Separation of the different forms of caspase-1 protein using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis followed by Western blot allows the visualization of the full length caspase-1 at 45 kDa (zymogen) and of the cleaved fragments of the protein resulting from its autoprocessing, for instance p20 or p10 depending on the epitope recognized by the antibody. Similarly this technique allows the detection of both the immature and mature form of the substrate of caspase-1, for instance the pro-IL-1 $\beta$  at 35 kDa and the mature IL-1 $\beta$  at 17 kDa. However, recent studies identified specific situations where caspase-1 is active despite the absence of autoprocessing. Thus, for some situations, to assess caspase-1 activity, monitoring its autoprocessing is not sufficient and assessing substrate cleavage and the induction of cell death are also required [ 4 , 5 ]. We therefore include a simple method to monitor cell death, the measurement of lactate dehydrogenase released in the medium.

In this chapter, we activate caspase-1 by triggering the formation of the NLRP3 and NLRP1b inflammasomes in mouse peritoneal macrophages. This method can be applied to bone marrow derived macrophages and dendritic cells, and even to human macrophages, using adequate antibodies. It can also be applied to monitor the activation of other inflammasomes using cognate activators.

## 2. Materials

All buffers and solutions must be prepared using ultrapure water.

### 2.1. Cells and Inflammasome Stimulation

1. Mouse peritoneal macrophages from WT, and ideally, from *caspase-1* deficient (KO) mice that will serve as negative control (for method *see ref. 5*). If no caspase-1 KO mice are available, the caspase-1 inhibitor Z-YVAD-fmk can be used.

2. 12-well plates treated for tissue culture.
3. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) cell culture medium complemented with 10 % (vol/vol) decomplemented fetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate, 100 IU/ml penicillin/streptomycin, and 2 mM glutamine.
4. Opti-MEM<sup>®</sup> medium (this medium is exclusive of Life Technologies); other serum free media could be also used.
5. Phosphate buffered saline solution (PBS): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4.
6. Ultrapure *Escherichia coli* 0111:B4 lipopolysaccharide (LPS).
7. Stock solution of 10 mM nigericin in ethanol.
8. 1 mM adenosine triphosphate (ATP) stock solution in water (*see Note 1*).
9. Lethal toxin (LT) from anthrax: the stock is composed of 1 µg/µl of lethal factor mixed with 1 µg/µl of protective antigen [5].
10. 6 mM EDTA in PBS buffer: dilute 0.5 M EDTA stock solution in PBS.

## 2.2. Protein Extractions

1. RIPA lysis buffer stock 2×: Mix 5 ml of 1 M Tris-HCl pH 7.5, 3 ml 5 M of NaCl, 10 ml of 10 % sodium deoxycholate, 0.15 ml of 20 % SDS, 1 ml of 0.5 % Triton X-100, 1 ml of 0.5 M EDTA, and 0.2 ml of 1 M sodium orthovanadate. Add two tablets of Roche protein inhibitor cocktail; other protein inhibitors cocktails are also suitable. Make the volume up to 50 ml with H<sub>2</sub>O. Mix well. Aliquot 0.5 ml in 1.5 ml microtubes and store at -80 °C.

AQ2

## 2.3. SDS-PAGE

1. Bio-Rad mini-PROTEAN Tetra cell electrophoretic system (or equivalent).
2. Glass plates with 1.5 mm spacer, 15-well combs.
3. Solution of premixed 30 % ratio 37.5:1 acrylamide-bis-acrylamide.
4. 10 % (wt/vol) ammonium persulfate (APS) solution in water.
5. *N,N,N,N'*-tetramethyl-ethylenediamine (TEMED).
6. Stacking gel buffer: 0.5 M Tris-HCl pH 6.8: Weigh 60 g of tris base, add 0.5 L of H<sub>2</sub>O, mix using magnetic stirrer, adjust pH to 6.8 using HCl (*see Note 2*) and add H<sub>2</sub>O up to 1 L. Store at +4 °C.
7. Separating gel buffer 1.5 M Tris-HCl pH 8.8: Weigh 181.5 g tris base, add 0.7 L of H<sub>2</sub>O, mix, adjust pH to 8.8 using HCl (*see Note 2*), make up to 1 L with H<sub>2</sub>O. Store at +4 °C.

8. Separating gels: for two 15 % acrylamide mini-gels mix 4.8 ml of H<sub>2</sub>O, 10 ml of 30 % acrylamide–bis-acrylamide, 5 ml of separating gel buffer, 0.1 ml of 20 % SDS, 0.2 ml of 10 % APS, 0.01 ml TEMED.
9. Stacking gels: for two 5 % acrylamide mini-gels mix 5 ml H<sub>2</sub>O, 1.7 ml of 30 % acrylamide–bis-acrylamide, 2.5 ml of staking gel buffer, 0.05 ml of 20 % SDS, 0.1 ml of 10 % APS, 0.01 ml TEMED.
10. Running (migration) buffer 10× stock solution: Weigh 60.6 g of tris base, 288 g of glycine, add 0.1 L of 20 % SDS, make up to 2 L with H<sub>2</sub>O. Mix.
11. 3× Laemmli buffer (LB): Weigh 60 mg phenol red (*see Note 3*), add 69 ml of glycerol, 37.5 ml of 1 M Tris–HCl pH 6.8 and 60 ml of 20 % SDS. Make up to 200 ml using H<sub>2</sub>O. Mix well. Verify final pH is 6.8 and adjust if necessary. Just before adding the LB to the protein extracts, add 100 mM DTT to reach final concentration.
12. 1 M dithiothreitol (DTT): Dissolve 15.45 g of DTT in H<sub>2</sub>O, aliquot into microtubes and store at –20 °C.
13. Protein ladder.

## 2.4. Western Blot and Antibody Incubation

1. Bio-Rad Mini Transblot electrophoretic system (or equivalent).
2. Transfer buffer × 1 (store at + 4 °C): weigh 25 g of tris base, 120 g of glycine, add 8 L of H<sub>2</sub>O, mix. Adjust pH to 8.3 using HCl, add 1.6 L of pure ethanol, make up the volume to 10 L with H<sub>2</sub>O.
3. 10× stock solution of tris buffer saline Tween (TBST) (store at +4 °C): 500 ml of 1 M tris base pH 7.5, 10 ml of Tween 20, 300 ml of 5 M NaCl, and 190 ml of H<sub>2</sub>O.
4. Nitrocellulose membranes with 0.22 µm pore size.
5. Whatman paper, cut into 7.5 × 7.5 cm pieces.
6. Ponceau S.
7. Nonfat dry milk.
8. Blocking buffer: 5 % (wt/vol) nonfat dry milk in TBST 1×.
9. Primary antibodies: 1:500 dilution of anti-caspase-1 Casper-1 mouse (Adipogen), 1:1000 dilution of anti-IL-1β IL-1F2 (R&D Systems).
10. Secondary antibodies coupled to the horseradish peroxidase (HRP): 1:5000 dilution of donkey anti-goat or donkey anti-mouse.
11. Chemoluminescence substrate for HRP.

12. Frozen ice pack for the transfer.

## 2.5. Cell Death Assay

1. Lactate dehydrogenase (LDH) activity assay kit, such as the CytoTox 96<sup>®</sup> Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega). However, other brands are also suitable. Prepare LDH substrate mix following manufacturer's instructions.
2. Flat-bottom 96-well plate.

## 3. Methods

### 3.1. Activation of the Inflammasome

1. Plate the WT and *caspase-1* KO macrophages at a density ranging from  $8 \times 10^5$  to  $10^6$  cells in a 12 well-plate in 1 ml of complete DMEM. Make sure to seed the adequate number of wells; do not forget to seed an extra control well that will be used as a positive control for the LDH assay. After 2 h, change the medium to remove the non-adherent cells.
2. Prime the cells overnight by stimulating them in complete DMEM containing 0.5  $\mu\text{g/ml}$  of LPS. This step allows the induction of the production of the pro-IL-1 $\beta$  and of the NLRP3 proteins.
3. The following morning, remove the medium and replace it with 1 ml of Opti-MEM (*see Note 4*). Then stimulate the cells to activate the inflammasome by adding either 10  $\mu\text{M}$  nigericin per well for 2–4 h or 5 mM ATP for 30 min or 1  $\mu\text{g/ml}$  LT for 6 h, or the solvent to the control wells. If using Z-YVAD-fmk, add the inhibitor at 50  $\mu\text{M}$  30 min prior to the stimulation.

### 3.2. Sample Preparation

1. Collect each 1 ml of cell supernatant into labeled microtubes and centrifuge gently at  $1500 \times g$  to get rid of any dead cells. Remove the supernatant and store it in 2 aliquots of 0.5 ml at  $-20^\circ\text{C}$  (1 for protein precipitation and 1 for other applications such as LDH assay or ELISA)
2. Wash the cells with PBS and then incubate the cells in 0.5 ml of 6 mM EDTA in PBS for 5 min on ice. Scrape the cells and collect the cells into a clean microtube. Pellet the cells at  $1500 \times g$  in a refrigerated centrifuge. Discard the supernatant, store the dry cell pellet at  $-80^\circ\text{C}$  or proceed directly to the cell lysis.
3. Cell extracts: Make the RIPA buffer 1 $\times$  by adding 0.5 ml of water, and lyse the cells in 40  $\mu\text{l}$  of buffer. Incubate on ice for 30 min and centrifuge at  $+4^\circ\text{C}$  at  $15,800 \times g$ . Collect the cell protein extract into a clean tube (optional: measure the protein concentration using the Bradford assay and use bovine serum albumin as a standard). Add Laemmli buffer containing DTT to the extracts, heat for 5 min at  $95^\circ\text{C}$ . Load directly onto SDS-PAGE or store at  $-80^\circ\text{C}$ .
4. Supernatants: to analyze the protein contents of cell supernatants, we use the methanol/chloroform protein precipitation method. This part should be conducted under a fume hood. To 0.5 ml of cell supernatant, add 0.1 ml of chloroform and 0.5 ml of methanol. Vortex. Centrifuge for 3 min at  $15,800 \times g$ . The white protein disk is visible at the interphase between the



aqueous and organic phase. Discard most of the upper phase without disturbing the protein pellet. Add 0.5 ml of methanol, vortex, and centrifuge for 3 min at  $15,800 \times g$ . The protein pellet should be stacked at the bottom of the tubes. Discard the supernatant. Leave the pellets to air-dry under a fume hood to remove any trace of solvent. Resuspend the proteins in 50  $\mu$ l of LB 3 $\times$  containing DTT (*see Note 5*). Heat at 95 °C for 5 min. Load directly onto gels or store at  $-80$  °C.

### 3.3. SDS-Polyacrylamide Gel Casting and Electrophoresis

1. Assemble the glass plates (1.5 mm spacer) using the casting system of miniPROTEAN electrophoretic system.
2. Prepare Separating gels.
3. Mix well.
4. Pour 7.5–8 ml of gel preparation into the plates and gently overlay the gel with 0.5 ml water. Leave to polymerize (20 min).
5. Prepare the stacking gels.
6. Mix well.
7. Remove the water from the surface of the gels and pour the stacking gels on top of the separating gels. Quickly add the combs to the stacking gel. Wait until gels are polymerized (*see Note 6*).
8. Install the glass plates containing the gels into the migration tank, fill with running buffer 1 $\times$  and gently remove the combs.
9. Load the gels: add the protein ladder to one well and load 20  $\mu$ g of samples (or 15–20  $\mu$ l) per well. Top up the tank with running buffer 1 $\times$  if necessary (*see Note 7*).
10. Start the electrophoresis at 70 V for 20 min then increase the voltage to 100 V for 90 min. Regularly check the migration. Another method is to electrophorese by applying 35 mA/gel.

### 3.4. Western Blot, Wet Method

1. Prepare a tank containing transfer buffer and soak the foam pads and membranes in this buffer.
2. Uncast the gels and remove the gels from the glass plates carefully.
3. Prepare the transfer sandwich by stacking 1 foam pad, 2 Whatman papers soaked into the transfer buffer, the gel (we remove the stacking gel before the transfer), the nitrocellulose membrane, and 2 Whatman papers soaked in the transfer buffer, on the black lid of the transfer cassette (Fig. 2). Get rid of any bubbles by gently rolling the top of the pile with half of a 5 ml pipette. Add another foam pad and close the cassette, place it into the transfer cell, taking care to put the cassette in the proper orientation with regards to the electrodes (with the Bio-Rad system the black side of the cassette toward the black side of the transfer cell). Add one ice block to the transfer tank and fill with transfer buffer (*see Note 8*).

**Fig. 2**

## Schematic representation of the sandwich assembly for the Western blot



4. Transfer at 100 V for 1 h.

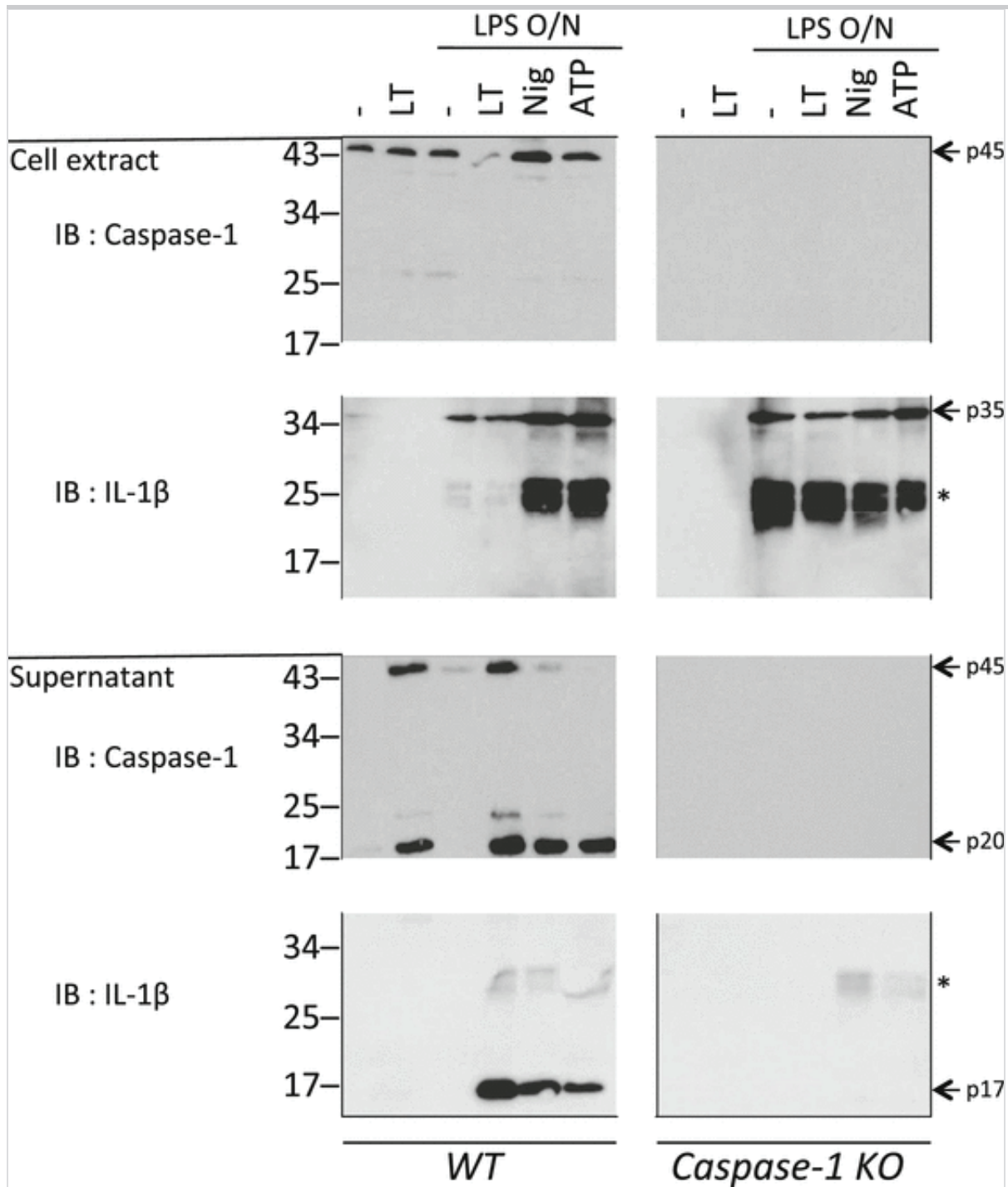
### 3.5. Probing and Detection

1. Open the transfer cassettes to collect the membranes.
2. Optional: you may want to incubate your membrane in a Ponceau S solution before the blocking step. The Ponceau S stains the proteins and is useful to visualize the quality of the protein transfer and the protein load of each well. Incubate the membranes in a solution of Ponceau S for 5 min under agitation, then rinse briefly several times with water.
3. Block the membranes by incubating them in the blocking buffer for 1 h at room temperature and under gentle agitation.
4. Incubate the membranes overnight in the primary antibodies diluted in the blocking buffer at +4 °C under gentle agitation.
5. Proceed to the washing step: add at least 10 ml of TBST 1× for 15 min at room temperature under agitation. Discard the buffer and repeat this step three times.
6. Incubate the membranes in the secondary antibody solution. Dilute the appropriate horseradish-coupled antibody in 1 % milk TBST.
7. Wash the membranes with 10 ml of TBST 1× for 15 min at room temperature under agitation. Discard the buffer and repeat this step three times.
8. Incubate the membranes in HRP substrate. For detection of IL-1 $\beta$  and caspase-1, we incubate the membranes for 5 min in the luminescence HRP substrate solution diluted 1:2 with water (*see Note 9*).
9. Expose the membranes to autoradiography films or to a gel imager (*see example results in Fig. 3*) (*see Note 10*).

#### **Fig. 3**

Immunoblots showing caspase-1 autoproteolysis and IL-1 $\beta$  cleavage in response to the NLRP1b and NLRP3 inflammasome activation in WT and *caspase-1* KO peritoneal macrophages. Caspase-1 and IL-1 $\beta$  are shown in cell extracts and cell supernatants. *O/N*

overnight, *LT* lethal toxin, *Nig* nigericin, – untreated, \* unspecific signal



### 3.6. LDH Assay

This assay is carried out following the manufacturer's instructions. It is used to detect the cell death induced by caspase-1 activation.

1. Make sure to set up the experimental controls: 1 well left untreated for cell spontaneous LDH release and 1 well treated with a lysis solution for cell maximum LDH release.
2. Transfer 50  $\mu$ l of cell supernatant to a flat-bottom 96-well plate.
3. Add 50  $\mu$ l of the reconstituted LDH Substrate Mix to each well of the plate, cover and incubate at room temperature, protected from light, up to 30 min.

4. Add 50 µl of the Stop Solution to each well of the plate.
5. Read the absorbance at 490 nm.

LDH release percentage is calculated by the following formula:

$$\frac{([\text{LDH}_{\text{treated}}] - [\text{LDH}_{\text{untreated}}])}{([\text{LDH}_{\text{total lysis}}] - [\text{LDH}_{\text{untreated}}])} \times 100$$

## 4. Notes

1. Make small aliquots of ATP stock and always use a new aliquot for inflammasome stimulation.
2. Use 12 N HCl to get close to the desired pH then use 6 N HCl to finish the adjustment.
3. Phenol red can be replaced by bromophenol blue. We find convenient, for instance, to use a blue LB for cell extracts and a red LB for cell supernatants.
4. Opti-MEM<sup>®</sup> medium allows a cleaner protein electrophoresis as it contains very few proteins.
5. It is also possible to resuspend the protein pellet in 30 µl of RIPA buffer 1× and then add LB.
6. The casted gels can be stored for 10 days immersed in a box containing running 1× buffer at +4 °C.
7. If many wells are empty, we recommend adding 15 µl of LB 3× to these empty wells to ensure an even migration of the samples.
8. As the best transfer is obtained with cool buffer, do not remove buffer from the fridge until immediately prior to filling tanks. Some people of the team like to transfer in the cold room.
9. We use the Luminata<sup>TM</sup> Crescendo Western HRP substrate (Millipore). This HRP substrate is convenient as it is premixed. Furthermore, depending on the abundance of the protein detected and on the specificity of the primary antibody, it is possible to adapt the substrate concentration by diluting it with water and to also adapt the time of membrane incubation to modulate the intensity of the signal.
10. The membranes can be re-hybridized with another antibody to detect another protein without being stripped if, the size of the other protein of interest to be detected is different and if the primary antibody species is different. To that purpose, we block the membranes as described in Subheading 3.5 and add 0.05 % of sodium azide to the buffer to inactivate the HRP. For instance, the anti-caspase-1 antibody can be re-hybridized following the hybridization with the anti-IL-1β antibody.

## Acknowledgement

We thank Sarah Karabani for proofreading the manuscript. V. Petrilli is supported by the ITMO cancer and the Ligue contre le cancer comité de l'Ain.

## References

1. Walker NP et al (1994) Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer. *Cell* 78:343–352
2. Elliott JM, Rouge L, Wiesmann C, Scheer JM (2009) Crystal structure of procaspase-1 zymogen domain reveals insight into inflammatory caspase autoactivation. *J Biol Chem* 284:6546–6553
3. Lamkanfi M, Dixit VM (2012) Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:137–161
4. Broz P, von Moltke J, Jones JW, Vance RE, Monack DM (2010) Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe* 8:471–483
5. Guey B, Bodnar M, Manié SN, Tardivel A, Petrilli V (2014) Caspase-1 autoproteolysis is differentially required for NLRP1b and NLRP3 inflammasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:17254–17259





## Résumé

---

L'inflammasome est une plateforme moléculaire composée d'un récepteur de l'immunité innée tel que NLRP3 ou NLRP1b, de la protéine adaptatrice ASC et de la caspase-1. Il joue un rôle essentiel dans le déclenchement de la réponse inflammatoire via l'activation de la caspase-1 qui mène à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ .

Dans un premier axe de recherche, nous avons mis en évidence que les macrophages de souris déficientes pour ASC traités avec l'activateur de l'inflammasome NLRP1b, la toxine létale de *Bacillus anthracis*, étaient capables de sécréter la forme mature de l'IL-1 $\beta$  en absence de clivage de la caspase-1 pourtant décrit comme un événement indispensable à son activité. En reconstituant des macrophages *caspase-1* KO avec une forme mutante non-clivable de la caspase-1, nous avons démontré que la forme entière de la caspase-1 est capable d'induire la sécrétion d'IL-1 $\beta$  en réponse à la toxine létale alors qu'elle n'est pas fonctionnelle au sein de l'inflammasome NLRP3.

Dans un second axe de recherche, mon travail de thèse s'est intéressé à comprendre le rôle de l'inflammasome au cours de la progression tumorale. En effet, l'IL-1 $\beta$  est une cytokine fréquemment retrouvée dans le microenvironnement tumorale mammaire suggérant donc l'activation de l'inflammasome au sein des tumeurs. Au moyen d'un modèle de tumeurs in vivo, nous avons montré que l'absence de la caspase-1 et de ASC dans les cellules immunitaires chez la souris conduit à une réduction de la croissance tumorale. De plus, l'absence de ces deux protéines provoque également un plus fort recrutement et une meilleure activité des cellules NK au sein des tumeurs.

En plus d'identifier un nouveau mécanisme d'activation de la caspase-1, mon travail de thèse a permis de mettre en évidence le rôle de l'inflammasome dans l'altération des cellules NK au cours de la progression tumorale mammaire. Ces données permettent d'envisager l'inflammasome comme une cible thérapeutique dans le cancer.

## Abstract

---

The inflammasome is a molecular platform composed of an innate immune receptor such as NLRP3 or NLRP1b, of the adaptor protein ASC and of the caspase-1. It plays an essential role in triggering inflammatory response through the activation of caspase-1 that leads to the secretion of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ .

In a first research axis, we showed that ASC deficient mice macrophages treated with an NLRP1b inflammasome activator, the lethal toxin of *Bacillus anthracis*, were able to secrete the mature form of IL-1 $\beta$  in absence of any cleavage of caspase-1 previously described as an essential event for its function. By reconstituting *caspase-1* KO macrophages with an uncleavable mutant form of caspase-1, we showed that the entire form of the protein is able to induce IL-1 $\beta$  secretion upon lethal toxin treatment but is nonfunctional upon NLRP3 inflammasome activation.

In a second research axis, my PhD work focused on underlying the inflammasome role during tumor progression. Indeed, IL-1 $\beta$  is frequently found within breast tumor microenvironment suggesting that inflammasome is activated in tumors. Using in vivo tumor model, we showed that the absence of caspase-1 of ASC in immune cells lead to a delay tumor growth. In addition, the absence of these two proteins also causes a stronger recruitment and an enhanced activity of NK cells within mammary tumors.

In addition to identify a new caspase-1 activation mechanism, my PhD work allows to highlight a role for the inflammasome in NK cell alteration during mammary tumor progression. These data enable to consider inflammasome as a therapeutic target in cancer.