



**HAL**  
open science

# Analyse de la contribution des inflammasomes et de l'interleukine-1 $\beta$ dans un modèle murin d'inflammation microcristalline

Alexandre Mariotte

► **To cite this version:**

Alexandre Mariotte. Analyse de la contribution des inflammasomes et de l'interleukine-1 $\beta$  dans un modèle murin d'inflammation microcristalline. Rhumatologie et système ostéo-articulaire. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT: 2019STRAJ016 . tel-03738030

**HAL Id: tel-03738030**

**<https://theses.hal.science/tel-03738030v1>**

Submitted on 25 Jul 2022

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

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

*ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la vie et de la santé*  
INSERM UMR\_S1109

**THÈSE** présentée par :  
**Alexandre MARIOTTE**

soutenue le : 26 mars 2019

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Immunologie

**Analyse de la contribution des  
inflammasomes et de l'interleukine-1 $\beta$   
dans un modèle murin d'inflammation  
microcristalline**

**THÈSE dirigée par :**

**Mr. GEORGEL Philippe**

Professeur, INSERM UMR\_S1109, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mr. GABAY Cem**

Professeur, Hopitaux universitaires de Genève, Université de Genève

**Mr. LIOTÉ Frédéric**

Professeur, INSERM UMR\_S1132, Université Paris-Diderot

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mr. GROS Frédéric**

Maitre de conférences, CNRS UPR3572, Université de Strasbourg

---

**INVITEE :**

**Mme. PINZANO Astrid**

Chargée de recherche, CNRS UMR7365, Université de Lorraine



## Remerciements

Ca y est, enfin, la concrétisation de 8 ans et demi de travail acharné et de plusieurs décennies de passion est arrivée. Si ce travail apparaît ici être le mien et avoir été fait à coup de matinées, de journées, de soirées et de nuits également, je ne pourrais pas le présenter décemment sans clairement remercier un ensemble de personnes qui m'ont aidé d'une manière que je ne peux décrire aussi brièvement. Ainsi, et pour ne pas écrire une thèse rien que là-dessus, je vais tâcher d'être concis et exhaustif à la fois dans ces quelques pages.

Tout d'abord, je souhaiterais remercier messieurs les professeurs Cem GABAY et Frédéric LIOTÉ, madame le docteur Astrid PINZANO et monsieur le docteur Frédéric GROS pour avoir accepté de juger cette thèse et ainsi d'apporter leurs expertises respectives à l'examen de mes travaux. Je remercie également monsieur le docteur Frédéric GROS pour avoir également participé à mon suivi tout au long de cet exercice (comité de mi-parcours) mais aussi durant mon Master.

Au cours de ces 4 ans et demi passés au laboratoire d'Immuno-Rhumatologie Moléculaire, j'ai pu effectuer mes travaux avec une réelle aisance (moyens mis en œuvre). Ainsi, je souhaiterais remercier monsieur le professeur Seiamak BAHRAM pour la confiance qu'il m'a accordé tout au long de ces années. Vous m'avez toujours soutenu et encouragé dans la voie que je me suis fixé et je ne peux pas écrire ces remerciements sans le mentionner.

Je remercie chaleureusement le professeur Philippe GEORGEL pour l'encadrement mais aussi la liberté qu'il m'a donné lors de ce doctorat. J'ai ainsi été tout à fait libre d'explorer certaines pistes que je jugeais intéressantes et tester des hypothèses de ma conception sans aucune réticence de sa part. Vous m'avez toujours soutenu dans ma démarche et impliqué dans de nombreux projets me permettant à ce jour d'avoir signé ou co-signé plusieurs articles publiés. Vous m'avez fait confiance sur tous les plans et vous vous êtes toujours montré disponible pour moi que ce soit pour des raisons professionnelles mais aussi personnelles.

D'un point de vue plus scientifique, vous m'avez largement conforté dans l'idée de poursuivre dans le monde de la recherche et fait de cette thèse une étape agréable. Cette dernière s'est effectivement très bien passée. Le seul bémol est que je ne pourrai pas faire la plaisanterie de comparer ce doctorat à une crise de goutte... En somme, je vous adresse de très sincères remerciements et j'ai été très franchement chanceux de vous avoir eu comme directeur de thèse !

Dans mon apprentissage, je dois également beaucoup à quelques personnes qui ont été présentes pour moi dès le début au laboratoire. Je tiens ainsi à remercier Ghada ALSALEH pour avoir littéralement guidé mes pas lors de mon Master et de ce début de thèse. Ghada, tu as été quelqu'un de bienveillant et j'estime avoir appris beaucoup de choses grâce à toi.

De même, je tiens à remercier Ramzi NEHMAR, ancien étudiant en thèse du laboratoire, pour sa bonne humeur et l'aide qu'il a pu me fournir dans le début de cet exercice. Merci beaucoup.

Si cette thèse a été faite à l'institut d'Hématologie et d'Immunologie, j'ai eu la chance d'effectuer mon stage de master 1 à l'Institut de biologie moléculaire et cellulaire (IBMC) sous la direction du professeur Sylviane MULLER. Je tiens ainsi à la remercier, elle ainsi que le Dr. Fengjuan WANG, pour m'avoir appris à respecter une certaine rigueur et pour avoir à l'époque confirmé mon souhait d'évoluer dans cette branche. Merci également à mes professeurs de Master, le Pr. Sylvie FOURNEL, le Dr. Frédéric GROS et le Dr. Samuel LIEGOIS pour nous avoir inculqué des bases solides et nous avoir préparés dans les meilleures conditions à la recherche. Enfin, je tiens à adresser mes remerciements à nos collaborateurs : le Pr. Roméo Ricci, le Dr. Zhirong ZHANG, le Dr. Christelle PO, le Pr. Benoit FRISCH, Sulliman Ommar OMARJEE, le Dr. Christian VON FRENCKEL, le Dr. Celia JACOBBERGER, le Pr. Nadia JESSEL, le Dr. Sabine BOPP-KUCHLER, le Dr. Pascale SCHWINTE, le Dr. Xavier VAN BELLINGHEN et le Dr. David MOULIN.

Aurore (DE CAUWER), je te remercie pour avoir toujours été présente au laboratoire comme en dehors. Nous avons passé de très bons moments et tu as contribué à rendre ces quelques années agréables. Par ailleurs, tu m'a également aidé pour mon projet et tu n'as jamais refusé de donner de l'aide pour quoi que ce soit. Sur le versant du travail, j'ai toujours apprécié tes idées et tes conseils, souvent bien utiles. Sur un versant plus personnel, je garderai longtemps en mémoire ces journées de ski au col de la Schlucht (la « Schl-u-ch-te » en de-cauwerien) et te remercie sincèrement pour ton amitié. Je reste également admiratif de sang-froid face à mes blagues, plus riches en limon les unes que les autres.

Chérine (ABOU-FAYCAL), je suis ravi d'avoir fait ta connaissance et tu vas sincèrement me manquer. J'ai été particulièrement enjoué de travailler avec toi et ton amitié fut très appréciable. A défaut d'avoir gardé les vaches ensemble, nous aurons purifié les neutrophiles ensemble ! Merci beaucoup Chérine ! J'espère que l'on pourra continuer à échanger après mon départ, qui approche malheureusement à grands pas.

Selven (MURDAMOOTHOO), je tiens aussi à te remercier pour ta bonne humeur, ton sang-froid et les discussions que nous avons pu avoir, toujours enrichissantes.

Raphael (CLERE), j'ai beaucoup apprécié de discuter avec toi et j'admire très sincèrement ton dévouement ainsi que ton courage, merci également pour ta bonne humeur et ton sens du partage.

De même, je remercie aussi Alev, Grégory, Thomas, William, Perrine, Rolando et Ben pour les soirées passées ensembles et Livio BERNARDI pour nos discussions et sa sympathie. Votre présence à tous a beaucoup aidé à rendre ces années agréables.

Je remercie aussi Cécile, Véronique, Aurore (MORLON), Anne et Irina pour l'aide que vous m'avez souvent apporté lors de mes expériences. Un grand merci également à Mirjana (RADOSAVLJEVIC) pour son soutien lors de ces années et pour son écoute. Merci également aux bio-informaticiens (Nicodème, Ismail, Aline), aux nouveaux venus (Yang, Thibaut, Vincent, Alice) mais aussi à Laure, Angélique, Diane, Antoine, Fanny, Stéphanie, Raphael (CARAPITO), Gertraud, Camille, Cédric, Ouria, Laurent, Wassila et Lydie pour leur bonne humeur et l'aide qu'ils ont pu me fournir.

Sur un versant plus personnel, je tiens à remercier mes amis en particulier Mickael, Chantal et Louis PIERRON que je connais désormais depuis de nombreuses années et qui m'ont toujours soutenu. Un énorme merci aussi à mes anciens voisins, Lucie KRIEGSHAUSER et Kevin AZEREDO donc on ne peut plus compter le nombre de soirées passées ensembles. Merci également à Bastien DAVRAIVILLE, mon plus ancien ami. Enfin, merci à Quentin, Adrien, Pauline, Anaëlle, Florent, Delphine, Julien, Farouk, Damien, Ivana, Tiphany et P-J.

Bien-sûr, j'adresse un gigantesque merci à ma mère – Liliane BERRING – dont la contribution à tout ceci est inestimable. Maman, tu as toujours tout fait pour mon avenir et je ne peux pas décrire à quel point tu m'as aidé dans cet exercice comme pour le reste (et il n'est pas négligeable). Je ne pourrai jamais assez te remercier !

Je remercie également ma grand-mère – Ginette BERRING – et mon grand-père – Albert BERRING, malheureusement parti – pour l'aide et le soutien familial qu'ils m'ont apporté. J'ai vraiment pu compter sur eux pendant toutes ces années. Merci également à mon père – Lionel MARIOTTE – pour m'avoir soutenu pendant mes études, et à Sylvie PETIT, sa compagne.

Je remercie également la famille VEBER : Pascale, Claude, Anaïs, Marie-Christine et Bernard, vous êtes comme ma famille et je vous remercie du fond du cœur pour votre soutien ! Enfin, je terminerai par Romain (VEBER). Nous avons fait toutes nos études ensembles, passé près de 8 ans à s'entre-aider pour y arriver et je ne pourrai jamais te remercier suffisamment pour tout cela ; je te remercie ainsi infiniment pour ton soutien sincère et durable tout au long de ce périple.



## Table des matières

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Préambule</b> .....	<b>1</b>
<b>I. Les inflammasomes en conditions physiologiques et pathologiques</b> .....	<b>3</b>
1. Vue d'ensemble .....	3
1.1. Les inflammasomes, une découverte révolutionnaire .....	3
1.2. Les acteurs moléculaires des inflammasomes .....	4
1.2.1. NLRs et ALRs, deux familles de senseurs .....	5
1.2.2. ASC, une protéine adaptatrice .....	6
1.2.3. Les caspases, enzymes effectrices des inflammasomes .....	7
1.2.4. Gasdermine D et pyroptose .....	8
1.3. Les inflammasomes en bref .....	9
1.4. Les cytokines de la famille de l'IL-1 et les inflammasomes .....	13
1.4.1. La famille de l'IL-1 .....	13
1.4.2. Les cytokines de la famille de l'IL-1, tour d'horizon .....	14
1.4.2.1. L'IL-1 $\beta$ .....	14
1.4.2.2. L'IL-1Ra, un régulateur important .....	16
1.4.2.3. IL-18.....	16
1.4.2.4. L'IL-33 et l'IL-1 $\alpha$ , des alarmines .....	17
1.4.2.5. IL-36, 37 et 38, des nouveaux membres.....	17
2. L'inflammasome NLRP3 .....	19
2.1. NLRP3, d'un point de vue moléculaire .....	19
2.2. Un senseur de multiples stress .....	21
2.3. Des voies d'activation multiple.....	22
2.3.1. La déstabilisation lysosomale .....	22
2.3.2. Les espèces réactives de l'oxygène ou ROS .....	24
2.3.3. L'hypothèse de l'efflux potassique .....	25
2.4. Des régulations multiples.....	28
2.4.1. Nécessité de plusieurs signaux .....	28
2.4.2. Contrôles transcriptionnels et post-transcriptionnels .....	29
2.4.3. Contrôles post-traductionnels .....	29
2.4.3.1. Ubiquitinylation .....	29
2.4.3.2. Phosphorylation .....	30
2.4.3.3. Intervention d'autres protéines kinases.....	31



2.4.4. D'autres voies intracellulaires .....	31
2.4.4.1. La voie calcique et AMPK .....	31
2.4.4.1. L'autophagie .....	32
2.4.5. Des régulateurs spécifiques .....	33
2.4.5.1. Les POPs et les COPs .....	33
2.4.5.2. D'autres partenaires régulateurs .....	35
2.4.6. Régulation par le système immunitaire lui-même .....	36
2.4.6.1. Les Interférons .....	36
2.4.6.2. L'immunité adaptative .....	37
3. Un autre inflammasome : AIM2 .....	40
3.1. Découverte de l'inflammasome AIM2 .....	40
3.2. Un détecteur d'ADN cytosolique .....	41
3.3. AIM2, requis dans diverses situations .....	43
3.4. Régulations .....	44
3.5. Conclusion.....	45
4. Les maladies auto-inflammatoires, une affaire d'inflammasomes .....	46
4.1. Le concept de maladies auto-inflammatoires .....	46
4.2. Les cryopyrinopathies .....	47
4.3. La goutte - transition.....	49
<b>II. La goutte, une maladie auto-inflammatoire particulière .....</b>	<b>50</b>
1. Epidémiologie et clinique de la goutte .....	51
1.1. Historique.....	51
1.2. Epidémiologie et étiologie .....	52
1.2.1 Epidémiologie .....	52
1.2.2. Etiologie de la goutte .....	53
1.2.2.1. Des mutations affectant le métabolisme de l'urate .....	54
1.2.2.2. Facteurs environnementaux .....	55
1.3. Caractéristiques cliniques de la goutte .....	57
1.3.1. Description clinique .....	57
1.3.2. Localisations et caractéristiques de l'atteinte articulaire .....	58
1.3.3. La goutte d'un point de vue clinico-biologique .....	59
1.3.4. Goutte et comorbidités .....	60
1.3.5. Complications et conséquences .....	61

2. Physiopathologie et traitements de la goutte .....	61
2.1. Les cristaux, agents étiologiques des maladies microcristallines .....	61
2.1.1. Les différents microcristaux, en bref .....	61
2.1.2. Les cristaux de MSU .....	62
2.2. Physiopathologie de la phase aiguë .....	66
2.2.1. Les cellules impliquées dans la crise de goutte .....	66
2.2.1.1. Les neutrophiles .....	66
2.2.1.2. Les monocytes et macrophages .....	68
2.2.1.3. Les autres types de cellules .....	69
2.2.2. La détection des cristaux d'urate .....	70
2.2.2.1. Activation au contact des cristaux .....	71
2.2.2.2. Les récepteurs cellulaires aux cristaux de MSU .....	71
2.2.2.3. Les voies TLRs .....	72
2.2.2.4. Les MAP kinases .....	73
2.2.2.5. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	73
2.2.3. La crise de goutte : une histoire d'IL-1 $\beta$ et beaucoup de neutrophiles .....	76
2.2.3.1. La voie IL-1 $\beta$ -IL-1R.....	76
2.2.3.1.1. L'IL1 $\beta$ est une cytokine majeure .....	76
2.2.3.1.2. Implication de l'inflammasome NLRP3 .....	77
2.2.3.1.3. L'inflammasome NLRP3, quelles limites ? .....	78
2.2.3.2. La voie CXCL1/2-CXCR2 et le recrutement des neutrophiles .....	81
2.2.3.3. D'autres médiateurs modulant le recrutement des neutrophiles.....	84
2.2.3.3.1. Les anaphylatoxines du complément .....	84
2.2.3.3.2. Les MRPs .....	84
2.2.3.3.3. L'IL-1 $\alpha$ .....	85
2.2.3.3.4. Le TNF $\alpha$ .....	85
2.3. Physiopathologie de la phase de résolution .....	87
2.3.1. La NETose, un régulateur des crises inflammatoires ? .....	87
2.3.2. Efferocytose et résolution .....	88
2.3.3. Le TGF $\beta$ .....	89
2.3.4. L'IL-37 .....	89
2.4. Physiopathologie de la goutte chronique/tophacée.....	91
2.4.1. Le tophus goutteux, une structure particulière .....	91
2.4.2. Le remodelage osseux dans la goutte chronique .....	92

2.4.3. Lésions cartilagineuses et tendineuses .....	93
2.5. Facteurs régulateurs .....	95
2.5.1 Des modulateurs épigénétiques .....	95
2.5.2. Le métabolisme, un régulateur global .....	97
3. Traitements actuels de la goutte .....	99
3.1.1. Traitements à visée anti-inflammatoire .....	99
3.1.1.1. La « bonne vieille colchicine » .....	99
3.1.1.2. Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens et les corticoïdes .....	100
3.1.1.3 Les antagonistes de l'IL-1 .....	100
3.1.2. Traitements à visée hypouricémiante .....	101
3.2. Nouvelles pistes thérapeutiques : les petits inhibiteurs de NLRP3 .....	102
<b>III. Objectifs de la thèse .....</b>	<b>104</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>107</b>
<b>L'indépendance des inflammasomes dans un modèle de goutte encourage l'emploi de stratégies ciblant l'IIIb .....</b>	<b>107</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>107</b>
A. Un modèle d'inflammation uratique aiguë périarticulaire .....	107
B. L'inflammation induite par les cristaux de MSU est indépendante de NLRP3 .....	112
C. Qu'en est-il pour les autres inflammasomes ? .....	120
D. L'imiquimod, un moyen topique de cibler l'IL-1 $\beta$ .....	124
E. L'application d'imiquimod topique montre un effet clair à l'IRM .....	128
F. L'imiquimod pourrait réduire l'expression de la pro-IL-1 $\beta$ via la synthèse d'IFN $\beta$ .....	132
G. Analyse transcriptomique des effets induits par l'imiquimod topique .....	137
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>143</b>
<i>Un modèle reproduisant certaines caractéristiques de l'accès goutteux</i> .....	143
<i>Une physiopathologie indépendante des inflammasomes</i> .....	145
<i>La synthèse de l'IL-1<math>\beta</math> est une étape centrale</i> .....	148
<i>Interférer avec la production de pro-IL-1<math>\beta</math> pour réduire l'inflammation</i> .....	150
<i>Modèle d'action de l'imiquimod topique</i> .....	153

<i>Un moyen thérapeutique local</i> .....	154
<i>Conclusion</i> .....	154

## Résultats complémentaires: l'implication de NLRP12 dans la réponse inflammatoire aux cristaux d'urate mono-sodique ..... **159**

<i>Introduction</i> .....	159
<b>1. Des fonctions régulatrices</b> .....	160
<b>2. Des rôles dans l'établissement de l'inflammation</b> .....	160
<b>3. Vers de nouveaux questionnements ?</b> .....	161
<i>Résultats</i> .....	165
<i>Conclusion et perspectives</i> .....	167

## Matériel et méthodes ..... **169**

1. Animaux et réactifs. ....	169
A) Préparation des cristaux d'urate de sodium mono-hydratés. ....	169
B) Autres réactifs. ....	170
2. Le modèle d'inflammation aiguë uratique .....	170
3. Analyse de l'inflammation locale par IRM .....	172
4. Le modèle de péritonite au MSU .....	173
5. Cytométrie en flux .....	174
6. Collecte des neutrophiles et macrophages péritonéaux de souris .....	175
7. Culture des monocytes THP1 et des MEFs .....	176
8. Activation des inflammasomes NLRP3 et AIM2 .....	176
A) Activation de l'inflammasome NLRP3 .....	176
B) Activation de l'inflammasome AIM2 .....	177
9. Tests de migration des neutrophiles .....	177
10. Expériences de transferts de surnageants .....	178
11. Western blot .....	179
a) Préparation des échantillons .....	179
b) Quantification des protéines .....	179
c) Migration sur gel .....	180
d) Transfert .....	180
e) Saturation et marquage .....	180
f) Révélation .....	180

12. Tests ELISA .....	181
13. Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR .....	182
a) Extraction des ARN totaux par la méthode Trizol-Chloroforme .....	182
b) Dosage au Nanodrop et RT-PCR .....	183
c) qPCR et analyse .....	183
14. Séquençage d'ARN .....	184
15. Analyses statistiques et logiciels utilisés .....	185
a) Analyses statistiques .....	185
b) Logiciels utilisés .....	185
Table 1 .....	185
Table 2 .....	186
<b>Bibliographie .....</b>	<b>187</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>217</b>
Publication en cours de soumission.....	217
<i>NLRP3- and AIM2-autonomy in a mouse model of gouty arthritis in vivo highlights targeting of Il-1b expression as efficient therapeutic strategy .....</i>	<i>217</i>
Publications acceptées.....	247
<i>Therapeutic Modulation of Plasmacytoid Dendritic Cells in Experimental Arthritis .....</i>	<i>247</i>
<i>Therapeutic Perspectives for Interferons and Plasmacytoid Dendritic Cells in Rheumatoid Arthritis .....</i>	<i>259</i>
<i>Anti-inflammatory effect of active nanofibrous polymeric membrane bearing nanocontainers of atorvastatin complexes .....</i>	<i>269</i>
<i>DICER1: A Key Player in Rheumatoid Arthritis, at the Crossroads of Cellular Stress, Innate Immunity, and Chronic Inflammation in Aging .....</i>	<i>293</i>
Annexe 3 - Western blot entiers .....	301

## Table des Figures

Figure 1 : Structure simplifiée des principales protéines impliquées dans la formation des inflammasomes .....	12
Figure 2 : Le clivage de l'IL-1 $\beta$ par la caspase 1 .....	15
Figure 3 : L'inflammasome NLRP3 s'assemble en une superstructure faite de filaments hélicoïdaux .....	20
Figure 4 : Plusieurs signaux mènent à l'activation de l'inflammasome NLRP3 .....	27
Figure 5 : NLRP3 est sujet à de multiples points de contrôle .....	38
Figure 6 : AIM2 forme un inflammasome en réponse à l'ADN double brin cytosolique ....	42
Figure 7 : Les inflammasomopathies .....	48
Figure 8 : Epidémiologie de la goutte .....	53
Figure 9 : Métabolisme de l'acide urique, de sa genèse à son élimination .....	56
Figure 10 : La goutte en clinique .....	58
Figure 11 : Les cristaux d'urate monosodique (MSU) en microscopie .....	64
Figure 12 : La formation des cristaux d'urate .....	65
Figure 13 : Les cristaux d'urate activent de nombreuses voies cellulaires .....	75
Figure 14 : L'IL-1 $\beta$ mature, un produit de plusieurs clivages .....	81
Figure 15 : La voie de l'IL-1 $\beta$ , un axe majeur .....	83
Figure 16 : La phase aiguë ou « crise de goutte » .....	86
Figure 17 : Phase de résolution .....	90
Figure 18 : Le tophus goutteux, une structure pathognomonique .....	94
Figure 19 : traitements de la goutte .....	103
Figure 20 : Tableau des modèles murins d'inflammation uratique aiguë .....	105
Figure RS1: Le modèle d'inflammation aiguë uratique par injection sous-cutanée de cristaux de MSU reproduit certaines caractéristiques cliniques de la goutte chez l'Homme .....	109
Figure RS2: L'inflammation aiguë uratique par injection sous-cutanée de MSU répond aux traitements de référence de l'accès goutteux .....	111
Figure R1: L'inflammasome NLRP3 n'est pas requis pour la maturation de l'IL-1 $\beta$ et l'inflammation qui en découle dans le modèle sous-cutané d'inflammation aiguë uratique .....	114
Figure RS3: L'axe PKD-NLRP3 est crucial pour la maturation de l'IL-1 $\beta$ <i>in vitro</i> .....	115
Figure RS4: NLRP3 n'a pas d'impact sur l'expression de plusieurs gènes marqueurs de l'inflammation .....	116
Figure RS5: L'inhibition pharmacologique de l'axe PKD-NLRP3 n'impacte pas le développement de l'inflammation aiguë uratique à l'instar d'une ablation de NLRP3 .....	117

Figure RS6: NLRP3 n'est pas requis lors des péritonites au MSU .....	118
Figure R2 : Aim2 n'a pas de rôle privilégié dans l'inflammation aiguë uratique et ne compense pas la perte de <i>Nlrp3</i> .....	121
Figure RS7 : L'inflammation aiguë uratique par injection sous-cutanée de MSU peut se développer indépendamment des caspases 1 et 11 .....	122
Figure R3 : La présence des neutrophiles ne favorise pas la production d'IL-1 $\beta$ par les macrophages .....	123
Figure R4: L'application topique d'imiquimod 5% décroît fortement la sévérité de l'inflammation aiguë uratique en abaissant l'expression de l' <i>Il1b</i> et de l' <i>Il6</i> .....	127
Figure R5 : L'imiquimod topique empêche totalement la formation d'œdèmes .....	130
Figure RS8 : L'imiquimod topique résout les œdèmes sous-cutanés mais aussi les ténosynovites .....	131
Figure RS9: L'imiquimod topique induit l'expression de gènes de la réponse interféron à 8hpi .....	134
Figure R6 : L'imiquimod peut décroître indirectement la sécrétion d'IL-1 $\beta$ dans un système <i>in vitro</i> .....	135
Figure R7: l'effet de l'IMQ est dépendant du récepteur IFNAR1 et peut être reproduit par l'emploi d'IFN $\beta$ recombinant .....	136
Figure RS10: Les voies d'adhésion et de diapédèse des neutrophiles sont activées par les cristaux de MSU, décrues par l'imiquimod topique .....	140
Figure RS11: L'imiquimod topique module une constellation de gènes intervenant dans l'adhésion des neutrophiles et la voie Syk-PI3K.....	141
Figure D1: Schéma du mode d'action supposé de l'imiquimod topique dans l'inflammation aiguë uratique par injections sous-cutanées de MSU .....	156
Figure NLRP12-1. La fonctionnalité de NLRP12 dans la souche B6N engendre une forte pyrexie déclenchée par l'injection de cristaux de MSU par voie sous-cutanée .....	162
Figure NLRP12-2. Le fond génétique B6N est associé à un recrutement accru de neutrophiles dans le modèle de péritonite au MSU .....	163
Figure NLRP12-3. Le fond génétique B6N est associé à une plus forte expression de <i>Cxcl1</i> et à un recrutement accru de neutrophiles .....	164
Table 1 : anticorps et kits ELISA .....	185
Table 2 : Amorces employées lors des mesures par RT-qPCR .....	186

## Liste des abréviations

3D : en trois dimensions

7-AAD: 7-amino-actinomycine D

Å : Angström

AA : amylose AA (Amyloïde sérique A)

AAT-Fc:  $\alpha$ 1-anti-trypsine-Fc

ABCG2: *ATP-binding cassette G2*

ACR: *American college of rheumatology*

ADCY: adénylate cyclase

ADN: acide désoxyribonucléique

ADN-db : ADN double brin

ADP: Adénosine Di-phosphate

AIA: *antigen-induced arthritis*

AIFEC: *autoinflammation with infantile enterocolitis*

AIM2: *Absent in melanoma 2*

AINS: anti-inflammatoires non stéroïdiens

Akt: également appelée protéine kinase B (PKB)

ALRs: *Absent in melanoma (AIM2)-like receptors*

AMPc: adénosine mono-phosphate cyclique

ANCA: anticorps anti-cytoplasme de polynucléaires neutrophiles

AP-1: *Activator protein 1*

Apo-E: *apolipoprotein E*

APDC: *4-aminopyrroline-2,4-dicarboxylate*

APAF1: *Apoptotic peptidase activating factor 1*

ARNm: Acide ribonucléiques messagers

ASC: *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD (caspase activation and recruitment domain)*

ATG: *autophagy gene* (ATG16L1 par exemple)

ATP: adenosine triphosphate

AUC: *area under curve*

AVC: accident vasculaire cérébral

B6J: C57BL/6J (Jackson)

Bcl2: *B-cell lymphoma 2*

BLIMP1: *B-lymphocyte-induced maturation protein 1*

BRCA1/2: *Breast cancer 1/2*

BRCC3: *BRCA1/2-containing complex subunit 3*

BSA: *bovine serum albumine*

C57BL/6: C57 black/6

CAD: *cis-aconitic acid decarboxylase*

CaMKs: calmodulin-kinase

CAPS: *cryopyrin associated periodic syndrome*

CARD: *caspase activation and recruitment domain*

CASR: *calcium-sensing receptor*

CCL: *C-C motif ligand*

CD: *cluster of differentiation* (ex: CD14)

C/EBP: *CCAAT-enhancer binding protein*

CIA: arthrite induite au collagène

CIAS1: *cold induced auto-inflammatory syndrome 1*

CIITA: *Class II transactivator*



CINCA/NOMID pour *chronic infantile neurologic cutaneous and articular syndrome/Neonatal onset multisystemic inflammatory disease*.

cGAMP: *cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate*

cGas: *cGAMP (cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate) synthase*

Clec12a: *C type lectin 12a*

CMA: *chaperones mediated autophagy*

CMH-II: *complexe majeur d'histocompatibilité de classe II*

CO<sub>2</sub>: *dioxyde de carbone*

COP: *CARD-only protein*

COS7L: *CV-1 in Origin with SV40*

COX2: *cyclooxygenase 2*

cPLA2 $\alpha$ : *Phospholipase A 2 $\alpha$  cytosolique*

CPP: *calcium pyrophosphate*

CREB: *cAMP response element (Cre)-binding protein*

CREBBP1: *CREB binding protein 1*

CRP: *protéine C réactive*

Ct: *cycle threshold*

CUX2: *Cut-like homeobox 2*

CXCL: *C-X-C motif ligand*

CXCR: *C-X-C motif receptor*

DAI: *DNA-dependant activator of IFN-regulatory factors*

DAG: *diacylglycérol*

DAMPs: *danger-associated molecular patterns*

DAPI: *4,6-diamino-2-phénylindone*

DECT: *Dual energy computed tomography*

DEPC: *di-éthyl pyro-carbonate*

DFG: *débit de filtration glomérulaire*

DFN: *Deafness-associated tumor suppressor*

DIRA: *Deficiency of IL-1Ra*

dKO: *double knock out*

DMEM: *Dulbecco modified Eagle medium*

DMSO: *Di-méthyl-sulfoxyde*

DNase: *Désoxyribonucléase*

DPI: *diphenylene-iodonium*

DSS: *dextrane sulfate de sodium*

EAE: *encéphalomyélite auto-immune expérimentale*

EDTA : *acide éthylène-diamine tétra-acétique*

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*

ERK: *extracellular signal regulated kinases*

FC: *Fold Change*

FCAS: *familial cold auto-inflammatory syndrome*

FKBP12: *FK506-binding protein 12*

FKLC: *familial keratosis lichenoides chronica*

FLS: *Fibroblast-Like Synoviocytes*

FMF: *fièvre méditerranéenne périodique*

FSC/SSC: *Forward scatter/Side scatter*

G-CSF: *granulocyte colony stimulating factor*

GPR43: *G-protein coupled receptor 43*

Gr1: *Granulocyte receptor 1*

GSDM: *Gasdermine*

GTPases: *Guanosine triphosphatase*

GWAS: *genome-wide association studies*

HDAC: *histone desacetylase*

HDL: High density lipoproteins

HEK193T: *Human embryonic kidney 193T*

HGPRT: *hypoxantine Guanine Phosphoribosyl-transférase*

HIV: *Human immunodeficiency virus*

HLA-DM: *human leucocyte antigen DM*

HO-1: *Heme oxigenase 1*

HRP: *horseradish peroxidase*

HSP90: *heat shock protein of 90kDa*

HTA: hypertension artérielle

HUS : hopitaux universitaires de Strasbourg

Hz: hémozoïne

ICAM1: *intercellular cell adhesion molecule 1*

ICE: *Interleukine-1 converting enzyme*

ICEBERG : aussi appelée CARD18

icIL-1Ra1 : isoforme intracellulaire de l'IL-1Ra 1

IFI16: *Interferon-gamma inducible protein 16*

IFN: Interféron (alpha, beta, gamma, lambda)

IFNAR: *Interferon alpha/beta receptor*

IgG: Immunoglobuline G

IKK $\beta$ : *I $\kappa$ B kinase  $\beta$*

I $\kappa$ B: *inhibitor of NF $\kappa$ B*

IL: interleukine

IL-XR : Interleukine-X receptor (ex : IL-1R, IL-18R).

IL-1Ra: *IL-1R antagonist*

IL-1 $\beta$ : interleukine-1 beta

IL-18: interleukine-18

IL-18BP: *IL-18 binding protein*

IL1F: *IL-1 family*

IL-1R1: *Interleukine-1 receptor 1*

IMD: *Indices of Multiple Deprivation*

IMQ: imiquimod

INCA: aussi appelée CARD17

iNOS: *inductible Nitric Oxid synthase*

InsP3: Inositol triphosphate

InsP3R : récepteur à l'inositol triphosphate

IRAK: *IL1R-associated kinases*

IRC: insuffisance rénale chronique

*Irf* : *Interferon regulatory factor*

IRG1: *Immunoresponse gene 1*

IRM : imagerie à résonance magnétique

*Itgam* : *integrin alpha m*

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

KBxN: KRN x *Non obese diabetic (NOD)*

KDa: kilo-Daltons

KO: *knock out*

LC3B: *light chain 3B*

LED: lupus érythémateux disséminé

LL-OMe: *L-leucyl-L-leucine-methyl ester*

LRR: *leucine rich repeats*

LPS: *lipopolysaccharides*

LTB4: Leukotriène B<sub>4</sub>

5-LO: 5-lipoxygénase

Ly6G: *Lymphocyte antigen 6 complex locus 6G*

MAL: *Myd88 adaptor-like*

MAMs: *mitochondrion-associated endoplasmic reticulum membranes*

MAPK: *mitogen activated protein kinases*

MAS: *syndrome d'activation macrophagique*

MAVS: *Mitochondrial antiviral signaling protein*

MCMV: *mouse cytomegalovirus*

M-CSF: *monocyte colony stimulating factor*

MCP1: *monocyte chemoattractant protein 1*

MDA5: *Melanoma differentiation associated protein 5*

MDP: *muramyl-dipeptide*

MEF: *mouse embryonic fibroblasts*

MEF2: *myocyte enhancer factor 2*

MEFV: *Mediterranean fever*

MEM: *modified Eagle medium*

MIP-1 $\alpha$ : *macrophage inflammatory protein 1 alpha*

MiR: *microRNA*

MLKL: *mixed-lineage kinase domain like*

MMP: *matrix metalloprotease*

MPO: *myéloperoxidase*

MRPs: *myeloid-related proteins*

MSU: *Monosodium urate crystals*

MTP1: *articulation métatarso-phalangienne proximale 1*

MVA: *modified vaccinia virus Ankara*

MWS: *syndrome de Muckle-Wells*

Myd88: *Myeloid differentiation primary response 88*

MSCP: *multiple self-healing palmoplantar carcinoma*

Mx: *myxovirus resistance*

NaC: *N-acetyl-cystéine*

NACHT: *Neuronal apoptosis inhibitor protein, MHC class II transcription activator, incompatibility locus protein from Podospora anserina and telomerase-associated protein.*

NaCl: *chlorure de sodium*

NADPH: *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NAIAD: *NLRP1-associated auto-inflammation with arthritis and dyskeratosis*

NAIPs: *NLR family, apoptosis inhibitor protein*

NBD: *nucleotide binding domain*

NCEP/ATPIII: *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*

NE: *élastase neutrophilique*

NEK7: *NIMA [Never in mitosis A]-related kinase 7*

NETs: *Neutrophil extracellular traps*

NF $\kappa$ B: *Nuclear factor  $\kappa$ B*

NFY: *nuclear transcription factor Y*

NHANES: *National Health And Nutrition Examination Survey*

NIK: *NF $\kappa$ B-inducing kinase*

NLRs: *Nucleotide Oligomerization Domain (NOD)-like receptors*

NLRC4: *NACHT, LRR and CARD containing 4*

NLRP3 (ou NALP3): *NACHT, LRR and pyrin containing protein 3*

NLRP12-AD: *NLRP12-associated auto-inflammatory disease*

NOD2: *Nucleotide oligomerisation domain 2*

NRF2: *Nuclear factor E2 related factor 2*

OAT: *organic acid transporter*

OB-folds: *Oligonucleotide/nucleotide-binding folds*

OCP: *octacalcium phosphate*

ODN-CpG: *oligo-dinucléotide CpG*

OPG: *osteoprotégérine*

OR: *odd ratio*

PAF: *platelet activation factor*

PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns*

PBMC: *cellules mononuclées du sang périphérique*

PBS : *phosphate buffered saline*

PCB: *cristaux de phosphate de calcium basiques*

PDE4: *phosphodiesterase 4*

PGE2: *prostaglandine E2*

pH : *potentiel d'hydrogène*

PI3K: *phosphoinositide 3 kinase*

PK: *protein kinase (A, B, C, D, N, R)*

PLC: *phospholipase C*

PNP: *purine nucléotide phosphorylase*

POP: *pyrin-only protein*

PPAR $\gamma$ : *Peroxisome proliferator activated receptor gamma*

PR: *polyarthrite rhumatoïde*

PR3: *protéinase 3*

PTEN: *Phosphatase and Tensin homolog*

PVDF: *poly-vinylidene Di-fluoride*

PYD: *pyrin domain*

PYCARD: *Pyrin and CARD domain containing protein*

PYHIN: *Pyrin and HIN-200 (Haematopoietic Interferon-inducible Nuclear antigens with 200 amino acid repeats) domain-containing protein).*

PYPAF: *Pyrin-containing APAF-1 like protein*

PRR: *pathogen-recognition receptors*

RANKL: *Receptor activator of NF $\kappa$ B ligand*

RFX5: *regulatory factor X5*

RIG-I: *Retinoic acid-induced gene 1*

RIPK1: *Receptor interacting protein kinase 1*

RLRs: *RIG-I like receptors*

RNO: *responsive to nitric oxid*

ROL: *Renal overload*

ROS: *espèces réactives de l'oxygène*

RPMI: *Roswell park memorial institute medium*

RT-qPCR: *Real time-quantitative polymerase chain reaction*

RUNX2: *Runt-related transcription factor 2*

RUE: *Renal underexcretion*

SCW: *streptococcal cell wall-induced arthritis*

SEP: sclérose en plaque

SFMCs: cellules synoviales mononuclées

SHIP1: *src* homology 2 (SH2) domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 1

SIGIRR: *Single Immunoglobulin and TIR containing*

SEM: *standard error of the mean*

SGT1: *suppressor of G2 allele of Skp1 (S-phase kinase associated protein 1)*

SLC X: *Soluble carrier family member X*

SMR: *standardized mortality rate*

Sn: surnageants

SNP: *single nucleotide polymorphism*

SOCS3: *Supressor of cytokine secretion 3*

SOD1: *superoxide dismutase 1*

ST2: récepteur à l'IL-33

STAT1: *Signal transducer and activator of transcription 1*

STING: *stimulator of interferon genes*

STA ou STA-KBxN: arthrite induite par transfert de sérum de souris KBxN

SVF: sérum de veau fœtal

Syk: *Spleen tyrosine kinase*

TISS: *Type III secretion system*

TBST: *Tris buffered saline*

Tcrb: *T cell receptor beta*

T<sub>H17</sub>: Lymphocytes T helper 17

TGFβ: *Transforming growth factor β*

THP1: lignée issue d'une leucémie monocytique aigue

TIR1: *Toll-like/IL-1R*

TLRs: *toll-like receptors*

TMB: 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine

TNFα: *Tumor necrosis factor-alpha*

TNFAIP3/A20: *Tnf-alpha induced 3*

TNFR: *TNF-receptor*

TRAF6: *TNFR (Tumor necrosis factor-receptor)-associated factor*

TRAM: *TRIF-related adaptor molecule*

TRAPS: *TNF-related periodic syndrome*

TRIF: *TIR-containing adapter inducing IFNβ*

TXNIP: *Thioredoxin-interacting protein*

URAT1: *Urate transporter 1*

3'UTR: *3' untranslated sequence*

VAS: *visual analogic score*

VCAM1: *vascular cell adhesion molecule1*

Wt: *wild type*

XO: xanthine oxydase

# **INTRODUCTION**

## **Préambule**

- I. Les inflammasomes en conditions physiologiques et pathologiques**
  
- II. La goutte, une maladie inflammatoire microcristalline**



# Introduction

## Préambule

Véritable rempart destiné à protéger l'organisme, les défenses immunitaires innées se sont constituées au cours de l'évolution. Indispensables, elles se retrouvent d'ores et déjà formidablement diversifiées chez des insectes comme *Drosophila melanogaster* – organisme modèle – ainsi illustrées par les récepteurs *toll*. La découverte des voies de l'immunité innée a ainsi mis en lumière un arsenal considérable de récepteurs dénommés PRR (*pathogen-recognition receptors*) convergeant généralement vers l'activation de la voie NFκB (*Nuclear factor κB*), engageant alors la synthèse de facteurs pro-inflammatoires. Très efficaces dans la plupart des situations, ces défenses innées sont bien souvent le seul système immunitaire que possèdent de nombreux organismes comme les insectes ; il faudra en effet attendre l'apparition des poissons à mâchoires (gnathostomes) pour voir émerger les premières ébauches d'un système immunitaire adaptatif, capable non plus de détecter des motifs communs à de nombreux pathogènes, mais cette fois-ci capable d'une reconnaissance spécifique d'un motif moléculaire donné et surtout capable de réengager une réponse en cas d'une nouvelle exposition à ce dernier.

Si les TLRs (*toll-like receptors*) sont désormais mieux connus chez de nombreux organismes, beaucoup d'autres PRR ont également été l'objet d'intenses recherches. Parmi eux, les NLRs (*Nucleotide Oligomerization Domain (NOD)-like receptors*) et les ALRs (*Absent in melanoma (AIM2)-like receptors*) se sont révélés particulièrement intéressants dans la mesure où, chez les mammifères, leur activation par un vaste répertoire de ligands conduit à la formation de superstructures moléculaires dénommées « inflammasomes ».

Décrits par Jurg Tschopp et son équipe au début des années 2000, les inflammasomes sont actuellement considérés comme des acteurs majeurs des défenses innées qu'ils orchestrent au moyen de plusieurs cytokines dont ils régissent l'activité. Telle une complication des voies *toll*, les inflammasomes et les cytokines associées donnent lieu à une réponse inflammatoire par des récepteurs aux signalisations étroitement proches de celles empruntées en aval des TLRs. En effet, l'IL-1β (interleukine-1 bêta) fut décrite comme activant l'IL-1R1 (*Interleukine-1 receptor 1*), possédant un domaine TIR1 (*Toll-like/IL-1R*) – similaire à celui présent dans la partie intra-cytoplasmique des TLRs – qui permettra la liaison à l'adaptateur Myd88 (*Myeloid differentiation primary response 88*) et l'activation de NFκB, à travers d'activation des kinases IRAK (*IL1R-associated kinases*). Ceci mènera également à



l'activation en aval de la synthèse de plusieurs facteurs pro-inflammatoires. Les inflammasomes représentent toutefois un moyen de réguler la production de ces cytokines – très inflammatoires – et de coupler leur production à la détection de stress cellulaires, de ligands d'origine infectieuse ou encore de signaux de danger. De plus, certains de ces inflammasomes furent ultérieurement décrits comme des senseurs, capables de détecter des perturbations cellulaires (ADN (acide désoxyribonucléique) cytosolique, ATP (adénosine triphosphate) extracellulaire, dommages mitochondriaux, de nombreux stress).

D'un point de vue évolutif, cela permet non seulement un contrôle local des perturbations en question mais aussi de s'affranchir des mécanismes de « détournement » exercés par certains pathogènes (mutations des potentiels ligands de PRR). En effet, leur présence s'en retrouve signalée par des écarts à l'homéostasie plutôt que par leur détection à proprement parler. Champ d'étude particulièrement excitant, la biologie des inflammasomes a également connu un formidable essor depuis la découverte de mutations dans certains de leurs composants, donnant lieu à des maladies génétiques dites « auto-inflammatoires ». Dans un même temps, et compte-tenu des rôles très largement pro-inflammatoires des cytokines que sont l'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 (également maturée par les inflammasomes), les implications pathologiques des inflammasomes n'ont cessé de croître au cours des dernières années. De même, la découverte d'un nombre considérable d'inflammasomes avérés, potentiels et la découverte continue de nouveaux régulateurs/partenaires moléculaires et ce dans des contextes allant de l'infection au cancer en font actuellement un domaine de recherche très dynamique.

## I. Les inflammasomes en conditions physiologiques et pathologiques

### 1. Vue d'ensemble

Au cours de ce chapitre, il sera question d'aborder cette diversité et de se rapprocher de la question de l'auto-inflammation – centrale dans ma thèse. J'y décrirai ces structures puis leur lien avec des pathologies auto-inflammatoires. Un accent sera tout particulièrement mis sur l'inflammasome NLRP3 (*NACHT, LRR and pyrin containing protein 3*) mais aussi AIM2 (*Absent in melanoma 2*) sur lesquels cette thèse a partiellement porté.

#### 1.1. Les inflammasomes, une découverte révolutionnaire

Si le champ de recherche concernant les inflammasomes est désormais en plein essor et semble continuellement relier ces structures à diverses pathologies (infectieuses, cancéreuses, auto-immunes, auto-inflammatoires, neurodégénératives), cette notion était tout à fait absente il y a deux décennies. Le concept d'inflammasome a émergé au début des années 2000 lorsque l'équipe de Jurg Tschopp (Lausanne, Suisse) s'est intéressé aux protéines de la famille NLRs, reliées peu de temps avant à des syndromes auto-inflammatoires, comme *CIAS1* [*cold induced auto-inflammatory syndrome 1*], autrement nommée *NALP3*, codant pour la protéine NLRP3) (**Hoffman, H.M. et al. 2001**). C'est ainsi en 2002 que parut une toute première étude reliant une protéine de la famille NLRs, ici NALP1 (NLRP1) à la constitution d'une telle structure (**Martinon, F. et al. 2002**). Cette démonstration a été réalisée en employant plusieurs techniques ; des immuno-précipitations leur ont tout d'abord permis de montrer que NALP1 pouvait lier et activer les caspases 1 et 5 ; PYCARD (*Pyrin and CARD domain containing protein*) (autrement nommée ASC [*Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD (caspase activation and recruitment domain)*]) était également capable de se fixer à la pro-caspase 1 et l'activer. Par la suite, la co-transfection simultanée de PYCARD, NALP1 et des caspases 1 et 5 dans des HEK193T (*Human embryonic kidney 193T*) a été montrée comme nécessaire afin d'engendrer une production d'IL-1 $\beta$  mature. Enfin, la formation de complexes de plus de 700kDa (kilo-Daltons) et contenant ces mêmes constituants fut directement visualisée grâce à des filtrations sur gel d'extraits de monocytes THP1 (lignée issue d'une leucémie aigue monocytique). Dans cet article, Jurg Tschopp attribua alors à cet assemblage multi-protéique le nom d'« inflammasome » en rapport au fait qu'il s'agissait (littéralement traduit) d'un complexe inductible de haut poids moléculaire contenant NALP1, PYCARD et des caspases pro-inflammatoires.

Dans la même année, une autre étude réalisée par les équipes du Pr. Mc. Dermott et de Jurg Tschopp fut publiée et associait également des mutations de NALP3 à l'occurrence des syndromes auto-inflammatoires que sont le syndrome de Muckle-Wells et l'urticaire familiale induite par le froid (FCAS) (**Aganna, E. et al. 2002**). En 2004, une nouvelle étude fut publiée et montra alors que NALP3 mais aussi NALP2 pouvaient se lier à la caspase 1, toutefois, la dépendance d'ASC fut ici clairement démontrée. Ainsi, des transfections en HEK293T ne donnaient lieu à un clivage de la pro-forme de l'IL-1 $\beta$  qu'après transfection d'une protéine NALP (1, 2 ou 3) et d'ASC. Des co-immunoprécipitations ont ensuite révélé la présence de complexes contenant à la fois ASC, NALP3 et la caspase 1, des résultats similaires ont été obtenus avec NALP2 (**Agostini, L., Martinon, F., et al. 2004**). De manière intéressante, des macrophages issus de patients atteints du syndrome de Muckle-Wells ont été montrés comme sécrétant davantage d'IL-1 $\beta$  mature que des macrophages contrôles sous stimulation au LPS (lipopolysaccharides).

Après cette découverte, les voies convergeant vers l'activation des inflammasomes et surtout les différents agents causaux de cette activation ont été progressivement décrits. Dans cette démarche, l'équipe de Jurg Tschopp s'est encore particulièrement démarquée en caractérisant les activateurs de NALP3 (NLRP3) (revue de **Dagenais, M. et al. 2012**). Ainsi, NLRP3 est à ce jour l'inflammasome le mieux connu. Toutefois, plusieurs autres inflammasomes ont été découverts plus tard comme AIM2 ou encore NLRC4 (*NACHT, LRR and CARD containing 4*) et la compréhension des mécanismes les régulant et des complexes les impliquant est également un champ de recherche en constante expansion.

## 1.2. Les acteurs moléculaires des inflammasomes

Les inflammasomes sont de véritables plateformes multimoléculaires dont le rôle est de réaliser le clivage (maturation) de pro-cytokines, présentes sous forme de zymogènes, en une autre forme (plus ou moins bioactive). Cette fonction est finement régulée et doit, dans des conditions physiologiques, se déclencher dans les conditions appropriées et dans des proportions adéquates pour permettre l'élimination du stress mais sans pour autant provoquer des dommages additionnels – compromis fondateur de la réponse immunitaire. En effet, lorsque trop faible, elle expose l'individu à un sur-risque infectieux, en revanche, son action prolongée ou trop intense peut mener à des dommages cellulaires et tissulaires non souhaités. Les inflammasomes sont constitués de plusieurs acteurs que sont 1) un senseur, 2) une protéine adaptatrice, et 3) une enzyme, la caspase 1, dont la présence est requise en vue de la réalisation du clivage protéolytique. La caspase 11 a aussi été montrée comme importante

dans certaines conditions, formant ce que l'on appelle l'inflammasome non canonique. S'y associent plusieurs autres acteurs aux fonctions plutôt régulatrices (NEK7 (*NIMA [Never in mitosis A]-related kinase 7*) par exemple). Ces inflammasomes activent ainsi la production de certaines cytokines (IL-1 $\beta$  et IL-18 notamment) ainsi que certaines protéines (gasdermines) dont l'action va aboutir au relargage des cytokines alors activées dans le milieu extracellulaire. Ce dernier processus appelé pyroptose sera ultérieurement décrit brièvement.

Dans cette partie, j'y aborderai les éléments moléculaires (1.2.1 senseurs, 1.2.2. adaptateur, 1.2.3. Les caspases, 1.2.4. gasdermines), (1.3.) les inflammasomes en tant que tels et (1.4.) les cytokines de la famille de l'IL-1 dont plusieurs membres sont l'objet d'une activation réalisée au moyen des inflammasomes.

### 1.2.1. NLRs et ALRs, deux familles de senseurs

Les senseurs appartiennent à deux familles de protéines différentes, les NLRs pour *Nucleotide binding domain and leucine-rich repeat containing receptors* et les PYHIN (*Pyrin and HIN-200 (Haematopoietic Interferon-inducible Nuclear antigens with 200 amino acid repeats) domain-containing protein*).

Les premiers comprennent 22 membres chez l'Homme et davantage chez la souris (**Schroeder, K. and Tschopp, J. 2010**). Ils sont scindés en quatre groupes distincts que sont NLRA, NLRB, NLRP et NLRC. Alors que les NLRA et NLRB n'interviennent pas, du moins directement, dans la formation des inflammasomes connus à ce jour, les NLRP et NLRPC contiennent respectivement un domaine pyrine et un domaine CARD (*Caspase recruitment and activation domain*) permettant la liaison directe ou non à la caspase 1, enzyme effectrice commune à beaucoup d'inflammasomes. Ainsi, ces deux sous-types peuvent former de telles structures : NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRP6, NLRP12 ; NOD2 (*Nucleotide oligomerisation domain 2*) (CARD15) (**Tuncer, S. et al. 2014**) serait aussi capable de former son propre inflammasome.

Les NLRA sont représentés par la protéine CIITA (*Class II transactivator*) au rôle primordial dans l'expression du CMH-II (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II) à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. Exprimé par les macrophages, lymphocytes B et T, et cellules dendritiques, CIITA peut former un complexe avec la protéine CREB (*cAMP response element (Cre)-binding protein*), CREBBP1 (*CREB binding protein 1*), RFX5 (*regulatory factor X5*), et NFY (*nuclear transcription factor Y*) au niveau du promoteur du CMH-II et de HLA-DM (*human leucocyte antigen DM*) permettant leur expression. La perte

de ce gène est par ailleurs associée au syndrome des lymphocytes nus de type II, un déficit immunitaire sévère. Les NLRB incluent notamment les NAIPs (*NLR family, apoptosis inhibitor protein*) connus comme permettant l'activation de NLRC4 en exerçant le rôle d'intermédiaire dans la reconnaissance et la liaison des cibles de ce dernier (exemple : flageline). La structure des NLRA et NLRB est un peu différente de celle des autres NLRs à l'exception des éléments communs que sont le LRR (*leucine rich repeats*) et le NBD (*nucleotide binding domain*) (Tuncer, S. et al. 2014).

Les PYHIN, quant à eux, comprennent 13 membres chez la souris et 4 chez l'Homme (Schroeder, K. and Tschopp, J. 2010). Ils se caractérisent par le port d'un domaine HIN (AIM2) ou deux (IFI16 (*Interferon-gamma inducible protein 16*)) et d'un domaine pyrine (PYD). Exprimés chez les mammifères placentaires et marsupiaux, AIM2 semble en être le représentant le plus conservé ; des disparités sont toutefois notées entre les mammifères (AIM2 déficient chez les vaches, moutons, porcs, chats, chiens et dauphins ; ALRs absents chez les chauves-souris) (Lugrin, J. and Martinon, F. 2018). Parmi les inflammasomes les mieux caractérisés, AIM2 est désormais un membre phare permettant notamment la réponse à l'ADN double-brin, étranger ou non, lorsque ce dernier accède au compartiment cytosolique.

### 1.2.2. ASC, une protéine adaptatrice

ASC (*Apoptosis-related speck-like protein containing a CARD (caspase recruitment and activation domain)*, aussi dénommée PYCARD) est une protéine adaptatrice caractéristique des inflammasomes où elle joue un rôle majeur. Composée d'un domaine pyrine (PYD) et d'un domaine CARD (d'où son ancien nom de PYCARD), elle est ainsi capable de réunir en un même complexe les protéines possédant un de ces deux domaines. Sa nécessité fut démontrée notamment dans étude publiée en 2002. Les auteurs firent la démonstration de la capacité d'ASC à lier la caspase 1 via des interactions homotypiques de type CARD-CARD et à engager son clivage et la production d'IL-1 $\beta$  sous forme mature. Dans un système reconstitué en cellules HEK (caspase et pro-IL-1 $\beta$ ), une protéine contenant ASC<sup>CARD</sup> fusionné à trois domaines FKBP12 (*FK506-binding protein 12*) – s'oligomérisant sous l'effet d'un traitement à AP20187 – fut capable d'enclencher la production d'IL-1 $\beta$  mature. La construction équivalente renfermant ASC<sup>PYD</sup> en fut incapable. Cela permis de conclure à l'activation de la caspase 1 par ASC et à la nécessité d'un processus d'oligomérisation dans cette activation (Srinivasula, S.M. et al. 2002).

Dans le cas de l'inflammasome NLRP3, sa position est ainsi centrale dans la mesure où NLRP3 – ne contenant pas de domaine CARD – est incapable à lui seul de contacter la caspase 1 entre-autre. Ce n'est toutefois pas le cas pour l'inflammasome NLRC4 où la présence d'un domaine CARD permet la liaison directe de ce dernier à la caspase ; de manière intéressante, ASC joue un rôle amplificateur dans cette réaction en permettant la formation de plus amples complexes. Affectée d'un poids moléculaire de 22kDa à l'état monomérique, ASC est souvent visualisée – lors d'expériences d'électrophorèses non-dénaturantes – sous forme de plusieurs bandes correspondant à des multimères sous activation. Il est ainsi désormais bien reconnu que la protéine ASC est capable de former de très larges structures tubulaires par polymérisation selon un mode dit « *prion-like* ». L'établissement de telles superstructures donne *in fine* lieu à la liaison de nombreux monomères de caspase 1 et à leur activation massive. En immunofluorescence, un marquage spécifique d'ASC permet généralement la visualisation d'un spot unique, témoin de sa polymérisation. Ce type de phénomène est visible après activation de chacun des inflammasomes dépendant de cette protéine (**Lugrin, J. and Martinon, F. 2018**).

### 1.2.3. Les caspases, enzymes effectrices des inflammasomes

Les caspases correspondent à un groupe de protéases possédant, au niveau de leur partie N-terminale, un domaine CARD ; ce sont typiquement des protéases à cystéine produites au départ sous forme de zymogènes inactifs (**Lugrin, J. and Martinon, F. 2018**). Ces enzymes furent tout d'abord documentées comme les protéases effectrices de l'apoptose, au cours de laquelle la caspase 8 (apoptose extrinsèque) et la caspase 9 (apoptose intrinsèque) peuvent former des dimères en vue d'une maturation par auto-clivage. De manière intéressante, ces protéines sont également capables de s'assembler, avec le cytochrome C et la protéine APAF1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*), en un complexe dénommé *apoptosome*, très similaire à l'inflammasome. L'apoptosome fut le premier étudié et une source d'inspiration pour la découverte et la conception des inflammasomes, qui quant à eux, activent la caspase 1 (**Lugrin, J. and Martinon, F. 2018**). La caspase 1 (anciennement appelée ICE ou *Interleukine-1 converting enzyme*) a été clonée en 1992 (**Cerretti, D.P. et al. 1992**). Il s'agit d'une protéine de 50kDa, conservée entre l'Homme et la souris et dont l'activation se fait par dimérisation et auto-clivage en deux sous-unités p10 et p20 qui pourront alors s'assembler en tétramères p10/p20 (**Schroder, K. and Tschopp, J. 2010**). Ces derniers sont alors dédiés à la maturation des pro-cytokines en leur forme mature (IL-1 $\beta$ , IL-18 en leurs formes actives) ainsi qu'au clivage de la Gasdermine D (pyroptose).

De manière intéressante, la caspase 1 n'est pas la seule caspase impliquée dans ce processus. En effet, la caspase 11 (chez la souris) mais aussi les caspases 4 et 5 chez l'Homme sont capables de suppléer la caspase 1. Cet effet est d'ailleurs reconnu pour plusieurs inflammasomes. La caspase 11 est ainsi impliquée dans la formation d'un inflammasome dit non canonique (**Kayagaki, N. et al. 2011**).

#### 1.2.4. Gasdermine D et pyroptose

En aval de l'activation des caspases, le relargage des cytokines pro-inflammatoires alors maturées (IL-1 $\beta$ , IL-18 notamment) a lieu. Toutefois, l'absence d'un peptide signal dans la séquence polypeptidique de ces deux cytokines laissait largement supposer un mécanisme de sécrétion non conventionnel.

Une mort cellulaire très originale, enclenchée en aval de l'activation des caspases (caspase 1 mais aussi caspase 11 chez la souris et les caspases 4 et 5 chez l'Homme) s'est révélée capable de mener à cette libération. La pyroptose, telle qu'elle fut nommée, se présente comme une mort cellulaire immunogène aux caractéristiques typiques d'une nécrose programmée. Typique des cellules myéloïdes, elle est décrite comme impliquant un gonflement cellulaire (contrairement à l'apoptose) provoqué par l'apparition à la surface cellulaire de pores (un peu moins de 15nm) formés par la fraction N-terminale d'une protéine dénommée la Gasdermine D (GSDMD). Cette dernière sera notamment l'objet d'un clivage protéolytique par les diverses caspases listées ci-dessus après activation au sein d'un inflammasome (NLRP3, AIM2, NLRC4 etc.) ou d'un inflammasome non-canonique (Caspase 11, activée par le LPS), libérant alors la fraction d'intérêt. Les pores alors constitués (16 protomères de GSDMD clivée, 12-14nm de diamètre interne) donnent lieu à une rupture des gradients osmotiques de part et d'autre de la membrane plasmique aboutissant en une entrée d'eau et un gonflement cellulaire.

D'un point de vue moléculaire, les gasdermines comme GSDMD sont constituées d'une fraction N-terminale et d'une fraction C-terminale, aux fonctions auto-inhibitrices, reliées entre elles par une section clivable par les caspases. A priori, les différentes gasdermines (GSDMA, B, C, DFNA5 (*Deafness-associated tumor suppressor*) et DFNB59) seraient toutes capables de former des pores membranaires à condition que le clivage puisse avoir lieu ; cependant, seule la GSDMD semble posséder ce site de clivage et DFNB59 ne possède tout simplement pas de domaine C-terminal.

Conservées chez les mammifères, il est néanmoins intéressant de noter que ces molécules ne semblent pas seulement impliquées dans la pyroptose, comme l'indique leur expression majoritairement intestinale (épithéliums). De plus, des défauts en DFNB59 donnent lieu – tout comme des gains de fonction de DFNA5 – à des surdités, qui dans le premier cas ne semblent pas en lien avec des modifications de la pyroptose. En revanche, la GSDMD fut associée à l'occurrence de chocs septiques. (Shi, J., Gao, W. and Shao, F. 2017)

### 1.3. Les inflammasomes en bref

Parmi les inflammasomes, l'inflammasome **NLRP3** est le plus connu. Il répond à de nombreux stimuli arborant des formes très variables (cristaux, métabolites, polluants, toxines, stress cellulaires, parois bactériennes) et semble relié à un nombre impressionnant de pathologies et de contextes différents. La présence de mutations de type « gain de fonction » dans ce locus engendre des pathologies auto-inflammatoires dénommées CAPS (*cryopyrin associated periodic syndrome*) ou cryopyrinopathies. On y distingue le FCAS pour *familial cold auto-inflammatory syndrome*, le syndrome de Muckle-Wells et le CINCA/NOMID pour *chronic infantile neurologic, cutaneous and articular syndrome/Neonatal onset multisystemic inflammatory disease*.

L'inflammasome **NLRC4** est, quant à lui, activé par des produits bactériens notamment par la bactérie *Salmonella enterica* au travers de la flageline et de son système de sécrétion de type III (TIIIS). Pour s'activer, NLRC4 requiert des NAIPs (évoqués précédemment) afin de lier ces éléments et d'enclencher la formation de l'inflammasome NLRC4. Muté chez l'Homme, il est responsable d'apparition des syndromes auto-inflammatoires associant des colites mais aussi des syndromes d'activation macrophagique récurrents (AIFEC, *autoinflammation with infantile enterocolitis* et NLRC4-MAS, *NLRC4-Macrophage activation syndrome*).

**NLRP1** fut le premier NLRs caractérisé et est requis dans la réponse induite par le pathogène *Bacillus anthracis*. NLRP1 est alors capable de former un inflammasome et de déclencher la production successive d'IL-1 $\beta$  après exposition à la toxine létale de cette bactérie. Cette toxine, dont l'entrée est permise par une autre toxine (au rôle perméabilisant), est capable de cliver NLRP1 au niveau N-terminal et cela conduit à l'activation de cette protéine. Chez la souris, trois paralogues (NLRP1a-c) ont été découverts et sont aussi capables de former un inflammasome, de manière intéressante, NLRP1a semble même pouvoir le faire sans la protéine adaptatrice ASC. NLRP1 semble aussi jouer un rôle dans la lutte contre *Toxoplasma gondii*, ainsi sa mutation donne lieu à une susceptibilité accrue à ce parasite. Dans d'autres



contextes, des mutations de NLRP1 chez l'Homme sont retrouvées dans certaines maladies comme la NAIAD (*NLRP1-associated auto-inflammation with arthritis and dyskeratosis*), MSCP (*multiple self-healing palmoplantar carcinoma*) et FKLC (*familial keratosis lichenoides chronica*), plus généralement, ses polymorphismes sont associés à la polyarthrite rhumatoïde (PR), maladie d'Addison, maladie de Crohn, vitiligo et sclérodémie systémique (De Torre-Minguela, C., Mesa del Castillo, P. and Pelegrin, P., 2017).

NLRP6 et NLRP12, de leur côté, sont considérés comme impliqués dans la formation d'inflammasomes. Ceci a ainsi été démontré par la même équipe en 2002. La démonstration que NLRP12 – autrement nommée PYPAF7 (*Pyrin-containing APAF-1 like protein 7*) – pouvait s'associer à la caspase 1 et ASC et engendrer la production d'IL-1 $\beta$  mature a été ainsi réalisée au moyen de transfections de ces différents éléments en cellules COS7L (*CV-1 in Origin with SV40*). Cette production était impossible si la caspase 1 était dépourvue de domaine PYRIN, avait une mutation empêchant son activation ou après usage de l'inhibiteur de caspase 1 z-WEHD. Dans cet article, ASC fut aussi relié à l'activation de la caspase 1 de manière dose dépendante (Wang, L. et al. 2002). La découverte de la formation d'un inflammasome par PYPAF5 (NLRP6) fut réalisée exactement de la même manière et par cette même équipe (Grenier, J.M. et al. 2002) où seule PYPAF5 fut capable de mener à l'activation de la caspase 1 via ASC contrairement à PYPAF1-4 et 6.

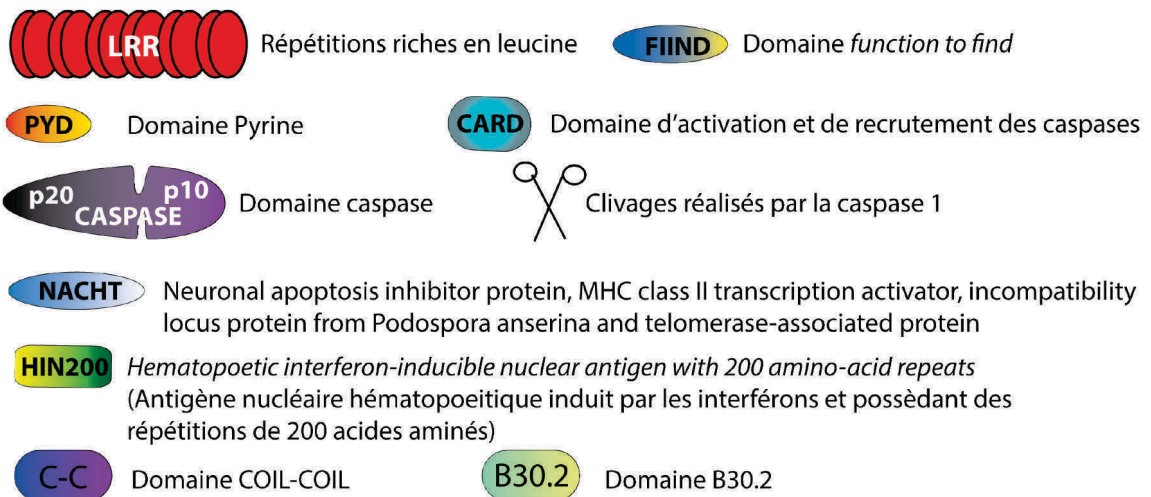
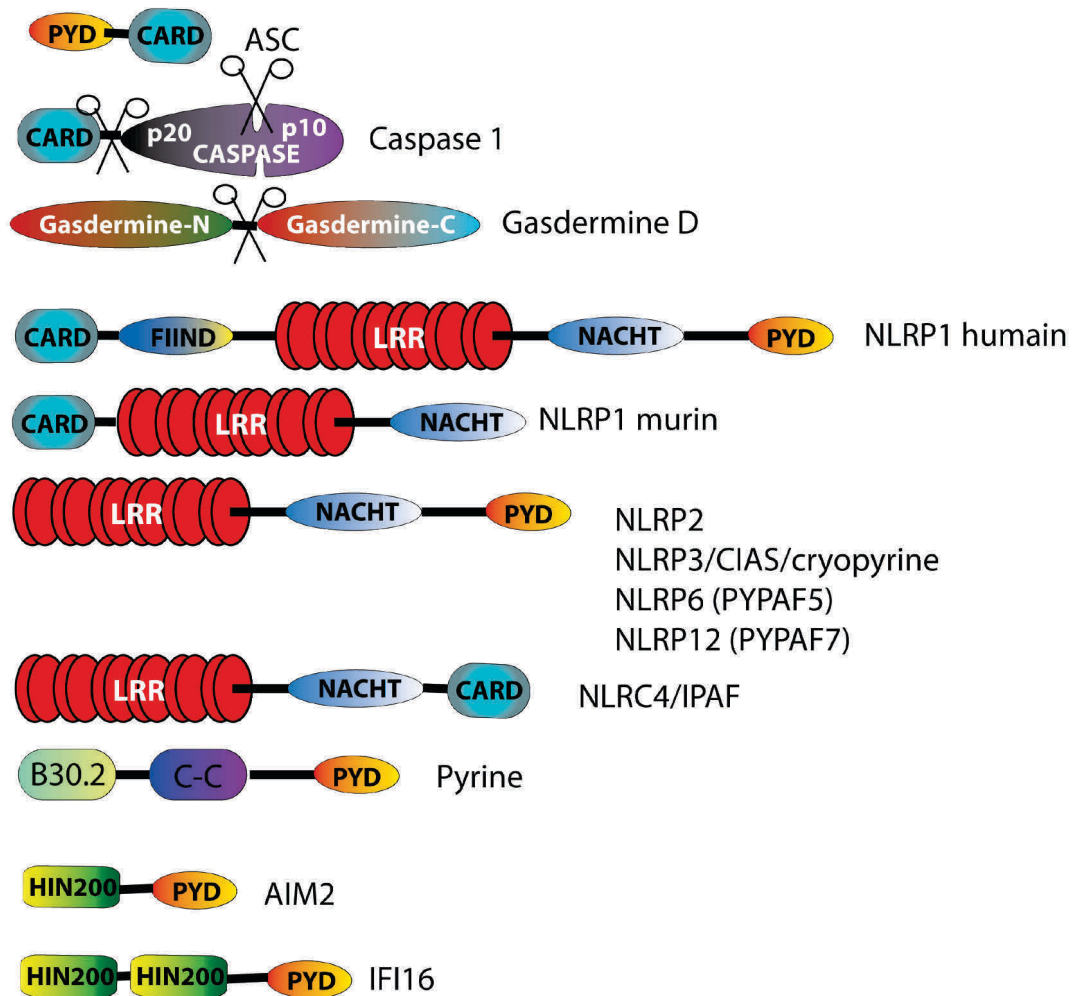
Paradoxalement, et de manière toujours controversée, NLRP12 et 6 ont été principalement décrits tels des régulateurs négatifs des réponses inflammatoires, principalement au travers d'un effet inhibiteur sur la voie NF $\kappa$ B (Lich, J.D. et al. 2007 ; Tuncer, S. et al. 2014). Exprimés au niveau intestinal, leur rôle a été envisagé à ce niveau par de nombreuses équipes de recherche (Sharma, D. and Kanneganti, T.D., 2016), ainsi, leur perte fut montrée comme exacerbant les colites et carcinogénèses coliques induites (modèle au DSS, dextrane sulfate de sodium, et au mélange d'azoxyméthane et DSS respectivement). Dans le cadre de NLRP6, sa perte semble principalement résulter en des dysbioses (Tuncer, S. et al. 2014); des mutations de type « perte de fonction » de NLRP12 sont également responsables de maladies auto-inflammatoires semblables au FCAS dénommées FCAS2 ou NLRP12-AD (*NLRP12-associated auto-inflammatory disease*) (Shen, M. et al. 2017).

Récemment, NLRP12 a été reliée à la production de la chimiokine CXCL1 (*C-X-C motif ligand 1*), aux rôles importants dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles. Ceci fut illustré dans le cadre de l'infection à *Kliebsiella pneumoniae* où les souris NLRP12<sup>-/-</sup> furent plus susceptibles à l'infection de par un déficit dans le recrutement des neutrophiles (Cai, S.

*et al.* 2016). Chez les souris B6J (C57BL/6J), une mutation ponctuelle dans le gène NLRP12 a été retrouvée et semble considérablement diminuer le recrutement des neutrophiles dans le cas de l'infection à *Francisella tularensis* et à la suite d'injections de LPS, une baisse de la production de CXCL1 était constatée (Ulland, T.K. *et al.* 2016).

La **pyrine**, codée par le gène *MEFV* (*Mediterranean fever*), est une protéine désormais connue pour ses capacités à former un inflammasome. L'inflammasome pyrine, ainsi appelé, est activé après la reconnaissance de GTPases (*Guanosine triphosphatase*) Rho modifiées par des enzymes émanant de certaines bactéries (*Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*, *Histophilus somni* ou encore *Vibrio parahaemolyticus*). Dans ce contexte, la pyrine est alors capable de lier les GTPases Rho modifiées, là où la forme native n'est pas reconnue. Par ailleurs, certains auteurs ont pu montrer une régulation de la pyrine par des protéines de type 14-3-3, des protéines ayant de l'affinité pour des substrats phosphorylés, les séquestrant ainsi en dehors de leurs voies de signalisation respectives. Ainsi, l'activation de la pyrine pourrait passer par la déphosphorylation de cette dernière (Sharma, D. and Kanneganti, T.D., 2016). De manière intéressante, les Rho GTPases en question furent ensuite montrées comme capable d'initier la phosphorylation de la pyrine par le biais des kinases PKN1 (*protein kinase NI*) et PKN2 ; les bactéries capables de modifier ces Rho GTPases sont alors capables de rompre de mécanisme suppresseur et ainsi d'activer l'inflammasome pyrine (De Torre-Minguela, C., Mesa del Castillo, P. and Pelegrin, P., 2017). Le gène *MEFV*, codant la pyrine, est la cible de nombreuses mutations donnant lieu à des dermatoses neutrophiliques et à la fièvre méditerranéenne périodique (FMP ou FMF).

Les structures des différents éléments moléculaires décrits ci-dessus sont présentées à la **Figure 1**.



**ASC:** *apoptosis-related speck-like protein containing a CARD* (protéine semblable à Speck reliée à l'apoptose et contenant un domaine CARD)

**NLRP3:** *NACHT, LRR and pyrin-containing protein 3* (protéine contenant les domaines NACHT, LRR et pyrine numéro 3)

**AIM2:** *absent in melanoma* (Absent dans le mélanome)

A partir des informations de Shi, J. *et al.* 2017 (Gasdermine), Schroder, K. and Tschopp, J. 2010, De Torre-Minguela, C. *et al.* 2017 et Strowig, T. *et al.* 2012 pour les autres protéines.

## **Figure 1 : Structure simplifiée des principales protéines impliquées dans la formation**

**des inflammasomes.** Les protéines ci-dessus sont impliquées dans la formation des différents inflammasomes, on y retrouve ASC (PYCARD) possédant à la fois les domaines pyrine (PYD) et CARD nécessaires à établir des liaisons homotypiques avec la caspase 1 (CARD) et les senseurs de la famille NLRP (PYD) et les ALRs que sont AIM2 et IFI16 (PYD). Les senseurs de la famille NLRP sont très similaires avec la présence d'un domaine riche en leucine (LRR) et d'un domaine de liaison des nucléotides (NBD ou NACHT) ainsi que d'un domaine PYD. NLRC4 possède en revanche un domaine CARD, permettant un contact direct avec la caspase 1, ASC est malgré tout impliquée dans la formation de l'inflammasome NLRC4 en amplifiant le signal. Les ALRs, quant à eux, possèdent un ou plusieurs domaines HIN200 dédiés à la liaison à l'ADN, et un domaine PYD. Enfin, la Gasdermine D (GSDMD) possède deux domaines (N-terminal et C-terminal) dont le premier est impliqué dans la pyroptose en formant des pores dans la membrane plasmique. La caspase 1 est une enzyme majeure dans la mesure où elle va procéder à son auto-clivage et à celui de la GSDMD.

### 1.4. Les cytokines de la famille de l'IL-1 et les inflammasomes

#### 1.4.1. La famille de l'IL-1

Si l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 matures figurent tels des produits de l'activation des inflammasomes, ces cytokines appartiennent à un groupe beaucoup plus large : les cytokines de la famille de l'IL-1. Cette famille de cytokines s'est considérablement agrandie au cours du temps, comptant désormais pas moins de 11 cytokines aux fonctions diverses ; une nomenclature IL1F (*IL-1 family*) leur a été attribuée afin de rendre compte de l'appartenance des derniers membres identifiés aux cytokines précédemment définies comme telles (**Sims, J.E. et al. 2001**).

On dénombre ainsi à ce jour l'IL-1 $\alpha$  (IL-1F1), IL-1 $\beta$  (IL-1F2), IL-1Ra (récepteur antagoniste) (IL-1F3), IL-18 (IL-1F4) et IL-1F5-F11 désormais connues respectivement sous les noms d'IL-36Ra (récepteur antagoniste), IL-36 $\alpha$ , IL-37, IL-36 $\beta$ , IL-36 $\gamma$ , IL-38 et IL-33 (**Dinarello, C. et al. 2010**).

Localisées sur le chromosome 2 humain comme murin (excepté l'IL-33 : 19 murin et 9 humain et l'IL-18 : 9 murin et 11 humain), ces dernières ont toutes en commun la présence d'un motif dit *trefoil* fait de 12 feuillets  $\beta$  en position C-terminale. Néanmoins, il est important de noter que toutes ces cytokines ne nécessitent pas d'être clivée lors de l'activation d'un inflammasome, en effet, d'autres enzymes peuvent très bien activer ces dernières. Ainsi, l'IL-18 et IL-1 $\beta$  sont rendues matures et bioactives par clivage (caspase 1, d'autres caspases et même d'autres enzymes (protéases comme la chymase, protéinase 3, métalloprotéases)) tout comme l'IL-36 et son récepteur antagoniste (par divers protéases) ou encore l'IL-1 $\alpha$  (par la calpaine) (**Palomo, J. et al. 2015**). La cytokine IL-38 serait également clivée mais la protéase qui en est responsable n'est pas encore identifiée. Les effets biologiques de ces cytokines sont

divers et déterminés par les signalisations en aval des récepteurs à ces dernières, eux même faisant partie-intégrante de la famille de l'IL-1R dont 10 membres ont été découverts. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer IL-1R1, récepteur à l'IL-1 $\beta$  et à l'IL-1 $\alpha$ , IL-18R $\alpha/\beta$ , formant le récepteur à l'IL-18, IL-36R, à l'IL-36, ou encore ST2, fixant l'IL-33. Enfin, il existe également des récepteurs « leurre » comme IL-1R2 ou encore IL-18BP (*IL-18 binding protein*) aux fonctions régulatrices (**Palomo, J. et al. 2015**).

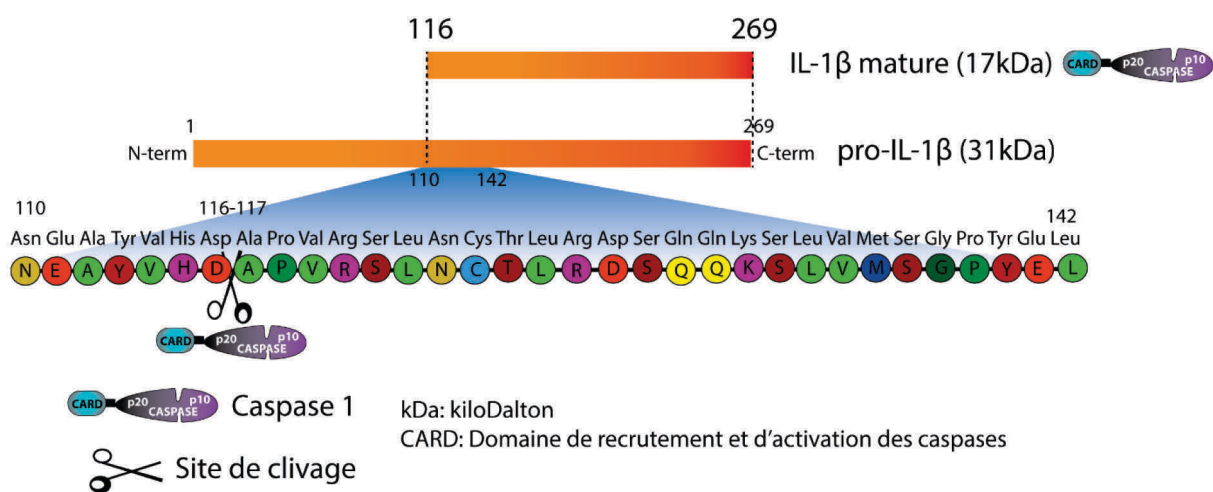
#### 1.4.2. Les cytokines de la famille de l'IL-1, tour d'horizon

##### 1.4.2.1. L'IL-1 $\beta$

L'IL-1 $\beta$  est ainsi produite sous forme d'une pro-protéine, de 31kDa, à partir de laquelle est généré le fragment actif de 17kDa (portion C-terminale) après action de la caspase 1 ou 11 (voir **Figure 2**). Toutefois, des clivages ne faisant pas intervenir les caspases ont été également documentés (protéases extracellulaires). Etant donné que cette cytokine, tout comme beaucoup d'autres membres de la famille de l'IL-1, ne possède pas de peptide signal, elle est, par conséquent, dans l'impossibilité d'être sécrétée selon les voies conventionnelles. Plusieurs études ont montré que son relargage pouvait avoir lieu lors de la mort cellulaire par pyroptose.

Découverte dans les années 1940, l'IL-1 $\beta$  est une cytokine aux rôles pléiotropes et ses sources sont diverses (monocytes/macrophages, neutrophiles, à la suite de stimulation par des ligands de TLRs ou des cytokines). Ses multiples actions sont permises par le récepteur IL-1R1, possédant dans sa région intra-cytoplasmique, un domaine TIR (*Toll-like/IL-1R*). L'engagement d'une signalisation en aval faisant intervenir l'adaptateur Myd88, les kinases IRAK et la protéine TRAF6 (*TNFR (Tumor necrosis factor-receptor)-associated factor 6*) aboutissent ensuite à l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B, à l'origine des effets biologiques de cette cytokine. Elle est associée à des effets allant de l'initiation de l'inflammation locale (recrutement des cellules immunitaires, activation de l'endothélium, synthèse d'autres médiateurs inflammatoires) à de nombreux effets systémiques (hypotension, fièvre, neutrophilie, thrombocytose ; (**Dinarello, C.A. 1996** ; revue de **Gabay, C. et al. 2010**). Connue principalement pour ses propriétés pyrogènes, l'IL-1 au sens large (IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ ) a d'abord été dénommée « pyrogène endogène » ou « pyrogène leucocytaire » ou encore de « pyrexine ». Dans les années 1980, il fut ainsi montré que l'IL-1 était en mesure d'activer la production de prostaglandines au niveau cérébral, un mécanisme qui fut relié à cette capacité pyrogène (**Dinarello, C.A. and Bernheim, H.A. 1982**). D'autres substances furent aussi qualifiées de pyrogène comme la cachectine (désormais appelée TNF $\alpha$  (*Tumor necrosis*

*factor-alpha*)) ou l'IFN $\alpha$  (Interféron-alpha), néanmoins, le premier fut montré comme activant la synthèse d'IL-1 *in vivo* comme *in vitro* (Dinarello, C.A. *et al.* 1986). Toujours au niveau systémique, il a été montré que l'interleukine 1 pouvait enclencher la synthèse de protéines de la phase aigüe par le foie. De manière intéressante, l'IL-1 $\beta$  fut montrée comme étant capable d'induire la production d'IL-1Ra (*IL-1R antagonist*) de manière synergique avec l'IL-6 en activant les facteurs de transcription NF $\kappa$ B et C/EBP (*CCAAT-enhancer binding protein*) au niveau hépatique faisant de l'IL-1Ra une protéine de la phase aigüe (Gabay, C. *et al.* 1997). De nombreux rôles lui sont aussi attribués sur le versant du métabolisme osseux auquel elle participe activement en renforçant l'ostéoclastogenèse. Ceci est particulièrement important dans le mesure où certaines pathologies, telle la polyarthrite rhumatoïde (PR), conduisent à des dommages ostéo-cartilagineux très importants par l'action de nombreux médiateurs (TNF $\alpha$ , IL-17, RANKL (*Receptor activator of NF $\kappa$ B ligand*)) mais aussi via l'IL-1. Cruciale, cette cytokine a été associée aux réponses immunitaires dans une pléthore de situations pathologiques allant de l'infection (candidose) à l'auto-immunité (polyarthrite rhumatoïde) et à l'auto-inflammation (maladies auto-inflammatoires mono-géniques).



Adapté de Stehlik, C. *et al.* 2009, séquence issue de Mizutani, H. *et al.* 1991

**Figure 2 : Le clivage de l'IL-1 $\beta$  par la caspase 1.** La pro-IL-1 $\beta$  est produite sous la forme l'un polypeptide de 269 acides aminés (31kDa) et son clivage par la caspase 1 mènera à production de l'IL-1 $\beta$  mature et bioactive sous forme d'un fragment de 153 acides aminés (117-269) faisant 17kDa. Le clivage par la caspase 1 a lieu entre l'Aspartate 116 et l'Alanine 117.

#### 1.4.2.2.L'IL-1Ra, un régulateur important

L'IL-1Ra (Interleukine-1 Récepteur antagoniste) est une protéine soluble aux rôles régulateurs de l'action des cytokines IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  en se liant au récepteur IL-1R1, d'ordinaire engagé par ces cytokines. Présentant un peptide signal, l'IL-1Ra est sécrété par les voies conventionnelles et ce par les monocytes/macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques et cellules épithéliales. Crucial quant à la régulation de l'inflammation, la perte de ce facteur est connue pour engendrer une maladie auto-inflammatoire infantile sévère dénommée DIRA (*Deficiency of IL-1Ra*) due à une inflammation non-contrôlée (**Gabay, C. et al. 2010**). L'IL-1Ra semble intervenir dans plusieurs contextes pathologiques parmi lesquels nous pouvons citer l'arthrite. Il fut ainsi montré que l'IL-1Ra était exprimé dans les articulations de souris avant et après la survenue de l'arthrite induite au collagène (CIA), de plus, le ratio des ARNm (Acide ribonucléiques messagers) IL-1 $\beta$ /IL-1Ra était corrélé aux scores cliniques et abaissé lors de la phase de résolution. Dans ce même article, icIL-1Ra1 – une isoforme intracellulaire de l'IL-1Ra – n'était exprimée que dans les pattes arthritiques et semblait corrélée à la survenue de la phase de résolution (**Gabay, C. et al. 2001**). Alors qu'une surexpression de l'IL-1Ra ou d'une de ses isoformes intracellulaires (icIL-1Ra1) abolissait l'arthrite CIA (**Palmer, G. et al. 2003**), inversement, une déficience globale en IL-1Ra ou uniquement dans les cellules myéloïdes a été montrée comme suffisant pour augmenter la sévérité de l'arthrite induite par transfert de sérum de souris KBxN (STA) (**Lamacchia, C. et al. 2012**). De nombreuses autres preuves ont également relié l'IL-1Ra à la polyarthrite rhumatoïde, l'usage de stratégies bloquant l'IL-1 s'est toutefois avérée assez peu efficace. Actuellement, ces thérapies trouvent davantage leur place dans les maladies auto-inflammatoires où la dérégulation des voies IL-1 $\beta$ -IL-1R est centrale, l'anakinra (IL-1Ra recombinant) est également efficace dans la goutte (**So, A. et al. 2007**).

#### 1.4.2.3. IL-18

L'IL-18 est une autre cytokine de la famille de l'IL-1 et dont le clivage est dépendant de la caspase 1. Cette dernière est reliée à la réponse antivirale à travers l'induction notamment de l'IFN $\gamma$  (interféron-gamma). L'IL-18 est là aussi sécrétée d'une manière non conventionnelle et exerce ses rôles biologiques en se liant au récepteur IL-18R $\alpha/\beta$  permettant alors d'enclencher une signalisation en aval faisant intervenir Myd88 et aboutissant en l'activation de NF $\kappa$ B. L'IL-18 a son propre régulateur – l'IL-18BP (*IL-18 binding protein*) – dont la fonction est de se lier à l'IL-18 et ainsi d'empêcher sa liaison au récepteur IL-18R (**Arend, W.P. et al. 2008**). Récemment, l'IL-18BP a été reliée à la régulation de l'IL-18 dans le

contexte du syndrome d'activation macrophagique (MAS). Ainsi, l'administration d'oligonucléotides CpG (ODN-CpG) à 3 reprises provoque un MAS plus sévère chez des souris IL-18BP<sup>-/-</sup>, saines à l'état basal, que chez les souris Wt (*wild type*) ce qui fut alors reversé par l'emploi d'anticorps anti-IL-18 et anti-IFN $\gamma$  (**Girard-Guyonvarc'h, C. et al. 2018**). D'une manière générale, l'IL-18 a été reliée à de nombreux contextes pathologiques dont des maladies auto-inflammatoires (maladie de Still par exemple).

#### 1.4.2.4. L'IL-33 et l'IL-1 $\alpha$ , des alarmines

Contrairement à l'IL-1 $\beta$  et à l'IL-18, l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-33 ne sont pas activées au moyen de la caspase 1. Ces cytokines se présentent davantage comme des alarmines – des molécules endogènes se comportant comme des signaux de danger – externalisées au cours de la mort cellulaire et ainsi capables d'amorcer les réponses immunitaires de manière précoce. Clivée par la calpaine et des enzymes issues des neutrophiles, l'IL-1 $\alpha$  exerce des rôles biologiques très similaires à ceux de l'IL-1 $\beta$  en liant le récepteur IL-1R1, engageant la signalisation menant à NF $\kappa$ B (**Gabay, C. et al. 2010**). L'IL-33, quant à elle, exerce ses rôles via le récepteur ST2 ; le récepteur sST2 – soluble – agit comme un leurre, limitant l'action de l'IL-33. L'IL-33 a été montrée comme délétère dans l'asthme, ainsi étudié dans le modèle d'asthme induit par les poussières de mite, un allergène couramment employé (**Madouri, F. et al. 2015**). Elle semble aussi s'illustrer dans des conditions variées comme les maladies allergiques, la rectocolite hémorragique, et la polyarthrite rhumatoïde (**Palmer, G. and Gabay, C. 2011**).

#### 1.4.2.5. IL-36, 37 et 38, des nouveaux membres

Découvertes il y a une vingtaine d'années, les cytokines IL-36 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), l'IL-36Ra, l'IL-37 et l'IL-38 commencent à être mieux caractérisées. Les IL-36 se présentent, tout comme l'IL-36Ra, telles des facteurs solubles dont l'activité est accrue à la suite d'un clivage, possiblement réalisé par divers caspases et protéases comme cela a ainsi été montré par **Clancy, D.M. et al. (2017)**. Ces cytokines n'empruntent pas les voies de sécrétion conventionnelles dans la mesure où elles ne possèdent pas de peptide signal, elles enclenchent ensuite des réponses cellulaires en se liant au récepteur IL-36, commun aux trois IL-36. La signalisation en aval repose sur l'activation de NF $\kappa$ B ; de manière intéressante, l'IL-36Ra se comporte comme un récepteur « leurre », entrant en compétition avec le récepteur à la manière du système IL-1R1-IL-1Ra. Exprimées dans la peau, ces cytokines semblent intervenir principalement dans ce tissu et ont été principalement associées au développement



du psoriasis. Ainsi, la présence de mutations dans l'IL-36Ra engendre un psoriasis pustuleux généralisé, dû à une dérégulation des réponses permises par l'IL-36 (**Bassoy, E.Y. et al. 2018**).

L'IL-37 et l'IL-38 sont moins bien caractérisées et connues pour des fonctions davantage anti-inflammatoires. Plusieurs articles ont attribué à l'IL-37 des fonctions régulatrices impliquant le récepteur IL-18R $\alpha$  et le récepteur inhibiteur IL-1R8, autrement appelé TIR8 ou SIGIRR (*Single Immunoglobulin and TIR containing*). Dans un modèle murin d'arthrite goutteuse, une efficacité de l'IL-37 humaine recombinante (rhIL-37) est capable de freiner l'inflammation en modulant l'axe IL1R8-SOCS3 (*Supressor of cytokine secretion 3*)-Metk donnant ainsi des résultats précliniques intéressants (**Liu, L. et al. 2016**). L'IL-37 s'est aussi illustrée dans d'autres contextes pathologiques.

L'IL-38, quant à elle, se présente comme une protéine de 18kDa, clivée et relargée au cours des processus apoptotiques ; néanmoins aucune protéase n'a été assignée à cette étape. L'IL-38 semble pouvoir se lier à plusieurs récepteurs afin d'enclencher une réponse biologique (IL-36R, IL-1R1 et IL-1RAPL1/TIGIRR2) de nature plutôt inhibitrice (en se liant à IL-36R par exemple). L'IL-38 a été reliées à l'inflammation lors d'arthrites expérimentales (STA, CIA et *antigen-induced* ou AIA) où sa surexpression mena à une arthrite diminuée dans deux des trois modèles conjointement à une baisse des cytokines T<sub>H17</sub> (Lymphocytes T helper 17) (IL-17A, IL-23). Cette baisse fut aussi observée chez des THP1 surexprimant cette cytokine (**Boutet, M.A. et al. 2017**).

Au final, les cytokines de la famille de l'IL-1 s'illustrent dans leur diversité et leurs régulations, visant à limiter tout excès inflammatoire. La présence de récepteurs antagonistes, de récepteurs leurres ainsi que de cytokines directement inhibitrices sous-tend cette notion ; ainsi, des perturbations de cette fonction (dans le cas des déficits en IL-1Ra et IL-36Ra par exemple) donnent lieu à de sévères maladies inflammatoires comme le DIRA. Les cytokines de la famille de l'IL-1 semblent intervenir dans de nombreux contextes pathologiques et les rôles de certaines d'entre elles devraient être mieux caractérisés dans les prochaines années.

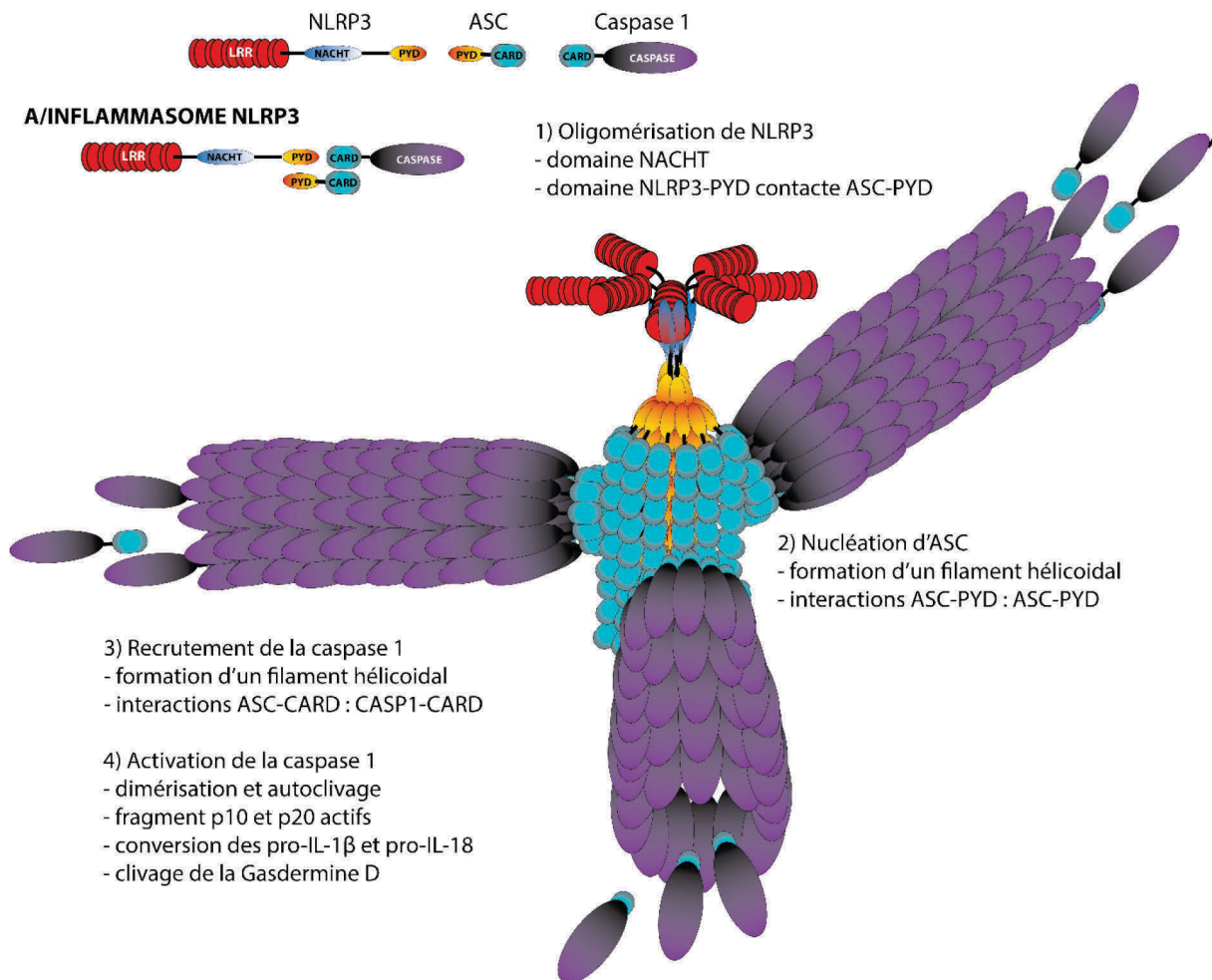
## 2. L'inflammasome NLRP3

### 2.1. NLRP3, d'un point de vue moléculaire

Au sein de la formidable diversité des PRRs (*Pattern recognition receptors*, récepteurs reconnaissant des motifs conservés entre différents pathogènes) se dresse une classe de récepteurs aux fonctions très diverses appelés NLRs pour *nucleotide-binding domain and leucin-rich repeat containing receptors*. Parmi ceux-ci, NLRP3 est un des plus connus. Codé par le gène *NALP3* (*NACHT-, LRR- and Pyrine-containing 3*) situé sur le bras long du chromosome 1 (position 1q44), la protéine NLRP3 contient de sa partie C-terminale à N-terminale : un motif riche en leucine (LRR), un site permettant la liaison de l'ATP dénommé NBD pour *nucleotide bonding domain*, et un domaine Pyrine (PYD). Présent dans de nombreux types cellulaires (phagocytes mononuclées, polynucléaires neutrophiles), l'inflammasome NLRP3 est à l'heure actuelle le mieux connu. Il renferme les protéines ASC (*Apoptosis-related Speck-like protein containing a Caspase-recruitment domain (CARD)*) et la Caspase 1 dont l'oligomérisation aura lieu suivant la détection par NLRP3 d'un signal activateur. NLRP3 est localisée au niveau du réticulum endoplasmique et, lors de son activation par un stimulus, le cytosquelette (microtubules et dynéine) sera mobilisé afin de la rapprocher d'ASC et de la caspase 1, plutôt localisés au niveau des mitochondries. L'assemblage de l'inflammasome par oligomérisation de ses composants mènera alors à l'émergence de grosses structures appelées *specks* où ASC joue un rôle prépondérant.

L'oligomérisation de l'inflammasome NLRP3 (mais aussi de AIM2) a été montrée lors de plusieurs travaux mais sa structure ternaire (senseur, ASC et Caspase1) a été particulièrement bien décrite en 2014 (Lu, A. *et al.* 2014). Dans une étude élégante, les auteurs ont visualisé la formation de structures filamenteuses hélicoïdales par le domaine pyrine d'ASC (ASC<sup>PYD</sup>) lorsque ce dernier était en présence d'AIM2 ou de NLRP3. La présence des senseurs à l'extrémité de ces filaments d'ASC<sup>PYD</sup> a ensuite laissé supposer que ces senseurs constituaient le point de nucléation. De manière surprenante, alors que cette nucléation était dépendante de la présence d'ADN double-brin pour AIM2, le domaine NACHT de NLRP3 fut clairement requis dans ce processus. L'étude *in vitro* du complexe ternaire (AIM2/NLRP3, ASC, caspase1) permis ensuite de visualiser des superstructures en forme d'étoiles dont le centre contenait ASC et les branches la caspase 1 après marquage par des billes d'or colloïdal et microscopie électronique (représentation schématique à la **Figure 3**) (Lu, A. *et al.* 2014). Cette étude a ainsi décrit avec précision l'assemblage des inflammasomes NLRP3 et AIM2 mais aussi confirmé l'importance des interactions entre les NLRP3/AIM2<sup>PYD</sup> et ASC<sup>PYD</sup>.

Au final, l'inflammasome NLRP3 semble donc s'assembler en un complexe multi-protéique, formant alors une vaste plateforme dédiée à la maturation des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18 et au déclenchement de la pyroptose à travers le clivage d'effecteurs comme la gasdermine D. Néanmoins, cette représentation obtenue *in vitro* peut être probablement un peu différente *in vivo*, où les éléments ne sont pas surexprimés ni introduits sous des formes tronquées (Elliott, E. and Sutterwala, F.S. 2015).



**Figure 3 : L'inflammasome NLRP3 s'assemble en une superstructure faite de filaments hélicoïdaux.** L'assemblage de l'inflammasome NLRP3 *in vitro* se fait en plusieurs étapes : 1) sous l'influence d'un signal activant NLRP3, celui-ci va s'oligomériser (heptamère), 2) ASC va alors se lier via des interactions PYD-PYD puis 3) la caspase 1 rejoindra ensuite le complexe en établissant des interactions CARD-CARD. L'auto-clivage de la caspase 1 aura ensuite lieu et aboutira en la formation des fragments p10 et p20 dont les tétramères (p10/p20) seront capables de cliver les cytokines pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 ainsi que la Gasdermine D. Le modèle proposé ci-dessus est celui décrit par Lu, A. *et al.* 2014, le schéma est ainsi adapté de la représentation figurant dans la publication en question. Il y fut décrit que l'inflammasome NLRP3 s'assemblait en une superstructure impliquant la polymérisation d'ASC et de la caspase 1 selon des filaments hélicoïdaux

caractéristiques ; ceux-ci prennent alors la forme d'une étoile donc le centre est constitué par les protéines ASC et les branches par les filaments de Caspase 1.

## 2.2. Un senseur de multiples stress

L'inflammasome NLRP3 est un senseur très particulier et, à ce jour, ses voies d'activation restent parfois mal comprises. Son activation repose sur la présence de deux signaux : **un premier signal dit « signal I » ou « priming »** est apporté par de nombreuses molécules (microbiennes, signaux de danger) activant les voies TLRs ou d'autres menant à la production d'IL-1 $\beta$  et facilitant l'activation ultérieure de NLRP3 ; le **second (« signal II »)** est apporté, dans le cadre de NLRP3 par de multiples agents chimiques ou physiques. Dans cette sous-partie, il est question de faire un tour d'horizon de ces différents agonistes de NLRP3.

La première substance connue pour activer l'inflammasome NLRP3 fut vraisemblablement le muramyl-dipeptide (MDP), un produit bactérien issu de la dégradation des peptidoglycanes. Ainsi, à l'inverse du LPS ultra-pur, le MDP – contenu dans le LPS cru - a été décrit comme capable de mener à l'activation de la caspase 1 et à la maturation de l'IL-1 $\beta$  par les cellules THP1. De plus, la production d'IL-1 $\beta$  s'est révélée dépendante de la transfection simultanée des éléments ASC, Caspase1 et NLRP3 dans les cellules HEK293T attestant ainsi de la dépendance de NLRP3 dans ce processus (**Martinon, F. et al. 2004**). Un autre type d'activateur de NLRP3 fut également découvert dans le début des années 2000 grâce aux travaux de Fabio Martinon (équipe de Jurg Tschopp), travaux de référence, fréquemment cités dans la littérature. Ainsi, les agents cristallins comme les cristaux d'urate mono-sodiques (UMS ou MSU en anglais) – responsable de la goutte – ou encore les cristaux de pyrophosphate de calcium (CPP, responsables du rhumatisme à pyrophosphate de calcium) ont été montrés comme activant l'inflammasome NLRP3. Les macrophages péritonéaux issus de souris invalidées génétiquement pour *Nalp3* (codant NLRP3), *Asc* et *Casp1* étaient ainsi incapables de produire de l'IL-1 $\beta$  en réponse à ces substances cristallines (**Martinon, F. et al. 2006**). Ces résultats obtenus *in vitro* ont depuis été très largement répliqués et sont désormais bien admis dans la littérature. D'autres substances formant ce que l'on peut dénommer du matériel particulaire ont également été montrées comme activant cet inflammasome : les cristaux de cholestérol (**Duewel, P. et al. 2010**), les cristaux d'hémozoiné (**Dostert, C. et al. 2009**), les adjuvants particuliers comme l'alum, poly(lactide-co-glycolide) et les microparticules de polystyrène (**Sharp., F.A. et al. 2009**), l'asbeste – connue pour provoquer l'asbestose (maladie de l'amiante) (**Dostert, C. et al. 2008**), la silice (**Dostert, C. et al. 2008**) et les nanoparticules de Silice et de Titane (nano-SiO<sub>2</sub> et nano-TiO<sub>2</sub>) (**Yazdi, A.S. et al.**

2010). D'autre part, certains pathogènes comme *Candida albicans* – agent causal de la candidose – ou bien *Saccharomyces cerevisiae*, se sont révélés capables d'activer l'inflammasome NLRP3. Ce processus a été ainsi décrit comme impliquant la protéine kinase Syk (*Spleen tyrosine kinase*), probablement activée en aval de plusieurs récepteurs comme les lectines de type C (**Gross, O. et al. 2009**). D'autres travaux ont également montré que l'activation de l'inflammasome NLRP3 pouvait avoir lieu en présence d'ARN bactériens. De manière intéressante, leur présence dans le cytosol a été montrée comme permise par un mécanisme de fuite lysosomale, révélateur de la virulence des agents infectieux en question. Cela fut ainsi démontré par l'exposition de macrophages à la bactérie *Escherichia coli* qui n'active NLRP3 uniquement si celle-ci est vivante ou bien inactivée thermiquement et adjointe à des ARN bactériens. L'ajout de RNase annule cet effet (**Sander, L.E. et al. 2011**). Par ailleurs, l'exposition de macrophages au virus influenza est aussi capable d'activer la production d'IL-1 $\beta$  de manière NLRP3 dépendante via l'action du canal viral M2, affectant alors le pH de l'appareil de Golgi (**Ichinohe, T. et al. 2010**).

Des métabolites comme l'adénosine triphosphate (ATP) – activant le récepteur purinergique P2X7 – ou les toxines formant des pores comme la nigéricine ou la gramycidine sont également des activateurs bien décrits de NLRP3. Les variations de l'osmolarité, en particulier, constituent des agents physiques pouvant également activer ce complexe. Cela a été démontré à travers plusieurs expériences montrant le déclenchement d'une production robuste d'IL-1 $\beta$  *in vitro* (macrophages) et *in vivo* (péritonites) via l'exposition à un stress hypertonique (NaCl, glucose). Cet effet a été attribué à l'activation des inflammasomes NLRP3 et NLRC4 (avec activation de la caspase 1) dans un mécanisme impliquant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) mitochondriaux (**Ip, E.W.K. and Medzhitov, R. 2015**).

### 2.3. Des voies d'activation multiple

#### 2.3.1. La déstabilisation lysosomale

Au vu du nombre considérable d'agents capables d'activer l'inflammasome NLRP3, un véritable paradigme s'est constitué autour de ce point clé. En effet, il est assez peu probable que toutes ces substances entrent en interaction directement avec la protéine NLRP3. Ainsi, plusieurs hypothèses ont été formulées. Il est vraisemblable que plusieurs de ces acteurs, notamment les agents cristallins, seraient en mesure d'être phagocytés et de déstabiliser les phagolysosomes (**Hornung, V. and Latz, E. 2010**). La phagocytose a d'abord été démontrée comme importante face à tous les agonistes de NLRP3 de nature particulière. La

cytochalasine D – inhibant la phagocytose – bloque ainsi l’activation de NLRP3 en réponse à l’Hémozoïne (**Dostert, C. et al. 2009**), aux nanoparticules de titane et de silice (**Yazdi, A.S. et al. 2010**), à la silice et à l’asbeste (et au MSU mais pas à la nigericine) (**Dostert, C. et al. 2008**), aux cristaux de cholestérol (**Duewel, P. et al. 2010**) et à l’alum (**Sharp, F.A. et al. 2009**). Pour plusieurs de ces activateurs, ceci a été relié à l’apparition de dommages lysosomaux. La production d’IL-1 $\beta$  par des cellules dendritiques en réponse à plusieurs types de particules (telle l’alum) s’est ainsi avérée dépendante de l’acidification des phagolysosomes. En effet, le blocage de la phagocytose (cytochalasines B et D), de l’acidification lysosomale (bafilomycine A) ou de la cathépsine B (CA-074-Me) ont été en mesure de décroître cette production (**Sharp, F.A. et al. 2009**). Les mêmes arguments ont été évoqués dans le cas de la réponse induite par les particules de silice et les sels d’aluminium (**Hornung, V. et al. 2008**). Dans cette publication, un autre exemple – très intéressant – a été employé afin d’étayer l’hypothèse de la rupture lysosomale. A cette fin, les auteurs ont soumis des cellules à deux types de stress (exposition au dipeptide LL-OMe (*L-leucyl-L-leucine-methyl ester*) ; choc osmotique) afin d’engendrer une rupture des lysosomes sans besoin d’un agent particulaire. Dans les deux cas, le clivage de la caspase 1/production d’IL-1 $\beta$  engendrés par ces procédés est partiellement abrogé par l’emploi d’un inhibiteur de cathépsine B et totalement par la perte de NLRP3. D’autres articles ont par ailleurs étendu ce constat aux réponses à l’asbeste et aux cristaux de cholestérol (**Strowig, T. et al. 2012**, **Duewel, P. et al. 2010**).

Ces données semblent donc montrer une importance de la voie de rupture lysosomale, via laquelle les enzymes comme la cathépsine B notamment pourraient enclencher l’activation de l’inflammasome NLRP3. Néanmoins, certaines données semblent montrer que de nombreuses cathépsines pourraient intervenir lors de l’activation de l’inflammasome NLRP3 et que la réduction observée après usage de l’inhibiteur précité ne serait pas due seulement à un blocage de la cathépsine B mais aussi de plusieurs autres (**Orlowski, G.M. et al. 2015**). De plus, ces inhibiteurs (CA-074-Me et K777) auraient également des répercussions sur les étapes de priming (expression de *Nlrp3* et de *Il1b*). Ces résultats sont donc à nuancer.

### 2.3.2. Les espèces réactives de l'oxygène ou ROS

Les ROS semblent importants dans l'activation de NLRP3 mais leur action reste toutefois controversée. L'action des ROS a ainsi été proposée lors de plusieurs travaux. En 2007, une équipe a ainsi mis en évidence la production de ROS dans des macrophages activés par l'ATP – un activateur classique de NLRP3 – ce qui fut reversé par l'ajout de l'antioxydant NaC (N-acetyl-cystéine). Suite à l'ajout d'ATP, l'activation de la caspase 1 et la production d'IL-1 $\beta$  qui en découlent furent efficacement inhibés par le diphenylene-iodonium (DPI, inhibiteur de NADPH oxydase) ainsi que par le blocage des protéines kinases ERK (*extracellular signal regulated kinases*) et PI3K (*phosphoinositide 3 kinase*). Cela semblait ainsi mettre en lumière une signalisation impliquant les ROS, l'activation des voies PI3K/Akt (Akt, aussi nommée PKB pour protéine kinase B) et l'activation d'ERK en amont de l'activation de la caspase 1 (**Cruz, C.M. et al. 2007**). Par ailleurs, plusieurs publications de l'équipe de Jurg Tschopp ont ensuite fait mention de l'inhibition de l'activation de l'inflammasome NLRP3 suite à des stratégies visant la production de ROS. Ainsi, en réponse à des agents cristallins comme l'Asbeste et la silice (et aussi MSU) (**Dostert, C. et al. 2008**) ou encore l'Hémozoine (**Dostert, C. et al. 2009**), la perte de la sous-unité p22phox (NADPH oxydase) abolissait le clivage de la caspase 1 et la production d'IL-1 $\beta$ . L'usage de NaC ou d'inhibiteurs de ROS (APDC ou *4-aminopyrroline-2,4-dicarboxylate*) aboli aussi cela en réponse à l'asbeste mais aussi au MSU et l'ATP (**Dostert, C. et al. 2008**). Lors de l'infection par le virus influenza A, l'action du canal ionique viral M2 conduisant à la neutralisation du pH du *trans*-Golgi, fut montrée comme entraînant la production de ROS conjointement à un efflux potassique. Ce processus culminait alors en l'activation de l'inflammasome NLRP3 ; cela illustre ainsi la potentielle contribution des ROS et des flux ioniques dans ce phénomène (**Strowig, T. et al. 2012**). Par ailleurs, une production de ROS fut également mentionnée dans le cadre de l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse à des organismes fongiques comme *Candida albicans*. Dans ce cadre, la kinase Syk était cruciale pour la synthèse de la pro-forme de l'IL-1 $\beta$  (Card9-dépendante) ainsi que pour l'activation de la caspase 1 (production de ROS de manière Card9-indépendante) (**Gross, O. et al. 2009**). Enfin, l'interaction entre NLRP3 et la protéine TXNIP (*Thioredoxin-interacting protein*) fut montrée en 2010 et associée à l'activité de NLRP3 ; les macrophages de souris *Txnip*<sup>-/-</sup> étaient ainsi incapables de produire de l'IL-1 $\beta$  en réponse à plusieurs activateurs de NLRP3. Dans ce mécanisme, la production de ROS (induite par plusieurs agonistes de NLRP3) abolissait la liaison unissant TXNIP à la thioredoxine, aboutissant en l'association de TXNIP à NLRP3 et à la production d'IL-1 $\beta$  ; cet

effet pouvait d'ailleurs être obtenu par le traitement de macrophages avec du peroxyde d'hydrogène seul (Zhou, R. *et al.* 2010).

Ensemble, ces données montrent donc que la production de ROS est loin d'être anecdotique en réponse à un vaste panel d'agonistes de NLRP3 (de l'ATP aux agents particuliers), la NADPH oxydase pourrait en être la source. Toutefois, si cette enzyme est bien reliée à la production de ROS, la mitochondrie est un compartiment cellulaire pouvant en regorger. En effet, un parallèle entre la présence de mitochondries défectueuses et l'activation de l'inflammasome NLRP3 a d'emblée été fait. Plusieurs travaux semblent montrer que la présence de ces dernières pourrait aboutir en la libération incongrue d'ADN mitochondrial et de ROS alors capables d'engager l'activation de la caspase 1 (Nakahira, K *et al.* 2011). De même, une série de publications a clairement montré une corrélation inverse entre l'activité autophagique (élimination des mitochondries défectueuses) et l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Saitoh, T. *et al.* 2008 ; Nakahira, K *et al.* 2011, Shi, C.S. *et al.* 2012 ; Harris, J. *et al.* 2011). Par ailleurs, la libération de l'ADN mitochondrial, oxydé par ces même ROS, a été incriminée dans l'activation de NLRP3 via une interaction directe. Il fut ainsi montré que les cellules activées par certains agonistes de NLRP3 comme l'ATP subissaient des perturbations mitochondriales analogues à celles retrouvées lors de l'apoptose (perte du gradient de potentiel). La manipulation de l'expression de Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*), aux rôles anti-apoptotiques, se répercuta alors sur la production d'IL-1 $\beta$ . Dans les expériences suivantes, les auteurs montrèrent alors que de l'ADN mitochondrial oxydé – issu des mitochondries – pouvait atteindre le cytosol et se fixer directement sur NLRP3, l'activant ainsi (Shimada, K. *et al.* 2012). Ensemble, ces données montrent donc un rôle des mitochondries quant à l'activation d'NLRP3, à travers la production de ROS mais aussi d'ADN oxydé sous leur effet.

Au final, l'hypothèse selon laquelle les ROS activeraient l'inflammasome NLRP3 apparaît telle une explication séduisante mais néanmoins controversée. En effet, d'autres mécanismes comme l'efflux potassique ont aussi été évoqués et semblent assez conservés entre les différents activateurs, menant à penser qu'ils pourraient jouer un rôle prépondérant. Enfin, les mécanismes par lesquels les ROS activeraient NLRP3 demeurent encore assez troubles.

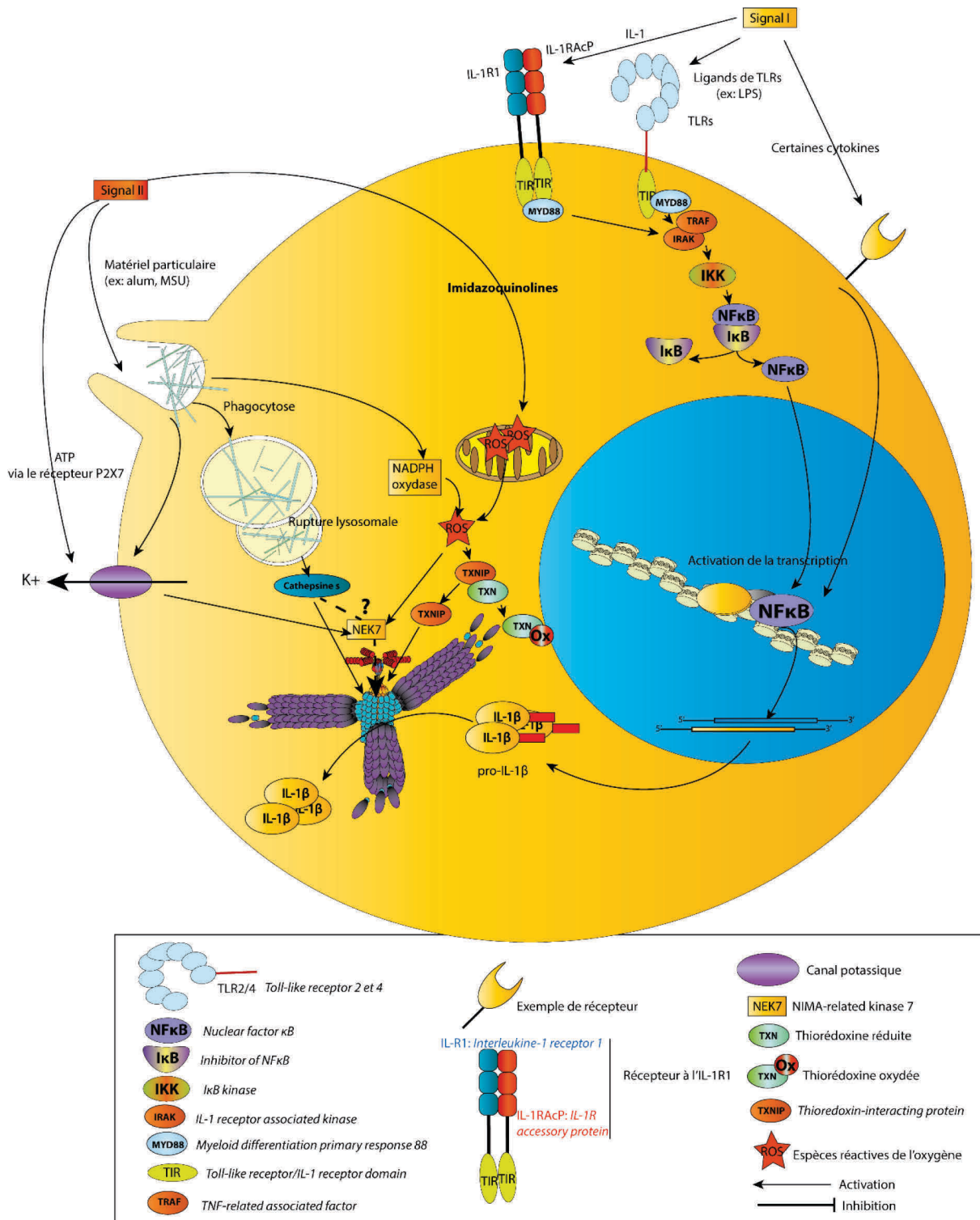
### 2.3.3. L'hypothèse de l'efflux potassique

D'autre part, l'initiation d'un efflux de potassium par ces mêmes agents pourrait aussi constituer un mécanisme alternatif. Cela a par exemple été mis en relief par certaines molécules telles que les toxines formant des pores comme la nigéricine qui perméabilisent



ainsi la membrane plasmique et rendent alors possible un efflux de potassium vers l'extérieur puisque ce dernier est plus concentré dans le cytosol que dans le milieu extracellulaire. L'équipe de Jurg Tschopp a ainsi évoqué ce mécanisme lors d'un article dédié, montrant qu'une hausse du potassium extracellulaire bloquait NLRP3 spécifiquement en réponse à de nombreux activateurs (ATP, MSU, Peptidoglycanes) et ce en empêchant l'activation de la caspase 1 (**Petrilli, V. et al. 2007**). Dans d'autres articles de cette même équipe, l'hémozoïne (**Dostert, C. et al. 2009**), l'Asbeste et la silice (**Dostert, C. et al. 2008**), l'alum (**Sharp, F.A. et al. 2009**) ainsi que *Candida albicans* (**Gross, O. et al. 2009**) ont été montrés comme incapables d'activer l'inflammasome NLRP3 si le potassium extracellulaire était artificiellement accru. De manière intéressante, tous les activateurs de l'inflammasome NLRP3 testés parmi un large panel d'agonistes se sont avérés déclencher un efflux potassique faisant de ce mécanisme un point-clé dans ce processus et le seul réellement commun (**Munoz-Planillo, R. et al. 2013**). Dans ce dernier article, les auteurs ont ainsi montré qu'une chute du potassium intracellulaire a lieu juste avant l'activation de l'inflammasome NLRP3 par de très nombreux stimuli allant des toxines formant des pores (nigéricine, gramicidine,  $\alpha$ -Hemolysine, aerolysine) jusqu'à du matériel particulaire (cristaux de CPP, silice, oxyde d'Aluminium ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ )), des molécules déstabilisant les lysosomes (LL-OMe) ou encore de l'ATP. En revanche, aucun des autres mécanismes testés dans leur étude (production de ROS, perturbations mitochondriales, ouverture de larges pores non sélectifs, influx sodique) n'était strictement requis pour tous les activateurs ; inversement, l'incubation dans un milieu pauvre en  $\text{K}^+$  - stimulant alors l'efflux – était tout à fait suffisante. Toutefois, il n'est pas forcément à exclure que ces agonistes activent NLRP3 par des voies différentes ou spécifiques. De plus, une découverte étonnante a récemment bouleversé l'hypothèse selon laquelle l'efflux potassique était l'acteur commun et nécessaire pour l'activation de NLRP3. En effet, les molécules de la famille des imidazoquinolines (comme l'Imiquimod, CL097) ont été décrites comme des activateurs de l'inflammasome NLRP3 d'une manière indépendante de TLR7 mais dépendante de la protéine NEK7 et de la production de ROS en provenance des mitochondries. L'influx potassique ne fut absolument pas requis dans ces conditions, contrastant largement avec les autres activateurs de NLRP3. Ainsi, ceci semble indiquer que l'activation de NLRP3 ne dépend pas uniquement de l'influx potassique mais possiblement aussi de la production de ROS (**Groß, C.J. et al. 2016**). En conclusion, les mécanismes régissant l'activation de NLRP3 demeurent encore mystérieux. Ainsi, plusieurs mécanismes semblent probablement impliqués (rupture lysosomale, production de ROS, efflux potassique)

mais aucune démonstration n'a actuellement permis d'affirmer avec certitude lequel ou lesquels est/sont vraiment nécessaire(s). Ces différentes voies sont résumées dans la **Figure 4**.



**Figure 4 : Plusieurs signaux mènent à l'activation de l'inflammasome NLRP3.** L'activation de l'inflammasome NLRP3 se fait par l'intermédiaire de deux signaux (I et II). Le signal I est apporté par diverses substances activant les voies situées en aval de récepteurs tels les TLRs ou les récepteurs de certaines cytokines. Le signal II est quant à lui apporté par les agonistes de NLRP3 à proprement parler. Dans ce

contexte, de nombreux agonistes différents (ATP, substances particulières, imidazoquinolines) font intervenir plusieurs signaux parmi lesquels trois ont été retenus comme communs à beaucoup d'agonistes de NLRP3 et importants sur la base de blocages fonctionnels. On y retrouve 1) l'efflux potassique, 2) l'activation de NLRP3 par les ROS (mitochondriaux ou issus de l'activité d'enzymes comme la NADPH oxydase) et 3) la voie de rupture lysosomale. Ces voies culmineront en l'activation de NLRP3, toutefois, la manière demeure sujette à discussion. Certains activateurs comme les imidazoquinolines ne font intervenir que les ROS tandis l'ATP active surtout P2X7 et l'efflux potassique en aval, enfin, les substances particulières impliquent parfois les trois à la fois (ex: MSU).

## 2.4. Des régulations multiples

### 2.4.1. Nécessité de plusieurs signaux

Au vu de son rôle crucial à travers la production de cytokines inflammatoires – l'IL1 $\beta$  et IL-18 principalement – l'inflammasome NLRP3 est un complexe moléculaire soumis à de nombreux points de contrôle. Ainsi, la nécessité de deux signaux en vue de sa pleine activation est, en soit, déjà un moyen efficace mais non suffisant d'adapter la production de ces cytokines au contexte. Ainsi, le « signal I » sera apporté par des PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) et DAMPs (*danger-associated molecular patterns*) rendant compte d'une infection ou/et d'un dommage tissulaire, et le « signal II » (activateur(s) de l'inflammasome à proprement parler) sera ensuite requis afin de déclencher l'assemblage de l'inflammasome et le clivage des cytokines en question. En effet, ces dernières sont d'abord synthétisées sous forme de zymogènes – inactifs – et ce après l'engagement des voies en aval des TLRs notamment (signal I) mais aussi d'autres récepteurs activant *in fine* le facteur de transcription NF $\kappa$ B. L'induction de la pro-IL-1 $\beta$  est ainsi importante en vue son clivage ultérieur. Ce premier signal permet également d'augmenter la production de NLRP3 ainsi que certaines modifications de nature post-traductionnelle permettant de favoriser son activation. De manière intéressante, NLRP3 apparaît dans ces conditions tel un facteur limitant. La nécessité d'un second signal pour la pleine activation de l'inflammasome NLRP3 empêche ensuite toute activité indépendamment de ce dernier (**Hornung, V. and Latz, E. 2010**).

Classiquement, ceci explique pourquoi une très large majorité des études portées sur les inflammasomes ont recours à des étapes de pré-stimulation à l'aide de LPS (quelques heures, 0,1-1 $\mu$ g/mL) ou d'autres agonistes de TLRs avant tout ajout d'un signal II (ATP, nigéricine, cristaux). Ce mécanisme n'est d'ailleurs absolument pas spécifique de l'inflammasome NLRP3 et cette étape est nécessaire pour une pleine production d'IL-1 $\beta$  ou d'IL-18 en réponse à des activations des autres inflammasomes (AIM2, NLRC4 par exemple).

#### 2.4.2. Contrôles transcriptionnels et post-transcriptionnels

Comme mentionné ci-dessus, NLRP3 est d'emblée très étroitement contrôlé d'un point de vue transcriptionnel. Dans de nombreux contextes, les signaux émanant de divers PRRs comme les TLRs, des récepteurs à de nombreuses cytokines – le récepteur à l'IL-1 $\beta$  lui-même – ou encore d'autres récepteurs convergent en l'activation du facteur NF $\kappa$ B, alors capable d'activer la transcription de *Nalp3* et des pro-cytokines *Il1b* et *Il18*.

Il y a quelques années, il fut également montré que la protéine A20, une ubiquitine ligase codée par le gène *Tnfaip3* (*Tnf-alpha induced 3*), était capable de réguler les taux d'ARNm de *Nalp3* (NLRP3) mais aussi des substrats de NLRP3 : *Il1b* (IL-1 $\beta$ ) et *Il18* (IL-18). Ceci fut démontré chez des souris dans lesquelles A20 fut délété dans les cellules myéloïdes (A20<sup>myel-KO</sup>) ; dans ces conditions, une polyarthrite érosive se mettait alors en place spontanément et ce de manière dépendante de NLRP3, des caspases 1 et 11 et du récepteur à l'IL-1 (IL-1R1), ainsi mis en évidence par des combinaisons de déficiences génétiques (**Vande Walle, L. et al. 2014**). Une apparente hyperproduction de NLRP3 et ses substrats était alors observée et semblait sous-tendre cette inflammation spontanée.

La stabilité de NLRP3 semble ensuite soumise à des modulations par certains ARN interférants comme les microARNs (miR). Dans ce cas, il s'agit de petits ARNs de quelques 22-25 nucléotides, omniprésents chez les eucaryotes, capables de se lier à des ARNm en vue de promouvoir leur dégradation ou/et de bloquer leur traduction. Alors que l'inflammation compte de nombreux microARNs parmi ses régulateurs : miR-155, miR-346, miR-146a ou encore l'oncomiR (cluster miR-17~92), NLRP3 est par ailleurs régulé par le miR-223 (**Bauernfeind, F. et al. 2012**).

#### 2.4.3. Contrôles post-traductionnels

##### 2.4.3.1. Ubiquitylation

La protéine NLRP3 est très régulée au niveau post-traductionnel par de nombreuses modifications comme l'ubiquitylation. Cette réaction, réalisée par une enzyme spécifique (une ubiquitine ligase E3), consiste en la liaison d'une petite protéine de 76kDa nommée ubiquitine à une protéine cible. Après plusieurs cycles d'ubiquitylation, la protéine en question se retrouve liée à une chaîne dénommée poly-ubiquitine dont la présence permet l'engagement de plusieurs voies menant à sa dégradation par une structure cellulaire – le protéasome 26S. De plus, l'autophagie, brièvement évoquée ci-dessus, peut aussi procéder à l'élimination de ces substrats ubiquitylés.

Dans le cas de NLRP3, l'ubiquitinylation est un des mécanismes régulateurs. Il a ainsi été montré qu'une très courte exposition au LPS (10 min) pouvait suffire à *primer* l'inflammasome NLRP3 sans élévation de sa quantité ; le même constat était fait après blocage de la traduction par le cycloheximide. Dans cet article, les auteurs ont montré que le mécanisme qui sous-tendait cette observation était la dé-ubiquitinylation de NLRP3 après exposition au LPS (**Juliana, C. et al. 2012**). De même, de nombreuses enzymes sont engagées dans ce mécanisme telle BRCC3 (*BRCA1/2-containing complex subunit 3*), qui pourra dé-ubiquitinyler NLRP3 et bloquer sa dégradation. Ce mécanisme est ainsi de rigueur lors de la stimulation par l'ATP. Sur le versant de la dégradation, l'autophagie a été montrée comme capable de procéder à l'élimination de plusieurs acteurs de l'inflammasome NLRP3 et notamment d'ASC. Ainsi, une fois encore, l'autophagie semble interférer avec les voies de l'inflammasome NLRP3.

#### 2.4.3.2. Phosphorylation

Récemment, une équipe strasbourgeoise a montré que certaines kinases dénommées protéines kinases D (PKD) intervenaient dans le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles ainsi que dans l'activation de l'inflammasome NLRP3. Les protéines kinases D (PKD) – au nombre de 3 isoformes chez les mammifères (PKD1, 2 et 3) – exercent des rôles pléiotropes et partiellement redondants. De la famille des calmodulin-kinase (CaMKs), les kinases PKD sont activées en aval de la protéine kinase C (PKC) et sont aussi connues comme des récepteurs au diacylglycérol (DAG), un produit de l'activation de la phospholipase C (PLC) (**Elwanger, K. et al. 2013**).

Ces kinases ont des rôles variés, du trafic vésiculaire à la survie cellulaire, et sont généralement connues pour phosphoryler de nombreux substrats et provoquer leur séquestration par des protéines dites 14-3-3. Elles interviennent ainsi dans l'activité du système immunitaire adaptatif mais aussi inné, sont reliées au développement embryonnaire, à l'adaptation du myocarde à l'effort via l'axe HDAC (*histone desacetylase*) type II-MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*), au développement osseux via RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*) et l'oncogenèse (**Rozengurt, E. et al. 2011**).

En 2011, l'équipe de Roméo Ricci (IGBMC, Strasbourg) s'était intéressée aux PKDs et avait montré que PKD1 était un modulateur négatif de l'influx de neutrophiles via des régulations des voies PI3K/PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*), cruciales pour le chimiotactisme des neutrophiles (**Itner et al. 2012**). Quelques années plus tard, cette même équipe publia un

autre article montrant que les PKDs étaient en mesure de moduler l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse à de nombreux stimuli. Ainsi, les macrophages de souris PKD1,3<sup>Amy</sup> étaient affectés négativement dans leur production d'IL-1 $\beta$  en réponse à plusieurs activateurs de l'inflammasome NLRP3 et ceci fut confirmé à l'aide d'un inhibiteur spécifique et efficace des 3 isoformes de PKD : le CRT0066101. *In vivo*, les souris PKD1,3<sup>Amy</sup> présentaient une mortalité accrue à la suite de l'inoculation d'une souche de *Staphylococcus aureus* et ceci fut relié à l'incapacité des cellules myéloïdes de ces animaux à produire l'IL-1 $\beta$  sous sa forme mature. Au niveau moléculaire, les kinases PKD1-3 – probablement activées par le DAG émanant de l'activité de la PLC – se sont avérées capables de phosphoryler directement NLRP3 (sérine 293) et ceci était permis par un rapprochement spatial entre certaines structures subcellulaires : les MAMs (*mitochondrion-associated endoplasmic reticulum membranes*) où est localisé NLRP3, et l'appareil de Golgi où se trouvent les PKDs. La conséquence fonctionnelle de cette phosphorylation était alors le relargage de NLRP3 et la formation de l'inflammasome NLRP3 (**Zhang, Z. et al. 2017**).

#### 2.4.3.3. Intervention d'autres protéines kinases

Par ailleurs, une étude a également relié une autre protéine kinase à l'activation de NLRP3. Il s'agit ici de la kinase PKR (protéine kinase R). Dans la présente publication, les auteurs ont montré que la perte de PKR était associée à une baisse de la production d'IL-1 $\beta$  dépendante de la caspase 1 en réponse à l'activation de NLRP3 par plusieurs agonistes (Alum, MSU, ATP et *E. coli* vivante) mais aussi des inflammasomes NLRC4, NLRP1 et AIM2. Cet effet s'est avéré dépendant de l'interaction de la PKR avec NLRP3 et son autophosphorylation, ainsi démontré par plusieurs techniques (immuno-précipitation et système reconstitué en cellules HEK293T avec PKR mutée). Néanmoins, aucune phosphorylation directe de NLRP3 ne put être détectée (**Lu, B. et al. 2012**). Par ailleurs, la kinase Syk a également été impliquée dans l'activation de NLRP3 mais aucune phosphorylation directe ne fut avancée (**Gross, O. et al. 2009**). Syk semblerait intervenir en aval des lectines de type C ainsi supposé lors de l'étude de l'activation de NLRP3 induite par *C. albicans*.

#### 2.4.4. D'autres voies intracellulaires

##### 2.4.4.1. La voie calcique et AMPK

Si les protéines kinases D ont été montrées comme capitales dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponses à divers agonistes, les voies AMPK et calcique se sont aussi illustrées dans ce mécanisme. Dans un premier article (**Lee, G.S. et al. 2012**), il fut

ainsi montré que la protéine CASR (*calcium-sensing receptor*) – liant le calcium – était en mesure de régir spécifiquement l'activité de l'inflammasome NLRP3. Ainsi, l'ajout de calcium extracellulaire ou d'agonistes de CASR (R-568 et Gadolinium) mena à une production d'IL-1 $\beta$  NLRP3-dépendante ; ceci fut abrogé par l'usage d'ARN interférents dirigés contre CASR. Le rôle de la phospholipase C (PLC) – hydrolysant le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate – et d'un de ses produits – l'Inositol triphosphate (InsP3) – fut établi depuis longtemps dans la mobilisation du calcium intracellulaire ; ici, l'ARN interférence dirigée contre InsP3R abolit alors ce mécanisme tandis que le blocage de la protéine kinase C (PKC) se révéla sans aucun effet sur la production d'IL-1 $\beta$  induite par le calcium extracellulaire. Ainsi, un axe CASR-PLC-InsP3-InsP3R semblerait intervenir dans l'activation de NLRP3. Dans ce même article, CASR fut montrée comme diminuant l'activité de l'adénylate cyclase (ADCY), une enzyme connue pour synthétiser de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), nécessaire à l'activation de la protéine kinase A (PKA). Les blocages de la PKA, des ADCY et de la phosphodiesterase 4 (PDE4) confirmèrent l'importance de cette voie en tant qu'inhibiteur de l'inflammasome NLRP3. En effet, l'AMPc semblerait capable de se lier au domaine NACHT de NLRP3 et ainsi de le réguler négativement. D'autres études ont confirmé ce rôle régulateur conféré par l'AMPc (**Wang, Y. et al. 2016**) en employant un jeu d'agonistes de l'AMPK1 $\alpha$  et des souris déficientes pour cette protéine. De manière intéressante, ces travaux ont montré que l'AMPK était décruée suivant la stimulation avec des cristaux de MSU. Ainsi, ces études mettent en lumière une régulation de l'activation de NLRP3 par deux mécanismes : 1) l'activation de NLRP3 à travers la mobilisation du calcium intracellulaire, impliquant la voie calcique et 2) l'inhibition de la voie régulatrice ADCY-AMPc-PKA.

#### 2.4.4.2. L'autophagie

L'autophagie regroupe plusieurs mécanismes intracellulaires permettant la dégradation de composants internes de l'échelle moléculaire à celle de l'organite. On en distingue plusieurs formes dont la macro-autophagie, la micro-autophagie et l'autophagie dépendante des protéines chaperonnes ou CMA. L'autophagie est typiquement fondamentale dans la mesure où ses fonctions sont directement en lien avec le maintien de l'intégrité des cellules et leurs fonctions homéostatiques.

Depuis quelques années, les voies autophagiques ont été décrites comme interférant avec l'activation de l'inflammasome. Ainsi, plusieurs auteurs ont montré que le traitement par la rapamycine, une substance capable d'amplifier l'autophagie, était en mesure de diminuer

l'activation de ce complexe ; Par ailleurs, la perte d'ATG16L1 (*Autophagy gene 16L1*), un gène impliqué dans le processus autophagique, est liée à une sécrétion augmentée d'IL-1 $\beta$  *in vitro* et *in vivo* (Saitoh, T. *et al.* 2008). Ces dernières années, plusieurs études brillantes ont montré que l'autophagie pouvait réguler l'activation des inflammasomes par deux mécanismes distincts : 1) par l'élimination des mitochondries endommagées ou dysfonctionnelles et 2) via l'élimination directe des inflammasomes. Dans le premier cas, la perte de la Becline-1 et de LC3B – deux acteurs de l'autophagie – a été reliée à une production accrue d'IL-1 $\beta$  après activation de NLRP3 par adjonction d'ATP. Les auteurs ont décrit ici une libération d'ADN mitochondrial dans le cytosol consécutive à une accumulation de mitochondries anormales et la production locale d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Par ailleurs, dans deux modèles de sepsis (injections de LPS et ligatures caecales), les souris déficientes pour LC3B (*light chain 3B*) ou pour la Becline-1 ont présenté des taux d'IL-18 et d'IL-1 $\beta$  sériques accrus et une mortalité plus élevée (Nakahira, K *et al.* 2011).

Sur l'autre versant, certains travaux ont démontré que l'activation des inflammasomes AIM2 et NLRP3 allait de pair avec l'activation de la GTPase RalB et l'engagement des voies autophagiques. Dans ce cas, les inflammasomes et leurs senseurs ont été retrouvés co-localisés avec les autophagosomes après l'activation de ces deux inflammasomes ; la poly-ubiquitinylation d'ASC a été également observée et cela conduisit à son incorporation dans les autophagosomes au cours d'un processus requérant la protéine p62 et la bécline-1 (Shi, C.S. *et al.* 2012). Enfin, une autre étude a montré que l'IL-1 $\beta$  elle-même pouvait être dirigée vers les autophagosomes après l'activation des cellules par des ligands de TLRs. Dans cette publication comme dans les précédentes, accroître l'autophagie s'est soldé par une baisse de la production d'IL-1 $\beta$  tandis que les stratégies visant à la diminuer donnaient lieu à une hausse NLRP3-dépendante de cette cytokine (Harris, J. *et al.* 2011).

Au final, l'autophagie semblerait donc bien impliquée dans la régulation des inflammasomes, principalement en éliminant les mitochondries défectueuses – sources d'ADN mitochondrial et de ROS – ou en éliminant les inflammasomes ou l'IL-1 $\beta$  directement.

#### 2.4.5. Des régulateurs spécifiques

##### 2.4.5.1. Les POPs et les COPs

Si l'étape de priming s'avère être systématiquement nécessaire, d'autres points de contrôle sont également en place afin de limiter l'activation des inflammasomes. Il y a quelques années, une équipe de l'Université de Chicago a ainsi décrit les fonctions de trois protéines



dénommées POP1, POP2 et POP3 pour *Pyrin-only protein* 1, 2 et 3. Absentes chez la souris, ces protéines ont été décrites récemment comme capables d'interférer avec l'assemblage de plusieurs inflammasomes en compromettant les interactions homotypiques entre les domaines pyrine.

En 2014, POP3 a ainsi été montré comme capable d'interférer avec l'assemblage de l'inflammasome AIM2, un autre inflammasome désormais bien caractérisé. Dans ce contexte, la capacité de souris exprimant POP3 dans les macrophages CD68<sup>+</sup> (*cluster of differentiation 68*) à monter une réponse antivirale efficace (IL-18, IFN $\gamma$ ) était compromise (**Khare, S. et al. 2014**). Le rôle de POP1 fut décrit un an plus tard par cette même équipe comme capable d'interférer avec la production d'IL-1 $\beta$  mais émanant cette fois-ci de l'activation de plusieurs inflammasomes. En effet, POP1 s'est avérée entrer en compétition avec la protéine adaptatrice ASC. Son expression ectopique chez la souris (dans les macrophages CD68<sup>+</sup>) fut capable d'abroger l'inflammation dans plusieurs situations expérimentales (péritonite au LPS, auto-inflammation induite par la mutation de NLRP3 A350V) (**De Almeida, L. et al. 2015**). Un rôle pour POP2 fut finalement publié en 2017, avec, là aussi, une propension très nette à inhiber la liaison d'ASC à la caspase 1 et ainsi à bloquer la production d'IL-1 $\beta$ . L'expression de cette dernière conduisit ainsi à une forte baisse du recrutement des neutrophiles dans des modèles de péritonites au MSU ou au LPS (**Ratsimandresy, R.A. et al. 2017**).

Par ailleurs, si les protéines POP1, 2 et 3 sont des régulateurs des inflammasomes chez l'Homme, d'autres protéines ayant des fonctions similaires existent également. Les COPs pour *CARD-only proteins* partagent des rôles homologues en bloquant l'activité de la caspase 1, néanmoins, leurs rôles ont été moins documentés que ceux des POPs (**Lugrin, J. and Martinon, F. 2018**). Chez l'Homme, on retrouve les protéines ICEBERG, Pseudo-ICE (COP1), INCA, Caspase12S et NOD2S. Iceberg (CARD18) fut le premier COP à être décrit et s'est montré capable d'entraver la production d'IL-1 $\beta$  dans des monocytes en séquestrant la caspase 1. Pseudo-ICE et INCA (CARD17) agissent d'une manière très similaire, tout comme Caspase12S et NOD2S (**Stehlik, C. and Dorfleutner, A. 2009**).

Enfin, il est intéressant de noter que la pyrine mais aussi NLRP10 possèderaient eux-aussi des rôles régulateurs. Il a été notamment proposé que la pyrine puisse bloquer l'interaction entre ASC et NLRP3 via son domaine pyrine, NLRP10 pourrait – quant à lui – se lier à ASC mais toutefois sans engager de liaison avec la caspase 1 (**Stehlik, C. and Dorfleutner, A. 2009**).

#### 2.4.5.2. D'autres partenaires régulateurs

Si l'inflammasome NLRP3 était jusqu'alors connu comme étant un complexe formé par trois protéines (NLRP3, ASC et la Caspase1), un autre partenaire a été découvert récemment : NEK7. NEK7 est une serine/thréonine kinase qui était à l'origine associée au processus de division cellulaire. Toutefois, une étude publiée en 2016 l'a pour la première fois reliée à l'inflammasome NLRP3 à l'aide d'un criblage génétique réalisé sur des souris C57BL/6 soumises à l'agent mutagène N-nitroso-N-éthylurée. La perte de *Nek7* fut alors associée à une déficience notoire dans la production d'IL-1 $\beta$  dépendante de l'inflammasome NLRP3 sous-tendue par un défaut de nucléation d'ASC à NLRP3. De manière intéressante, les auteurs ont également relié les niveaux cellulaires limitants de NEK7 à la mutuelle exclusion entre la mitose et l'activation de l'inflammasome chez les macrophages murins (Shi, H. *et al.* 2016). Dans un même temps, une autre équipe publia des résultats similaires montrant l'interaction entre NEK7 et NLRP3. Dans celle-ci, NEK7 fut montré comme crucial pour l'activation de NLRP3 spécifiquement en intervenant en aval de l'efflux potassique ; sa perte entravait alors l'incorporation de NEK7 dans l'inflammasome NLRP3 (He, Y. *et al.* 2016). Dans une troisième étude, certains activateurs de NLRP3 comme l'imiquimod ont été montrés dépendants de NEK7, toutefois, si la production de ROS était effective, l'efflux potassique n'était pas indispensable. Ceci montre donc que l'activation de NLRP3, dépendante de NEK7, n'est pas nécessairement due à l'efflux potassique et NEK7 possède ainsi des rôles plus larges que la seule détection de l'efflux potassique (Groß, C.J. *et al.* 2016).

En dehors de NEK7, NLRP3 mais aussi d'autres senseurs impliqués dans la formation d'inflammasomes (NLRP2, NLRP12, NLRC4) ainsi que NOD1, se sont avérés régulés par SGT1 (*suppressor of G2 allele of Skp1 (S-phase kinase associated protein 1)*) et HSP90 (*heat shock protein of 90kDa*). Très conservées au cours de l'évolution (levures, plantes), SGT1 et HSP90 ont été montrées comme s'associant aux domaines LRR et NACHT de NLRP3. De manière intéressante, leur présence s'est montrée cruciale pour l'activation de NLRP3 en réponse aux peptidoglycanes et au MSU mais aussi pour l'activation de NOD2 et NLRC4 (Mayor, A. *et al.* 2007).

En 2010, Zhou, R. *et al.* publièrent un article décrivant alors un nouvel interactant de NLRP3 : TXNIP (*Thioredoxin-interacting protein*). Cette protéine – interagissant avec la thioredoxine réduite – a été montrée ici comme pouvant interagir avec NLRP3 en engageant sa fraction C-terminale et les domaines NACHT et LRR de NLRP3 ; cette interaction n'était toutefois possible qu'après traitement avec des activateurs de NLRP3 comme les cristaux de

MSU ou bien l'exposition directe des cellules à du peroxyde d'hydrogène. Sous l'effet de ceux-ci, TXNIP s'en retrouvait alors associée à NLRP3 corrélant ainsi la production d'IL-1 $\beta$  mature, cette dernière fut d'ailleurs lourdement abaissée chez les cellules *Txnip*<sup>-/-</sup>. Ensemble, ces données ont ainsi montré TXNIP comme étant un interactant induit par les ROS et indispensable à l'activation de NLRP3 en réponse à plusieurs agonistes comme le MSU (**Zhou, R. et al. 2010**).

#### 2.4.6. Régulation par le système immunitaire lui-même

##### 2.4.6.1. Les Interférons

D'ordinaire associés à l'immunité antivirale, les interférons – ainsi dénommés pour leur capacité à interférer avec la réplication virale – sont également connus pour être produits en réponse à de nombreux PAMPs mais aussi à des DAMPs, généralement des acides nucléiques. Ainsi, les IFN de type I (13 IFN $\alpha$  différents et l'unique IFN $\beta$ ) sont robustement produits en réponse à la ligation des TLRs endosomaux (TLR3, 7, 8 et 9) mais aussi en aval de nombreux détecteurs d'ADN et ARN cytosoliques (voie cGAS (*[cGAMP (cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate)] synthase*)-STING (*stimulator of interferon genes*) et DAI (*DNA-dependant activator of IFN-regulatory factors*), RIG-I (*Retinoic acid-induced gene 1*) et MDA5 (*Melanoma differentiation associated protein 5*)). Classiquement, ces cytokines sont produites précocement au cours des réponses immunitaires et ont un spectre d'action très large d'où un rôle majeur dans l'immunité innée comme adaptative. Toutefois, leurs rôles semblent être très dépendants du contexte immunologique (types d'infections, cadre temporel) et les interférons ont été jusqu'alors associés à de nombreuses pathologies (lupus érythémateux disséminé, psoriasis, choc septique). Récemment, un rôle plutôt régulateur leur a été attribué dans certaines pathologies de nature auto-immune ou inflammatoire. Deux exemples furent ainsi principalement documentés : la polyarthrite rhumatoïde (PR) et la sclérose en plaque (SEP). Dans ces deux cas, l'IFN $\beta$  fut principalement décrit comme efficace dans les modèles animaux correspondant. Ainsi, pour les modèles de PR, l'arthrite au collagène (CIA) chez la souris (**Van Holten, J. et al. 2004**), arthrite à l'adjuvant (AIA) chez le rat (**Adriaansen, J. et al. 2006**) et CIA chez le macaque rhésus montrèrent une nette amélioration mais ceci se révéla non significatif chez l'Homme (**Vervoordeldonk, M.J. et al. 2009**). Pour la SEP, en revanche, les résultats obtenus sur le modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) chez les souris ont permis l'usage désormais courant de l'IFN $\beta$  en thérapeutique. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que l'IFN $\beta$  était tout à fait capable de contrôler l'activation de l'inflammasome

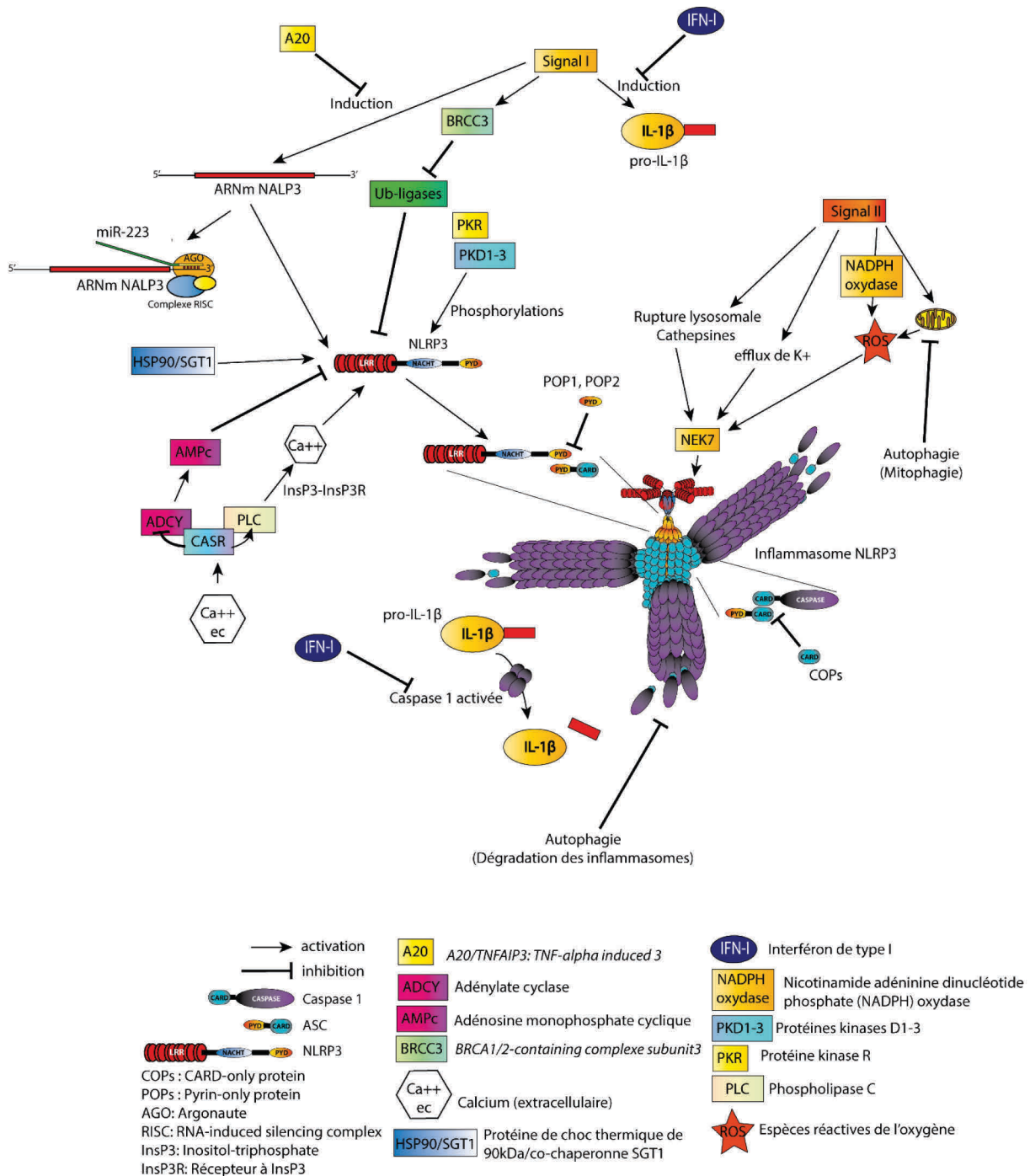
NLRP3 (**Guarda, G. et al. 2011**). Cette répression a été décrite à travers deux mécanismes distincts : dans le premier, l'activation de STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription 1*) réprime directement l'activité des inflammasomes NLRP1 et NLRP3 ; dans le second, l'activation de STAT1 mène à la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 permettant alors d'inhiber la transcription des pro-cytokines pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-1 $\alpha$ . De manière intéressante, les monocytes sanguins de patients atteints de SEP et traités avec de l'IFN $\beta$  étaient moins enclins à produire de l'IL-1 $\beta$  relativement à ceux de patients sains.

Paradoxalement, la voie précitée (cGAS-STING) a été montrée comme agissant en augmentant la production d'IL-1 $\beta$  par les macrophages. Ainsi, la transfection de cGAMP – le produit de l'activité de la cGAS en réponse à l'ADN cytosolique – a été montrée comme activant les inflammasomes AIM2 et NLRP3 et même possiblement un inflammasome mixte d'une manière dépendante de *Sting*. Ainsi, la perte sélective de *Nlrp3* ou d'*Aim2* abrogea la production d'IL-1 $\beta$  au même titre qu'une perte combinée de ces deux éléments ou celle de la *caspase 1* ou d'ASC ; AIM2, NLRP3 et ASC furent de plus co-localisés lors d'expériences de microscopie confocale. En plus de cet effet sur l'activité de ces inflammasomes, le cGAMP s'est révélé accroître la synthèse de ces composants (*Nlrp3*, *Aim2*, *Casp1*), d'*Ifnb* ainsi que de l'*Il1b* d'une manière dépendant de *Sting* mais aussi d'*Ifnar1*, codant pour le récepteur aux interférons de type I (**Svanson, K.V. et al. 2017**). Ensemble, ces résultats montrent donc une implication de la voie cGAS-STING dans l'activation des inflammasomes NLRP3 et AIM2. Un tel mécanisme fut également bien documenté dans un article montrant l'activation de l'inflammasome NLRP3 consécutivement à l'engagement de la voie cGAS-STING en activant la voie de rupture lysosomale (**Gaidt, M.M. et al. 2017**).

#### 2.4.6.2. L'immunité adaptative

De son côté, l'immunité adaptative et certaines des cellules majeures de ce système ont été reliées au contrôle de l'activation des inflammasomes NLRP1 et NLRP3. Dans ce contexte, il fut démontré que les lymphocytes TCD4<sup>+</sup> effecteurs et mémoires activés étaient en mesure de bloquer l'activation de macrophages murins si et seulement s'ils étaient en contact de ces derniers. Cet effet était retrouvé avec plusieurs activateurs de NLRP3 (alum, ATP, MSU, asbeste) et dépendait de la stimulation antigénique ; l'usage de protéines recombinantes a ensuite permis de montrer que plusieurs ligands de la famille du TNF étaient capables de reproduire cet effet et notamment CD40L (*cluster of differentiation 40 ligand*). Enfin, la démonstration fut conclue chez la souris par la réalisation de péritonites à l'alum précédées par une immunisation à l'ovalbumine et concurrentes avec une seconde injection

d'ovalbumine ; l'immunisation eut alors un effet suppressif profond sur le recrutement des neutrophiles et ceci fut inefficace chez les souris  $Cd4^{-/-}$  et  $Tcrb$  (*T cell receptor beta*) $^{-/-}$ , dépourvues de  $TCD4^{+}$  et de lymphocytes T respectivement. Ceci suggère donc une régulation des inflammasomes NLRP1 et NLRP3 par les lymphocytes  $TCD4^{+}$  via l'interaction CD40L-CD40 (Guarda, G. et al. 2009). Ces mécanismes, ainsi multiples, sont résumés en **Figure 5**.



engendre alors la production d'IL-1 $\beta$  et de NLRP3 ainsi que la dé-ubiquitylation de NLRP3, il est ainsi requis pour l'activation de NLRP3. Le signal II est apporté par des agonistes de NLRP3 (ATP, nigéricine, cristaux etc.) et mène à l'engagement des voies d'efflux potassique et/ou rupture lysosomale et/ou production de ROS culminant en l'activation de NLRP3. Les régulations directes s'exercent en de nombreux points : 1) contrôle transcriptionnel/post-transcriptionnel (A20), 2) post-traductionnel (phosphorylation activatrice par les PKD, ubiquitylation inhibitrice) ; 3) interactants (SGT1/HSP90 nécessaires à l'activité, AMPc inhibant en se liant au domaine NACHT, calcium et voie calcique). Une série de régulations ont ensuite lieu au niveau des étapes d'assemblage de l'inflammasome via les protéines COPs et POPs empêchant les associations NLRP3/ASC et ASC/Caspase 1 respectivement. Inversement, NEK7 connecte l'inflammasome NLRP3 aux voies activées lors du signal II engendrant son activation. Certains régulateurs ciblent l'inflammasome NLRP3 en plusieurs points. Ainsi, les inflammasomes peuvent être directement pris en charge et dégradés par la machinerie autophagique tout comme les mitochondries (mitophagie) diminuant ainsi la production de ROS mitochondriaux participant à l'activation de NLRP3. Les interférons de type I comme l'IFN $\beta$  agissent en bloquant la production d'IL-1 $\beta$  lors du signal I et l'activation de la caspase 1. Ainsi, NLRP3 est finement régulé en vue d'éviter son activation excessive, cause de maladies inflammatoires.

### 3. Un autre inflammasome : AIM2

L'inflammasome NLRP3 est désormais le plus documenté et semble relié à une myriade de conditions physiologiques et pathologiques, néanmoins, plusieurs autres inflammasomes ont été également décrits. Parmi ceux-ci, AIM2 a l'originalité de conduire à la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 à la suite de la détection de l'ADN lorsque ce dernier est présent dans le cytosol. Conceptuellement, cela implique donc AIM2 et son inflammasome dans des situations aussi larges que les infections virales, des contextes où l'ADN endogène passe par erreur dans le cytosol ou encore des maladies auto-inflammatoires/auto-immunes où l'inflammasome est activé de manière dérégulée.

Dans ce court chapitre, il sera question de décrire AIM2 quant à ces divers aspects, de sa découverte jusqu'à quelques contextes où son implication a été documentée.

#### 3.1. Découverte de l'inflammasome AIM2

AIM2 (*Absent in melanoma 2*) est une protéine de la famille PYRIN contenant typiquement un domaine HIN200 en portion C-terminale ainsi qu'un domaine pyrine (PYD). En 2009, AIM2 fut élégamment décrit comme capable de former un inflammasome avec la protéine ASC et également capable d'activer la caspase 1 (**Hornung, V. et al. 2009**). Dans cet article, les auteurs se sont tout d'abord penchés sur l'étonnante indépendance de NLRP3, NLRP6 et NLRP12 – protéines connues pour lier ASC – à la suite de l'activation de macrophages à l'aide d'un ADN double-brin synthétique : le poly-dA:dT. De manière intéressante, les macrophages dépourvus d'ASC étaient totalement incapables de répondre à cette molécule par une production robuste d'IL-1 $\beta$ . Cherchant des candidats éligibles pour la liaison d'ASC (domaine PYD) et possédant un domaine de liaison à l'ADN, seule la protéine AIM2 s'est révélée cytosolique parmi plusieurs candidats. Plusieurs expériences ont ensuite pu montrer qu'ASC et AIM2 interagissaient à l'instar de NLRP3 et ASC ; de plus, la co-expression d'ASC, d'AIM2 et de la caspase 1 était favorable à la maturation de la pro-IL-1 $\beta$  en sa forme mature. La liaison d'AIM2 à l'ADN fut également démontrée et fut attestée dépendante du domaine HIN200. Enfin, l'élimination ciblée d'AIM2 par une stratégie d'ARN interférence s'est montrée capable d'abroger ce mécanisme confirmant la dépendance d'AIM2, au sein d'un complexe pourvu d'ASC/Caspase 1 (inflammasome) pour la maturation de l'IL-1 $\beta$  après la détection d'ADN cytosolique (**Hornung, V. et al. 2009**). Par ailleurs, trois autres études similaires publiées la même année ont aussi mené à ce constat (**Fernandes-Alnemri, T. et al. 2009** ; **Roberts, T.L. et al. 2009** et **Burckstummer, T. et al. 2009**). Ces données ont permis

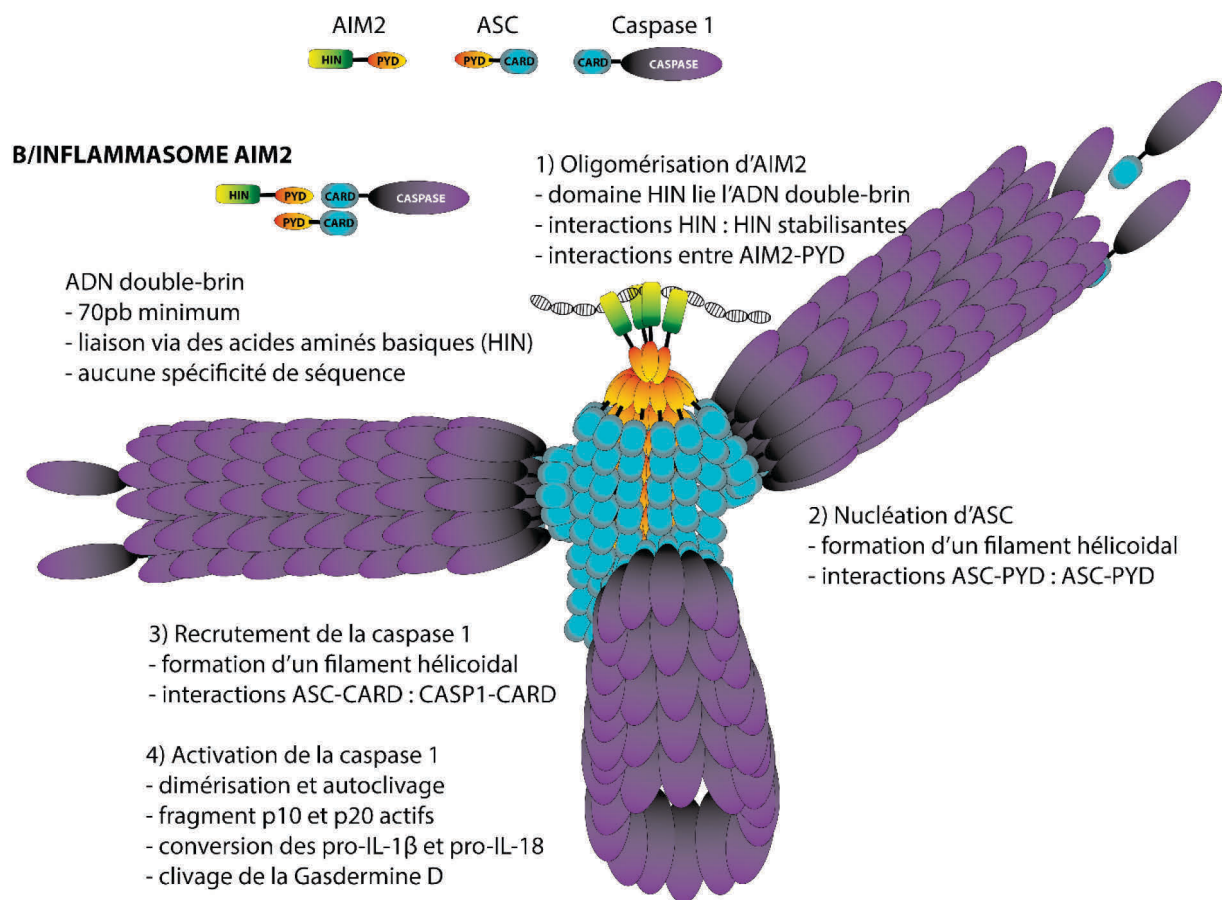
la découverte de l'inflammasome AIM2 et de ses fonctions dans la détection de l'ADN cytosolique.

### 3.2. Un détecteur d'ADN cytosolique

Structuralement parlant, le domaine HIN200 d'AIM2 s'est révélé indispensable pour sa liaison à l'ADN double-brin. En effet, on retrouve une très grande homologie structurale entre AIM2 et les OB-folds (*Oligonucleotide/nucleotide-binding folds*), retrouvés par exemple dans la protéine BRCA2 (*Breast cancer 2*), aux fonctions de liaison de l'ADN simple-brin (voie de la recombinaison homologue). Ce type de motifs contient classiquement plusieurs feuillets  $\beta$  permettant la liaison d'oligonucléotides ou d'autres molécules (protéines, ions métalliques, polysaccharides) (**Lugrin, J. and Martinon, F. 2018**). Peu après l'association de l'ADN double-brin (ADNdb) au domaine HIN200, l'inflammasome AIM2 s'engage dans la formation de grands complexes filamenteux analogues à ceux générés au cours de la formation de l'inflammasome NLRP3. Cette polymérisation, décrite comme « *prion-like* » repose ici sur l'association homotypique entre les monomères d'ASC (PYD) et le PYD d'AIM2, les filaments générés constituent alors de multiples sites de liaison pour la caspase 1 (interaction homotypiques CARD-CARD). Il a été proposé que l'inflammasome AIM2 pourrait s'assembler en fixant de nombreux sites sur l'ADN double-brin (**Burckstummer et al. 2009 ; Schroder, K. and Tschopp, J. 2010**). Ceci fut ainsi montré lors de travaux de biologie structurale montrant une interaction entre les résidus chargés positivement du domaine HIN d'AIM2 avec le squelette sucre-phosphate des ADNdb. Cette interaction s'est ainsi révélée être non séquence-spécifique (**Jin, T. et al. 2012**). Des études biochimiques ont par ailleurs montré que l'oligomérisation d'AIM2 était directement régulée par la taille de l'ADNdb auquel AIM2 va se lier. Ainsi, la proportion d'AIM2 (pleine taille ou domaine HIN200 seul) se liant à l'ADNdb fut directement corrélée à la taille de ce dernier. De manière surprenante, le domaine PYD a été montré comme intervenant positivement dans la liaison à l'ADNdb (**Morrone, S.R. et al. 2015**). Ces auteurs ont également confirmé qu'AIM2 engageait une oligomérisation robuste face à des ADNdb d'au moins 70pb, proche des 80pb nécessaires pour une production efficace d'IL-1 $\beta$  (induite par le poly-dA:dT) (**Jin, T. et al. 2012**). D'un point de vue mécanistique, la détection de l'ADNdb par AIM2 donnerait lieu à son oligomérisation et l'arrangement des AIM2<sup>PYD</sup> sous forme d'une structure tubulaire hélicoïdale (90Å diamètre externe, 20Å en interne). Cette structure serait stabilisée, sur l'ADN, par des interactions de type HIN:HIN (liaison coopérative). L'hélice formée par les AIM2<sup>PYD</sup> servirait alors de site de nucléation pour la liaison des monomères d'ASC (domaine



PYD : ASC<sup>PYD</sup>) selon les mêmes modalités : formation d'un filament hélicoïdal, similaire à celui réalisé par les AIM2<sup>PYD</sup>, étendant alors la structure. Les domaines CARD, disposés vers l'extérieur du filament hélicoïdal alors formé, pourraient alors s'associer avec les domaines CARD de la caspase 1 (Wang, B. *et al.* 2017). Des mécanismes similaires avaient été également décrits pour d'autres senseurs d'acides nucléiques comme les RLRs (*RIG-I like receptors*) (RIG-I et MDA-5) quant à la nucléation et activation de MAVS (*Mitochondrial antiviral signaling protein*) ou encore IFI16 dans la formation de son propre inflammasome (Sohn, J. *et al.* 2016). Un schéma illustrant le complexe formé *in vitro* par AIM2, ASC et la caspase 1 est présenté à la **Figure 6**.



**Figure 6 : AIM2 forme un inflammasome en réponse à l'ADN double brin cytosolique.**

A la manière le NLRP3, AIM2 forme également son propre inflammasome mais cette fois-ci en réponse à l'ADN double brin cytosolique (70-80pb au minimum). Les étapes sont similaires à celles nécessaires à l'activation et la constitution de l'inflammasome NLRP3. La reconnaissance du signal est néanmoins directe puisqu'AIM2 lie directement l'ADN double-brin via son domaine HIN200. La présence de plusieurs monomères d'AIM2 va conduire à leur oligomérisation via les domaines PYD mais aussi des interactions entre domaines HIN200. L'assemblage de superstructures *in vitro* est en tous points similaire à celui présenté à la figure 3 et est décrit ici aussi selon le modèle de Lu, A. *et al.* 2014 dont le schéma est inspiré.

### 3.3. AIM2, requis dans diverses situations

Depuis sa découverte, AIM2 fut montré tel un détecteur d'ADN cytosolique. Cette protéine fut ainsi décrite comme un senseur d'ADN, qu'il soit d'origine infectieuse mais aussi endogène. Tout d'abord, AIM2 fut reconnu comme une protéine permettant la détection des ADN viraux. C'est ainsi que son rôle dans la production d'IL-1 $\beta$  en réponse à l'introduction d'ADN fut illustré dans le cadre de l'exposition à l'ADN du virus de la vaccine (**Hornung, V. et al. 2009**). Plus largement, AIM2 a été décrit comme activé par lors d'infections bactériennes (*Francisella tularensis*, *Lysteria monocytogenes*) et virales (virus de la vaccine, cytomégalo virus murin) (**Lugrin, G. and Martinon, F. 2017**).

De manière intéressante, une étude a élégamment montré qu'AIM2 pouvait aussi s'activer au cours de l'infection par des agents du paludisme (**Kalantari, P. et al. 2014**). Dans le présent cas, les cristaux d'hémozoin (Hz) – initialement démontrés comme activant NLRP3 *in vitro* (**Dorstert, C. et al. 2009**) – ont été décrits comme pouvant activer conjointement les deux inflammasomes (AIM2 et NLRP3). Ce mécanisme a été illustré par l'obtention d'une forte production d'IL-1 $\beta$  suivant l'exposition de macrophages à des complexes Hz-ADN génomique (*Plasmodium*) ou à des globules rouges infectés. Aboli en contexte *Aim2<sup>-/-</sup>Nlrp3<sup>-/-</sup>*, cette production était dépendante de la phagocytose des cristaux, la présence des cathépsines B et D et celle de TLR9 (*priming*). Ainsi, la rupture lysosomale semblerait donner lieu à un passage d'ADN dans le cytosol activant alors AIM2 tandis que NLRP3 pouvait être activé par la rupture en elle-même.

Plusieurs publications ont par ailleurs fait cas de la détection d'ADNdb endogène. Récemment, il fut démontré qu'une altération de l'enveloppe nucléaire était tout à fait capable de culminer en l'activation de l'inflammasome AIM2. Engagé par un agent d'ordinaire utilisé dans les traitements du HIV (*human immunodeficiency virus*), le nelfinavir (inhibiteur de la protéase), un déficit de maturation de la lamine A fut ainsi constaté et directement associé à des protrusions nucléiques dans le cytosol. Les cellules traitées avec cet agent présentaient alors d'emblée un noyau déformé et un relargage mesurable d'ADN dans le compartiment cytosolique. De manière intéressante, l'usage d'un inhibiteur d'une protéase permettant la conversion de la farnésyl-prélamine A en lamine A mature conduisit également à ce phénomène. *In vitro*, ces deux traitements donnèrent ainsi lieu à une libération d'IL-1 $\beta$  et cette démonstration fut conclue par l'abolition de cette production lors de l'emploi de cellules déficientes pour AIM2 (**Di, Micco, A. et al. 2016**). D'une manière similaire, le déficit en DNase (Désoxyribonucléase) II chez la souris fut aussi relié au déclenchement d'une

polyarthrite associée à une forte hausse locale des taux de caspase 1 activée. Dans le présent cas, l'arthrite fut totalement abolie chez des souris déficientes pour Aim2, laissant supposer que l'ADN contenu dans les lysosomes – normalement dégradé par des DNases – aurait pu atteindre le cytosol (**Jakobs, C. et al. 2015**). Une autre publication (**Baum, R. et al. 2015**), parue la même année avait aussi relié l'activation d'Aim2 mais aussi la production d'IL-18 au développement de l'arthrite dans ce même modèle. Dans un contexte différent, la mort cellulaire dans deux syndromes liés à des irradiations (syndromes gastro-intestinal radio-induit et hématopoïétique radio-induit) fut décrite comme directement *Casp1*, *Asc* et *Aim2* dépendante. Dans ce cas, AIM2 fut décrit comme formant un inflammasome au sein du noyau en réponses aux dommages perpétré sur l'ADN. La cytotoxicité induite par les radiations et d'autres agents génotoxiques (Doxorubicine, Etoposide) fut ainsi réduite chez les souris *Aim2*<sup>-/-</sup> ainsi que leur mortalité induite par l'irradiation (**Hu, B. et al. 2016**).

En dehors de ce contexte, des rapprochements ont été fait avec plusieurs types de cancers et avec une maladie auto-immune : le lupus érythémateux disséminé (LED) (**Lugrin, G. and Martinon, F. 2017**). Certains aspects de cette maladie auto-immune systémique, où la réponse immunitaire est dirigée contre des éléments nucléaires (notamment l'ADN natif), ont ainsi été reliés à ces acteurs moléculaires (AIM2 et p202). De la même manière, certains résultats ont aussi impliqué l'activation de NLRP3 dans cette pathologie via l'activation par la cathélicidine LL37 (**Kahlenberg, J.M. et al. 2013**). Cependant, l'activation de la production d'IFN $\beta$  par les ALRs, également reliée au développement de la pathologie lupique, a été récemment contestée dans un article publié en 2016 où les auteurs ont procédé à l'élimination des 13 ALRs présents chez la souris. Ils montrèrent ainsi que l'induction de la réponse interféron (IFN) et la mortalité des souris *Trex1*<sup>-/-</sup>, présentant une pathologie similaire au lupus, était inchangée en contexte *ALR*<sup>-/-</sup> alors qu'ils furent totalement abolis par la perte de la cGAS (**Gray, E.E. et al. 2016**). Dans cet article, la responsabilité de la cGAS dans la réponse IFN induite par l'introduction d'ADN dans le cytosol fut aussi également montrée comme largement dominante, comparé à celle des ALRs. Néanmoins, rien n'a été stipulé quant à la production d'IL-1 $\beta$ .

### 3.4.Régulations

A l'instar de NLRP3, où de nombreuses voies de régulations existent, AIM2 est également régulé afin d'éviter une activation incongrue. Ainsi, l'activation d'AIM2 est, dans des conditions normales, empêchée par l'intégrité du noyau, prévenant ainsi toute fuite cytosolique d'ADN. Cette compartimentation est donc un prérequis important, d'autre part,

certaines compartiments (lysosomes) et le cytosol lui-même contiennent des enzymes comme des DNases, éliminant ainsi l'ADN potentiellement activateur. Outre cet élément spatial, plusieurs régulateurs négatifs d'AIM2 ont été décrits dans la littérature. L'oligomérisation d'AIM2 est ainsi entravée par l'action de plusieurs protéines régulatrices telles que p202 (**Roberts, T.L. et al. 2009**), retrouvée chez la souris et POP3 (*pyrine-only protein 3*), chez l'Homme (**Khare, S. et al. 2014**). P202 est une protéine de la famille ALR associée par Roberts, T.L. à une régulation négative d'AIM2. Dans cette publication, p202 a été décrite comme s'associant à l'ADNdb ; l'usage d'ARN interférents dirigés contre cette dernière augmentait alors l'activation des caspases 1 et 3 en réponse au polydA:dT, alors montrée comme activant AIM2 dans ce même article (**Roberts, T.L. et al. 2009**). Une approche structurale confirma cela en montrant que le deuxième domaine HIN de p202 pouvait se lier à celui d'AIM2, modifiant l'organisation des domaines PYD et ainsi l'oligomérisation et l'assemblage de l'inflammasome AIM2 (**Yin, Q. et al. 2013**).

Dans ce second cas, la protéine POP3, codée par un seul exon situé sur le chromosome 1 (position 1q23), a été montrée comme ayant 60% d'homologie avec hAIM2 et est considérablement augmentée après traitement à l'IFN $\beta$ . Dans cet article, POP3 s'est révélée capable de bloquer l'oligomérisation d'AIM2 et ainsi d'inhiber la production d'IL-1 $\beta$  en réponse à l'ADN du MCMV (*mouse cytomegalovirus*) et MVA (*modified vaccinia virus Ankara*). Chez des souris exprimant POP3 dans les macrophages CD68<sup>+</sup>, les réponses antivirales induites par le MCMV furent diminuées fortement (baisse de l'IL-18 et IFN $\gamma$ , hausse de la charge virale splénique) (**Khare, S. et al. 2014**).

### 3.5. Conclusion

AIM2 est un senseur d'ADN cytosolique capable d'engager la formation d'un inflammasome. A l'instar de NLRP3, il commence à être mieux compris, tant au niveau des mécanismes enclenchant son activation que de ceux le contrôlant. Il est intéressant de préciser que si l'inflammasome AIM2 a été relié à la détection de l'ADN exogène (viral entre autre), il semble l'être également avec celle de l'ADN endogène, ayant accédé par erreur au compartiment cytosolique (manque d'activité DNase, vecteur cristallin, altération de la compartimentation cellulaire). Toutes ces données font d'AIM2 un senseur permettant d'associer à la détection de l'ADN cytosolique, un signal pro-inflammatoire fort (production d'IL-1 $\beta$ ).

#### 4. Les maladies auto-inflammatoires, une affaire d'inflammasomes

##### 4.1. Le concept de maladies auto-inflammatoires

L'inflammasome NLRP3 est désormais associé à une myriade de pathologies allant des maladies infectieuses aux maladies neurodégénératives. Toutefois, si NLRP3 a une participation partielle dans ces dernières, ce facteur est apparu responsable à lui seul de quelques maladies génétiques de type auto-inflammatoires. Parmi le large spectre de maladies dys-immunitaires, un petit groupe – également associé à un très faible effectif de patients – constitue les maladies auto-inflammatoires mono-géniques. De nombreux types ont été décrits jusqu'alors mais elles trouvent en général leur cause dans la dérégulation manifeste de voies contributives de l'inflammation. De manière globale, les maladies auto-inflammatoires furent ainsi définies comme des pathologies découlant de mutations/perturbations dans des voies en lien avec l'immunité innée et ses régulations ; elles donnent lieu à une auto-inflammation impliquant des acteurs de l'immunité innée (neutrophiles et macrophages généralement) à des sites déterminés par des facteurs locaux. Certaines d'entre-elles découlent aussi de troubles intéressant les voies de détection des pathogènes (maladie de Crohn par exemple) (**McGonagle, D. and McDermott, M.F. 2006**). Parmi ces affections, l'une, dénommée TRAPS pour *TNF-related periodic syndrome*, a été décrite comme associée à des mutations dans le gène codant le récepteur au TNF $\alpha$ , TNFR1. D'autres syndromes comme le DIRA (*Deficit in IL-1 receptor antagonist*) sont causés par des mutations dans des voies contrôlant la production d'IL-1. Dans le présent cas, la perte du récepteur antagoniste à l'IL-1 (IL-1Ra) est directement causale et donne lieu à une inflammation sévère et non contrôlée.

Au sein des maladies auto-inflammatoires monogéniques, plusieurs peuvent être distinguées par le fait qu'elles découlent de mutations situées dans des protéines formant directement les inflammasomes. Cela a ainsi été décrit surtout pour NLRP3, plusieurs entités pathologiques y furent associées formant ce que l'on appelle également les cryopyrinopathies, relative au nom de cryopyrine qui fut donné à NLRP3. De manière intéressante, des mutations dans NLRC4 (causant un syndrome inflammatoire à prédominance intestinale) ou dans NLRP12 (F402L, responsable d'une urticaire au froid) ont été aussi décrites (**Shen, M. et al. 2017**).

Cliniquement, ces pathologies donnent des tableaux typiques dits de fièvres périodiques. On y retrouve ainsi des fièvres et des symptômes inflammatoires intéressant de nombreux territoires corporels : peau avec des rashes ou des pustuloses, arthralgies/myalgies, conjonctivites, douleurs abdominales, pouvant être catastrophiques dans certaines formes.

## 4.2. Les cryopyrinopathies

Les cryopyrinopathies, autrement appelées **CAPS** (*cryopyrin-associated periodic syndrome*) sont des maladies inflammatoires autosomales dominantes de gravité variable dont le point commun est d'être causées par des mutations du gène NALP3 (NLRP3). Celles-ci sont de nature « gain de fonction » et donnent ainsi lieu à une activation anormale de l'inflammasome NLRP3 et à des fièvres récurrentes associées à des troubles systémiques. Parmi plus de 170 mutations connues à ce jour, la plus commune d'entre elle est la R260W, associée à un phénotype plutôt favorable, en revanche, les mutations T348M et D303N, plus rares, sont reliées à des cas sévères.

Dans ce groupe de pathologies, on distingue le FCAS ou *familial cold auto-inflammatory syndrome*, le syndrome de Muckle-Wells (MWS) et le CINCA/NOMID pour *chronic infantile neurologic cutaneous and articular syndrome/Neonatal onset multisystemic inflammatory disease*.

Le **FCAS**, décrit pour la première fois en 1940 (**Kile, R.L. et al. 1940**), associe une fièvre transitoire, des conjonctivites et arthralgies/gonflements articulaires et suivant le plus souvent une exposition au froid. Un rash urticarien est typiquement présent sous forme d'une franche éruption cutanée (macules, plaques, urticaire et même des pétéchies) et caractérise ce syndrome. La sévérité est variable d'un patient à l'autre (**Zip, C.M. et al. 1993**).

Le **CINCA/NOMID** est, à l'autre extrême, d'une importante gravité et on y retrouve de nombreux symptômes systémiques. La fièvre est présente mais sa cinétique n'est pas spécifique, des signes généraux sont présents (fatigue) et de multiples atteintes inflammatoires touchent principalement les téguments, les articulations et le système nerveux. Ainsi peuvent survenir des arthralgies, des arthrites, des déformations osseuses et un retard staturo-pondéral, une hypertension intracrânienne, des méningites chroniques aseptiques, des neuropathies, une perte de l'audition, un retard mental, des uvéites, une perte possible de la vision et des rashes cutanés de type urticariens. Cette maladie est connue comme de mauvais pronostic d'autant plus qu'elle est de survenue très précoce (**Prieur, A.M. et al. 1987**).

Enfin, le **syndrome de Muckle-Wells** est une entité intermédiaire dans laquelle des rashes cutanés et des arthralgies surviennent. On y retrouve des troubles auditifs (perte de l'audition de cause nerveuse) et souvent une amylose de type AA (dépôts d'amyloïde sérique A) endommageant les reins principalement (**Muckle, T.J. and Wells, M. 1962**). Cette complication est d'ailleurs parfois retrouvée chez les patients ayant d'autres syndromes

inflammatoires (maladie de Behçet, TRAPS) ou bien une goutte non soignée ou incontrôlée depuis longtemps.

Ces maladies, généralement graves, sont ainsi l'illustration directe de l'action de NLRP3 lorsque celui-ci est dérégulé. Alors que la mortalité était encore élevée y a peu de temps, le développement des biothérapies ciblant l'IL-1 (IL-1Ra recombinant : Anakinra, anti-IL-1 $\beta$  : Canakinumab) fut une véritable révolution dans le domaine. Les symptômes de ces différentes affections sont présentés à la **Figure 7**.

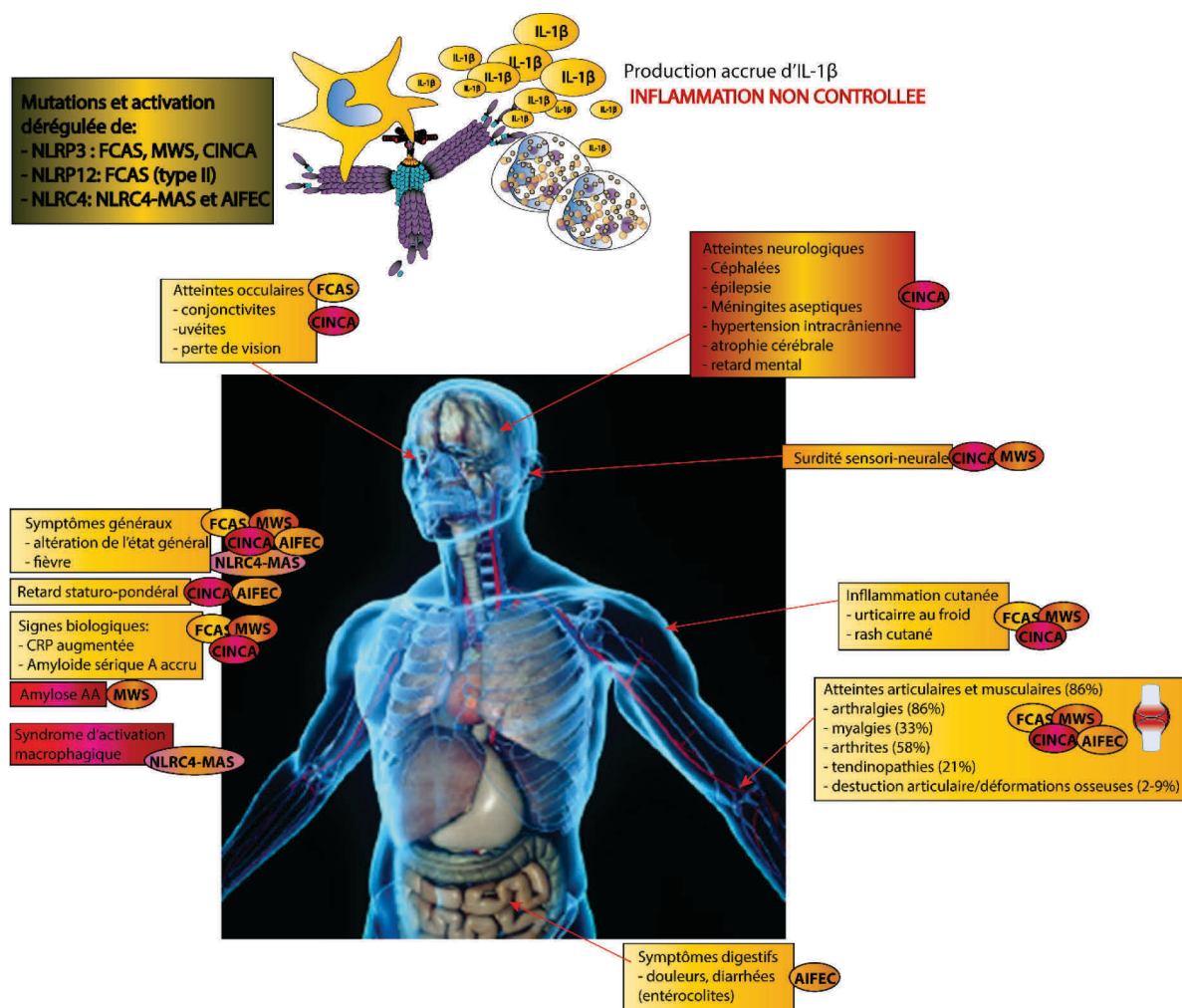


Schéma réalisé à partir des symptômes mentionnés par De Torre-Minguela, C. et al. 2017, Jamilloux, Y. et al. 2016 pour ceux de l'AIFEC/NLRC4-MAS silhouette humaine provenant de «<https://www.coursetalk.com/providers/alison/courses/diploma-in-human-anatomy-and-physiology>»

- NLRC4-MAS** Maladie auto-inflammatoire liée à NLRC4 avec syndrome d'activation macrophagique
- AIFEC** Auto-inflammation avec enterocolite infantile
- CINCA** Syndrome chronique infantile neurologique, cutané et articulaire
- MWS** Syndrome de Muckle-Wells
- FCAS** Syndrome auto-inflammatoire familial induit par le froid

**Figure 7 : Les inflammasomopathies.** Certaines maladies auto-inflammatoires sont directement dues à une hyperactivité des inflammasomes et ainsi une production anormale d'IL-1 $\beta$ . Ce pathologies monogéniques

sont connues comme reliées à des mutations de type « gain de fonction » dans les gènes NLRP3 et NLRC4, « perte de fonction » de NLRP12. On y distingue plusieurs tableaux cliniques : urticaire fébrile au froid (FCAS par mutation de NLRP3 (FCAS-I) ou de NLRP12 (FCAS-II) de sévérité modérée, le syndrome de Muckle-Wells (NLRP3), plus grave, et le CINCA (NLRP3) une forme précoce et catastrophique avec de nombreuses atteintes. Deux pathologies ont été également reliées à des mutations de NLRC4 mais le tableau clinique est différent. Dans cette figure, les différentes atteintes sont présentées et attribuées à ces différentes pathologies.

#### 4.3. La goutte - transition

Si les maladies auto-inflammatoires monogéniques peuvent être perçues comme l'expression de dérégulations multiples dans les voies contrôlant la production de cytokines comme l'IL-1, il existe aussi quelques maladies inflammatoires dépendantes de l'IL-1 dont l'expression est, de prime abord, plus inductible. Ces pathologies sont par exemple représentées par les arthrites microcristallines, la goutte étant la plus connue. Dans cette maladie, l'inflammation aiguë tient à la présence de microcristaux d'urate de sodium (MSU) au contact desquels les cellules de l'immunité innée (monocytes, macrophages M1 et neutrophiles) s'activent et produisent des médiateurs inflammatoires réalisant la crise de goutte. La prédominance de l'IL-1 et particulièrement l'IL-1 $\beta$ , le déclenchement de symptômes fébriles (fièvre, élévation des marqueurs inflammatoires sériques) et les atteintes articulaires notoires sont également, en une certaine mesure, semblables à ce que l'on peut voir dans certaines maladies auto-inflammatoires. Enfin, les thérapies employées sont parfois communes avec celles utilisées dans les maladies auto-inflammatoires : colchicine et biothérapies ciblant l'IL-1. Au début des années 2000, la découverte des inflammasomes et surtout celle de NLRP3 a permis de comprendre comment l'IL-1 $\beta$  pouvait être maturée et comment certains agents (cristallins ou non) pouvaient en activer la synthèse. La démonstration de l'implication de l'inflammasome NLRP3 en réponse aux cristaux de MSU *in vitro* (synthèse d'IL-1 $\beta$  mature) constitua alors un grand pas dans la compréhension des mécanismes pathologiques associés à la goutte. Toutefois, la contribution de NLRP3 à l'inflammation induite par les cristaux de MSU *in vivo* demeure encore un sujet de controverse.

L'objet de cette thèse vise principalement à comprendre l'importance de NLRP3 dans un modèle animal d'inflammation uratique aiguë. Ainsi, la partie suivante sera orientée sur la goutte, une pathologie aux multiples facettes.



## II. La goutte, une maladie inflammatoire microcristalline

La goutte, est une maladie inflammatoire, souvent chronique, au cours de laquelle des foyers inflammatoires se constituent au sein des articulations mais aussi souvent dans les tissus mous. La goutte est une maladie dite de surcharge : elle survient à la suite d'une hyperuricémie chronique, qui se définit par une élévation des taux d'urate sérique au-delà du seuil de saturation (60mg/L) ; dans ce contexte, des dépôts de cristaux d'urate de sodium (MSU) se forment au dépend de l'urate sanguin alors en sursaturation et se mettent en place à différents sites anatomiques (articulaires ou non). Ce mécanisme est alors responsable de crises inflammatoires aiguës (crises de goutte ou accès goutteux) mais aussi de la constitution de nodules pathognomoniques que l'on appelle des tophus. Souvent handicapante, la goutte est associée à une prévalence croissante, notamment dans les pays occidentaux et émergents où la consommation de certains alcools (bière) et de sodas aux forts contenus en fructose est directement incriminée. De plus, les patients atteints de goutte présentent fréquemment de nombreuses comorbidités, des insuffisances cardiaques congestives et rénales notamment. Ainsi, ces facteurs font de la goutte une maladie prévalente, lourde et d'actualité.

Connue depuis longtemps, la goutte est une pathologie dont la participation de l'IL-1 est désormais bien admise et attestée chez l'Homme et l'animal. Néanmoins, l'implication de l'inflammasome NLRP3, demeure un point de controverse quant à la génération de l'IL-1 $\beta$ . De plus, la goutte semble également faire intervenir une multitude de facteurs tant endogènes et exogènes.

Dans ce second chapitre, je vous propose ainsi une description de la goutte (épidémiologie, facteurs de risque, clinique) suivie d'une partie détaillant les mécanismes physiopathologiques intervenant dans cette pathologie. Au cours de la description clinique de la goutte, j'ai également décidé d'inclure certains passages d'une encyclopédie médicale éditée en 1921 (**Galtier-Boissière, Larousse médical, 1921**) dans laquelle les accès goutteux et les médications employées à l'époque étaient décrits avec une grande précision. Cela permet notamment d'apprécier certains détails épidémiologiques et environnementaux, non sans rapport avec ce que l'on peut retrouver aujourd'hui. D'autre part, l'accent sera mis sur le rôle potentiel de l'inflammasome NLRP3 dans ce contexte pathologique.

## 1. Epidémiologie et clinique de la goutte

### 1.1. Historique

Bien que les premières descriptions de la goutte aient été réalisées il y a plus de deux millénaires (400 avant J.C.) par Hippocrate, elle demeura pendant longtemps une maladie incomprise. Ainsi, le style de vie et les mœurs y furent très longtemps associés (à l'époque romaine notamment) faisant de cette maladie un synonyme de décadence et « d'excès de bonne chair ». La fréquence de cette maladie devait néanmoins être tout à fait remarquable dans la société romaine où le vin était à l'époque stocké dans des récipients en plomb et consommé sans modération. La corrélation entre l'intoxication au plomb et la goutte est de nos jours bien connue (« goutte saturnine », en référence au saturnisme) et ceci devait y jouer très probablement un rôle important. Dans la royauté française, les épisodes de goutte se sont révélés à priori très fréquents puisqu'il fut estimé que 20 des 34 rois de France en furent atteints ; la goutte fut jusqu'alors attribuée aux personnes aisées (**Bhattacharjee, S. 2009**).

En ce qui concerne l'étiologie de la goutte, celle-ci demeura bien longtemps incomprise ; ce n'est seulement qu'au XVIII<sup>ème</sup> siècle que Karl Scheele isola pour la première fois l'acide urique. Toutefois, son association avec la goutte n'est apparue qu'un siècle plus tard avec la participation de Garrod, un médecin anglais. Garrod fut aussi le premier à associer la goutte, mais pas d'autres rhumatismes, à l'hyperuricémie et à montrer la présence de cristaux d'urate de sodium dans les cartilages des patients goutteux. Malgré ces précieuses observations, il fallut attendre les années 1960 pour que Hollander identifie des cristaux d'urate de sodium dans des liquides synoviaux de patients, appuyant cette théorie. Par ailleurs, la goutte demeura bien longtemps peu dissociée des autres rhumatismes inflammatoires et il fallut attendre le milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle pour que Garrod sépare la goutte d'une autre affection articulaire inflammatoire : la désormais nommée polyarthrite rhumatoïde (anciennement « *rheumatic gout* » ou « goutte rhumatismale ») (**Storey, G.D. 2001**).

Quant aux traitements de la goutte, ils sont apparus progressivement. La colchicine a été introduite à la fin de XVIII<sup>ème</sup> siècle et fut la première molécule, connue aujourd'hui pour ses effets sur les crises de goutte, à être couramment utilisée. Plus récemment, au XX<sup>ème</sup> siècle, les médications consistaient en différentes préparations à base de colchicine (« Liqueur de Laville, teinture de colchique ») ou bien de salicylates (« aspirine et salicylate de soude »), données sur quelques jours. A cette période, les mesures hygiéno-diététiques étaient déjà bien appréhendées : « *sobriété des repas* » [...] « *de préférence, viandes blanches, volailles ; viandes rouges en plus faible quantité ; peu d'œufs, de poisson, d'aliments gras ; pas de*

*gibier, ni de crustacés* ». [...] « *ni bière, ni cidre, ni poiré, ni liqueurs, ni apéritifs* ». (Larousse Médical, 1921).

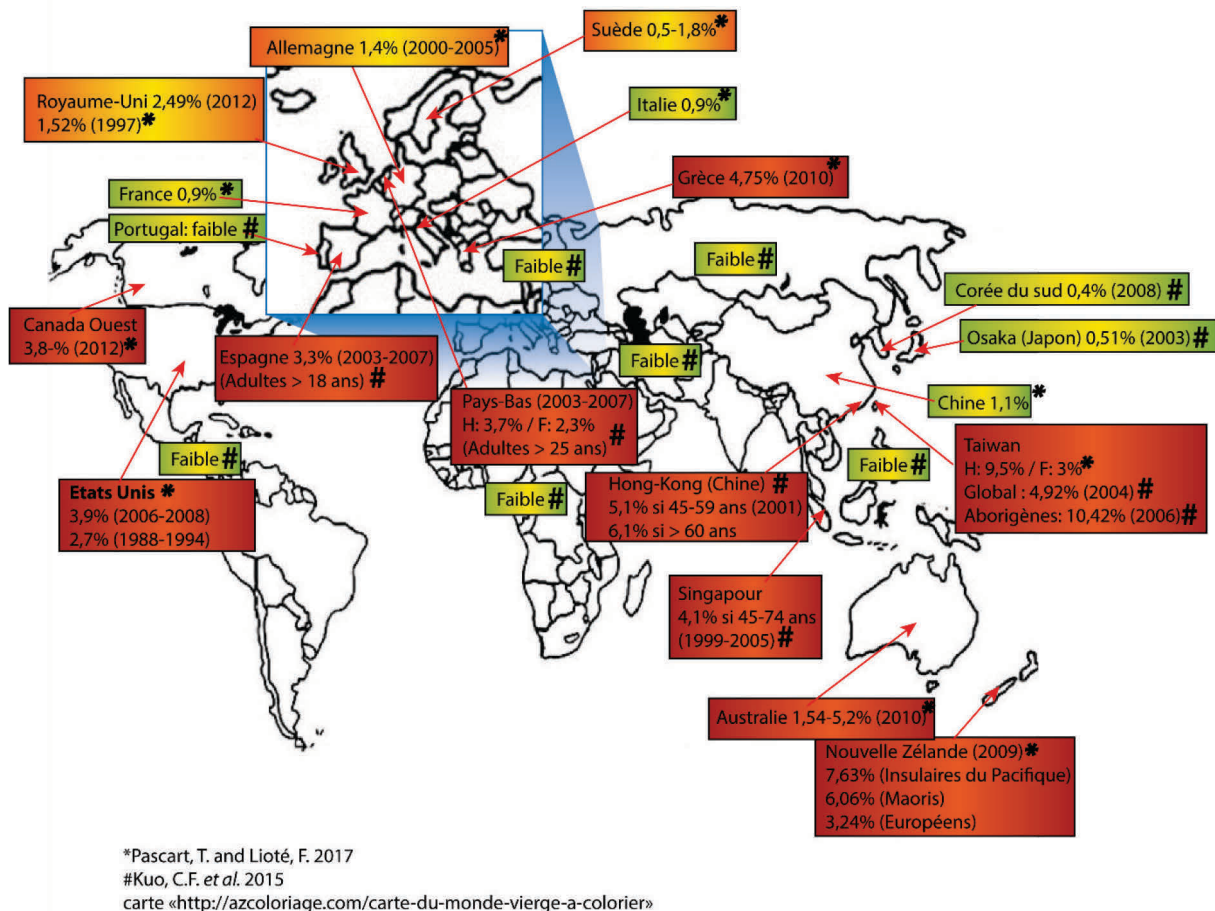
En revanche, le traitement des gouttes tophacées (avec de larges dépôts d'urate de sodium dénommé tophus) était pratiquement absent bien que la notion de dommages liés à la présence des tophus était d'ores et déjà bien documentée « *Lumière et Gélibert estiment que les tophus sont une cause d'ankylose, de déformations multiples* ». (Larousse Médical, 1921). Ainsi, l'avènement des traitements dits hypouricémiants (capables d'abaisser les taux sanguins d'urate) n'eut lieu qu'au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle avec successivement le probenecide en 1952, l'allopurinol (1964, le plus utilisé) et la benzbromarone (1977). En 2009, le fébuxostat est également arrivé sur le marché (Jansen, T.L. 2015).

## 1.2. Epidémiologie et étiologie

### 1.2.1. Epidémiologie

La goutte est à l'heure actuelle retrouvée chez près de 1 à 2% de la population adulte mondiale avec des prévalences très élevées dans les pays occidentaux (outre-Atlantique avec 4% de la population adulte, Zhu, Y. *et al.* 2016, 2,5% au Royaume-Uni, Abhishek, A. *et al.* 2017) et dans certaines îles de l'océan Pacifique (Nouvelle Calédonie notamment, Nouvelle-Zélande). Les pays émergents comme la République populaire de Chine et Taiwan connaissent également des prévalences remarquables et la tendance mondiale est clairement à la hausse. Ces prévalences, recueillies dans deux revues de la littérature (Pascart, T. and Lioté, F. 2018 ; Kuo, C.F. *et al.* 2015) sont présentées dans la figure suivante (Figure 8). La goutte présente par ailleurs une forte prédominance masculine et affecte généralement des sujets de plus de 45 ans, présentant souvent un syndrome métabolique et/ou une surcharge pondérale.

Le milieu socio-économique semble également être un déterminant. Ainsi, une étude a mis le doigt sur une corrélation inverse entre le niveau d'éducation et la présence de deux crises de goutte ou plus par an (OR = 0,54). De même, cette corrélation fut aussi supposée avec la présence d'une présentation oligo ou polyarticulaire (OR = 0,72, non significative toutefois). Enfin, l'indice de privation (*English Indices of Multiple Deprivation* ou IMD) – tenant compte des ressources financières, des emplois, des moyens de santé, de l'éducation, des logements, de la criminalité et du cadre de vie – a également été associé au nombre de crises de goutte (deux crises au moins par an). (Bowen-Davies, Z. *et al.* 2018).



**Figure 8 : Epidémiologie de la goutte.**

La goutte est l'arthrite de l'adulte la plus fréquente mais sa prévalence est particulièrement disparate à travers le monde. Ici, les données épidémiologiques recueillies dans deux publications (Pascart, T. and Lioté, 2018 et Kuo, C.F. *et al.* 2015) ont été replacées sur cette carte dont l'inspiration vient de la publication de Pascart, T. and Lioté, 2018. Globalement, la prévalence est élevée principalement dans les pays occidentaux, les îles de l'océan Pacifique et certains pays émergents (en Asie du sud-est notamment).

### 1.2.2. Etiologie de la goutte

L'étiologie de la goutte tient principalement à celle de l'hyperuricémie, facteur nécessaire à la formation des cristaux de MSU responsables de la goutte. Ici, je détaillerai principalement le métabolisme de l'urate ainsi que les déterminants génétiques et environnementaux conduisant à l'hyperuricémie.

### 1.2.2.1. Des mutations affectant le métabolisme de l'urate

Les purines présentes dans les acides nucléiques comme l'ADN sont l'objet d'un catabolisme réalisé au moyen de plusieurs enzymes permettant *in fine* la synthèse d'urate, un déchet métabolique. Celui-ci est, chez l'Homme, normalement présent dans le sang à des taux compris entre 40 et 60mg/L, auxquels il reste soluble. Contrairement aux primates, la plupart des mammifères possèdent une enzyme (uricase), permettant la conversion de l'urate en allantoïne, une molécule soluble qui peut alors être librement excrétée par les reins. La perte de l'uricase au Myocène (il y a 20 millions d'années) a donc été déterminante dans la mesure où l'absence de cette enzyme favorise l'hyperuricémie chez la plupart des primates, y compris l'Homme. Chez la souris, la présence de l'uricase permet de ne pas excéder 20-30mg d'urate/L.

La formation de l'urate est réalisée séquentiellement par l'excision de la base azotée du nucléotide en question par des enzymes appelées nucléotidases et PNP (*purine nucléotide phosphorylase*). Enfin, les bases azotées pourront alors être converties en xanthine ou hypoxanthine, pouvant à leur tour être oxydées en urate par la xanthine oxydase (XO). L'HGPRT (*hypoxanthine Guanine phosphoribosyl-transférase*) est, quant à elle, requise pour l'élaboration de nouveaux nucléotides à partir de l'hypoxanthine et de la guanine constituant une « voie de sauvetage ». Cette enzyme est ainsi cruciale puisqu'elle permet un recyclage des nucléotides et minimise ainsi la dégradation en urate (Voir cycle (**Figure 9**)). De manière intéressante, des mutations de type « perte de fonction » dans le gène codant l'HGPRT ont été isolées chez des patients présentant le syndrome de Lesch-Nyhan, grave et caractérisé par une goutte dite « tophacée » sévère et des troubles d'ordre psychiatrique et le syndrome de Kelley-Sigmiller, au tableau clinique plus modéré. Dans les deux cas, l'hyperuricémie survient anormalement tôt et mène rapidement à la formation de nombreux tophus (**Kelley-Textbook of Rheumatology, 9<sup>ème</sup> édition**).

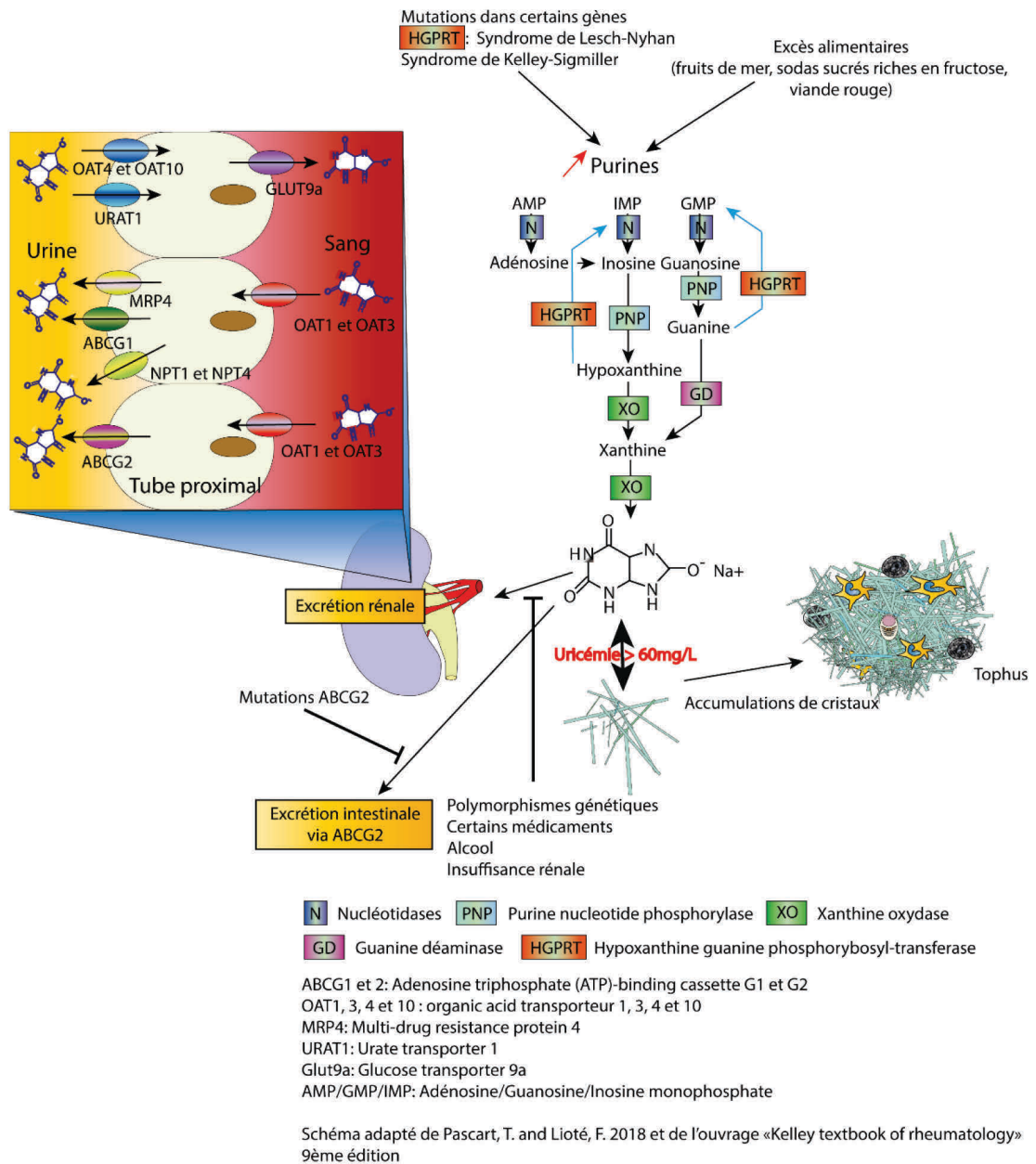
Si la quantité totale d'urate sanguine est fonction de l'activité de certaines enzymes (oxydases par exemple), elle est également dépendante des mécanismes d'excrétion rénale et intestinale. Au niveau rénal, des transporteurs tubulaires proximaux assurent la reabsorption de l'urate (URAT1, OAT4/10 et GLUT9a) puis sa sécrétion (via ABCG1/2, MRP4, OAT1/3). De manière intéressante, les polymorphismes d'ABCG2, de GLUT9a (SLC2A9) et d'URAT1 (SLC22A12) sont à ce jour bien reliés à l'hyperuricémie, ainsi démontré lors d'analyses d'association génétique (**Nakayama, A. et al. 2017 ; Matsuo, H. et al. 2009 (ABCG2)**). L'effet des polymorphismes d'ABCG2 fut même estimé supérieur aux autres facteurs de

risque dans la population japonaise (**Nakayama, A. et al. 2015**). De manière intéressante, l'excrétion rénale semble contrôler quelques 70% du processus d'élimination de l'urate, les 30% restant seraient imputables à une élimination d'ordre intestinale ; ABCG2 est lié à ce processus (**Matsuo, H. et al. 2009**) et d'ailleurs associé à la fois aux hyper-uricémies par sous-excrétion rénale (RUE pour *renal underexcretion*) et surcharge rénale (ROL pour *renal overload* où l'excrétion intestinale est déficiente) (**Matsuo, H. et al. 2015**).

#### 1.2.2.2. Facteurs environnementaux

Les facteurs étiologiques sont multiples et nous pouvons citer principalement la contribution alimentaire. Dans ce cadre, la consommation d'aliments et boissons riches en purines (bière, fruits de mer, viande rouge) mais aussi des boissons alcoolisées (bière, alcools forts) est clairement contributive en augmentant la quantité d'urate produite et en diminuant son excrétion rénale respectivement. Les boissons sucrées semblent également être capables d'accroître cette production en augmentant les taux d'Adénosine diphosphate (ADP). En effet, le fructose contenu dans celles-ci est convertit en fructose-1-phosphate par la fructokinase convertissant un ATP en un ADP par molécule de fructose. La hausse de l'ADP dans les cellules s'accompagne alors du catabolisme de cet ADP en une molécule d'urate.

Secondairement, la prise de certains médicaments semble en mesure d'accroître l'uricémie et donc de causer à long terme des crises de goutte. Pour cela, citons certains diurétiques tel le furosémide, certains immunosuppresseurs comme la ciclosporine A, des antituberculeux (Ethambutol) (**Dalbeth, N. et al. 2016**). Certaines substances toxiques sont aussi en mesure de provoquer de la goutte comme le plomb (« goutte saturnine »).



**Figure 9 : Métabolisme de l'urate, de sa genèse à son élimination.**

Les purines provenant de la dégradation des acides nucléiques endogènes et de l'alimentation sont l'objet de deux étapes d'oxydation permises par la xanthine oxydase (XO) formant alors de l'urate. Une voie dite « de sauvetage » permet toutefois de recycler l'hypoxanthine et la guanine afin de re-synthétiser des bases puriques, réduisant en partie la formation d'urate. L'urate est principalement éliminé par les reins via des transporteurs spécialisés permettant sa réabsorption et son excrétion. Une partie de son élimination se fait également au niveau intestinal via le transporteur ABCG2. De nombreux facteurs peuvent accroître les taux sanguins d'urate comme des polymorphismes intéressant les transporteurs rénaux/intestinaux d'urate, des mutations de l'HGPRT, une insuffisance rénale, la prise de certains médicaments, la prise d'alcool ou des excès alimentaires.

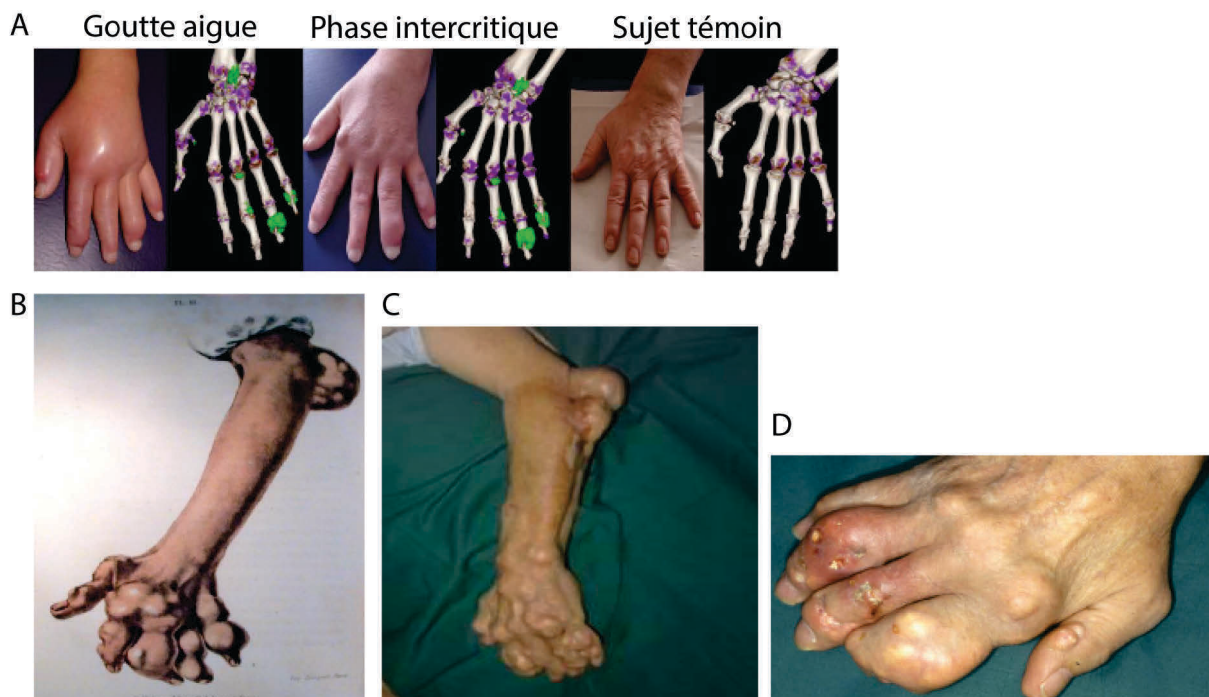
### 1.3. Caractéristiques cliniques de la goutte

#### 1.3.1. Description clinique

Les **crises de goutte** sont décrites comme des accès douloureux siégeant dans de nombreuses articulations, les tissus mous péri-articulaires sont aussi fréquemment atteints. On retrouve ainsi une atteinte articulaire au niveau du gros orteil (articulation métatarso-phalangienne 1 ou MTP1) réalisant ce que l'on appelle la podagre ; l'inflammation est alors intense et la peau prend une couleur rouge sombre caractéristique témoignant du degré d'inflammation. La douleur est vive ce qui traduit un phénomène hyperesthésique. Celle-ci est connue comme étant particulièrement forte. Dans un ouvrage ancien, les premières attaques de goutte furent décrites comme suit : *« se produisent au milieu de la nuit (ordinairement de minuit à 3 heures du matin). Le malade est réveillé par une douleur très violente au niveau de l'articulation qui unit le pied au gros orteil. Le moindre attouchement, le moindre mouvement rendent ces douleurs intolérables ; dans certains cas, elles s'étendent au pied et même à la jambe »* [...] *« la peau du gros orteil est rouge, luisante ; toute la région (notamment les veines) est tuméfiée »* [...] *« la fièvre atteint 38° à 40° et les urines sont rouges »*. (**Larousse Médical, 1921**). Bien que les « urines rouges » qualifient davantage d'autres atteintes que la goutte elle-même, ces écrits rendent compte d'une réalité encore actuelle, celle d'une maladie handicapante et très douloureuse.

Après plusieurs crises, la goutte peut devenir **chronique** et se généraliser, d'autant plus si l'hyperuricémie est laissée sans traitement. Dans cette situation, des tophus peuvent apparaître autour des articulations mais aussi à des sites plus distants de celles-ci (hélix de l'oreille, diverses localisations cutanées). Elle peut souvent devenir la source d'un handicap important. Dans ce cas, il fut écrit à son propos *« accès plus prolongés que ceux de la goutte aiguë, à laquelle elle succède, et dont les intervalles ne laissent jamais le malade complètement bien portant »* [...] *« les engorgement articulaires persistent indéfiniment. Les pieds, les genoux, les mains sont déformés par de petites tumeurs bosselées (tophus) dont le volume varie d'un pois à un petit œuf »*. (**Larousse Médical, 1921**). De même, les tophus sont tout à fait capables d'engendrer, de par leur présence au niveau des articulations, des dommages radiographiques (érosions notamment). Des images illustrant cette réalité clinique sont présentées à la **Figure 10**.





**Figure 10 : La goutte en clinique.**

La goutte se présente généralement sous la forme d'une arthrite douloureuse siégeant au niveau des extrémités (articulations des pieds et des mains) mais aussi à d'autres localisations. Ici, des images issues de deux publications sont présentées. En haut (A), plusieurs images montrent en parallèle des photographies et des images obtenues par reconstruction à partir de données de DECT (*dual energy computed tomography*) des mêmes patients. Le DECT permet de visualiser les dépôts d'urate spécifiquement en les distinguant des autres types de dépôts (pyrophosphate de calcium par exemple), ceux-ci sont colorés en vert, calcium en violet. Malgré la différence clinique (crise de goutte : gonflement évident ; goutte inter-critique avec plusieurs tophus), les dépôts de cristaux demeurent en place lors des phases inter-critiques. Ces images proviennent de Schauer, C. *et al.* 2014. En bas (C-D), plusieurs photographies prises sur la même patiente illustrent la gravité d'une goutte dite tophacée (photographies datant de 2000, issue de Jansen, T.L. *et al.* 2015), en B), image montrant cette réalité en 1867 (représentation par J.M. Charcot, issue de Jansen, T.L. *et al.* 2015).

### 1.3.2. Localisations et caractéristiques de l'atteinte articulaire

De nombreuses localisations ont été décrites, il est ainsi possible d'avoir des inflammations au niveau de divers sites articulaires (articulations des mains et des pieds, inflammation des bourses articulaires : bursite de l'olécrâne et rotulienne dans 15% des cas, **Abate, M. *et al.* 2013**) mais aussi extra-articulaires. Par ordre de fréquence, figurent 1) l'articulation MTP1, 2) des grosses articulations comme les genoux et les chevilles ainsi que les régions tarsales, 3) plus rarement les poignets et coudes (**Abhishek, A. *et al.* 2017**). On retrouve également volontiers des tophus dans les tissus mous chez certains patients ; quelques situations

cliniques sont plus propices à ce genre de présentation dite « tophacée » comme dans le cas de traitements à la ciclosporine A chez les patients greffés (**Abhishek, A. et al. 2017**).

Les épisodes sont volontiers soudains et la maladie évolue sous forme de crises durant quelques jours, unique ou bien espacées de périodes plus ou moins longues appelées périodes inter-critiques. Généralement, la crise de goutte est à son acmé 12 à 24h après ses débuts et sa résolution survient après 1 à 2 semaines (**Abhishek, A. et al. 2017**). Chez les patients chez lesquels l'hyperuricémie est laissée non traitée, les crises se suivent en écourtant les phases de rémission et l'évolution peut se compliquer de dommages articulaires parfois conséquents. Les gouttes tophacées sont aussi accompagnées d'érosions vraisemblablement provoquées par la présence des tophus et sont parfois visibles lors d'examens radiographiques.

Depuis très longtemps, les crises avaient été rapportées comme survenant de nuit et cela fut étayé par une publication récente. Ainsi, dans une étude publiée en 2015 (**Choi, H.K. et al. 2015**), il fut montré que les crises de goutte avaient une survenue principalement nocturne (minuit à 7h00) avec un Odd-ratio (OR) de 2,36 relativement à la tranche horaire 8h00-16h00 ; la tranche 16h00-minuit était aussi plus élevée que la période diurne (OR = 1,26). Quant à l'explication de cette prévalence nocturne des crises de goutte, les auteurs ont alors proposé 1) des variations nyctémérales de la température corporelle et des taux de cortisol (tous deux décrus en phase nocturne) et 2) la présence d'une hypoxie liée aux apnées du sommeil, fréquentes chez les patients obèses et ceux présentant de la goutte. Enfin, 3) la déshydratation nocturne pourrait aussi jouer un rôle.

### 1.3.3. La goutte d'un point de vue clinico-biologique

Si la douleur est souvent mise au premier plan, les crises peuvent s'accompagner de fièvre (habituellement de bas grade) et ce principalement dans le cas de crises polyarticulaires (impliquant plusieurs articulations) (**Dalbeth, N. et al. 2016**). Les analyses biologiques révèlent alors bien souvent une élévation des protéines de la phase aigüe (CRP (protéine C réactive) parfois supérieure à 100mg/L) qui peut être particulièrement forte. Une hyperleucocytose, de type neutrophilie, est également possible. Chez la plupart des patients, une hyperuricémie est détectée, c'est-à-dire l'obtention de valeurs d'uricémie supérieures à 360 $\mu$ mol/L soit plus de 60mg/L d'urate sanguin (**Abhishek, A. et al. 2017 ; Dalbeth, N. et al. 2016**) ; toutefois l'hyperuricémie est également présente chez de nombreux sujets asymptomatiques.

Dans le liquide synovial, la présence d'un nombre accru de leucocytes est habituelle. Ce liquide alors qualifié d'inflammatoire (si plus de 2000 leucocytes/ $\mu\text{L}$ ) regorge typiquement de neutrophiles, largement majoritaires et parfois en nombre supérieur à 50 000/ $\mu\text{L}$ . Le liquide synovial contient fréquemment les cristaux d'urate qui permettent alors de poser le diagnostic (**Dalbeth, N. et al. 2016**). Ces derniers ont une biréfringence négative en lumière polarisée et mesurent entre 1-20 $\mu\text{m}$  (**Paul, H. et al. 1983**).

#### 1.3.4. Goutte et comorbidités

Il est connu à l'heure actuelle que de nombreuses comorbidités sont agrégées avec la goutte. En 2007, l'étude NHANES (*National Health And Nutrition Examination Survey*) portant sur plus de 8 000 personnes (population de 1988 – 1994) avait retrouvé une prévalence très élevée du syndrome métabolique chez les patients gouteux (défini selon les critères NCEP/ATPIII *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*, 2002 : présence simultanée de 3 ou plus des anomalies suivantes parmi 1) tour de taille > 102cm (H) ou 88cm (F), 2) Triglycérides > 150mg/dL, 3) HDL < 40 (H) ou 50 mg/dL (F), 4) hypertension artérielle (HTA) > 130/85mmHg, 5) glycémie à jeun > 110mg/dL). Dans cette analyse, les patients atteints de goutte souffraient à 62,8% (contre de 25,4%) de syndrome métabolique (OR = 3,05 ou 4,96 selon s'il est ajusté sur le sexe ou non). Ces mêmes patients présentaient plus d'obésité abdominale (62,9% contre 35,3%), d'hypertension artérielle (69,1 contre 30,3%) et plus d'anomalies biologiques (hypertriglycémie (53,7% contre 27,9%), HDL faible (47,4 contre 36,6%) et glycémie à jeun élevée (33,1 contre 10,8%)) (**Choi, H.K. et al. 2007**). Dans un même ordre d'idée, les patients atteints de goutte présentent une forte mortalité d'origine cardiovasculaire et de nombreuses autres complications. Parmi celles-ci, citons notamment la présence d'une insuffisance rénale chronique (24% des patients en IRC (insuffisance rénale chronique) de grade 3 ou plus) (**Roughley, M.J. et al. 2015**), d'une insuffisance cardiaque ou d'autres pathologies cardiovasculaires (AVC (accidents vasculaires cérébraux), fibrillation atriale). Si la présence d'une hyperuricémie a été reliée à l'hypertension artérielle dans certaines études, cette association ne fait pas l'unanimité et cette causalité nécessite probablement encore d'autres investigations pour être affirmée clairement (**Bardin, T. and Richette, P. 2017**). Néanmoins, il demeure bien démontré que les patients gouteux présentent souvent des comorbidités (parfois multiples) rendant parfois leur prise en charge thérapeutique compliquée.

### 1.3.5. Complications et conséquences

Si la goutte est bien souvent, et très largement à tort, considérée comme une pathologie bénigne et « simplement » d'origine alimentaire, ses conséquences à long terme peuvent être lourdes. En effet, la chronicité des attaques et l'installation progressive des tophus est responsable de troubles fonctionnels des articulations (ankylose). Le retentissement fonctionnel peut être grand en raison de la douleur mais aussi de dommages aux structures osseuses (érosions) et tendineuses (risque de rupture) ; le cartilage peut être, quant à lui, très endommagé. En dehors des lésions osseuses, la présence de tophus donne lieu aussi à un risque d'ulcération.

Par ailleurs, il est important de noter qu'une surmortalité a été mise en évidence chez les patients atteints de goutte. Dans une cohorte, le taux de mortalité standardisé ou SMR (*standardized mortality rate*) était de 2,37 sur une population de 706 patients, 1,57 chez les hommes et jusqu'à 4,50 chez les femmes. De manière intéressante, la mortalité fut principalement cardiovasculaire (59,4% des décès, défaillance cardiaque (SMR = 25), infarctus du myocarde (SMR = 7) et accidents vasculaires cérébraux (AVC) (SMR = 6)) et fut surtout positivement associée à l'uricémie (SMR de 2,44 et 2,93 pour les troisième et quatrième quartiles) (**Perez-Ruiz, F. et al. 2014**).

## 2. Physiopathologie et traitements de la goutte

### 2.1. Les cristaux, agents étiologiques des maladies microcristallines

#### 2.1.1. Les différents microcristaux, en bref

Si les cristaux d'urate de sodium sont caractéristiques de la goutte et en font ce que l'on appelle une arthrite microcristalline, d'autres types de cristaux existent. C'est ainsi le cas pour le rhumatisme à pyrophosphate de calcium où les cristaux sont, cette fois-ci, fait de pyrophosphate de calcium di-hydraté (CPPD, *calcium pyrophosphate dihydrate*) et dont la présentation peut, en certaines mesures, mimer la goutte. Ces cristaux existent sous différentes formes dénommées monocliniques (mCPPD) ou bien tricliniques (tCPPD) en fonction de leur aspect. De manière intéressante, leur potentiel inflammatoire est très nettement différent et les cristaux monocliniques ont été montrés comme étant prompts à générer une forte production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  et CXCL1 notamment) en activant plus fortement que les autres cristaux les voies MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-NF $\kappa$ B (**Campillo-Gimenez, L. et al. 2018**).

D'autre part, les cristaux de phosphate de calcium basique (PCB) ont été retrouvés sous forme de dépôts dans de nombreux tissus articulaires comme les cartilages. Ces cristaux se déclinent sous différentes formes cristallines incluant les cristaux de phosphate octacalcique (OCP), apatite carbonatée, phosphate tricalcique et d'hydroxyapatite. En pathologie, on les retrouve principalement associés à l'arthrose, souvent avancée, mais aussi à d'autres maladies articulaires comme le syndrome de Milwaukee ; il fut récemment montré que certains d'entre eux (OCP) activent une inflammation dépendante des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-1 $\alpha$ , dont la production est effective *in vitro* mais aussi *in vivo* (Narayan, S. *et al.* 2011).

En outre, d'autres substances peuvent aussi provoquer des dommages tissulaires lors de leur cristallisation comme le cholestérol. En effet, certaines conditions comme l'hypercholestérolémie peuvent favoriser la cristallisation du cholestérol alors en excès, de manière d'autant plus importante que l'hypercholestérolémie est forte. Dans certaines maladies comme le syndrome d'hypercholestérolémie familiale, les dépôts de cholestérol peuvent même se produire dans les téguments (xanthomes, xanthélasma). De manière intéressante, les cristaux de cholestérol ont été associés à la production d'IL-1 $\beta$  via l'activation de l'inflammasome NLRP3 et participent alors à la formation des plaques d'athérome, ainsi illustré dans un modèle murin (Dewell, P. *et al.* 2010). Ces exemples montrent donc une fonction importante de nombreux types de cristaux en pathologie humaine même si la goutte demeure la pathologie cristalline la mieux étudiée et la plus fréquente.

### 2.1.2. Les cristaux de MSU

Les cristaux d'urate de sodium (MSU pour *Monosodium urate crystals*) ont été reliés à la goutte principalement dans les années 1960. Les travaux de McCarthy, Hollander et Faires ont ainsi fait figure de référence en montrant successivement leur présence dans les liquides synoviaux de patients (McCarthy, D.J. and Hollander, J.L. 1961 ; McCarthy, D.J. 1962) et que leur introduction intra-articulaire reproduisait des crises de goutte chez le chien mais aussi chez McCarthy lui-même (Faires, J. and McCarthy, D. 1962).

Ces cristaux se présentent sous forme d'aiguilles facilement identifiables lors de l'analyse du liquide synovial ; leur biréfringence est négative lorsqu'examinés en lumière polarisée. Lors d'une description détaillée réalisée en 1983, des cristaux de MSU – natifs ou bien synthétiques – ont été analysés par microscopie électronique à transmission (Paul, H. *et al.* 1983). Cette étude les a alors décrits comme des cristaux longs et pourvus de bords nets ; opaque en microscopie électronique, leur apparence s'en retrouve modifiée au cours de

l'exposition au canon à électrons. En termes de taille, cette étude les a estimés à 1-20 $\mu\text{m}$  dans les liquides synoviaux et de 1-40 $\mu\text{m}$  lorsqu'ils sont issus de la bourse de l'olécrâne ou de tophus de localisations variables. Cette analyse montra une structure similaire dans les préparations synthétiques de cristaux de MSU avec, toutefois, une taille légèrement supérieure (2-60 $\mu\text{m}$ ) (Paul, H. *et al.* 1983). Des photographies sont présentées à la **Figure 11**. De manière intéressante, une étude a montré qu'ils étaient capables d'activer la production de TNF $\alpha$  par les monocytes humains de manière indépendante de leur taille (de 2,5 $\mu\text{m}$  à 12,5 $\mu\text{m}$  de long) (Landis, R.C. *et al.* 2002).

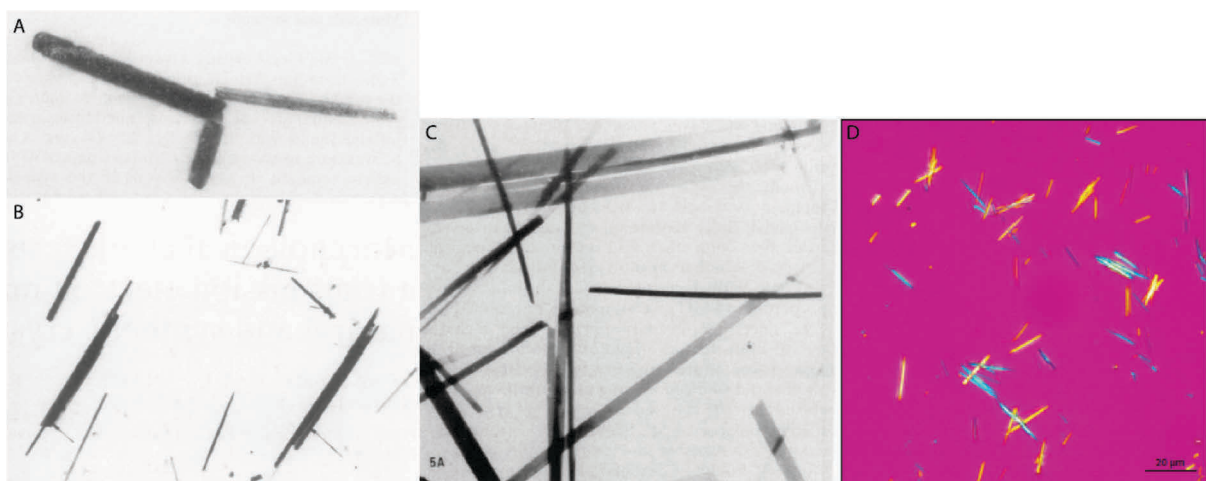
L'acide urique, à l'origine de ces cristaux, se présente tel un acide faible, généralement présent dans le sang à l'état d'ions urate (déprotonés). Lorsque l'urate se retrouve à l'état de sursaturation (taux supérieurs à 68mg/L en solution, à 37°C), la formation des cristaux de MSU se met en place par la constitution de noyaux contenant quelques molécules d'urate interagissant ensemble. Les molécules d'urate étant capables de se lier les unes aux autres par des liaisons hydrogènes, elles peuvent alors former des feuillets, eux-mêmes capables de se superposer afin d'effectuer une croissance en longueur des cristaux (Martillo, M.A. *et al.* 2014). Les cristaux obtenus sont alors dits tricliniques, c'est à dire décrivant 3 axes différents passant par les différentes faces cristallines et n'étant pas perpendiculaires entre eux (**Figure 12**). Lors de leur cristallisation, les cristaux de MSU se sont révélés être porteurs de nombreuses charges (négatives et positives dues à des protrusions d'atomes d'oxygène et d'ions sodium respectivement). De manière intéressante, ils sont capables d'interagir avec de nombreuses protéines parmi lesquelles le fibrinogène, CD16, des IgG (Immunoglobulines G), certaines fractions du complément (C5b-C9), et au total près de 25 protéines différentes (Liu-Bryan, R. *et al.* 2005). Enchevêtrés et enveloppés de protéines, les cristaux peuvent alors activer de nombreux types cellulaires, principalement des neutrophiles mais aussi des monocytes et macrophages *in situ*.

Les lieux de précipitation des cristaux de MSU, articulaires ou non, se sont révélés être plutôt périphériques. Certains auteurs ont alors supposé que les extrémités pourraient être un lieu approprié pour la cristallisation avec une température pouvant chuter rapidement lors de l'exposition au froid et une vascularisation limitée (Abate, M. *et al.* 2013). En effet, il a été montré qu'une chute de 2°C (de 37 à 35°C) était associée à un abaissement de la limite de solubilité de l'urate de 68mg/L à 60mg/L en solution (Loeb, J.N. *et al.* 1972).

Par ailleurs, plusieurs conditions semblent également influencer la cristallisation de l'urate de sodium. Ainsi, la présence d'un pH décroissant (relargage d'acide lactique, acidose due à

l'hypercapnie nocturne, consommation d'alcool), la hausse du calcium libre (acidose permettant notamment la libération du calcium précédemment complexé aux protéines), la présence de certaines substances (chondroïtine sulfate, phosphatidylcholine, Immunoglobulines de type IgG), la présence de cartilages arthrosiques ou les chocs mécaniques répétés sont des facteurs supposés influencer la formation des cristaux de MSU (**Martillo, M.A. et al. 2014**). Cela expliquerait ainsi, conjointement à une baisse de la température, pourquoi les crises de goutte sont si souvent localisées aux extrémités.

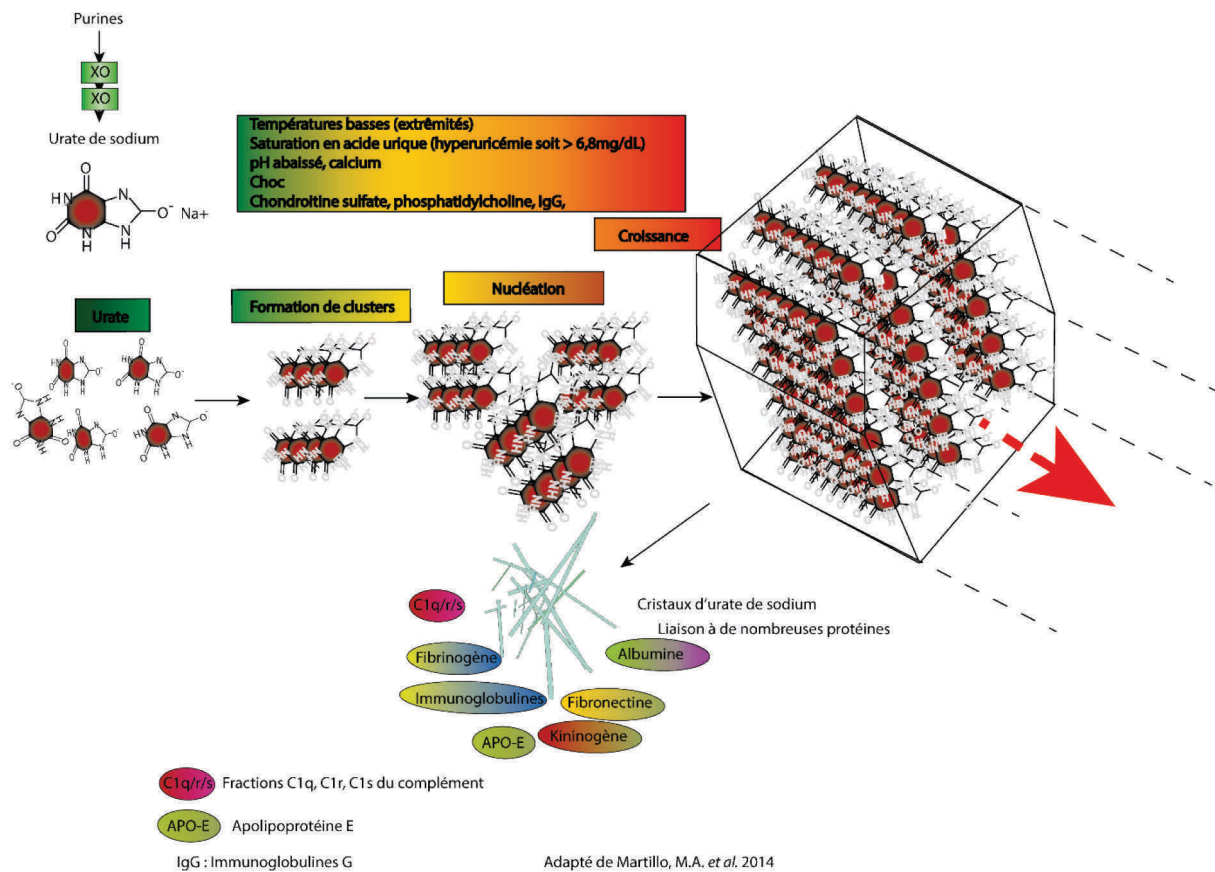
De manière intéressante, il est également à noter que l'urate soluble lui-même semble capable d'activer certains types de cellules. Ainsi, en 2003, **Shi, Y. et al.**, à partir de lysats cellulaires, ont pu montrer par chromatographie liquide et spectrométrie de masse que certaines fractions ayant un pouvoir adjuvant contenaient de l'urate en grande quantité. Bien que les auteurs estiment que les quantités d'urate présentes étaient suffisantes pour obtenir une cristallisation, plusieurs articles font état d'une contribution de l'urate sous forme soluble dans l'activation des certains types cellulaires (**Madouri, F. et al. 2015**).



Paul, H. et al. 1983

### **Figure 11 : Les cristaux d'urate monosodique (MSU) en microscopie**

A-C) Les images de microscopie électronique issue d'une publication de 1983 (**Paul, H. et al. 1983**) sont présentées ici. A) cristaux présents dans une ponction réalisée dans la bourse de l'olécrâne d'un patient (x12900), B) cristaux issus d'un tophus situé dans le pavillon de l'oreille d'un patient (x2860) et C) cristaux de MSU synthétiques (x3370). Globalement, leur forme évoque celle d'une aiguille mais avec des bouts francs et non effilés. Excepté leur taille – légèrement plus grande – les cristaux synthétiques ressemblent aux cristaux naturels. D) Cristaux de MSU visualisés en microscopie à lumière polarisée (**Dalbeth, N. et al. 2016**).



**Figure 12 : La formation des cristaux d'urate.**

Les cristaux d'urate se forment sous les effets de l'hyperuricémie, une situation dans laquelle l'urate se retrouve en saturation. Dans des conditions propices, l'urate va pouvoir cristalliser. L'urate forme d'abord des 'clusters' puis des noyaux (par mise en place de feuillets, stabilisés par des liaisons hydrogènes) à partir desquels aura lieu la nucléation et ensuite la croissance en longueur des cristaux. Les cristaux alors formés peuvent interagir avec de nombreuses protéines comme certaines fractions du complément, des immunoglobulines ou encore des protéines de la cascade de coagulation.



## 2.2. Physiopathologie de la phase aiguë

La crise de goutte est typiquement soudaine et est souvent documentée comme survenant à la suite d'un repas très riche, d'un trauma ou bien même parfois lors d'un traitement hypo-uricémiant chez un sujet sous traitement, en somme, plusieurs facteurs qui pourraient déstabiliser les structures formées par les cristaux. Certains auteurs ont pu montrer que certains acides gras (C18), lorsqu'injectés avec les cristaux de MSU dans la cavité synoviale, sont en mesure de déclencher une réponse plus robuste que les cristaux seuls chez la souris (**Joosten, L.A.B. et al. 2010**). Cela apporte donc une nuance quant à la participation seule de l'urate et des cristaux de MSU. Dans cette partie, il sera question ici de mettre en relief les différents mécanismes décrits dans la littérature participant à l'établissement de l'inflammation retrouvée lors de la goutte. Nous décrirons d'abord les différents types de cellules présentes sur place, les différents mécanismes au niveau cellulaire puis les grandes voies menant au recrutement des cellules impliquées dans la crise de goutte.

### 2.2.1. Les cellules impliquées dans la crise de goutte

#### 2.2.1.1. Les neutrophiles

Les neutrophiles, leucocytes sanguins majoritaires (60%, plusieurs milliers par microlitre de sang) ont été jusqu'alors rapportés comme des acteurs cruciaux dans de nombreuses arthrites. Ainsi, dans les liquides synoviaux de patients, les polynucléaires neutrophiles constituent l'essentiel des leucocytes présents au cours de la polyarthrite rhumatoïde comme des arthropathies microcristallines, catégorie à laquelle appartient la goutte. Ces derniers sont, de plus, fréquemment augmentés dans le compartiment sanguin réalisant une hyperleucocytose (polynucléose neutrophile). Afin d'étudier la goutte, différents modèles murins ont été à ce jour mis en place et reposent principalement sur l'injection des cristaux d'urate de sodium (MSU) préformés dans divers sites anatomiques ; la raison à ceci tient au fait que les rongeurs ont une uricémie très basse en raison de la présence d'une uricase fonctionnelle. Ces différents modèles, dont la majeure partie des résultats présentés ci-après ont été issus, consistent en des injections 1) intra-articulaires (genoux, cheville, tissus articulaires et péri-articulaires), 2) sous-cutanées (pattes arrières, gonflements diffus des tissus mous), 3) intra-péritonéales (infiltrat leucocytaire transitoire) et 4) dans une poche à air préformée (infiltrat leucocytaire transitoire). Dans tous ces modèles, la présence des polynucléaires a été observée et ces cellules constituent généralement la majorité de l'infiltrat. En reprenant quelques publications, ces chiffres atteignent quelques millions en général dans les modèles de la poche à air et des péritonites au MSU (Modèle de la poche à air :  $3-4 \times 10^6$  neutrophiles totaux à 6hpi

(Torres, R. *et al.* 2009 ; 1mg i.p.),  $2 \times 10^6$  à 6hpi et  $3 \times 10^6$  à 9hpi (Ryckman, C. *et al.* 2003, 1,5mg i.p.) ; Péritonites au MSU :  $1,5-3 \times 10^6$  neutrophiles totaux à 6hpi (Martinon, F. *et al.* 2006 ; 1mg i.p.) à  $3-4 \times 10^6$  à 4hpi (Gross, O. *et al.* 2012, 1mg i.p.) dans celui de la péritonite au MSU). Certains auteurs ont mentionné une majorité de neutrophiles (90%) dans le modèle de la poche à air notamment (Ryckman, C. *et al.* 2003), près de 50% dans le modèle de péritonite au MSU ( $4 \times 10^6$  neutrophiles contre  $5 \times 10^6$  monocytes/macrophages à 3hpi, 3mg i.p. Liu, L. *et al.* 2016).

Dans le modèle par injection intra-articulaire, l'infiltrat contient aussi de nombreux neutrophiles ( $1$  à  $4 \times 10^5$  neutrophiles dans les tissus péri-articulaires (cheville) à 15hpi, (Amaral, F. *et al.* 2016,  $100 \mu\text{g}$  i.a.) ; ainsi, la présence des neutrophiles ne fait à ce jour aucun doute à la fois chez l'Homme (liquides synoviaux) et dans les nombreux modèles animaux disponibles. Toutefois, la dépendance des neutrophiles dans des termes plus fonctionnels n'a été apportée que récemment. A cette occasion, des expériences de déplétion ont été réalisées à l'aide d'un anticorps anti-Gr1 (*Granulocyte receptor 1*) (Ly6G (*Lymphocyte antigen 6 complex locus 6G*) et Ly6C, déplétion vérifiée et efficace) ; en utilisant le modèle de goutte par injection sous-cutanée, il en est ressorti que l'œdème était franchement décri dans des temps très précoces (d'un facteur 5 de 0 à 6h, très significatif) et précoces (24 à 48h, variation légère mais significative) mais cet effet disparaissait dans les phases plus tardives. Ces mêmes auteurs ont également montré que les taux de myéloperoxidase (MPO), une enzyme spécifique des neutrophiles, était grandement décri par l'emploi de cet anticorps mais pas de l'isotype contrôle correspondant. Ces résultats furent de surcroît confirmés dans le modèle de goutte par injections intra-articulaires (injections dans la cheville) (Reber, L. *et al.* 2016). Ces résultats semblent donc confirmer un rôle majeur des neutrophiles dans plusieurs modèles de goutte.

Toutefois, une nuance mérite d'être apportée. Si les neutrophiles constituent l'essentiel de l'infiltrat ou du moins une part importante de celui-ci, de nombreux médiateurs inflammatoires semblent davantage émaner d'autres types cellulaires, principalement l'IL-1 $\beta$ , un médiateur crucial dans la goutte. Ainsi, il a été montré que les neutrophiles étaient tout à fait capables d'engager la production d'IL-1 $\beta$ , d'une manière dépendante de la caspase 1, en réponse à des agonistes solubles comme la nigéricine mais cela fut nettement moins efficace en réponse à des agonistes particuliers (MSU, alum, silice). Dans le cas des cristaux de MSU, la production de cette cytokine était pratiquement absente et cela était principalement expliqué par une inaptitude de la voie de rupture lysosomale à induire l'activation de

l'inflammasome NLRP3 chez les neutrophiles. Chez l'animal, la déplétion des neutrophiles (pratiquement totale) à l'aide d'un anti-Ly6G était tout à fait incapable d'abroger la production d'IL-1 $\beta$  après une injection intra-péritonéale d'Alum (autre activateur particulière de NLRP3) (Chen, K.W. *et al.* 2016).

Ces données montrent donc un rôle crucial des neutrophiles dans cette pathologie mais la constitution du foyer inflammatoire au cours de la goutte, humaine comme murine, semble aussi dépendre d'autres types cellulaires.

#### 2.2.1.2. Les monocytes et macrophages

Si les neutrophiles constituent une fraction notable de l'infiltrat, les monocytes et macrophages représentent une autre part importante de ce dernier. Ainsi, plusieurs études ont retrouvé des nombres importants de monocytes/macrophages dans le modèle de péritonite au MSU (Liu, L. *et al.* 2016), de la poche à air chez le rat (Schlitz, C. *et al.* 2002) où ces derniers représentèrent le type cellulaire le plus abondant dans les couches pariétales de la cavité. Dans ce dernier modèle (Gordon, T.P. *et al.* 1985), mais aussi chez le chien (Schumacher, H.R. *et al.* 1974, injections intra-articulaires), certains auteurs avaient également désigné les macrophages résidents (synoviocytes de type A) comme capables de phagocyter les cristaux de MSU et d'enclencher la réponse inflammatoire. Sur cette lancée, plusieurs autres études ont montré que la phagocytose des cristaux de MSU par les macrophages dépendait des récepteurs TLR2 et TLR4 et de leur adaptateur commun Myd88 (*Myeloid differentiation of 88kDa*) (Liu-Bryan, R. *et al.* 2005) ainsi que du récepteur CD14, un corécepteur de TLR4 (Scott, P. *et al.* 2006). Dans ces deux travaux, les auteurs reportèrent une baisse du recrutement des neutrophiles et de la production d'IL-1 $\beta$  dans le modèle de la poche à air (souris) ainsi qu'une abolition *in vitro* de la production d'IL-1 $\beta$  et de la chimiokine CXCL1, essentielle à l'attraction des neutrophiles.

Par la suite, les travaux de Fabio Martinon et de Jurg Tschopp ont alors largement réaffirmé la théorie selon laquelle la production d'IL-1 $\beta$  émanait des monocytes/macrophages stimulés par les cristaux de MSU. Celle-ci fut pour la première fois démontrée comme dépendante de l'inflammasome NLRP3 *in vitro*, dans les macrophages péritonéaux de souris mais aussi dans des monocytes humains THP1 avec une production de près d'un nano-gramme/mL d'IL-1 $\beta$  en quelques heures (Martinon, F. *et al.* 2006). Il est désormais admis dans la littérature que les macrophages résidents s'activent sur place en réponse aux cristaux de MSU et enclenchent

ensuite la chimiotaxie des neutrophiles, celle-ci est également renforcée par d'autres facteurs (complément, prostanoïdes, alarmines).

Ce postulat a également été étayé par plusieurs études. Il a été ainsi montré dans un modèle de péritonite aux cristaux de MSU, que les macrophages résidents semblaient tout à fait capables de promouvoir d'inflammation en recrutant les neutrophiles sur place à travers la production de chimiokines telles que CXCL1. Dans un même temps, des monocytes seraient attirés via CCL2 (chimiokine au motif C-C, ligand 2) et différenciés localement en macrophages M1 aux propriétés plus inflammatoires (**Martin, W.J. et al. 2011**). D'autre part, une autre équipe avait comparé des monocytes et macrophages humains (monocytes différenciés *in vitro*) quant à leur production de médiateurs inflammatoires. Ils ont ainsi montré que les monocytes sont davantage inflammatoires (sécrétant de l'IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF $\alpha$ ) lorsque stimulés avec des cristaux de MSU (**Landis, R.C. et al. 2002**). Les macrophages furent alors dépeints dans cette étude comme plutôt anti-inflammatoires.

Ces travaux annoncent donc les monocytes et macrophages comme les types cellulaires effecteurs dans la goutte bien que leurs rôles puissent être différents selon le contexte (phases précoces de la goutte, résolution). Ces derniers se présentent ainsi comme une source importante d'IL-1 $\beta$ , cytokine dont les rôles sont désormais bien documentés dans cette pathologie.

### 2.2.1.3. Les autres types de cellules

Parmi les types cellulaires impliqués dans l'inflammation goutteuse, plusieurs autres ont été également décrits comme les mastocytes et les synoviocytes.

Les mastocytes sont des polynucléaires retrouvées principalement dans les cavités corporelles. Présents en faible nombre, ils sont néanmoins capitaux pour plusieurs types de réponses immunitaires (réponse anti-parasitaire par exemple) et peuvent également contribuer à différentes pathologies comme cela a été décrit pour les maladies allergiques ou certaines maladies auto-immunes. Ainsi, les mastocytes ont été d'emblée reliés à l'inflammation au cours de maladies rhumatologiques comme la polyarthrite rhumatoïde. Dans cette dernière, il a ainsi été montré que les mastocytes étaient présents sur les lieux de l'inflammation dans un modèle d'arthrite au collagène (**Pimentel, T.A. et al. 2010**). En réalisant des traitements au nédocromil, une molécule capable d'entraver la migration des mastocytes, la sévérité de l'arthrite ainsi que le recrutement des neutrophiles sont alors décrus.

Afin de s'absoudre des effets confondants inhérents aux blocages pharmacologiques, une autre étude s'est intéressée aux rôles des mastocytes cette fois-ci dans la goutte par l'emploi de plusieurs modèles de déplétion. Ainsi, une série d'ablations constitutives (souris Cpa3-Cre, Mc11<sup>fl/fl</sup> et Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>) et inductibles (Mctp8<sup>DTR</sup> et Cpa3-Cre iDTR) et leur reversion par transfert adoptif de mastocytes dérivés de moelle ont été réalisés. Il fut ainsi montré que les mastocytes étaient nécessaires pour l'établissement de la goutte (par injections intra-articulaires) en sécrétant de l'IL-1 $\beta$ . L'analyse de liquides synoviaux leur a également permis de montrer une élévation de l'IL-1 $\beta$  conjointement à celle de l'histamine (**Reber, L.L. et al. 2014**). De manière intéressante, une publication (**Schlitz, C. et al. 2002**) avait montré un parallèle clair entre l'arrivée des mastocytes et le recrutement des neutrophiles dans un modèle d'injection de cristaux de MSU dans une poche à air chez le rat. L'infiltrat de mastocytes ainsi que la présence d'histamine semblaient précéder l'arrivée des polynucléaires neutrophiles laissant ainsi supposer un rôle précoce des mastocytes dans leur mobilisation.

D'autre part, le rôle des cellules délimitant les cavités synoviales – les synoviocytes – a été aussi questionné. Les synoviocytes peuvent être définis comme des cellules de deux types différents : les synoviocytes de type B ou de type fibroblastique (*Fibroblast-Like Synoviocytes* en anglais ou FLS) et les synoviocytes de type A (macrophages synoviaux). Alors que les premiers ont été très largement décrits dans la littérature comme contributifs de maladies rhumatologiques comme la polyarthrite rhumatoïde (**Bottini, N. and Firestein, G.S. 2013 ; Bartok, B. et al. 2010 ; Turner, J.D. et al. 2015**), leur contribution dans la goutte a été décrite lors de plusieurs travaux. Les FLS humains furent ainsi montrés comme étant capables de produire de l'IL-6 en réponse aux cristaux de MSU mais aussi de CPPD et d'hydroxyapatite, et d'une manière nettement supérieure aux monocytes (**Guerne, P.A. et al. 1989**). D'autres médiateurs semblent également être produits par ces cellules en réponse aux cristaux de MSU comme les chimiokines CCL2 et CXCL8 recrutant les monocytes/macrophages et neutrophiles respectivement (**Villiger, P.M. et al. 1992a ; Villiger, P.M. et al. 1992b ; Matsukawa, A. et al. 1998 ; Scanu, A. et al. 2010**).

### 2.2.2. La détection des cristaux d'urate

Si la responsabilité des cristaux de MSU est très claire dans le développement de la maladie goutteuse, la détection de ces derniers et les voies engagées en aval sont restées longtemps inconnues. Avant même les années 2000, plusieurs articles avaient montré que les cristaux de MSU étaient en mesure d'activer de nombreuses voies de signalisation intracellulaires aboutissant en la production de cytokines, chimiokines, anaphylatoxines et métalloprotéases.

### 2.2.2.1. Activation au contact des cristaux

En étudiant les cristaux d'urate de sodium, plusieurs équipes ont montré que ces derniers étaient capables de s'associer à de nombreuses protéines plasmatiques. Par une technique d'électrophorèse en deux dimensions, une trentaine de polypeptides furent retrouvés fixés sur les cristaux d'urate après exposition à du sérum humain ; parmi ceux-ci, des polypeptides dérivés du fibrinogène, de la fibronectine, kininogène, albumine, transferrine et IgG mais aussi des protéines de la cascade du complément (C1q, C1r, C1s) (**Terkeltaub, R. et al. 1983**). De manière intéressante, plusieurs articles ont alors montré que les protéines du complément pouvaient directement s'activer au contact des cristaux de MSU. L'activation de la voie classique fut ainsi observée mais décrite comme étant indépendante de la présence d'IgG dans le contexte des cristaux de MSU (**Giclas, P.C. et al. 1979**).

Quelques années plus tard, ces résultats furent confirmés mais la voie alterne fut aussi décrite comme activée à la surface de ces cristaux (**Fields, T.R. et al. 1983**). En dehors des anaphylatoxines C3a et C5a, aux rôles majeurs sur le recrutement des neutrophiles, une étude a également soulevé la question de l'importance des complexes d'attaque membranaire dans la crise de goutte. Les auteurs observèrent ainsi une nette baisse de la production d'IL-8 et du recrutement des neutrophiles dans les genoux de lapins C6<sup>-/-</sup> après injection des cristaux de MSU (**Tramontini, N. et al. 2004**).

### 2.2.2.2. Les récepteurs cellulaires aux cristaux de MSU

Plusieurs récepteurs cellulaires ont été décrits comme permettant d'enclencher la réponse aux cristaux de MSU ; des récepteurs activateurs comme CD14, CD16 et CD11b mais aussi inhibiteurs (comme certaines lectines) ont été associés aux réponses induites par ces cristaux. Le récepteur à la fraction Fc des anticorps – CD16 – a tout d'abord été montré comme important pour l'activation des polynucléaires neutrophiles, conjointement au récepteur CD11b. L'activation de la kinase Syk en aval fut l'un des événements inhibés lorsque ces deux récepteurs furent bloqués au moyen d'anticorps spécifiques (**Barabé, F. et al. 1998**). D'autre part, la dépendance à CD14, un récepteur interagissant avec TLR4 fut aussi montré comme déterminante dans la goutte. L'inactivation génétique de CD14 provoque une baisse de la production d'IL-1 $\beta$  et CXCL1 par les macrophages ainsi que du recrutement de neutrophiles dans un modèle de poche à air. L'interaction de CD14 aux cristaux de MSU fut aussi avancée (**Scott, P. et al. 2006**). Sur un autre versant, certaines lectines ont été reliées à la détection des cristaux de MSU. Clec12a, (*C type lectin 12a*) une lectine de type C, a été décrite comme un récepteur cellulaire fixant les cristaux de MSU mais délivrant cette fois-ci

un signal inhibiteur en aval. En effet, l'activation de la kinase Syk et la production de ROS – dépendant de la NADPH oxydase – fut majorée dans les cellules myéloïdes et les neutrophiles purifiés *Clec12a<sup>-/-</sup>*. Chez des souris *Clec12a<sup>-/-</sup>*, l'injection de MSU en intra-péritonéal donna lieu à une hausse du recrutement des neutrophiles (**Neumann, K. et al. 2014**). Toutes ces données montrent donc une implication notable de certains récepteurs cellulaires en fixant directement les cristaux de MSU. L'activation de la kinase Syk semble également être une étape importante dans les réponses cellulaires induites en aval (poussée oxydative des neutrophiles). Plusieurs articles ont par ailleurs montré que la voie Syk-PI3K/Akt était cruciale pour l'activation des neutrophiles puis leur dégranulation (**Popa-Nita, O. et al. 2007**) et que Syk était impliquée dans l'activation de la voie calcique et de la PLD (phospholipase D) dans ces mêmes cellules (**Desaulnier, P. et al. 2001**).

Enfin, si certains récepteurs semblent nécessaires, une liaison des cristaux de manière indépendante de ceux-ci fut aussi avancée (**Ng, G. et al. 2008**). Dans ces conditions, la liaison des cristaux semblait se faire principalement via le cholestérol des membranes cellulaires et une signalisation impliquant la kinase Syk. Une telle interaction fut montrée comme particulièrement forte et nuance ainsi les précédentes recherches/travaux visant à identifier un (des) récepteur(s) responsable(s) des réponses cellulaires aux cristaux de MSU.

### 2.2.2.3. Les voies TLRs

Si l'activation du complément et de Syk semblent bien assises, celle des voies TLRs fut démontrée mais reste controversée. Ainsi, plusieurs études ont montré une importance de TLR2 et 4 (**Liu-Bryan, R. et al. 2006**) avec une forte perte de l'activité de phagocytose des cristaux *in vitro* et une perte partielle de l'inflammation (neutrophiles, CXCL1, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) dans un modèle de la poche à air en contexte TLR2<sup>-/-</sup> ou TLR4<sup>-/-</sup>. Ces effets furent encore majorés par la perte de Myd88, un adaptateur commun aux voies TLRs et IL-1R. En utilisant un modèle intra-articulaire, une autre équipe décrivit la possibilité d'accroître le potentiel arthritogène des cristaux de MSU en y adjoignant des acides gras C18, un phénomène dépendant de TLR2 (**Joosten, L.A.B. et al. 2010**). Toutefois, ces résultats sont mis en doute par certaines publications ne montrant pas de rôles des différents TLRs (**Chen, C.-J. et al. 2006**) ; néanmoins, les modèles animaux employés ne sont pas les mêmes et cela pourrait expliquer les différences obtenues.

#### 2.2.2.4. Les MAP kinases

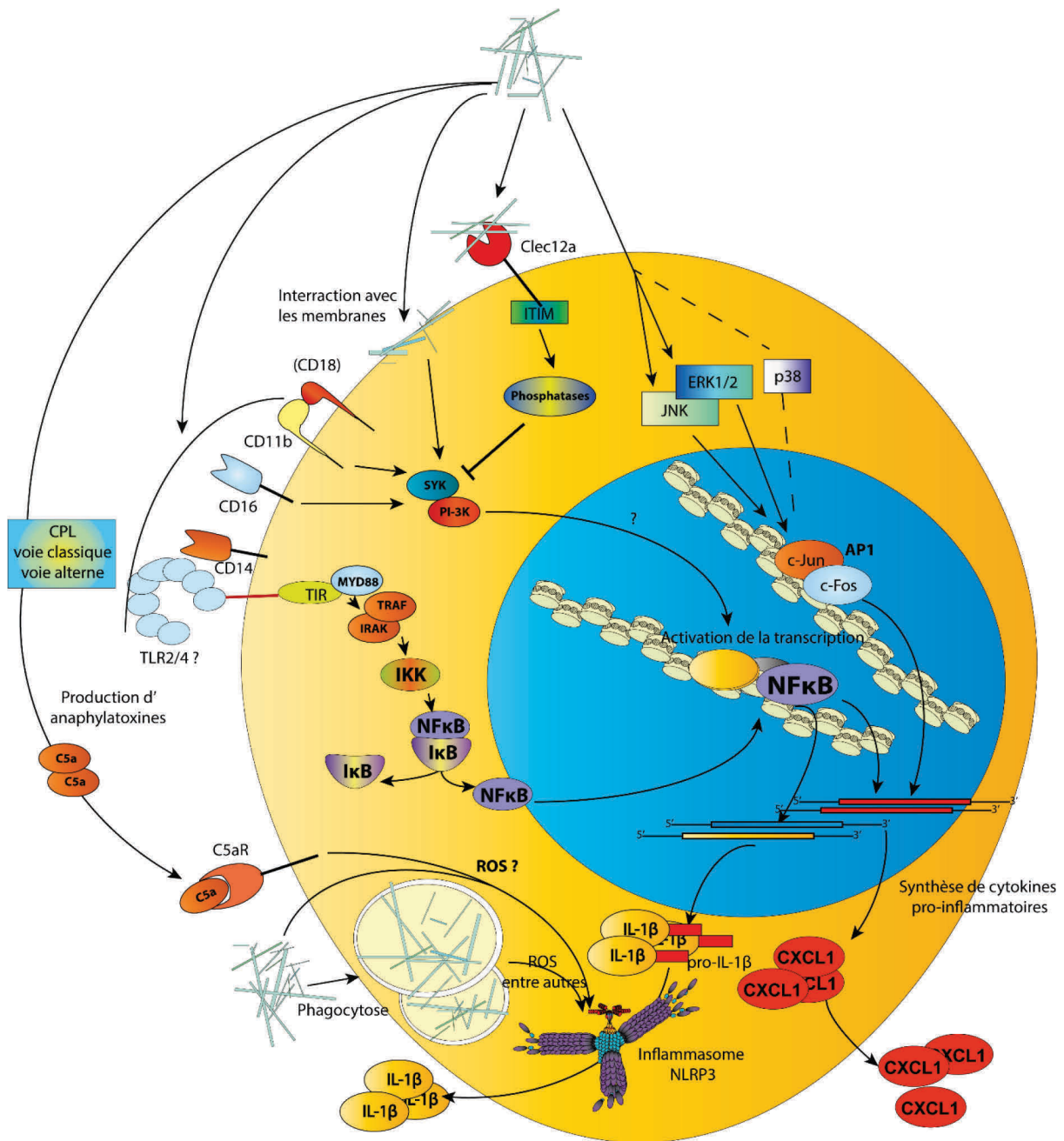
L'activation par les cristaux de MSU des voies de signalisation intracellulaires semble assez large. Activées en aval de nombreux récepteurs cellulaires, les voies MAPK (*mitogen activated protein kinases*) constituent des acteurs majeurs dans de nombreux processus (division cellulaire par exemple) à travers l'activation de facteurs de transcription tels qu'AP-1 (*Activator protein 1*). On distingue ainsi les protéines ERK1/ERK2 (*extracellular signal-related kinases*), p38 et JNK (*c-Jun N-terminal kinase*). Dans le contexte de l'exposition aux cristaux de MSU, l'activation des kinases ERK1/2 fut fonctionnellement reliée à l'expression de l'IL-8, principalement par l'activation du complexe AP1 (Liu, R. *et al.* 2000). La participation de NFκB a été aussi mise en lumière dans ce processus. En exposant des chondrocytes bovins aux cristaux de MSU, Liu, R. *et al.* 2004 démontrèrent que l'expression d'une métalloprotéase (MMP3) et d'iNOS était activée par un axe moléculaire impliquant Pyk2 et Src, activant alors la kinase p38. Chez ces cellules, l'expression d'iNOS (*inductible Nitric Oxid synthase*) (et la production successive d'oxyde nitrique) et celle de MMP3 est importante dans la mesure où ces médiateurs entrent en jeu lors des dommages cartilagineux.

#### 2.2.2.5. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Si les cristaux de MSU semblent pouvoir engager plusieurs récepteurs cellulaires, les MAPK et la voie Syk-PI3K en aval, il s'avère que ces cristaux pourraient aussi générer la production de ROS. Dans un article très original, les auteurs ont employé l'imagerie intra-vitale chez le poisson zèbre afin d'étudier l'inflammation induite par le MSU. Ces auteurs ont alors montré un recrutement de neutrophiles et de macrophages, largement dépendant de NFκB mais également de la production de ROS mitochondriaux, ainsi illustré par une baisse de l'*Il1b*, du *Tnfa*, du recrutement des neutrophiles et des macrophages lors de l'emploi d'inhibiteurs de la production de ROS mitochondriaux (MitoTEMPO). Cet effet était reversé par l'emploi de peroxyde d'hydrogène. Les auteurs ont montré que cette production de ROS mitochondriaux était initiée par l'oxydation des acides gras dans un mécanisme dépendant de l'enzyme IRG1 (*Immunoresponse gene 1*) ; ainsi l'excision d'*Irg1*, son blocage ou encore celui de la bêta-oxydation inhibait l'inflammation ; ces données furent ensuite transposées avec succès dans les cellules THP1 et chez la souris (modèle de la poche à air) (Hall, C.J. *et al.* 2018). Par ailleurs, de nombreux articles ont fait mention de la production de ROS en réponse aux cristaux de MSU (Dostert, C. *et al.* 2008 ; Zhou, R. *et al.* 2010) mais la responsabilité de la NADPH oxydase avait également été supposée. Par ailleurs, d'autres acteurs de la voie de réponse aux ROS, NRF2 (*Nuclear factor E2 related factor 2*) et HO-1 (*Heme oxygenase 1*),



ont été montrés comme nécessaires à l'activation de la production d'IL-1 $\beta$  à travers l'activation de NLRP3 dans les cellules THP1 (**Jhiang, J.J. et al. 2014**). Néanmoins, ces acteurs jouaient des rôles plutôt antioxydants et l'inhibition de la SOD1 (*superoxide dismutase 1*) abaisse cette production d'IL-1 $\beta$ . Cela nuance ainsi les précédentes observations selon lesquelles l'activation de la production de ROS activerait NLRP3. Ces mécanismes sont probablement plus complexes. Au final, il semblerait donc que les cristaux de MSU activeraient la production de ROS via les mitochondries mais aussi via d'autres enzymes (NADPH) et la manière dont ces ROS régissent l'activation des voies intra-cellulaires en aval nécessite encore d'être clarifiée. Tous ces mécanismes activés par les cristaux de MSU sont représentés à la **Figure 13**.



	(CD18) Cluster of differentiation (CD)18		Fraction C5a du complément	AP1: activator protein 1 ROS: espèces réactives de l'oxygène ← activation ⊥ Inhibition
	CD11b Cluster of differentiation (CD)11b		Nuclear factor κB	
	CD14 Cluster of differentiation (CD)14		Inhibitor of NFκB	
	CD16 Cluster of differentiation (CD)16		IκB kinase	
	C5aR Récepteur à la fraction C5a du complément		IL-1 receptor associated kinase	
	Clec12a C-type lectine 12a		Myeloid differentiation primary response 88	
	TLR2/4 Toll-like receptor 2 et 4		Toll-like receptor/IL-1 receptor domain	
	ERK1/2 Extracellular signal regulated kinases 1 et 2		TNF-related associated factor	
	JNK c-Jun N-terminal kinases		Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif	
	p38 p38 kinase		Phosphoinositide-3 kinase	
			Spleen tyrosine kinase	

### **Figure 13 : Les cristaux d'urate activent de nombreuses voies cellulaires.**

Les cristaux d'urate de sodium (MSU) semblent activer les voies NFκB, MAPK-AP1 ainsi que la kinase Syk en aval de nombreux récepteurs, aboutissant en la production de cytokines et chimiokines (IL-1β et CXCL1, CXCL8 dans les cellules humaines). Les cristaux de MSU pourraient ainsi engager plusieurs récepteurs comme CD14, CD16, CD11b et les TLR (TLR2 et TLR4) activant en aval les voies Syk et NFκB. La liaison des cristaux directement aux membranes cellulaires est également possible et conduit à l'activation de Syk. Paradoxalement, le récepteur inhibiteur Clec12a est également engagé, limitant l'activation de Syk en procédant à sa déphosphorylation via des phosphatases. D'autre part, les cristaux peuvent être phagocytés et activer l'inflammasome NLRP3 (voire section dédiée ci-après) et ainsi la production d'IL-1β bioactive. L'activation du complément à la surface des cellules semble également doper la production d'IL-1β via la génération de ROS en aval du récepteur à la fraction C5a du complément (C5aR). Tout ceci culmine en la production robuste d'IL-1β et de CXCL1.

#### **2.2.3. La crise de goutte : une histoire d'IL-1β et beaucoup de neutrophiles**

##### **2.2.3.1. La voie IL-1β-IL-1R**

###### **2.2.3.1.1. L'IL1β est une cytokine majeure**

Si la goutte est une maladie directement reliée aux cristaux de MSU, elle est apparue également très largement pilotée par une cytokine pro-inflammatoire : l'IL-1β. Ainsi, plusieurs études ont permis d'affirmer ce caractère IL-1-IL-1R dépendant. Dès 1987, les cristaux de MSU ont été montrés comme capables d'activer la production d'IL-1, encore dénommée « pyrogène endogène ». Dosée à l'aide d'un biotest et confirmée par l'emploi d'un antisérum de lapin, l'IL-1 était produite ici par des monocytes humains et des cellules présentes dans des liquides synoviaux humains (**Di Giovine, F.S. et al. 1987**). De même, l'IL-1β (mais aussi le TNFα) fut montrée comme augmentant l'expression de la sélectine E, de VCAM1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) et ICAM1 (*intercellular cell adhesion molecule 1*) chez les cellules endothéliales humaines et porcines, des molécules impliquées dans l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium et ainsi d'établissement précoce de l'inflammation (**Chapman, P.T. et al. 1997**).

Plus tard, d'autres résultats en ce sens furent publiés. Une très belle étude démontra ainsi l'importance de la protéine adaptatrice Myd88 dans un modèle d'injection intrapéritonéale de cristaux de MSU. Retrouvée en aval des récepteurs TLRs et de l'IL-1R1, Myd88 est une protéine adaptatrice cruciale dans l'établissement des réponses immunitaires innées ; ainsi, les auteurs ont tout d'abord démontré qu'aucune déficience isolée en l'un des TLR1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 ou 11, déficience combinée en TLR2/4 ou encore en protéines adaptatrices TRIF (*TIR-*

*containing adaptor inducing IFN $\beta$* ), MAL (*Myd88 adaptor-like*) ou TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) n'avait d'impact sur le recrutement des neutrophiles. L'usage de souris IL-1R1<sup>-/-</sup> ou d'anticorps polyclonaux anti-IL-1 $\beta$  et anti-IL-1 $\alpha$  abrogeait en revanche totalement ce recrutement (**Chen, C.-J. et al. 2006**). Ces données décrivent donc l'IL-1 ( $\alpha$  et/ou  $\beta$ ) ainsi que son récepteur comme des acteurs majeurs dans ce modèle. Par ailleurs, cet article montra aussi que l'expression de l'IL-1R était surtout importante sur les cellules non-hématopoïétiques.

En 2009, l'étude de **Torres, R. et al. 2009** montra que le blocage de l'IL-1 par l'emploi d'« IL-1-Trap » ou par une ablation génétique de l'IL-1R1, était capable de décroître l'inflammation dans le modèle par injection intra-articulaire (cheville) de cristaux de MSU. Chez l'Homme, les preuves obtenues quant à la participation de la voie de l'IL-1 et plus précisément de l'IL-1 $\beta$  furent notamment apportées par l'usage de l'Anakinra (**So, A. et al. 2007**, report de 10 cas traités par Anakinra) et du Canakinumab respectivement en clinique avec des efficacités remarquables. L'usage d'Anakinra (IL-1Ra recombinant) chez la souris a également montré des résultats intéressants dans le modèle de péritonite au MSU (**So, A. et al. 2007**) mais aussi intra-articulaire (**Joosten, L.A.B. et al. 2016**).

Ces données désignent donc l'IL-1 et les voies en aval (IL-1R1) comme capitales dans la goutte. Toutefois, il est important de noter que la délétion de l'IL-1R1 et l'emploi d'Anakinra ou d'IL-1 trap ne rendent en aucun cas compte des rôles différentiels de l'IL-1 $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$ . En effet, ces stratégies bloquent tant l'une que l'autre ; Des réponses furent néanmoins apportées par l'emploi de souris IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup> qui s'est également soldé par une abolition totale de la goutte dans des modèles intra-articulaires (**Reber, L.L. et al. 2014 ; Amaral, F.A. et al. 2012**). Cependant, dans les modèles d'injection intra-péritonéales de MSU, ce rôle prononcé de l'IL-1 $\beta$  est moins évident.

#### 2.2.3.1.2. Implication de l'inflammasome NLRP3

Dans la goutte et ses équivalents murins, la voie de l'IL-1 a donc été étudiée extensivement et de nombreuses publications ont attribué à cette cytokine un rôle crucial. La découverte de l'inflammasome NLRP3 puis celle de son implication dans la production d'IL-1 $\beta$  en réponse aux cristaux de MSU a contribué à cette vision (**Martinon, F. et al. 2006**). Dans cet article publié par l'équipe de Jurg Tschopp – un des découvreurs des inflammasomes – la réponse inflammatoire induite par les cristaux fut disséquée par l'emploi de plusieurs mutants dont *Nlrp3*<sup>-/-</sup>. Ici, la production d'IL-1 $\beta$  face aux cristaux de MSU fut reliée directement à la

présence des composants de l'inflammasome NLRP3 (ASC, Caspase 1, NLRP3) dans les macrophages péritonéaux *in vitro*. La perte d'un de ces composants induit ainsi l'abolition du clivage de la pro-IL-1 $\beta$  en sa forme mature et bioactive (IL-1 $\beta$  17kDa) dans ces cellules. *In vivo*, Dans un modèle de goutte péritonéale – où 1mg de MSU fut injecté par voie intra-péritonéale – la dépendance des membres de l'inflammasome NLRP3 (ASC, Caspase 1) et de la voie de l'IL-1 (IL-1R1) avait également été démontrée mais celle de NLRP3 ne fut toutefois pas rapportée (**Martinon, F. et al. 2006**). Par la suite, de nombreuses études ont confirmé la dépendance de la voie IL-1 $\beta$ -IL-1R1. La dépendance de l'inflammasome NLRP3 fut confirmée par **Amaral, F.A. et al. (2012)** ; ainsi, la perte de NLRP3, ASC ou encore de la caspase 1 abolit partiellement la goutte de même que chez les souris IL-1R1<sup>-/-</sup>, IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup> et Myd88<sup>-/-</sup> (adaptateur commun aux voies TLRs et IL-1R1) dans le modèle intra-articulaire (genoux).

Ces données semblent donc définir l'axe IL-1 $\beta$ -IL-1R1-Myd88 comme une voie incontournable dans la goutte. Si l'IL-1 $\beta$  semble si centrale, l'identification de sa (ses) source(s) n'a jusqu'alors pas donné de résultats très clairs. En effet, la participation de NLRP3 fait encore très largement débat.

#### 2.2.3.1.3. L'inflammasome NLRP3, quelles limites ?

A l'heure actuelle, la participation de l'IL-1 $\beta$  dans la goutte, en réponse aux cristaux de MSU, est un point de consensus retrouvé dans tous les modèles de goutte et chez l'Homme également. Toutefois, s'il est indéniable que l'IL-1 $\beta$  est bel et bien clivée par l'inflammasome NLRP3 *in vitro* dans plusieurs types cellulaires, les preuves de son importance *in vivo* demeurent insuffisantes (**Joosten, L.A.B. et al. 2011**). En effet, la majorité des équipes de recherche travaillant sur ce sujet, et se référant à une stratégie par souris *knock-out*, ont montré une dépendance vis-à-vis de l'IL-1 $\beta$  elle-même, de son récepteur IL-1R1 et des composants ASC et Caspase 1, communs à plusieurs inflammasomes (**Martinon, F. et al. 2006** ; **Joosten, L.A.B. et al. 2010** ; **Reber, L. et al. 2014** etc.). Ces résultats furent obtenus dans plusieurs modèles de goutte, mais la dépendance de NLRP3 demeure en suspens. **Joosten, L.A.B. et al. (2010)** ont notamment montré une indépendance de NLRP3 dans un modèle d'injection intra articulaire (genoux) de cristaux et ces auteurs ont avancé d'hypothèse d'un autre inflammasome impliqué localement. En effet, la perte d'ASC et de la Caspase1 donnait lieu à une baisse significative de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  dans les tissus patellaires conjointement à une baisse de l'œdème à 4hpi ; la perte de NLRP3 restait sans effet. **Reber, L. et al. (2014)** ont montré une faible dépendance de NLRP3, de la Caspase 1 et d'ASC

contrastant avec une très forte dépendance de l'IL-1R1 et IL-1 $\beta$  dans un modèle d'injection intra-articulaire (cheville). Néanmoins, aucune de ces deux publications n'a montré un quelconque mécanisme compensatoire ou autre inflammasome impliqué. Quelques années plus tard, l'hypothèse d'un clivage extracellulaire de l'IL-1 $\beta$  a été étendue dans le domaine de la goutte. Cette hypothèse stipule que les neutrophiles présents sur le site de l'inflammation seraient en mesure de libérer de la pro-IL-1 $\beta$  conjointement à des protéases extracellulaires (protéinase 3 (PR3), élastase neutrophilique (NE)) les mettant ainsi en contacts étroits. Le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  en sa forme de 17kDa, active, aurait ainsi pu se produire et contribuer à mettre en place le foyer inflammatoire en jeu dans la goutte. Ce modèle a notamment pu être étayé par plusieurs articles.

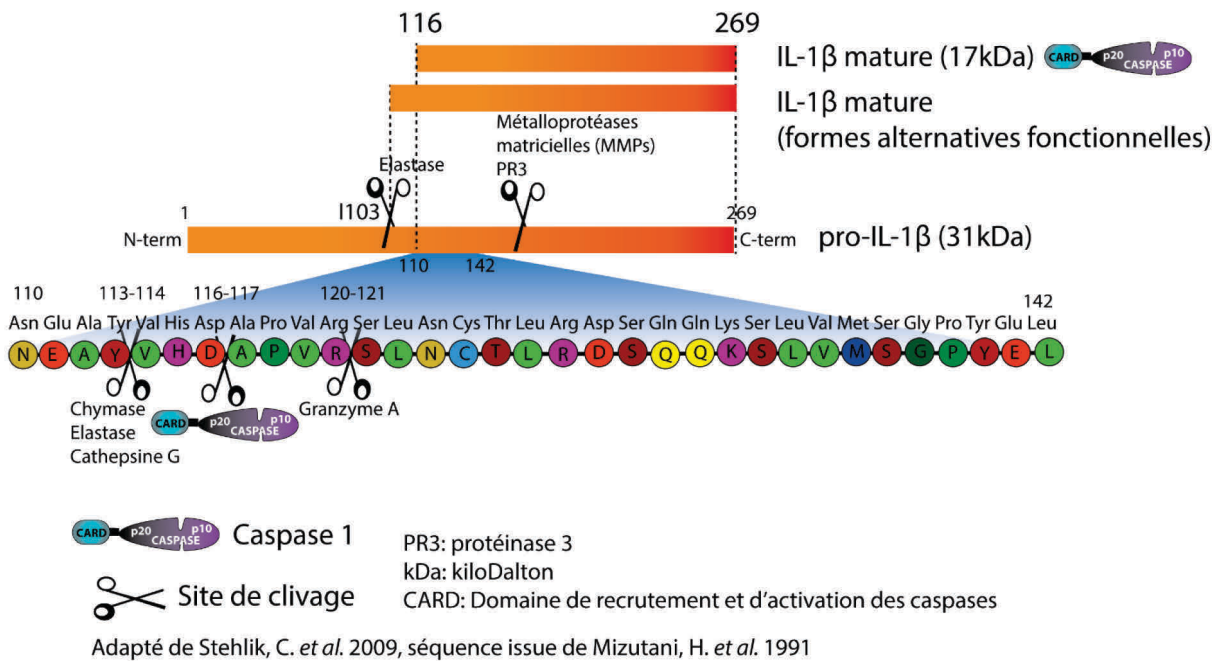
Il fut démontré, il y a désormais plus de 30 ans, que de nombreuses protéases comme la protéinase 3 (PR3) étaient en mesure d'assurer le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  en sa forme mature. Ce mécanisme fut documenté après la co-incubation de plusieurs enzymes avec de la pro-IL-1 $\beta$ , aboutissant à la genèse d'IL-1 $\beta$  mature : plasmine et trypsine (**Matsushima, K. et al. 1986**), chymase issue des mastocytes (**Mizutani, H. et al. 1991**), Granzyme A (**Irmeler, M. et al. 1995**), PR3 (**Coeshott, C. et al. 1999**) et les métalloprotéinases matricielles (MMP)-3 et 9 (**Schönbeck, U. et al. 1998**). Toutes ces enzymes conduisirent à production d'IL-1 $\beta$ , montrée bioactive au cours de biotests (incorporation de la thymidine tritiée par les thymocytes D10.G4.1) malgré des tailles parfois différentes des produits obtenus. De manière intéressante, MMP3 fut montrée comme procédant à la maturation de l'IL-1 $\beta$ , puis à sa destruction à des temps plus tardifs, montrant une contribution « diphasique » quant à l'activation de cette cytokine. La PR3, issue des neutrophiles fut illustrée dans plusieurs études. Dans la plus ancienne, la co-incubation de monocytes THP1 et de neutrophiles humains culminait ainsi en une hausse de la production d'IL-1 $\beta$  mais aussi de TNF $\alpha$ , ceci fut inhibé par le CE-2072 (bloquant la PR3 et la NE) mais pas par le SLPI (bloquant la Cathépsine G et la NE). Enfin, l'ajout de PR3 aux monocytes THP1 était capable d'accroître l'IL-1 $\beta$  mais la NE en était incapable (**Coeshott, C. et al. 1999**). Les sites de clivage potentiels de l'IL-1 $\beta$  par plusieurs protéases sont présentés à la **Figure 14**.

Ces résultats ont été confirmés par plusieurs équipes. Dans un modèle de choc septique, les neutrophiles se retrouvaient responsables d'une très forte production d'IL-1 $\beta$  mature lorsqu'en contexte IKK $\beta^{-/-}$  (*I $\kappa$ B (Inhibitor of NF $\kappa$ B) kinase  $\beta$* ) et ceci fut associé à une mortalité accrue des animaux employés ; dans ce cas il fut conclu qu'IKK $\beta$ , en activant NF $\kappa$ B, était en mesure d'accroître la synthèse d'inhibiteurs de protéases endogènes. La perte

d'IKK $\beta$  engendrait alors une hyper-activation de ces protéases (PR3 entre autres) par levée de répression et la production excessive d'IL-1 $\beta$  sous sa forme bioactive (**Greten, F.R. et al. 2007**). Dans un modèle de goutte par injection intra-articulaire de MSU (300 $\mu$ g) couplé à des acides gras C16, certains auteurs ont élégamment montré qu'une protéine de fusion  $\alpha$ 1-anti-trypsine-Fc (AAT-Fc) était en mesure de bloquer l'inflammation. Ainsi, à 4hpi, l'inflammation était très réduite (cellules infiltrées, CXCL1, IL-1 $\beta$  et IL-6) et ceci fut attribué à la capacité de l' $\alpha$ 1-anti-trypsine, sur laquelle est basée l'AAT-Fc, à inhiber les protéases extracellulaires (PR3). Ceci fut confirmé *in vitro* grâce à l'emploi d'une lignée cellulaire rapportrice. La sécrétion d'IL-6 fut ainsi activée par l'ajout simultané de pro-IL-1 $\beta$  et PR3 et inhibée de manière dose-dépendante par rajout d'AAT-Fc (**Joosten, L.A.B. et al. 2016**). Par ailleurs, la démonstration de l'implication des protéases extracellulaires dans un modèle d'arthrite aiguë avait été également apportée en 2009 par **Guma, M. et al.** où les auteurs ont employé le modèle d'arthrite STA (transfert de sérum). Ce modèle fut ainsi décrit comme indépendant de la Caspase1 mais sensible à l'usage d'inhibiteurs de chymase et d'élastase; dans le modèle d'injection péritonéale de MSU, la co-dépendance de la caspase 1 et de l'élastase a été montrée. Ces résultats furent confirmés dans une seconde étude utilisant ce modèle ainsi que celui d'arthrite induite par injection de paroi bactériennes (*Streptococcus pyogenes*) (SCW : *streptococcal cell wall-induced arthritis*); l'arthrite fut ici aussi indépendante de la caspase 1, excepté pour les phases tardives de l'arthrite SCW. De plus, le blocage conjoint de la caspase 1 et de la PR3 conduisirent à l'abolition de la production d'IL-1 $\beta$  ainsi qu'à une baisse de la sévérité de l'arthrite SCW (**Joosten, L.A.B. et al. 2009**). En parallèle, une étude portée sur un autre modèle d'arthrite (AIA : *antigen-induced arthritis*) avait aussi rapporté une indépendance des inflammasomes (aucun effet si *Casp1*<sup>-/-</sup>, *Nlr4*<sup>-/-</sup> et *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, effets sans lien avec les inflammasomes si *Asc*<sup>-/-</sup>) (**Kolly, L. et al. 2009**).

Les protéases extracellulaires seraient donc en mesure de cliver la pro-IL-1 $\beta$  en sa forme mature y compris dans le contexte de la goutte murine. Toutefois, il est intéressant de noter qu'elles seraient également requises pour l'activation d'autres cytokines de la famille de l'IL-1 (IL-36 $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  ainsi que l'IL-1 $\alpha$  (**Clancy, D.M. et al. 2017**) et l'IL-18 (**Sugawara, S. et al. 2001**)). Si NLRP3 est apparue telle une explication satisfaisante *in vitro*, sa nécessité *in vivo* demeure très incertaine. L'hypothèse d'un autre inflammasome ou/et la participation d'autres mécanismes permettant de cliver la pro-forme de l'IL-1 $\beta$  en sa forme active pourraient constituer des explications alternatives tout aussi intéressantes. De même, explorer cette voie est crucial dans le domaine car de nombreux inhibiteurs de NLRP3 sont actuellement à

l'étude en tant que futurs traitements. L'existence de voies compensant NLRP3 *in vivo* pourrait ainsi mettre à mal l'efficacité de cette stratégie.



**Figure 14 : L'IL-1 $\beta$  mature, un produit de plusieurs clivages**

A l'image de la figure 2, les différents sites de clivage de l'IL-1 $\beta$  sont présentés sur ce schéma. La pro-IL-1 $\beta$  (31kDa, 1-269) est clivée par la caspase 1 en la forme mature de 17kDa (153 acides aminés, 117-269). Toutefois, la chymase, dérivée des mastocytes, les protéases dérivées des neutrophiles (Elastase, Cathepsine G, PR3), le granzyme A et des métallo-protéases matricielles (MMPs) peuvent aussi générer de l'IL-1 $\beta$  bioactive mais possédant des tailles différentes de celle produite par la caspase 1.

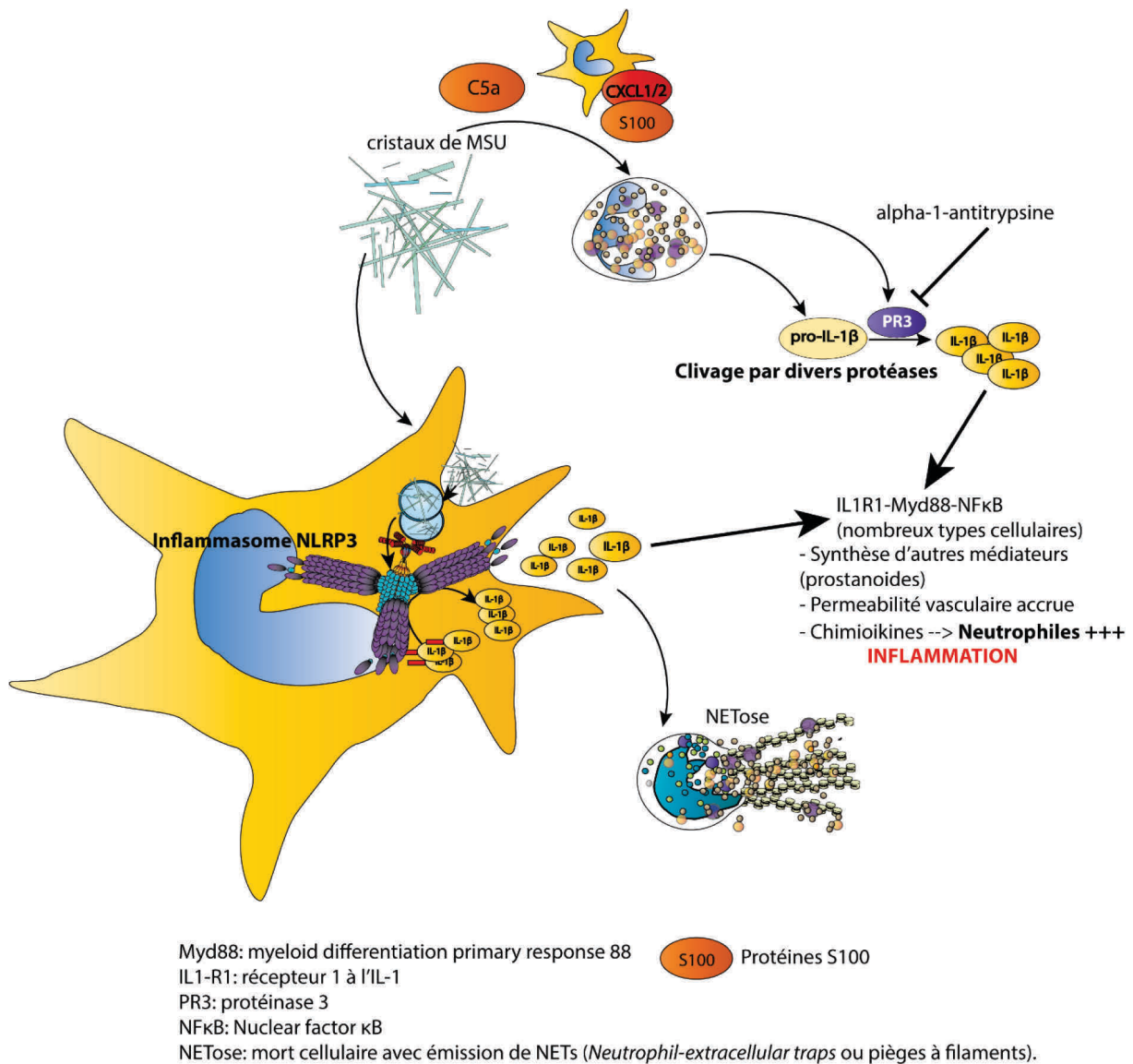
### 2.2.3.2. La voie CXCL1/2-CXCR2 et le recrutement des neutrophiles

L'IL-1 $\beta$ , cytokine pro-inflammatoire majeure, a ainsi été décrite comme capitale dans l'établissement de la crise de goutte, toutefois, de nombreux autres médiateurs sont également impliqués. Parmi ceux-ci, des chimiokines sont notamment produites par plusieurs types cellulaires et jouent un rôle tout à fait notable dans le recrutement des cellules immunitaires comme les neutrophiles et les monocytes/macrophages. Les neutrophiles, cellules majoritairement présentes sur le site de l'inflammation goutteuse, sont ainsi dépendants de la chimiokine CXCL8 – autrement nommée IL-8 – chez l'Homme. Cette dernière peut ainsi enclencher le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles en se liant au récepteur CXCR2. Chez la souris, les homologues de CXCL8 sont représentés par les chimiokines CXCL1 et CXCL2 aux rôles largement documentés.



Dans le cadre de la goutte, les premiers travaux ayant appuyé un rôle de ces chimiokines ont émergé dans les années 1990. Ainsi, une migration directionnelle de neutrophiles fut observée dans un système *in vitro* comportant des chambres de Boyden où des monocytes humains étaient au préalable activés par des cristaux de MSU. Cette dernière fut imputée à l'IL-8 (CXCL8), la migration étant abolie par l'usage d'un anticorps anti-IL-8. L'IL-8 fut aussi retrouvée sécrétée conjointement à l'IL-1 $\beta$  par des monocytes humains et décrite comme augmentée significativement dans les liquides synoviaux de patients atteints de goutte aiguë (Terkeltaub, R. *et al.* 1991). Quelques années plus tard, le rôle du récepteur CXCR2 (*C-X-C motif receptor 2*) fut affirmé chez la souris dans un modèle de poche à air où des cristaux de MSU furent injectés. Les souris déficientes en ce récepteur présentèrent un nombre de neutrophiles infiltrés très nettement décri ; chez des souris non déficientes, le récepteur CXCR2 ainsi que son ligand – CXCL1 – furent retrouvés exprimés par des leucocytes présents sur les feuillets pariétaux des poches à air, surtout près des dépôts cristallins (Terkeltaub, R. *et al.* 1998). D'autres publications ont également avancé des arguments dans cette direction ; Nishimura, A. *et al.* 1997 entravèrent ainsi le recrutement des neutrophiles dans un modèle de goutte intra-articulaire chez le lapin à l'aide d'un anticorps anti-IL-8. Matsukawa, A. *et al.* 1995 démontrèrent que l'injection intra-articulaire d'IL-8 de lapin était en mesure d'engendrer une synovite neutrophilique avec une production d'IL-1 $\beta$ , d'IL-1Ra et des dégâts cartilagineux imputables au relargage de l'élastase neutrophilique. De manière intéressante, la production d'IL-1 $\beta$  et son antagoniste étaient dépendants de la présence des neutrophiles, ainsi abolie par leur déplétion. Le récepteur CXCR2 et les chimiokines correspondantes sont donc étroitement liés au recrutement des neutrophiles lors de l'accès goutteux.

Enfin, une étude a montré que le leukotriène B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), produit par l'action de la 5-lipoxygénase (5-LO), est l'un des premiers médiateurs sur les lieux (1hpi) et précède la production de CXCL1 (3hpi) et celle d'IL-1 $\beta$  et de CXCL2 (dès 3hpi, pic à 6hpi). Le recrutement des polynucléaires neutrophiles (dès 3hpi) fut alors abrogé par blocage pharmacologique de CXCR2, de la 5-LO (ou par son ablation génétique) ou encore celui de LTB<sub>4</sub> lui-même (modèle intra-articulaire, Amaral, F.A. *et al.* 2012).



**Figure 15 : La voie de l'IL-1β, un axe majeur**

L'IL-1β est cruciale au cours de la goutte aigüe, sa production a été dépeinte comme dépendante de l'activité de l'inflammasome NLRP3 après phagocytose des cristaux de MSU par les macrophages. Toutefois, les neutrophiles recrutés sur place (via l'activité chimiotactique de C5a, CXCL1 ou encore des protéines S100) pourraient aussi procéder au clivage de l'IL-1β en sa forme active (voir Figure 14) via une batterie de protéases comme la PR3 ; l'α1-antitrypsine bloque ainsi la goutte dans un modèle murin en inhibant la PR3. L'IL-1β agit par son récepteur (IL-1R1) et engage en aval la voie NFκB et ainsi l'activation d'un vaste panel de gènes pro-inflammatoires (cytokines, chimiokines).

### 2.2.3.3. D'autres médiateurs modulant le recrutement des neutrophiles

#### 2.2.3.3.1. Les anaphylatoxines du complément

Parmi les autres médiateurs, l'anaphylatoxine **C5a** semble elle-aussi être très importante. Plusieurs travaux ont ainsi montré son implication dans la production d'IL-1 $\beta$  et le recrutement des neutrophiles. Une première étude a montré que C5a était capable, via sa liaison au récepteur C5aR, de déclencher une production de pro-IL-1 $\beta$  et d'IL-1 $\beta$  mature par des monocytes humains d'une manière dépendante de l'efflux potassique et de la caspase 1 (An, L.L. *et al.* 2014). Khameney, H. *et al.* 2017 ont pu démontrer que les macrophages péritonéaux traités par C5a produisaient davantage d'IL-1 $\beta$  mais aussi d'IL-1 $\alpha$  alors qu'il n'en était rien pour les cellules traitées avec l'anaphylatoxine C3a. Dans le modèle de goutte péritonéale, C5a et C3a furent mesurés à 60 et 1500pg/mL respectivement. De même, des souris déficientes pour C3 (C3<sup>-/-</sup>), pour le récepteur au C5a (C5ar<sup>-/-</sup>), mais pas pour C3aR, présentaient un infiltrat de neutrophiles décreu et des niveaux inférieurs d'IL-1 $\beta$ . Les auteurs montrèrent par la suite que C5a était efficace pour l'induction de la production de ROS. Cet article oriente ainsi le débat vers d'autres médiateurs exprimés précocement dans la goutte. En effet, de nombreux autres médiateurs sont également produits tels le TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\alpha$ , hétérodimère S100A8/A9, G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*), M-CSF (*monocyte colony stimulating factor*), MIP-1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein 1 alpha*, CCL3), MCP1 (*monocyte chemoattractant protein 1*, CCL2) (Liu-Bryan, R. *et al.* 2005 ; Gross, O. *et al.* 2012 ; Torres, R. *et al.* 2009) et contribuent à cette forte inflammation.

#### 2.2.3.3.2. Les MRPs

Les MRPs (*myeloid-related proteins*) sont de très petites protéines dont la taille est comprise entre 10 et 14kDa et dont on retrouve 3 représentants : S100A8, S100A9 et S100A12. Souvent présentes en hétérodimères S100A8/S100A9, elles se sont révélées être des puissants chimioattractants des polynucléaires neutrophiles. Ainsi, en 2003, une étude a démontré que ces protéines pouvaient participer à leur recrutement dans le modèle de la poche à air. Dans ces conditions, des chimiokines précoces (CXCL1, CXCL2) puis plus tardives (CCL2 et CCL3) apparurent. Toutefois, aucune de ces chimiokines ne fut, de par son blocage, montrée comme cruciale pour le recrutement des neutrophiles. Les MRPs quant à elles, accrue entre 6 et 12hpi, se sont révélées capables d'activer le recrutement des neutrophiles si injectées dans la cavité et leur blocage (S100A8 et A9 à la fois) fut très efficace, effondrant littéralement l'influx de neutrophiles dans cette cavité. De manière intéressante, l'hétérodimère S100A8/A9 fut montré comme très augmenté (20 000 fois) dans les fluides synoviaux des patients

goutteux et cette hausse est aussi visuelle dans le sérum (50 fois plus). Ces données ont donc démontré une importance des MRPs dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles (**Ryckman, C. et al. 2003**).

#### 2.2.3.3.3. L'IL-1 $\alpha$

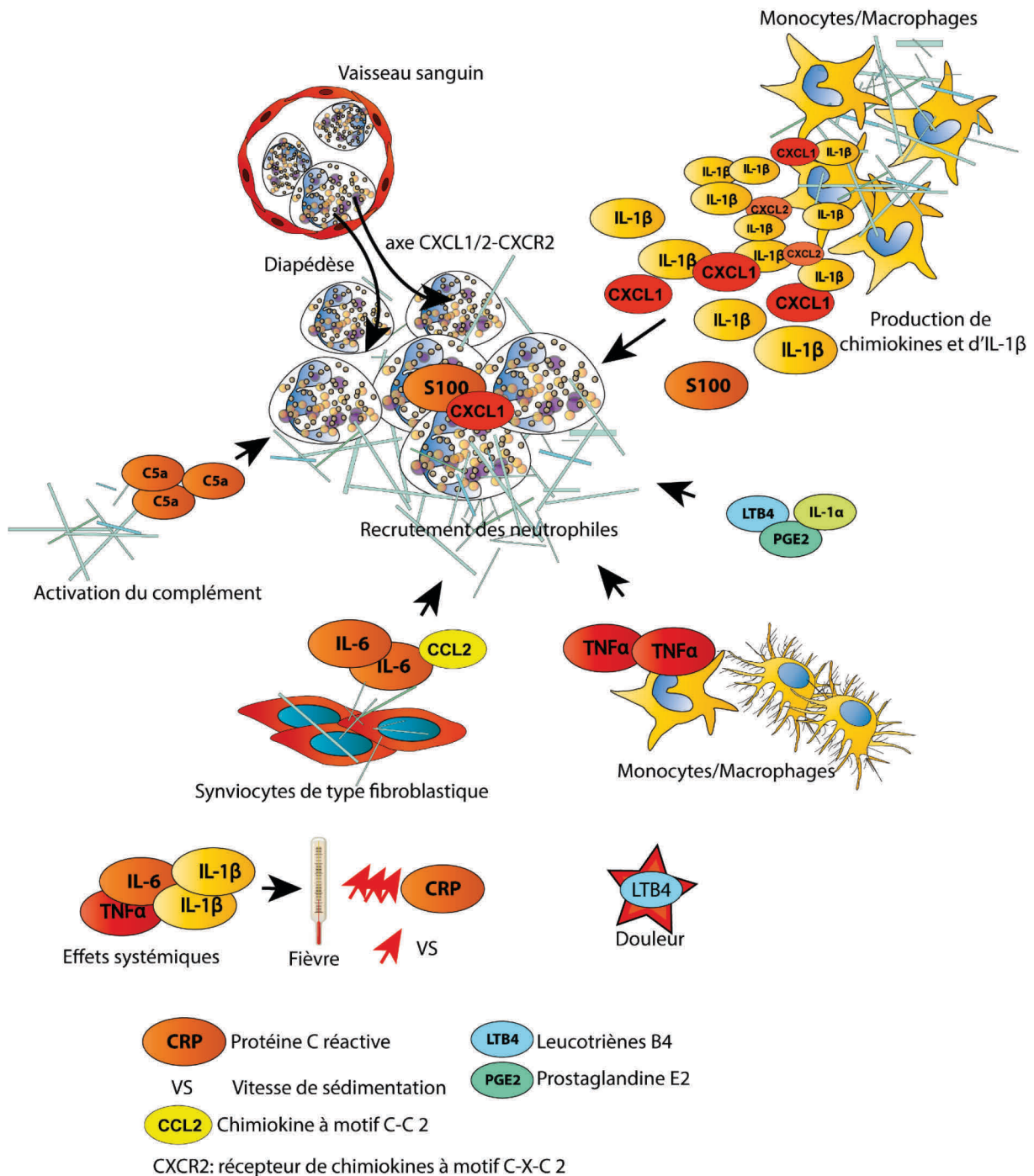
Si l'IL-1 $\beta$  est systématiquement considérée comme une cytokine centrale dans la goutte, l'IL-1 $\alpha$  a également été désignée comme un facteur inflammatoire important. En effet, l'IL-1 $\alpha$  est très impliquée dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles dans un modèle de péritonite au MSU. Dans ce modèle, **Gross, O. et al. (2012)** ont ainsi établi que l'IL-1 $\alpha$  était co-sécrétée avec l'IL-1 $\beta$  et que la perte de l'IL-1 $\alpha$  était plus dommageable pour l'établissement de l'infiltrat neutrophilique que celle de l'IL-1 $\beta$ . Toutefois les cristaux de MSU semblent capables de provoquer cette sécrétion d'une manière totalement indépendante des composants de l'inflammasome NLRP3 (ASC (PYCARD), CASP1, NLRP3); en revanche, ces cristaux requièrent le processus de phagocytose ainsi que la fonctionnalité des cathepsines contrairement aux ROS et à l'efflux potassique dont les blocages sont sans effet. Le clivage de l'IL-1 $\alpha$  est toutefois dépendant de la calpaine.

De manière intéressante, l'Anakinra – un récepteur soluble (IL-1Ra) recombinant reporté dans la littérature comme capable de freiner efficacement les crises de goutte chez certains patients – cible à la fois l'IL-1 $\beta$  et l'IL-1 $\alpha$ .

#### 2.2.3.3.4. Le TNF $\alpha$

Récemment, **Amaral, F. et al. (2016)** ont montré que le TNF $\alpha$  est un médiateur inflammatoire très exprimé dans les tissus péri-articulaires (> 1ng/100mg de tissu) dans le modèle avec injection intra-articulaire. Bloquer ce dernier par l'étaNERcept (TNFR couplé au Fc d'anticorps, 10mg/kg) ou bien par la Pentoxifylline permet alors de réduire drastiquement le nombre de neutrophiles infiltrés (perte totale et de 60% respectivement). De même, l'usage de souris déficientes pour le TNF $\alpha$  (*Tnfa*<sup>-/-</sup>) ou ses récepteurs *Tnfr1/2*<sup>-/-</sup> décroît l'influx de neutrophiles, la production de la chimiokine CXCL1 et la quantité d'IL-1 $\beta$  contenue dans les tissus mous péri-articulaires. Chez l'Homme, **Yokose, K. et al. 2018** ont pu également montrer que le TNF $\alpha$  exerçait un effet important sur la production d'IL-1 $\beta$  et de Caspase 1 induite par les cristaux de MSU lorsqu'employé en guise de pré-stimulation (TNF $\alpha$  10 et 50ng/mL) sur des neutrophiles humains. De manière intéressante, les agents pharmacologiques ciblant le TNF $\alpha$  ont montré une efficacité chez certains patients même s'ils

restent largement moins utilisés que ceux ciblant la voie de l'IL-1 (Anakinra, Canakinumab). La participation de tous ces facteurs est représentée à la **Figure 16**.



**Figure 16 : La phase aiguë ou « crise de goutte »**

Au cours de la crise de goutte, l'activation des cellules par les cristaux de MSU (voir figure 12) conduit à la biosynthèse et à la maturation de l'IL-1β par plusieurs voies (NLRP3 et protéases, Figure 14) ainsi qu'à la production de plusieurs chimiokines (CXCL1, CXCL2) par les macrophages. De plus, au contact des cristaux, des anaphylatoxines comme C5a sont produites. Conjointement, ces médiateurs activent alors l'endothélium et

recrutent en masse les neutrophiles, ce mécanisme peut s'auto-amplifier puisque les neutrophiles eux-mêmes peuvent produire des molécules comme la protéine S100 ou CXCL1. L'activation d'autres types cellulaires (FLS et macrophages) conduit à la production d'autres cytokines (IL-6, TNF $\alpha$ ) et chimiokines (CCL2); les leucotriènes (LTB4) et prostaglandines – produits précocement – mais aussi l'IL-1 $\alpha$ , relarguée par les cellules mortes jouent également un rôle majeur. Enfin, le passage systémique de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  engendre alors les signes fébriles et la synthèse de protéines de la phase aigüe par le foie (CRP). Le leucotriène LTB4 a été impliqué dans l'hyper-nociception associée à la goutte.

### 2.3. Physiopathologie de la phase de résolution

D'un point de vue clinique, les symptômes atteignent typiquement leur paroxysme dans les 24 premières heures de l'accès goutteux puis connaissent une phase dite de résolution. Les symptômes disparaissent pratiquement totalement alors que les cristaux sont toujours présents. Nettement moins étudiée que la phase aigüe inflammatoire, cette étape tardive est néanmoins très intéressante et sa compréhension représente un enjeu tout aussi grand d'un point de vue thérapeutique. Les recherches actuelles associent directement à cette phase certains mécanismes comme la NETose et quelques médiateurs anti-inflammatoires (IL-10, TGF $\beta$  etc.).

#### 2.3.1. La NETose, un régulateur des crises inflammatoires ?

Si les neutrophiles peuvent avoir recours à l'apoptose, ils peuvent aussi entrer en mort cellulaire par un autre procédé appelé la NETose. Dans de nombreuses situations, les neutrophiles mais aussi d'autres types de granulocytes ont été montrés comme capables de former des pièges à filaments (ou *Neutrophil extracellular traps (NETs)* en anglais d'où le nom de NETose issu de la contraction de NETs et d' « ose » (de « ptosis », tomber en grec)) (Jorch, S.K. and Kubes, P. 2017). Cette mort cellulaire très particulière a été montrée comme contributive dans de nombreuses maladies comme le lupus érythémateux disséminé et les vascularites à ANCA (anticorps anti-cytoplasme de polynucléaires neutrophiles) (Kaplan, M.J. 2013), les chocs septiques, pancréatites ou encore dans la polyarthrite rhumatoïde (Wright, H.L. et al. 2014) sur un versant plutôt pro-pathogène. Toutefois, la NETose est originellement un processus de défense antibactérien et antifongique; elle permet effectivement le relargage en masse de filaments d'ADN décondensés, décorés de peptides antimicrobiens (cathélicine LL37 en particulier), emprisonnant alors les agents infectieux dans ce « maillage toxique ».

Toutefois, ces NETs sont aussi connus pour présenter à leur surface de nombreuses enzymes comme la myéloperoxidase (MPO) et l'élastase neutrophilique (NE). Depuis peu, une équipe

de l'Université d'Erlangen (**Schauer, C. et al. 2014**) a montré un rôle important de la NETose dans la résolution des crises de goutte chez la souris. Dans ce contexte, les polynucléaires neutrophiles sembleraient, après injection de cristaux de MSU en sous-cutané dans les pattes des souris, entrer en NETose et former de très gros agrégats ; riches en protéases, ces amas se sont révélés capables de cliver plusieurs chimiokines (MCP1, MIP1 $\alpha$  et MIP1 $\beta$ ) et cytokines différentes (inflammatoires : IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 mais aussi IL-10 et IL-1Ra aux rôles plutôt anti-inflammatoires) *in vitro*. Ainsi, dans le cas d'une perte de cette fonction, la goutte présente une résolution anormale et une progression critique associée à des érosions osseuses. Ce processus a été montré dans des conditions où les neutrophiles sont susceptibles de se présenter en grands nombres sur les lieux de l'inflammation, comme cela a été très souvent décrit au cours de la goutte. Ainsi, la densité est un facteur majeur dans ce processus où les neutrophiles vont littéralement s'agréger autour des cristaux formant ces grosses structures, très similaires aux tophus goutteux (**Schauer, C. et al. 2014 ; Schett, G. et al. 2015**). De manière intéressante, il fut également démontré que la NETose était activée par l'IL-1 $\beta$  émanant des macrophages *in vitro*; ainsi, la formation de NETs fut accrue en présence de surnageants provenant de macrophages activés ou d'IL-1 $\beta$  recombinante, cet effet fut en revanche aboli par l'emploi d'Anakinra (**Sil, P. et al. 2017**). Ainsi, ces données montrent donc que les cristaux de MSU sont en mesure d'activer la NETose, un mécanisme visiblement important dans la phase de résolution de la goutte. De manière intéressante, il fut récemment montré que les cristaux de MSU étaient capables d'activer la libération de NETs au cours d'un autre processus de mort cellulaire : la nécroptose. Souvent confondue avec la NETose comme à l'origine de NETs également, la nécroptose est une nécrose programmée faisant intervenir la voie RIPK1 (*Receptor interacting protein kinase 1*)-RIPK3-MLKL (*mixed-lineage kinase domain like*). La formation de NETs induite par les cristaux de MSU mais aussi de phosphate de calcium, d'oxalate de calcium ou encore de silice est bloquée par l'usage de nécrostatine-1, de nécrosulfamide ou l'emploi de neutrophiles *Mkl<sup>-/-</sup>*. L'injection de cristaux de MSU dans la cavité péritonéale de souris Wt donne lieu à formation d'agrégats de NETs, ceux-ci sont abolis dans le fond *Mkl<sup>-/-</sup>* (**Desai, J. et al. 2017**).

### 2.3.2. Efférocytose et résolution

Certaines données de la littérature ont avancé des rôles variables aux phagocytes mononucléés, monocytes et macrophages. Ainsi, des données obtenues *in vitro* semblent montrer que les monocytes sont davantage inflammatoires (sécrétant de l'IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF $\alpha$ ) et participeraient à la crise de goutte puis seraient capables de se différencier en

macrophages pourvoyeurs d'IL-10, de TGF $\beta$ , PGE2 (*prostaglandine E2*) et PAF (*platelet activation factor*) (**Landis, R.C. et al. 2002**). Ces auteurs ont ainsi supposé que les cellules de Reiter, constituées d'une cellule phagocytaire contenant un neutrophile apoptotique, retrouvées dans le liquide synovial des patients atteints de goutte, pourraient découler de ce mécanisme.

### 2.3.3. Le TGF $\beta$

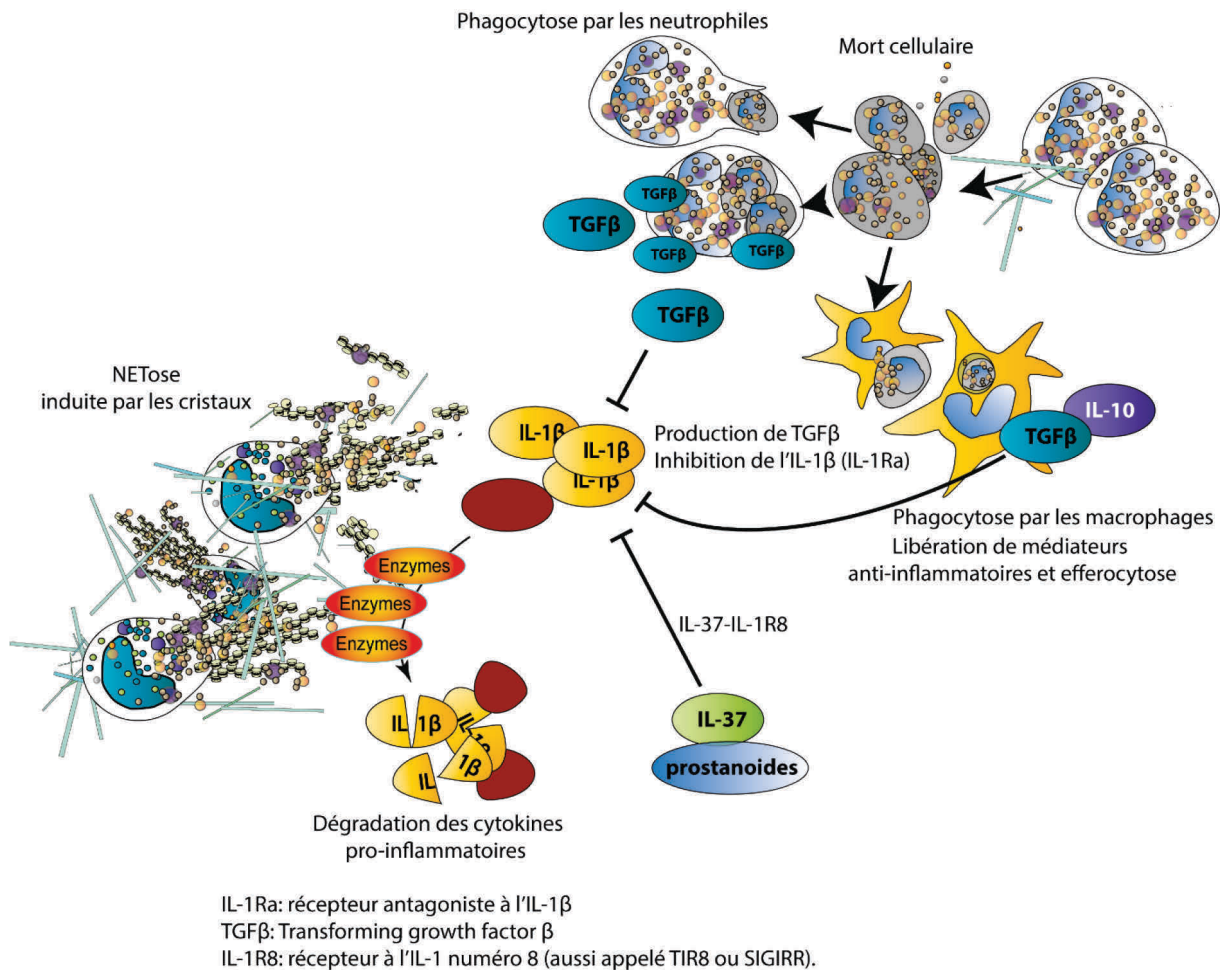
Le TGF $\beta$  (*Transforming growth factor  $\beta$* ) est une cytokine connue pour ses propriétés immuno-modulatrices et anti-inflammatoires. Dans le cas de la goutte, plusieurs études ont montré des rôles du TGF $\beta$  dans la limitation de l'inflammation en réponse aux cristaux de MSU. Dans un modèle de poche à air chez le rat, l'administration de TGF $\beta$ 1 recombinant humain s'est soldée par une baisse très nette du nombre de monocytes infiltrés. Cet effet fut obtenu avec des doses faibles (dès 10pg) et efficacement reversé par l'usage d'un anticorps bloquant (**Lioté, F. et al. 1996**). Par ailleurs, le TGF $\beta$  a été décrit comme ayant des effets antagonistes à l'IL-1 $\beta$  (**Wahl, S.M. et al. 1993 ; Turner, M. et al. 1991**). D'autre part, les neutrophiles sembleraient produire du TGF $\beta$  et ainsi participer à la résolution de l'inflammation élicitée par les cristaux de MSU. Ainsi, une étude a attestée du fait que les neutrophiles produisaient du TGF $\beta$ 1 *ex vivo* lorsqu'ils entraient en apoptose. La phagocytose des corps apoptotiques générés par d'autres neutrophiles fut alors associée à une plus forte production de TGF $\beta$ 1. L'usage d'anticorps bloquant cette cytokine résultait alors en une hausse de la poussée oxydative et de la production d'IL-1 $\beta$  (**Steiger, S. et al. 2013**). Ces différentes études semblent lier fortement le TGF $\beta$  à la phase résolutive de la goutte. De manière intéressante, des polymorphismes dans le gène codant le TGF $\beta$  ont été corrélés à l'occurrence de goutte tophacées plus sévères et de phases inflammatoires plus longues (**Chang, S.J. et al. 2008**). Ainsi, le caractère auto-résolutif de la goutte – caractéristique et connu depuis longtemps – pourrait trouver son origine dans la production de tels médiateurs.

### 2.3.4. L'IL-37

Par ailleurs, d'autres médiateurs semblent en mesure de contrôler l'inflammation telle l'IL-37. Cette cytokine présente chez l'Homme est activée par la caspase 1 et peut limiter l'inflammation en induisant l'expression d'IL-1R8, un récepteur inhibiteur de la voie de l'IL-1. Absente chez la souris, l'IL-37 recombinante humaine est néanmoins capable d'abroger l'inflammation via cette voie (hausse d'IL-1R8, SOCS3 et Smad3) dans le modèle d'injection de cristaux de MSU en sous-cutané dans les pattes des souris (**Liu, L. et al. 2016**). Par



ailleurs, de tels effets furent aussi documentés dans le modèle d'arthrite et de péritonites induites avec des parois de streptocoques (SCW, *streptococcal cell wall*) où l'IL-37 recombinante pu décroître l'inflammation d'une manière dépendante du récepteur IL-1R8 (Cavalli, G. *et al.* 2016). Ces mécanismes sont représentés à la **Figure 17**.



### Figure 17 : Phase de résolution

La phase de résolution semble contrôlée par plusieurs mécanismes visant à réduire l'inflammation locale où les neutrophiles jouent un rôle crucial. Ainsi, leur mort (nécroptose par exemple) donne lieu à la génération de débris qui peuvent alors être phagocytés par d'autres neutrophiles (cannibalisme) produisant du TGF- $\beta$ , une cytokine anti-inflammatoire. Induisant notamment la synthèse d'IL-1Ra, le TGF- $\beta$  est en mesure d'entraver l'action de l'IL-1 $\beta$ . Par ailleurs, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  sont aussi produits par les macrophages au cours du processus dit d'éfferocytose où les phagocytes procèdent à l'élimination des débris cellulaires. Les neutrophiles, lorsqu'activés par les cristaux de MSU, peuvent également entrer en NETose, relargant plusieurs protéases dans les filaments générés ; ces protéases sont capables de réaliser la dégradation de nombreuses cytokines dont l'IL-1 $\beta$ . D'autres médiateurs (15D-PGJ<sub>2</sub> et IL-37) ont été également reliés à cette phase.

## 2.4. Physiopathologie de la goutte chronique/tophacée

Lorsque l'hyperuricémie chronique qui a donné naissance aux premières crises de goutte se poursuit dans le temps, la goutte devient une maladie chronique dans laquelle les dépôts de cristaux de MSU peuvent s'accroître et toucher de nombreux sites anatomiques. De tels dépôts sont associés à une forme de la maladie dite « tophacée » c'est-à-dire dont la progression est associée à la présence de multiples tophus notamment sous-cutanés. Leur conséquences cliniques sont alors variables, allant d'un préjudice esthétique à un handicap important ; ces dépôts peuvent parfois se présenter comme des petits tophus sous-cutanés dans ce qu'il fut appelé « furonculose goutteuse » (**Lioté, F. 2019**). Rarement, ceux-ci peuvent également favoriser l'occurrence de fractures comme cela a pu être rapporté (**Nguyen, C. et al. 2010**). Si la crise de goutte dépend principalement du recrutement des neutrophiles et de l'activation de la voie de l'IL-1 $\beta$  entre autres, la goutte chronique fait aussi intervenir des cellules osseuses qui, lorsqu'affectées, vont pouvoir procéder à des mécanismes de résorption. Ces derniers sont alors directement liés à la formation de lésions osseuses érosives ; des perturbations des fonctions des chondrocytes sont également contributives des anomalies articulaires constatées au cours de la goutte chronique.

### 2.4.1. Le tophus goutteux, une structure particulière

Tout d'abord, il est important de préciser que la goutte chronique est associée très fréquemment à la présence de tophus, souvent sous-cutanés mais qui peuvent s'implanter à des localisations variées allant jusqu'à l'os lui-même. Les tophus sont composés de plusieurs éléments. On y retrouve ainsi un cœur de nature plutôt cristalline, résultat de l'accumulation des cristaux d'urate de sodium dans le site anatomique considéré ; il est entouré d'une couronne principalement faite de macrophages (CD68<sup>+</sup>), de mastocytes et plasmocytes. Enfin, une gangue fibreuse entoure le nodule précité (**Chhana, A. and Dalbeth, N. 2015**) (voir **Figure 18A**). De manière intéressante, ces structures ont été depuis quelques années reliées au processus de NETose par lequel les neutrophiles activés vont pouvoir éjecter leur chromatine vers l'extérieur. Dans le cas de la goutte, il a été montré à plusieurs reprises que les neutrophiles pouvaient entrer en NETose au contact des cristaux d'urate de sodium. Ce phénomène a été démontré comme dépendant de la production d'IL-1 $\beta$  par les macrophages (**Sil, P. et al. 2017**) et culminant en l'émission de NETs, arrimés aux cristaux de MSU et résistants aux DNases sériques (**Chatfield, S.M. et al. 2018**). Néanmoins, d'autres granulocytes semblent également capables d'émettre des NETs en réponse à ces éléments cristallins (**Schorn, C. et al. 2012**). Chez les neutrophiles, ce mécanisme s'est révélé très

contributif dans la formation de larges agrégats composés à la fois de cristaux de MSU et de filaments nucléoprotéiques (NETs), ainsi démontré *in vivo* (injections intra-péritonéales de MSU et inflammation uratique aiguë par voie sous-cutanée) et *ex vivo* sur des prélèvements humains (Schauer, C. *et al.* 2014). Si ce processus est désormais incriminé dans la formation des tophus goutteux, il a été toutefois reporté, par cette même équipe comme un acteur de poids dans la résolution des crises de goutte chez la souris (par l'élimination de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ ).

#### 2.4.2. Le remodelage osseux dans la goutte chronique

Retrouvée chez un grand nombre de patients goutteux, la formation de tophus n'est pas sans conséquences. En effet, la présence de ces derniers a été montrée comme étant corrélée à la mise en place de dommages osseux (érosions) sur les structures osseuses adjacentes (McQueen, F.M. *et al.* 2014). Cela a été aussi décrit par Allaey, I. *et al.* (2011) où les auteurs ont pu visualiser des amas intra-osseux de cristaux de MSU autour desquels une couronne de tissus nécrotiques et inflammatoires furent observés ; des cellules géantes multinuclées ainsi que des fibroblastes ont été retrouvés dans ces structures, la présence de neutrophiles fut aussi confirmée. Dans certains cas, des tissus granulomateux ont été observés. De manière intéressante, ces structures tophacées ont été décrites ici comme présentes dans les parties corticales mais aussi dans l'os trabéculaire et associées à une désorganisation des ostéoblastes qui se retrouvent alors dispersés. Enfin, dans les régions adjacentes aux dépôts d'urate de sodium, les auteurs ont aussi retrouvé des lacunes de résorption associées à la présence d'ostéoclastes. Ainsi, cette description semble faire état d'une désorganisation des ostéoblastes – cellules responsables de la néoformation osseuse – et de l'activation des ostéoclastes, aux rôles avérés dans la destruction osseuse. En effet, les ostéoclastes peuvent procéder au remodelage osseux en constituant des lacunes de Howship où la sécrétion de protons permet une acidification locale alors adéquate pour la fonction des protéases nécessaires à la digestion de l'os. Les ostéoclastes sont par ailleurs connus pour être activés par de nombreux médiateurs au cours de la polyarthrite rhumatoïde ou dans d'autres arthrites (arthrite juvénile idiopathique, arthrite psoriasique) et sont responsables de leur évolution vers une atteinte radiographique avec des érosions osseuses (Adamopoulos, I.E. and Mellins, E.D. 2014). Les tophus goutteux ont été montrés comme capables d'enclencher ce processus. Dans le cadre de la goutte, ceci a été expliqué à travers une mobilisation de la voie RANK-RANKL (Récepteur activateur du facteur de transcription NF $\kappa$ B) comme cela a lieu au cours de la polyarthrite rhumatoïde. Dans ce cas, l'expression de RANKL s'est avérée plus élevée

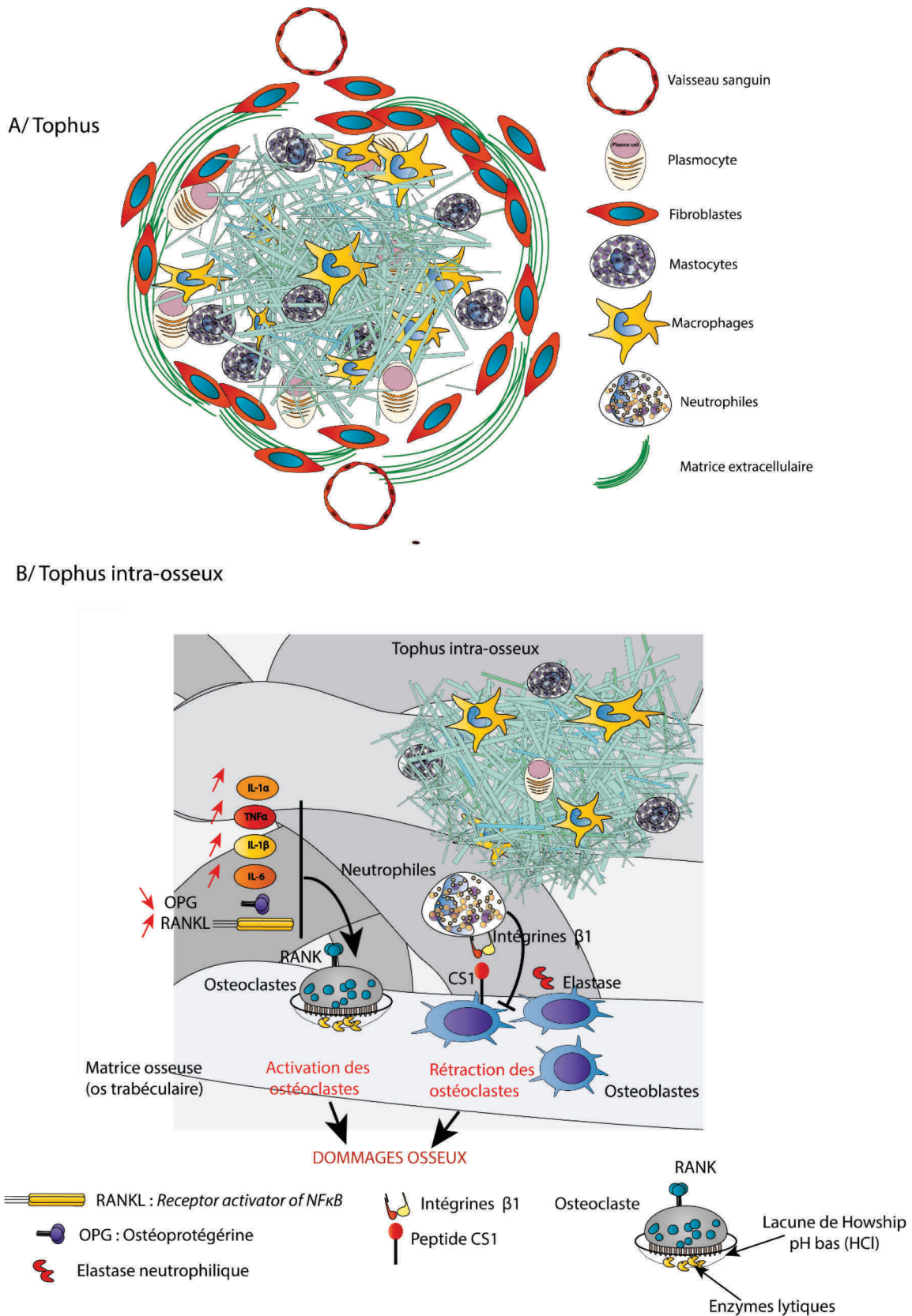
dans les tophus goutteux conjointement à une baisse de l'OPG (ostéoprotégérine), une protéine capable d'entrer en compétition avec RANKL pour la liaison au récepteur RANK). La présence de lymphocytes TCD8<sup>+</sup> et TCD4<sup>+</sup> au sein des tophus et leur expression de RANKL a été incriminée dans les modulations de l'ostéoclastogenèse (**Lee, S.J. et al. 2011**). De surcroît une étude publiée en 2008 avait également montré une corrélation entre les scores radiographiques/nombre de tophus et des taux sériques plus élevés de RANKL et de M-CSF ainsi qu'une plus forte propension des PBMCs (cellules mononuclées du sang périphérique) à se différencier en cellules multinuclées TRAP<sup>+</sup> *in vitro* ; une propension des cristaux de MSU à décroître la production d'OPG *in vitro* ainsi que la présence de cellules ostéoclastiques adjacentes aux tophus permet ainsi à ces auteurs de conclure que l'ostéoclastogenèse est probablement accrue chez les patients goutteux (**Dalbeth, N. et al. 2008**). Toutefois, une autre explication quant à l'apparition des lésions osseuses a été avancée par **Allaey, I. et al. 2011**, où il fut proposé que les neutrophiles infiltrés puissent désorganiser la couche d'ostéoblastes aux fonctions cruciales. Dans ce cas, les neutrophiles ont été montrés comme capables de se lier aux ostéoblastes pré-activés par des cristaux de MSU en faisant intervenir l'intégrine  $\beta 1$  (CD29/CD49b) des neutrophiles et le peptide CS1 présent sur les ostéoblastes ; la voie de la cPLA2 $\alpha$  (Phospholipase A 2 $\alpha$  cytosolique), permettant la synthèse de PAF (facteur activant les plaquettes) et de leucotriène B4 (LTB<sub>4</sub>) s'est aussi révélée importante. Cette interaction s'est notamment montrée, conjointement à la production d'élastase neutrophilique, capable d'engendrer une rétraction des ostéoblastes, réalisant de véritables lacunes dans le tapis cellulaire. Lorsque les ostéoblastes et neutrophiles furent co-cultivés avec des ostéoclastes sur une matrice calcifiée, l'interaction entre ces deux premiers types cellulaires a provoqué l'apparition de larges érosions de la matrice.

Ainsi, ces diverses observations semblent indiquer que les lésions osseuses associées à la présence des tophus goutteux trouveraient leur origine dans une activation accrue des ostéoclastes et une perte partielle de la fonction des ostéoblastes. Ces mécanismes sont schématisés à la **Figure 18B**.

#### 2.4.3. Lésions cartilagineuses et tendineuses

La présence des tophus dans l'articulation a été associée à des dommages au-delà des structures osseuses. Ainsi, la présence de ces derniers fut avérée dans les tendons et les ligaments (**Dalbeth, N. et al. 2013**) dans plus de 10% des cas. Pour les dommages cartilagineux, la production de MMP et de NO par les chondrocytes mais aussi la sécrétion

d'enzymes lytiques comme l'Elastase par les neutrophiles constituerait des mécanismes causaux.



**Figure 18 : Le tophus goutteux, une structure pathognomonique**

Les tophus, retrouvés chez de nombreux patients goutteux, sont constitués d'un cœur cristallin entouré d'une couronne de cellules (mastocytes, macrophages, cellules géantes, plasmocytes), elle-même vêtue d'une gangue fibreuse (A). Lorsqu'intra-osseux, les tophus induisent des dommages aux structures osseuses adjacentes dont un résumé des mécanismes est présenté en B). La hausse des médiateurs pro-ostéoclastogéniques (RANKL notamment, IL-1 $\beta$ ), et la baisse de l'ostéoprotégérine (limitant l'ostéoclastogénèse) favorisent la différenciation et l'activation locale des ostéoclastes. Ces derniers causent alors des dommages osseux par résorption de la matrice au moyen d'enzymes lytiques. En parallèle, les ostéoblastes – permettant la formation osseuse – voient leur action décrie sous l'effet des neutrophiles (par l'élastase et l'interaction intégrine  $\beta$ 1-CS1) via un phénomène de rétraction.

## 2.5. Facteurs régulateurs

### 2.5.1. Des modulateurs épigénétiques

Si un ensemble de médiateurs semblent régir le développement et le maintien des crises de goutte, il semblerait que certains modulateurs intracellulaires pourraient affecter l'intensité des réponses inflammatoires en jeu en réprimant spécifiquement d'expression de certains gènes codant pour des facteurs inflammatoires (*Il1b*, *Nlrp3*). Dans ces mécanismes, les microARNs trouvent toute leur place. Régulateurs épigénétiques connus depuis une vingtaine d'années (découverts en 1993 dans le laboratoire de Victor Ambros), ces petits ARNs non codants de 18 à 23nt présentent une séquence « *seed* » permettant leur arrimage à la séquence 3' non traduite (3'UTR, 3' *untranslated sequence*) des gènes cibles. Par cette interaction, les microARNs peuvent coordonner la répression (souvent traductionnelle) de gènes cibles dont l'expression peut être modulée d'un facteur 1,2 à 4. A ce jour, plus de 2000 microARNs différents ont été recensés chez l'Homme et semblent intervenir dans la plupart des mécanismes biologiques dont l'inflammation et les réponses immunitaires innées comme adaptatives. Parmi les maladies rhumatologiques, la polyarthrite rhumatoïde a été reliée à ces ARN interférants et notamment aux microARN (miR)-146a et 155. D'autres (cluster miR-17~92, miR-346, miR-223, miR-204) y ont été également associés fonctionnellement. Toutefois, leur contribution fut également étudiée dans la goutte et à la fois miR-155 et 146a se sont révélés importants. **MiR-155** est augmenté dans les cellules synoviales mononuclées (SFMCs) issues de patients goutteux par rapport aux PBMCs des sujets sains ; les PBMCs sur-expriment également miR-155 après exposition au MSU tandis que l'expression de SHIP1 (*src homology 2 (SH2) domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 1*), une phosphatase aux rôles régulateurs sur plusieurs voies de signalisations intracellulaires, est réduite, ce qui est en accord avec la baisse d'expression de SHIP1 dans des tissus synoviaux de patients goutteux. *In vitro*, la transfection d'un mimic de miR-155 dans la lignée

monocytaire THP1 est capable d'accroître la production de TNF $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$ , si prétraités au MSU ; cette corrélation fut ensuite constatée dans le modèle de péritonite au MSU où l'expression de ces médiateurs suit celle de miR-155 et inversement, la baisse de SHIP1 (**Jin, H.M. et al. 2014**). **MiR-146a** a lui aussi été relié à de nombreuses modulations de l'immunité innée et ce principalement au niveau des voies en amont du facteur de transcription NF $\kappa$ B. Dans ce cas, miR-146a a été montré comme capable de cibler la kinase IRAK1 et le facteur TRAF6 intervenant dans la signalisation en aval de plusieurs récepteurs. Si ces modulations ont d'ores et déjà été reliées à la polyarthrite rhumatoïde où miR-146a semble augmenté, probablement en guise de rétro-contrôle face à une inflammation ré-réglée, deux études ont récemment montré un rôle de ce microARN dans la goutte. Le premier lien fut établi par **Dalbeth, N. et al. (2015)** avec la découverte d'une expression accrue de miR-146a dans les PBMCs de patients en goutte inter-critique relativement à ceux présentant des crises de goutte et une baisse correspondante de ce microARN lors d'une péritonite au MSU (monocytes), au moment où l'expression de l'*Il1b* est à son paroxysme. Ces auteurs ont aussi confirmé un rôle régulateur de miR-146a sur la production de l'*IL1B* et du *TNFA* dans la lignée THP1 ; Ces données indiquent un rôle possible de ce microARN en tant que régulateur transcriptionnel, probablement déçu lors des crises inflammatoires.

Plus récemment, des résultats en ce sens ont été obtenus chez la souris en montrant une hausse de miR-146a dans des BMDMs (*bone-marrow derived macrophages*) stimulés au MSU mais aussi dans les monocytes CD11b<sup>high</sup>F4/80<sup>high</sup> recrutés dans un modèle de péritonite au MSU. Dans ces deux types de cellules, la synthèse d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$  fut significativement accrue en l'absence de miR-146a ; de même, l'expression de *Traf6*, *Irak1*, *Nlrp3* et *Asc* était anormalement élevée dans les BMDMs des souris KO (*knock-out*); l'induction de deux types d'inflammations goutteuses dans deux sites distincts a également permis d'observer une sévérité nettement accrue de la goutte chez les individus miR-146a KO (**Zhang, Q.B. et al. 2018**). D'autres microARNs ont aussi été reliés à la goutte et ce à travers des modulations de l'IL-1 $\beta$  ; les **microARN-488** et **920**, sous-exprimés dans les leucocytes circulants de patients atteints d'arthrite goutteuse, sont des régulateurs potentiels de l'expression de l'IL-1 $\beta$  en ciblant la région 3'UTR de son ARNm (**Zhou, W. et al. 2017**).

### 2.5.2. Le métabolisme, un régulateur global

Si la goutte est une maladie inflammatoire, elle fut toutefois largement décrite comme d'ordre métabolique. En effet, la plupart des patients présentent une hausse des taux sanguins d'urate mais souffrent aussi d'un syndrome métabolique dans une majorité de cas. La prévalence des dyslipidémies est par exemple très importante. Dans cette partie, il sera donc question d'aborder quelques études ayant relié la présence ou les taux de certains métabolites à l'occurrence des accès goutteux.

Un premier exemple a été illustré par plusieurs équipes lors de l'étude des voies de l'AMPK. L'AMPK (*Adénosine monophosphate-activated protein kinase*), un senseur du métabolisme, a été décrite comme modulée lors de variations dans la balance AMP/ATP et du statut énergétique cellulaire. En effet, la hausse de ce ratio traduit une carence énergétique dont les causes peuvent être variées (alimentation déficitaire, hypoxie) (Steinberg, G.R. *et al.* 2009). Dans une étude publiée par Wang, Y. *et al.* (2016), il a été démontré que la perte d'AMPK1 $\alpha$  engendrait une hausse notable de la production d'IL-1 $\beta$  et de CXCL1 *in vitro* mais aussi *in vivo* (péritonite) avec une hausse du recrutement de neutrophiles en réponse aux cristaux de MSU. L'usage d'un agoniste de cette protéine produisait l'effet inverse. En parallèle, si les cristaux diminuaient l'activité de l'AMPK $\alpha$ , l'exposition à la colchicine active cette voie et supprime la production d'IL-1 $\beta$  et CXCL1 *in vitro*. Ainsi, cette étude montra donc que la kinase AMPK pourrait bien être un régulateur important de la production d'IL-1 $\beta$ , liant ainsi le statut métabolique au développement des crises de goutte.

Dans un même ordre d'idée, il a été montré que la goutte élicitée par l'injection intra-articulaire de cristaux de MSU ne pouvait se développer chez les souris GPR43 (*G-protein coupled receptor 43*)<sup>-/-</sup> ou bien axéniques avec une perte de la production d'IL-1 $\beta$ . En revanche, le phénotype des souris axéniques était largement reversé lors d'un transfert de flore normale ou bien après des injections d'acétate, le ligand de GPR43 (Vieira, A.T. *et al.* 2015). Ainsi, l'acétate – principal acide gras à chaîne courte produit par le microbiote commensal – jouerait un rôle crucial dans la production d'IL-1 $\beta$ . De telles observations corroborent ainsi les travaux de Joosten, L.A.B. *et al.* 2010 où l'ajout d'acides gras C18 aux cristaux de MSU était particulièrement efficace pour déclencher l'inflammation dans ce même modèle. Dans le même faisceau argumentaire, des corrélations entre la prise d'alcool et la survenue de crise de goutte ont été publiées (Neogi, T. *et al.* 2014), or l'acétate sanguin a été montré comme accru par la prise d'alcool (Terkeltaub, R. *et al.* 2017). Plusieurs autres équipes ont également rapporté un rôle suppressif des omégas 3 (Yan, Y. *et al.* 2013), du  $\beta$ -



hydroxybutyrate (**Goldberg, E.L. et al. 2017**) et du butyrate (**Vieira, A.T. et al. 2017**) sur la production d'IL-1 $\beta$ .

A l'opposé, plusieurs lipoprotéines semblent capables de moduler le potentiel inflammatoire des cristaux de MSU. Une ancienne étude a mis en relief l'importance d'Apo-E dans la modulation de ces effets. Ainsi, Apo-E pourrait se lier aux cristaux d'urate et interférer avec leur capacité à déclencher la sécrétion d'enzymes comme l' $\alpha$ -mannosidase par les neutrophiles. Les auteurs ont également recueilli plusieurs indices qui laisseraient supposer une production locale d'Apo-E (*apolipoprotein E*) par les cellules synoviales (**Terkeltaub, R.A. et al. 1991**). Par ailleurs, les HDL (*High density lipoproteins*) ont été récemment reliées à la capacité des cristaux de MSU à entraîner la production de CCL2 par les FLS en inhibant sa synthèse et son relargage (**Scanu, A. et al. 2010**). Dans un modèle de la poche à air, la co-injection de HDL et de MSU donnait d'ailleurs lieu à une baisse du recrutement des neutrophiles et de la production des médiateurs inflammatoires mesurés (IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL2, CXCL1) relativement à l'injection de MSU seul (**Scanu, A. et al. 2015**).

Au final, de nombreux métabolites, qu'ils soient issus de l'activité du microbiote ou endogènes comme les lipoprotéines, semblent impacter significativement l'inflammation induite par les cristaux de MSU. De manière intéressante, les effets potentiels de ces substances sont en lien avec les effets bien connus de certaines habitudes alimentaires sur la goutte : butyrate dérivé des fibres alimentaires, oméga 3 du régime méditerranéen et le  $\beta$ -hydroxybutyrate augmenté dans les régimes cétogènes, tous connus pour limiter cette maladie. Inversement, la prise d'alcool est fortement corrélée à sa survenue. Ainsi, ces arguments sont en faveur d'un rôle très important des facteurs exogènes dans la goutte.

### 3. Traitements actuels de la goutte

#### 3.1.1. Traitements à visée anti-inflammatoire

Les traitements actuels de la goutte ont, à ce jour, plusieurs objectifs culminant en l'éradication ou du moins la diminution en intensité des crises. Il s'agit ici **dans un premier temps de traiter la crise** en tant que telle par une médication de nature anti-inflammatoire faisant intervenir la colchicine en première intention. Toutefois, ceci n'est pas toujours possible et la colchicine représente une source potentielle d'intoxications parfois fatales ; d'autres traitements ont donc également leur place dans le schéma thérapeutique de la goutte.

##### 3.1.1.1. La « bonne vieille colchicine »

Cette molécule, employée souvent en première intention, diminue les crises en agissant sur le recrutement des polynucléaires neutrophiles, la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  ainsi que sur l'expression de nombreuses molécules impliquées dans la réponse inflammatoire (**Leung, Y.Y. et al. 2015**). Historiquement, la colchicine a été intégrée dans l'usage courant dès la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle. De manière surprenante et pratiquement humoristique, la colchicine fut tout d'abord utilisée pour ses propriétés cathartiques dès 500 avant J.C. et ne fut introduite en tant que traitement anti-inflammatoire qu'en 1763 (**Bhattacharjee, S. 2009**). Ses vertus furent ensuite connues plus largement lorsque Thomas Sydenham, un médecin anglais, se mit à recommander, outre des mesures diététiques, l'adjonction de sortes de digestifs dénommés « *bitters* ». Ces « cocktails thérapeutiques », connurent alors un franc succès et en 1783, Nicolas Husson, commença à vendre de telles boissons en y incluant un extrait de *Colchicum autumnale*, le colchique d'Automne d'où dérive la fameuse colchicine (**Barnett, R. 2012**). La colchicine fut ensuite instaurée à la suite des travaux de Pelletier et Caventou qui isolèrent cet alcaloïde à partir des racines de Colchique en 1819. Alfred Houdé fut ensuite le premier à cristalliser la colchicine en 1884 (**Karamanou, M. et al. 2018**).

D'un point de vue thérapeutique, cette molécule a l'avantage d'être efficace (prise dès le début de la crise, 1 à 2mg par jour à ne pas dépasser), très peu coûteuse (quelques euros/boîte), assimilable par voie orale et également d'usage prophylactique (0,5 à 1mg/jour). De plus, sa pharmacocinétique est propice à un effet durable dans le temps. En revanche, la surdose est possible dès 3mg avec des effets principalement digestifs (diarrhées) et plus sévères lors d'un surdosage évident en raison de sa cardio-toxicité dans la majorité des cas. Son élimination se fait surtout par excrétion hépatobiliaire mais aussi via les reins (20%). Chez les patients présentant une insuffisance rénale avancée ou hépatique, son dosage doit

être précautionneux compte tenu de la sévérité des effets secondaires (**Leung, Y.Y. et al. 2015**). Biologiquement parlant, la colchicine se lie aux microtubules et en empêche leur polymérisation. Elle s'est avérée être capable de bloquer 1) le recrutement des neutrophiles en interférant avec la production de facteurs chimiotactiques comme l'IL-8, 2) l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium (altération de la distribution de la sélectine E) ainsi que leur extravasation, 3) la production de ROS par les neutrophiles et 4) la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  par les macrophages. Toutefois, aucune inhibition de NLRP3 ne semble avoir lieu à des doses compatibles avec celles mesurées dans le sang des sujets traités (**Leung, Y.Y. et al. 2015**).

### 3.1.1.2. Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens et les corticoïdes

D'autres molécules sont également disponibles sur le marché comme des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ou des corticoïdes. Les corticoïdes, ou glucocorticoïdes, sont employés au vu de leurs puissants effets anti-inflammatoires et immuno-modulateurs. Néanmoins, ils exposent les patients à un large éventail d'effets iatrogènes parmi lesquels l'occurrence d'un diabète sucré, de l'ostéoporose et une immunodépression. Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), quant à eux, sont également employés dans la crise de goutte mais leur emploi peut aussi mener à des effets secondaires. En effet, leur prise en continu peut être associée à la formation d'ulcères de l'estomac.

### 3.1.1.3. Les antagonistes de l'IL-1

Chez les patients difficiles à traiter, présentant des effets secondaires ou bien encore réfractaires aux traitements mentionnés ci-dessus, l'usage d'anakinra (Kineret®), une version recombinante de l'IL-1Ra, est également possible. En effet, ce récepteur soluble est un antagoniste efficace de l'IL-1 et son emploi est d'ailleurs indiqué, au même titre que le Canakinumab (anti-IL-1 $\beta$ ), dans certaines formes de maladies auto-inflammatoires appelées cryopyrinopathies, dépendantes de l'IL-1. Dans le cadre de la goutte, l'Anakinra est d'emploi fréquent avec de nombreux cas documentés dans la littérature répondant très bien à cette médication (**So, A. et al. 2007**), d'autant plus que celle-ci ne représente pas un coût excessif relativement à d'autres biothérapies. Ces options thérapeutiques sont principalement de rigueur chez les patients où les effets secondaires liés à la prise de colchicine pourraient être majorés (insuffisants rénaux au stade de l'IRC3 - débit de filtration glomérulaire inférieur à 30mL/min/1,73m<sup>2</sup>- par exemple). En ce sens, les résultats d'un essai clinique ont montré un réel bénéfice de l'Anakinra dans une cohorte de 31 patients au stade d'IRC4 et 5 comptant 6

patients greffés rénaux. La réponse fut particulièrement convaincante avec une réduction importante de la CRP et du score VAS (*visual analogic score*) (Loustau, C. *et al.* 2018). Le Canakinumab est lui aussi autorisé pour le traitement des crises de goutte. En effet, deux essais cliniques ont montré son efficacité. La première montra ainsi que 150mg de Canakinumab étaient plus efficaces (CRP, VAS) que 40mg d'acétonide de triamcinolone, l'effet fut aussi rapide que celui de l'Anakinra (dans les 24h) (So, A. *et al.* 2010). La seconde étude, portant sur 432 patients, a montré que toutes les doses testées étaient particulièrement efficaces, y compris les plus faibles (une seule injection de 25mg supérieure à la colchicine et 50mg pour avoir une réponse optimale (VAS)) (Schlesinger, N. *et al.* 2011). Toutefois, son coût rend son usage assez rare.

### 3.1.2. Traitements à visée hypouricémiant

**Secondairement, un traitement hypouricémiant** est proposé. Il vise ici à réduire les taux d'urate dans le sang et, si possible, à les limiter à 6mg/dL. Pour cela, l'arsenal thérapeutique consiste en 1) des *hypouricémiants de type uricosurique*, c'est-à-dire qui favorisent l'élimination rénale de l'urate. Parmi ceux-ci, citons la benzbromarone (Désuric®) et le probénécide (Bénémid®). Bien que très utiles, ces hypouricémiants ont le défaut d'induire quelquefois des lithiases urinaires, possiblement à cause d'un enrichissement en urate, susceptible de précipiter, du flux urinaire. De nouvelles molécules comme le lésinurad sont également disponibles.

2) Des *hypouricémiants faisant appel à un blocage sélectif de la xanthine oxydase*, une enzyme qui convertit la xanthine issue des bases azotées en urate, existent également et sont bien souvent en première ligne. Ainsi, l'allopurinol (Zyloric®) ou encore le Fébuxostat (Adénuric®) représentent les principaux médicaments utilisés à cette fin, le dernier étant davantage employé chez les patients à la fonction rénale décréue.

3) enfin, il est désormais possible d'utiliser des uricases recombinantes afin de détruire directement d'urate. Ces *médicaments dits « uricolytiques »* sont représentés par la pégloticase et la rasburicase, dont la première est autorisée. Ces traitements sont efficaces en réduisant très rapidement les tophus, d'ordinaire longs à la dissolution sous traitement hypouricémiant conventionnel.

Ces différents traitements permettent en général une réduction importante de l'uricémie et des éventuels tophus bien que ce processus soit long. Enfin, ils sont parfois associés à des crises de goutte lors de la mise en route du traitement, probablement dues à une déstabilisation des tophus (Dalbeth, N. *et al.* 2016 ; Abhishek, A. *et al.* 2017 ; Pascart, T. *et al.* 2018). Par

ailleurs, il est important de noter que des mesures hygiéno-diététiques sont également nécessaires afin d'accroître l'efficacité des traitements hypouricémiants (baisse de la consommation d'alcool, d'aliments hyperuricémiants, hausse des apports en eau).

### 3.2. Nouvelles pistes thérapeutiques : les petits inhibiteurs de NLRP3

A la suite de la découverte de l'inflammasome NLRP3 et son importance dans la production d'IL-1 $\beta$  en réponse aux cristaux de MSU, une véritable course au traitement ciblé s'est mise en place. Au cours des dernières années, plusieurs inhibiteurs ont vu le jour dans la littérature. Parmi ces molécules, quelques-unes ont été montrées comme spécifiques de NLRP3. Ainsi, les inhibiteurs MCC950, BAY11-7082 mais aussi le CY-09 inhibent NLRP3 avec une très forte efficacité tout en n'affectant pas l'activité des inflammasomes NLRC4 et AIM2 *in vitro* (Jiang, H. *et al.* 2017). Plusieurs inhibiteurs semblent en revanche assez peu spécifiques (Parténolide, sulforaphane). Dans l'article précité, les auteurs ont montré que le CY-09 était capable d'entraver l'oligomérisation de NLRP3 et sa liaison à ASC à travers un blocage du domaine ATPase de NLRP3. Un effet net sur la production d'IL-1 $\beta$  fut observé *in vitro* (MSU) et *in vivo* dans le modèle de péritonite au MSU et chez les souris porteuses de la mutation *Nlrp3*<sup>A350V</sup> responsable du syndrome de Muckle-Wells. Le MCC950 mena aux mêmes effets.

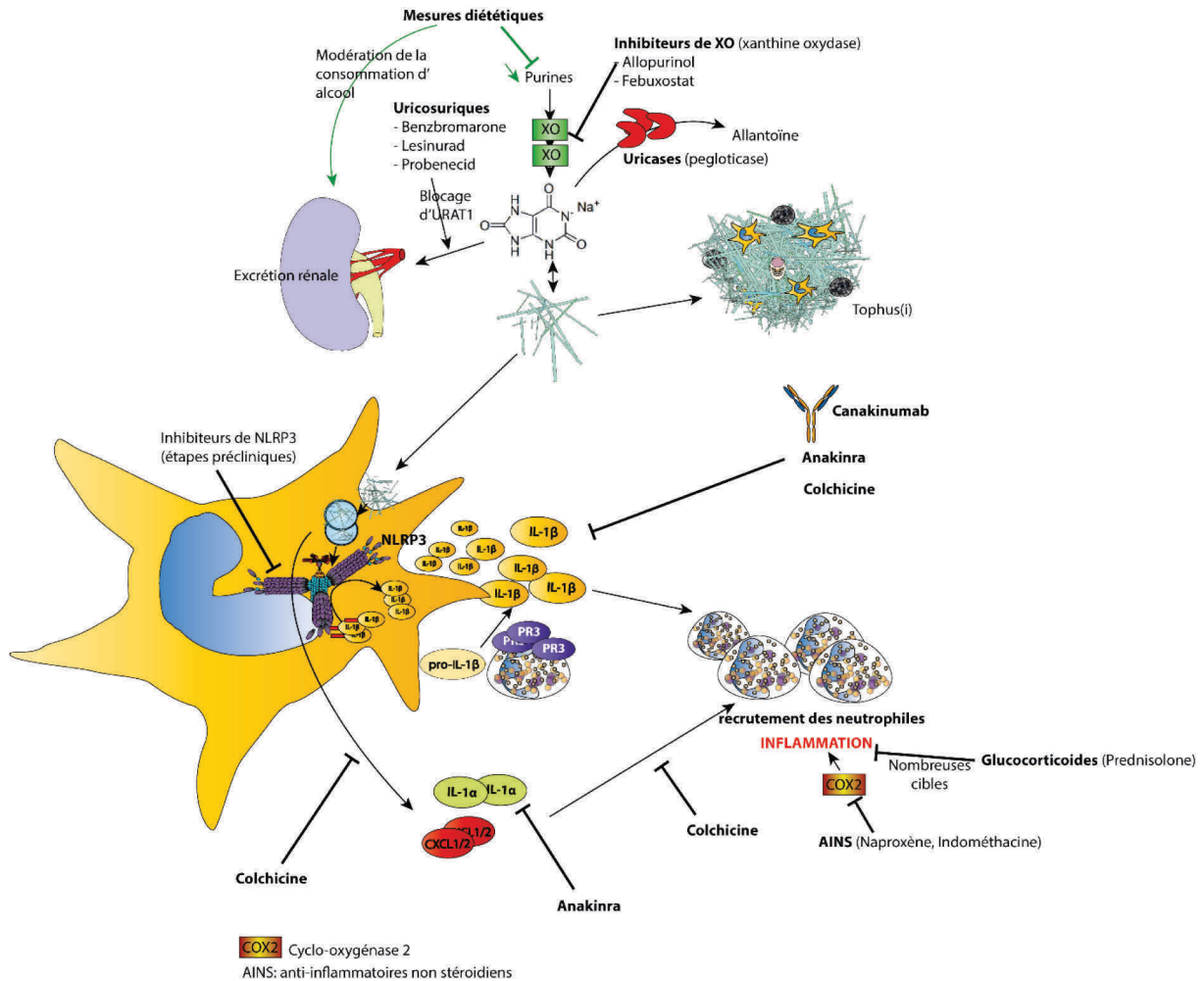
Quatre ans plus tard, cette même équipe publia l'effet du Tranilast – un anti-allergique – avec des résultats en tous points analogues à ceux du CY-09 (péritonites au MSU, souris *Nlrp3*<sup>A350V</sup> mais aussi par injection intra-articulaire de MSU) (Huang, Y. *et al.* 2018). Un autre inhibiteur, OLT1177, a lui-aussi été documenté comme bloquant l'activité ATPase de NLRP3 et ainsi l'assemblage de l'inflammasome (Marchetti, C. *et al.* 2018a). Un second article montra ensuite son efficacité dans le modèle d'arthrite par injections intra-articulaires de paroi de streptocoque (SCW) et le modèle de goutte par injection de MSU et d'acides gras C16 (Marchetti, C. *et al.* 2018b).

Enfin, le sulforaphane, un dérivé naturel d'isothiocyanate (retrouvé dans les brocolis) a aussi été montré comme capable de décroître l'activité de l'inflammasome NLRP3 et fut associé à une réduction de l'inflammation dans deux modèles murins (poche à air avec injection de MSU et injections sous-cutanées de MSU dans les pattes de souris) (Yang, G. *et al.* 2018). Toutefois, sa spécificité vis-à-vis de NLRP3 est questionnable (comme décrit ci-dessus).

Au final, plusieurs inhibiteurs de NLRP3 sont actuellement en cours de test, pour l'essentiel dans des étapes précliniques et, bien que certains ne soient pas toujours très spécifiques de

NLRP3, leur efficacité ne fait aucun doute dans certains modèles. Il est important de mentionner que l'OLT1177 (Dapansutrile) connaît à l'heure actuelle un certain succès au cours d'essais cliniques.

Un schéma intégratif tenant compte des différentes options thérapeutiques décrites au cours de cette partie vous est présenté ci-dessous (**Figure 19**).



**Figure 19 : traitements de la goutte**

Les traitements de la goutte se déclinent sur plusieurs plans. Tandis que les traitements hypo-uricémiants visent à décroître les taux d'urate sanguins (en haut), les traitements de la crise ciblent la production et/ou l'action des médiateurs inflammatoires (en bas). Sur le premier versant, on distingue des traitements bloquant la synthèse d'urate (inhibiteurs de XO : Allopurinol et Febuxostat), permettant d'accroître son excrétion urinaire ou *uricosuriques* (inhibiteurs d'URAT1 entre autres : benzbromarone, probenecid, lesinurad) ou encore *uricolytiques* (uricases recombinantes comme la pégloticase). Les traitements anti-inflammatoires sont constitués par la colchicine dont l'action bloque les microtubules et ainsi la sécrétion des cytokines dont l'IL-1β et le recrutement des neutrophiles. Les AINS (anti-inflammatoires non stéroïdiens) et les corticoïdes sont employés

alternativement à la colchicine, les premiers bloquent la COX2 (cyclo-oxygénase 2) et la synthèse de prostaglandines tandis que les seconds bloquent un ensemble de voies menant à une anti-inflammation globale.

### III. Objectifs de la thèse

La responsabilité de l'axe IL-1-IL-1R dans l'orchestration des crises de goutte est désormais bien admise ; l'IL-1 $\beta$  – en particulier – est là aussi considérée comme causale et cela est conforté par l'usage clinique de l'Anakinra et l'efficacité du Canakinumab chez l'Homme ainsi que les réponses obtenues chez des animaux déficients pour l'IL-1 $\beta$ , IL-1R1 ou encore Myd88 (**voir figure 20**). Toutefois, l'IL-1 $\beta$  nécessite un clivage préalable afin d'être rendue bioactive et pro-inflammatoire.

L'inflammasome NLRP3, acteur majeur de l'inflammation, agit principalement en coordonnant le clivage des pro-cytokines (pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18) en réponse à de nombreux stimuli allant de métabolites comme l'ATP à des agents particuliers comme l'alum. La découverte de l'implication de l'inflammasome NLRP3 dans la production d'IL-1 $\beta$  activée par les cristaux de MSU *in vitro* s'est ainsi présentée telle une explication attractive ; malgré tout, sa nécessité *in vivo*, où de nombreux types cellulaires différents sont impliqués dans des interactions complexes n'a été que partiellement démontrée. En effet, si certains modèles murins semblent dépendre de NLRP3, la contribution de ce facteur est parfois encore indéterminée (modèle sous-cutané), faible ou bien controversée dans d'autres modèles (**voir figure 20**). Par ailleurs, des mécanismes alternatifs à NLRP3 et permettant la production d'IL-1 $\beta$  mature ont été proposés. L'implication des protéases extracellulaires, décrite même avant la découverte de l'inflammasome, semble avoir un succès certain chez la souris et apparaît ainsi telle une explication convaincante. Pour mieux cerner son rôle dans cette pathologie, nous nous proposons ici d'étudier la dépendance de l'inflammasome NLRP3 dans des modèles de souris (injections sous-cutanées de MSU et péritonites induite par le MSU) et également de vérifier la dépendance des inflammasomes en général.

Par ailleurs, des données obtenues par notre équipe ont montré qu'une crème contenant 5% d'Imiquimod (ALDARA®) était capable de réduire l'inflammation locale dans plusieurs modèles d'arthrite chez la souris (modèle de transfert de sérum de souris KBxN, modèle CIA et TgTNF où le TNF $\alpha$  est surexprimé) (**Nehmar, R. et al. 2017**). Lors de ces travaux, une baisse de l'expression de l'*Il1b* et de l'*Il6* ainsi qu'un afflux réduit de neutrophiles ont pu être observés après application d'imiquimod. Au vu du rôle des neutrophiles et de l'IL-1 $\beta$  dans différents modèles murins d'arthrite goutteuse, la question de transposer cet effet dans un modèle d'inflammation uratique s'est posée. Mon travail visera ainsi à analyser les effets de

l'imiquimod topique dans le modèle par injections sous-cutanées de MSU qu'il convient de qualifier d'inflammation aiguë uratique.

Modèles animaux		Cinétique	production d'IL-1 $\beta$	Réponse à la colchicine	Dépendance de l'axe IL-1-IL-1R1	Dépendance de l'inflammasome NLRP3
Cavités anatomiques	Peritonites (0,5 à 3mg de MSU par voie i.p.)	courte (pic entre 6 et 16h) <sup>1</sup>	oui <sup>1</sup>	oui <sup>2</sup>	<i>Myd88</i> +++ <sup>1</sup> <i>Il1r1</i> +++ <sup>1, 2, 3, 4, 5</sup> <i>Il1b</i> ++ <sup>4</sup> <i>Il1a</i> +++ <sup>4</sup> Anakinra +++ <sup>1, 6</sup> Rinolacept +++ <sup>2</sup>	<i>Nlrp3</i> - <sup>7</sup> à ++ <sup>8, 9</sup> <i>Asc</i> ++ <sup>2</sup> <i>Casp1</i> ++ <sup>2, 5</sup>
	Modèle de la poche à air (3 à 5mg de MSU)	courte (pic à 6h, résolution sous 24-48h) <sup>10</sup>	oui <sup>11</sup>	oui <sup>2, 11</sup>	<i>Myd88</i> +++ <sup>12</sup> <i>Il1r1</i> +++ <sup>2</sup> Rinolacept +++ <sup>2</sup>	<i>Nlrp3</i> +++ <sup>13</sup>
Localisation intra-articulaire	injections dans le genou (0,1-0,3mg de MSU)	MSU	courte (acmé entre 6 et 15h) <sup>14</sup>	oui <sup>14</sup>	<i>Il1r1</i> +++ <sup>14</sup> <i>Myd88</i> +++ <sup>14</sup> <i>Il1b</i> +++ <sup>14</sup>	<i>Nlrp3</i> +++ <sup>14</sup> <i>Asc</i> +++ <sup>14</sup> <i>Casp1</i> ++ <sup>14</sup>
		MSU avec acides gras C18 <sup>15</sup> ou C16 <sup>16</sup>	Etudes dans des temps courts (4h) <sup>15, 16</sup>	oui <sup>15</sup>	<i>Il1b</i> +++ <sup>15</sup>	<i>Nlrp3</i> - <sup>15</sup> <i>Asc</i> ++ <sup>15</sup> <i>Casp1</i> ++ <sup>15</sup>
	Injections dans la cheville (0,5mg de MSU)	acmé à 24h, résolution sous plusieurs jours <sup>2, 17</sup>	oui <sup>2</sup>	oui <sup>2</sup>	<i>Il1r1</i> ++/+++ <sup>2, 17</sup> <i>Il1b</i> ++ <sup>17</sup> Rinolacept ++ <sup>2</sup>	<i>Nlrp3</i> + <sup>17</sup> <i>Asc</i> + <sup>17</sup> <i>Casp1</i> + <sup>17</sup>
Tissus mous	Injections sous-cutanées (1 à 3mg de MSU)	acmé à 24h, résolution sous plusieurs jours <sup>11</sup>	oui <sup>11</sup>	oui <sup>11</sup>	?	?

**Figure 20 : Tableau des modèles murins d'inflammation uratique aiguë.**

Dans ce tableau, j'ai choisi de présenter les modèles d'inflammation uratique aiguë intéressant des cavités anatomiques (introduction dans le péritoine ou bien dans une poche formée sur le dos des animaux (le modèle « de la poche à air »)), les arthrites goutteuses (injections intra-articulaires) et un modèle intéressant les tissus mous (injections sous-cutanées). Ceux-ci ont été décrits quant à leur cinétique, production locale d'IL-1 $\beta$ , réponse à la colchicine mais aussi quant à leur dépendance de l'axe IL-1-IL-1R1 (usage de souris invalidées génétiquement, les gènes en question sont en italique, ou blocages pharmacologiques) et de l'inflammasome NLRP3 (souris invalidées génétiquement, gènes en italique). Les références dont ces informations ont été extraites sont indiquées comme suit : <sup>1</sup> Chen, C.J. *et al.* 2006 ; <sup>2</sup> Torres, R. *et al.* 2009 ; <sup>3</sup> Martinon, F. *et al.* 2006 ; <sup>4</sup> Gross, O. *et al.* 2012 ; <sup>5</sup> Guma, M. *et al.* 2009 ; <sup>6</sup> So, A. *et al.* 2007 ; <sup>7</sup> Joosten, L.A.B. *et al.* 2011 ; <sup>8</sup> Mayor, A. *et al.* 2007 ; <sup>9</sup> Zhou, R. *et al.* 2010 ; <sup>10</sup> Lioté, F. *et al.* 1996 ; <sup>11</sup> Yang, G. *et al.* 2018 ; <sup>12</sup> Scott, P. *et al.* 2006 ; <sup>13</sup> Hoffman, H.M. *et al.* 2010 ; <sup>14</sup> Amaral, F. *et al.* 2012 ; <sup>15</sup> Joosten, L.A.B. *et al.* 2010 ; <sup>16</sup> Joosten, L.A.B. *et al.* 2016 ; <sup>17</sup> Reber, L.L *et al.* 2014.

Dans certains modèles, la dépendance de NLRP3 est faible ou bien fluctuante d'une étude à l'autre, cela est indiqué par un caractère gras et rouge. Les points d'interrogation rendent compte de la caractérisation incomplète du modèle par injections sous-cutanées de MSU.



## **Les objectifs de cette thèse sont donc :**

- **Réaliser et caractériser un modèle d'inflammation uratique chez la souris : l'inflammation aiguë uratique par injections sous-cutanées de cristaux de MSU.**
- **Analyser la dépendance de l'inflammasome NLRP3 et des inflammasomes en général par l'emploi de souris génétiquement invalidées pour NLRP3 et d'autres gènes impliqués.**
- **Observer et analyser l'effet d'un traitement expérimental (imiquimod topique) dans ce modèle d'inflammation aiguë uratique.**

# RESULTATS

L'indépendance des inflammasomes dans un modèle de goutte encourage l'emploi de stratégies ciblant l'*Il1b*

**RESULTATS**

**DISCUSSION**



## L'indépendance des inflammasomes dans un modèle d'inflammation aiguë uratique encourage l'emploi de stratégies ciblant l'*Il1b*

### RESULTATS

L'inflammasome NLRP3 a été découvert dans le début des années 2000 et est désormais considéré comme crucial dans un nombre croissant de contextes pathologiques. Parmi ceux-ci, l'inflammation élicitée par les microcristaux semble directement dépendante de l'inflammasome NLRP3 du moins *in vitro* (Martinon, F. *et al.* 2006). En effet, de très nombreuses études ont montré puis confirmé que la production de l'interleukine 1 beta (IL-1 $\beta$ ) en réponse aux cristaux de MSU ou de CPP – les agents étiologiques de la goutte et du rhumatisme à pyrophosphate de calcium respectivement – était dépendante de NLRP3, de l'adaptateur ASC et de la caspase 1 chez les macrophages. Toutefois, la démonstration de sa nécessité *in vivo* demeure incomplète. Ainsi, nous nous sommes penchés sur la question de l'inflammasome NLRP3 et des inflammasomes en général dans un modèle murin d'inflammation aiguë uratique encore incomplètement caractérisé (modèle par injections sous-cutanées de MSU).

#### A. Un modèle d'inflammation uratique aiguë périarticulaire

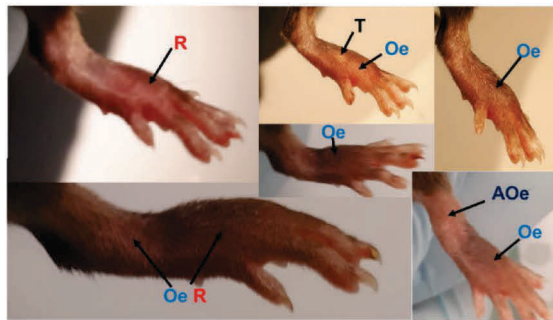
A cet effet, nous avons généré des cristaux d'urate de sodium (MSU) et déclenché une inflammation locale suivant leur injection par voie sous-cutanée (3mg dans un volume de 70 $\mu$ L). Ce modèle, d'ores et déjà mentionné dans la littérature (Schauer, C. *et al.* 2014) était néanmoins assez peu caractérisé ; ainsi, nous avons entrepris de décrire ce dernier dans un premier temps. L'observation des signes cliniques a ici rendu compte d'une forte similarité avec les crises de goutte humaines avec le développement d'une inflammation atteignant son acmé dans les 24 premières heures (œdème tarsal marqué, souvent jusqu'à la cheville, rougeur) et régressant ensuite (Figure RS1A et RS1B). Au bout de 7 jours, l'intensité de ces signes inflammatoires a en général fortement décru, laissant alors apparents des amas de cristaux d'urate de sodium. La présence d'une fièvre a été notée dès le premier jour suivant l'injection des cristaux. L'exploration par imagerie à résonance magnétique (IRM) des pattes d'une de ces souris a ensuite montré la présence d'une inflammation importante dans la patte MSU, pratiquement absente dans la patte controlatérale dans laquelle du PBS a été injecté. L'inflammation (hyper-signaux) semble ici concerner les tissus sous cutanés (flèches bleues) mais aussi les structures tendineuses (flèches rouges) comme les tendons fléchisseurs des

doigts (aspect similaire à celui des ténosynovites que l'on peut retrouver chez l'Homme). (**Figure RS1C**). Des hypo-signaux, imputables aux cristaux de MSU, sont également visibles (flèches vertes) (**Figure RS1C**). L'emploi du logiciel *3D viewer* nous a également permis de réaliser des images volumétriques des pattes de cette souris montrant ainsi une différence peu équivoque entre les pattes MSU et PBS (**Figure RS1D**). Afin d'obtenir des marqueurs biologiques, j'ai réalisé une analyse des pattes de souris broyées, ce qui m'a permis de visualiser une production robuste de pro-IL-1 $\beta$  (31kDa) dès 24hpi (heures post-injection), rapidement décroissante avec le temps. La production de la forme mature de l'IL-1 $\beta$  (17kDa) semble également avoir lieu à 24hpi mais cependant sous la forme d'un *smear*. Les pattes injectées avec du PBS (contrôle intrinsèque), ne montrent en revanche aucune production notable d'IL-1 $\beta$  sous l'une ou l'autre forme (**Figure RS1E**). La réalisation de dosages de l'IL-1 $\beta$  totale par ELISA corrobore ces résultats (maximum à 24hpi, **Figure RS1F**), la myéloperoxydase (MPO) est également accrue spécifiquement dans les pattes MSU dès 8hpi, d'une manière plus robuste à 24hpi (**Figure RS1G**) puis avec un taux stable jusqu'aux temps les plus tardifs (144hpi). Ces données montrent donc que notre modèle d'inflammation aiguë uratique est bien compatible avec une inflammation neutrophilique accompagnée d'une forte production d'IL-1 $\beta$  locale suivant l'injection des cristaux de MSU. L'aspect clinique est également compatible avec celui des crises de goutte humaines. Néanmoins, les crises possèdent aussi comme caractéristique d'être diminuées en réponse à la colchicine, le traitement de référence de l'accès goutteux. J'ai alors réalisé une caractérisation pharmacologique de ce modèle.

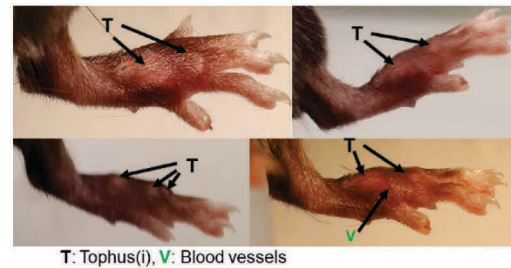
L'emploi de la colchicine, selon un schéma emprunté de **Torres, R. et al. 2009** (1mg/kg à J0, 0,5mg/kg/j à J1), montre une réponse particulière efficace avec une abolition quasiment totale des symptômes (épaisseur des pattes mesurée à l'aide d'un pied à coulisse (**Figure RS2A**), scores cliniques (**Figure RS2B**) et même température (**Figure RS2D**)), visualisée sur les photographies de la **Figure RS2C**. L'anakinra (récepteur antagoniste à l'IL-1) est également employé dans l'accès goutteux (**So, A. et al. 2010 ; Loustau, C. et al. 2018**) avec une certaine efficacité. L'emploi d'anakinra à 100mg/kg/j à J0 et J1 montre aussi une efficacité significative à 8hpi mais ses effets sont de courte durée (possiblement à cause de la pharmacocinétique de la molécule) et l'inflammation finit par se développer dès 16hpi (**Figures RS2E et RS2F**). L'étanercept (10mg/kg à J1) est en revanche totalement inefficace dans notre modèle, tout comme dans l'accès goutteux chez l'Homme (**Figure RS2G et RS2H**). Ces résultats montrent donc que ce modèle partage plusieurs caractéristiques avec la

crise de goutte humaine. Il s'agit donc ici d'une inflammation aiguë périarticulaire élicitée par les cristaux de MSU, accompagnée et probablement causée par une forte production d'IL-1 $\beta$ , comportant un recrutement de neutrophiles et répondant à plusieurs critères cliniques, cinétiques et pharmacologiques de la crise de goutte telle qu'elle est connue chez l'Homme. Il s'agit ici d'un modèle d'inflammation aiguë uratique intéressant les tissus périarticulaires.

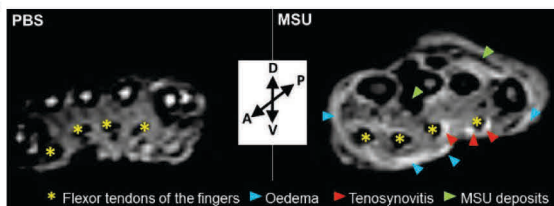
### A. 24hpi gout attack (acute phase)



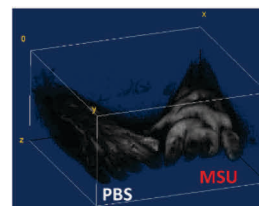
### B. 168hpi resolution phase



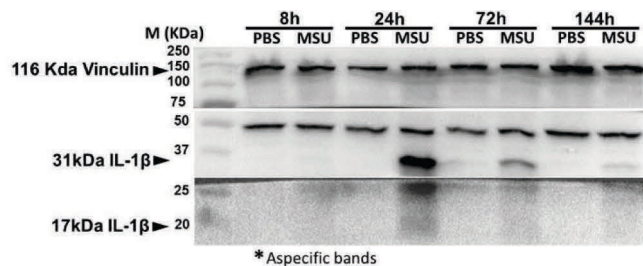
### C.



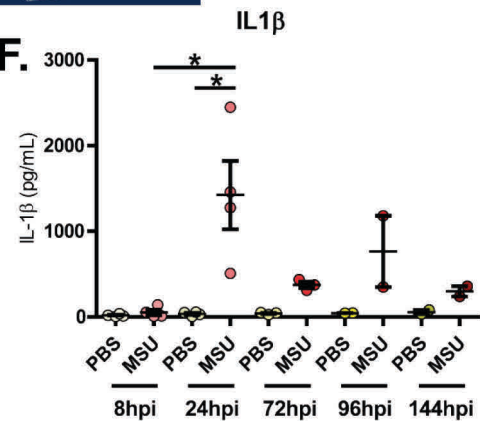
### D.



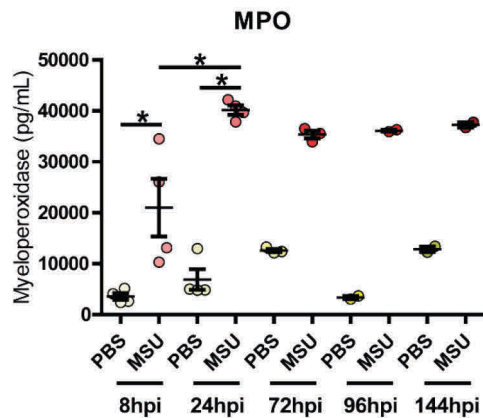
### E.



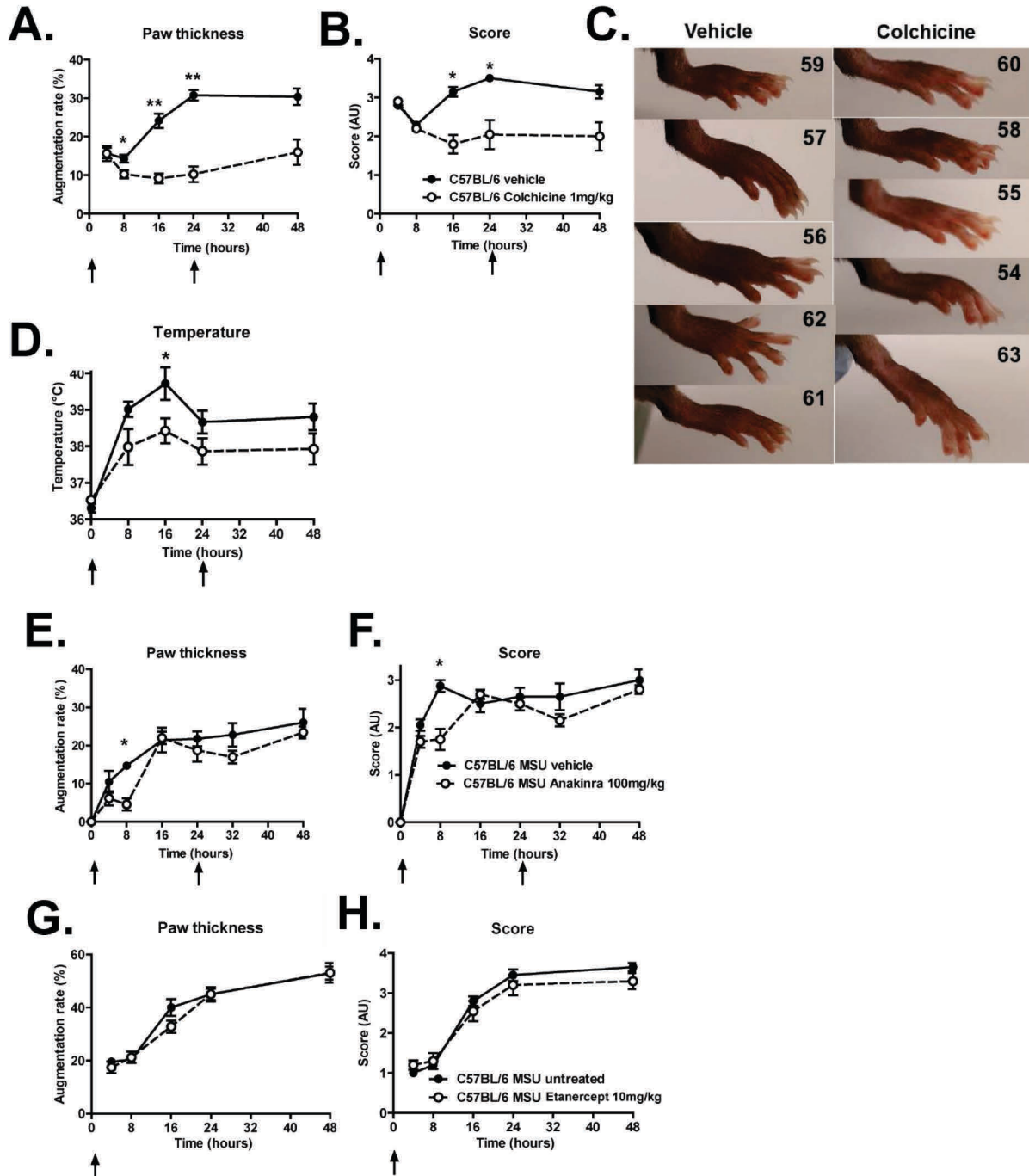
### F.



### G.



**Figure RS1: Le modèle d'inflammation aiguë uratique induit par injection sous-cutanée de cristaux de MSU reproduit certaines caractéristiques cliniques de la crise de goutte chez l'Homme. A and B.** Des photographies représentatives des pattes-arrières de souris C57BL/6J ont été prises 24h après l'injection de 3mg de cristaux de MSU (à l'acmé de la crise, n = 4) et 168h après (phase de résolution, n = 3). A l'acmé, les pattes présentent typiquement une inflammation intense où l'on peut identifier une rougeur (R), la formation d'œdèmes (Oe) pouvant aussi se localiser au niveau de la cheville (AOe). Les signes cardinaux de l'inflammation tendent ensuite à disparaître au cours de ce que l'on peut qualifier de phase de résolution, laissant apparaître de nombreuses structures similaires aux tophus goutteux (T) retrouvés chez les patients. **C et D.** Des acquisitions par imagerie à résonance magnétique (IRM, séquences T2, élimination des tissus gras) ont été réalisées sur les pattes d'une souris sacrifiée à 24hpi (heures post-injection), la patte PBS est à gauche, MSU à droite. Une image volumétrique des deux pattes a été générée à l'aide de *3D viewer* (**D.**). **E., F. et G.** Les pattes de ces souris ont été collectées à différents temps après l'injection des cristaux puis broyées. Les extraits obtenus ont été ensuite soumis à un western blot anti-IL-1 $\beta$ , la vinculine a été employée comme contrôle de charge. Ici, chaque temps (8, 24, 72 et 144h) est représenté par une souris (une patte PBS et une patte MSU) (**E.**) ; l'IL-1 $\beta$  (**F.**) et la myelopéroxydase (MPO) (**G.**) ont été mesurées par *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dans ces mêmes extraits. Les tests ELISA ont été réalisés à l'aide de 2 à 4 souris par point de temps, le western blot a été réalisé à trois reprises sur des échantillons différents. Chaque symbole représente une souris, les lignes horizontales et les barres d'erreurs correspondent à la moyenne +/- SEM. Les résultats sont analysés par le test de Mann-Whitney, \* = p < 0,05, ns = non significatif.



**Figure RS2:** L'inflammation aiguë uratique induite par injection sous-cutanée de MSU répond aux traitements de référence de l'accès goutteux.

A-D. Des souris C57BL/6J ont été soumises à une inflammation aiguë uratique et traitées avec de la colchicine (1mg/kg/j à J0 puis 0,5mg/kg/j à J1). **A.** Mesure de l'épaisseur des pattes à l'aide d'un pied à coulisse, **B.** scores cliniques, **C.** température corporelle et **D.** photographies représentatives des pattes de souris traitées à la colchicine (à droite) et ayant reçu le véhicule (à gauche). **E-H.** Inflammation aiguë uratique chez des souris C57BL/6J, traitées avec de l'Anakinra (100mg/kg/j) à J0 et J1 (**E-F.**) ou avec de l'Etanercept (10mg/kg à J0) (**G-H.**). **E.** et **G.** Epaisseur des pattes (gonflements), **F.** et **H.** scores cliniques. Toutes ces expériences ont été réalisées avec n = 5 dans chaque groupe. Chaque symbole représente une souris, les lignes horizontales et les barres d'erreurs



correspondent à la moyenne +/- SEM. Les résultats sont analysés par le test de Mann-Whitney, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , ns = non significatif.

## B. L'inflammation induite par les cristaux de MSU est indépendante de NLRP3

Une fois établi, ce modèle a ensuite été employé afin de répondre à l'interrogation principale de ce travail : la dépendance de NLRP3. Pour cela, nous avons eu recours à des souris *Nlrp3*<sup>-/-</sup>. Tout d'abord, j'ai constaté que l'emploi *in vitro* de macrophages péritonéaux *Nlrp3*<sup>-/-</sup> et leur stimulation par le MSU suivant un prétraitement au LPS conduisit à une abrogation de la production d'IL-1 $\beta$  (**Figure RS3A**). Conformément à la littérature, la production d'IL-6 et de TNF $\alpha$  est en revanche indépendante de NLRP3 (**Figure RS3C**). De manière intéressante, la stimulation de NLRP3 à l'aide de l'ATP est efficace dans les neutrophiles contrairement aux cristaux de MSU (**Figure RS3B**). Cela reproduit ainsi les observations publiées dans la littérature et confirme bien que les macrophages sont des producteurs majeurs d'IL-1 $\beta$  en réponse au MSU *in vitro*, contrairement aux neutrophiles.

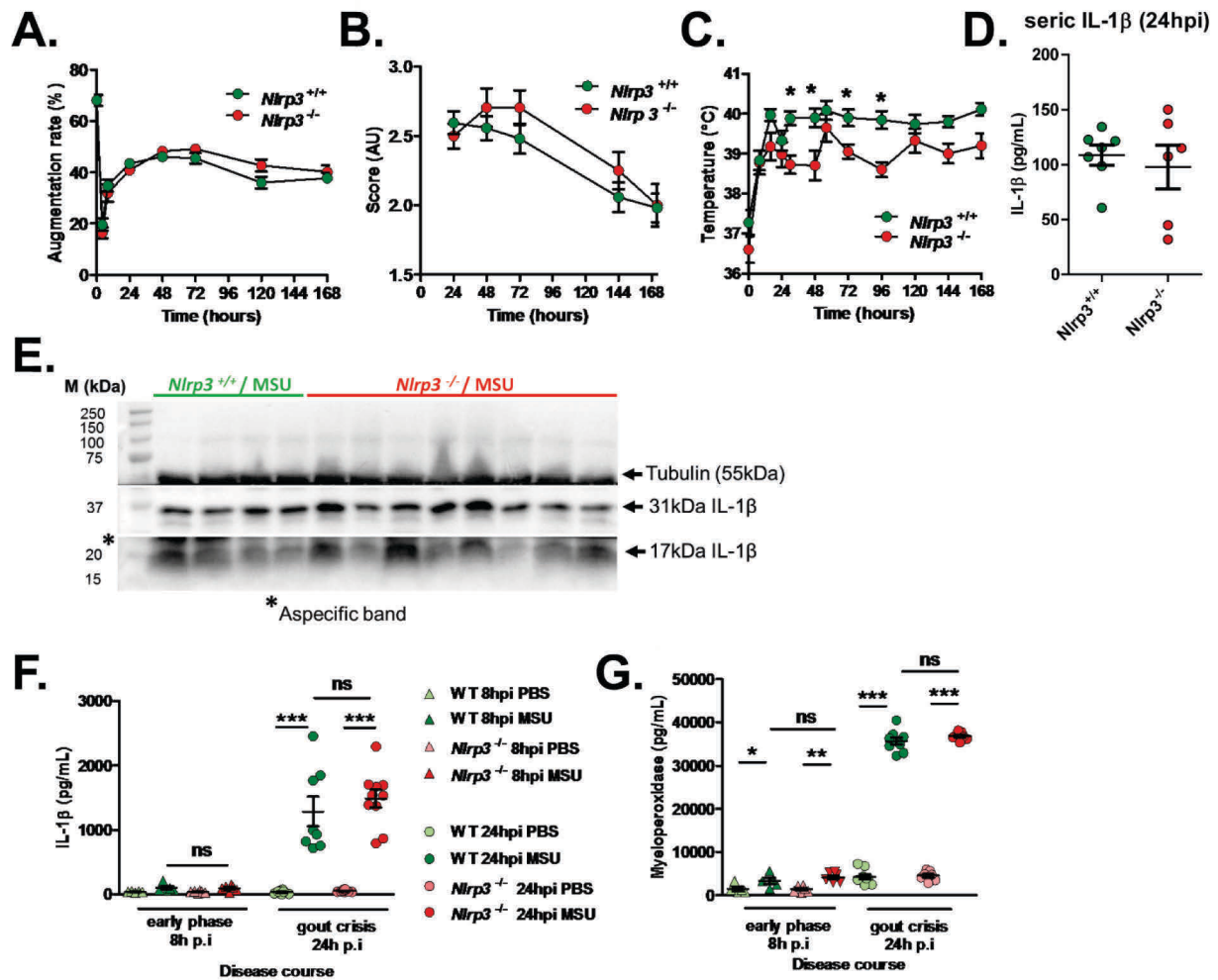
*In vivo*, la réalisation d'inflammations aiguës uratiques par injections sous-cutanées de MSU chez les souris *Nlrp3*<sup>+/+</sup> et *Nlrp3*<sup>-/-</sup> conduit à une absence totale de différence clinique attestée par la mesure de l'œdème (épaisseur des pattes, **Figure R1A**) et l'établissement de scores cliniques (**Figure R1B**). La température corporelle est en revanche abaissée significativement chez les mutants (**Figure R1C**) mais ceci n'est pas corrélé à une baisse de l'IL-1 $\beta$  sérique (**Figure R1D**). Il est important de noter que ces observations (cliniques) ont été répétées avec succès à l'aide de 5 cohortes de souris indépendantes.

L'analyse *in situ* par broyage des pattes de ces souris à 24hpi a ensuite montré une production égale de la pro-forme de l'IL-1 $\beta$  mais aussi de sa forme mature (**Figure R1E**) mise en évidence par western blot. Par ailleurs, la quantification par ELISA des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-6 n'est pas non plus modifiée chez les souris mutantes relativement aux Wt à 8 et 24hpi en dépit d'une très forte hausse de l'IL-1 $\beta$  entre ces deux temps (**Figures R1F et non montré**). Le dosage de la MPO donne des résultats similaires (**Figure R1G**), montrant une absence de différence entre les animaux *Nlrp3*<sup>-/-</sup> et *Nlrp3*<sup>+/+</sup>. L'analyse par RT-qPCR de l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation montre par ailleurs une forte hausse de l'*Il1b*, de l'*Il6* et de *Cxcl1* dans les pattes où les cristaux de MSU ont été injectés à 8hpi, les autres gènes testés étant stables (*Il18*, *Il33*, *Il1a*, *Itgam*, *Il12*, *Casp1*, *Aim2*). Néanmoins, aucune différence n'est observée entre les individus mutants et Wt (**Figure RS4**). L'expression de plusieurs gènes dépendant des interférons semble augmentée (*Ifit1*, *Ifnar1*, *Ifnar2* accrue ;

*Mx1/2*, *Ifna2/4* et *b* indétectables) mais de manière égale dans les deux génotypes (**Figure RS4E**).

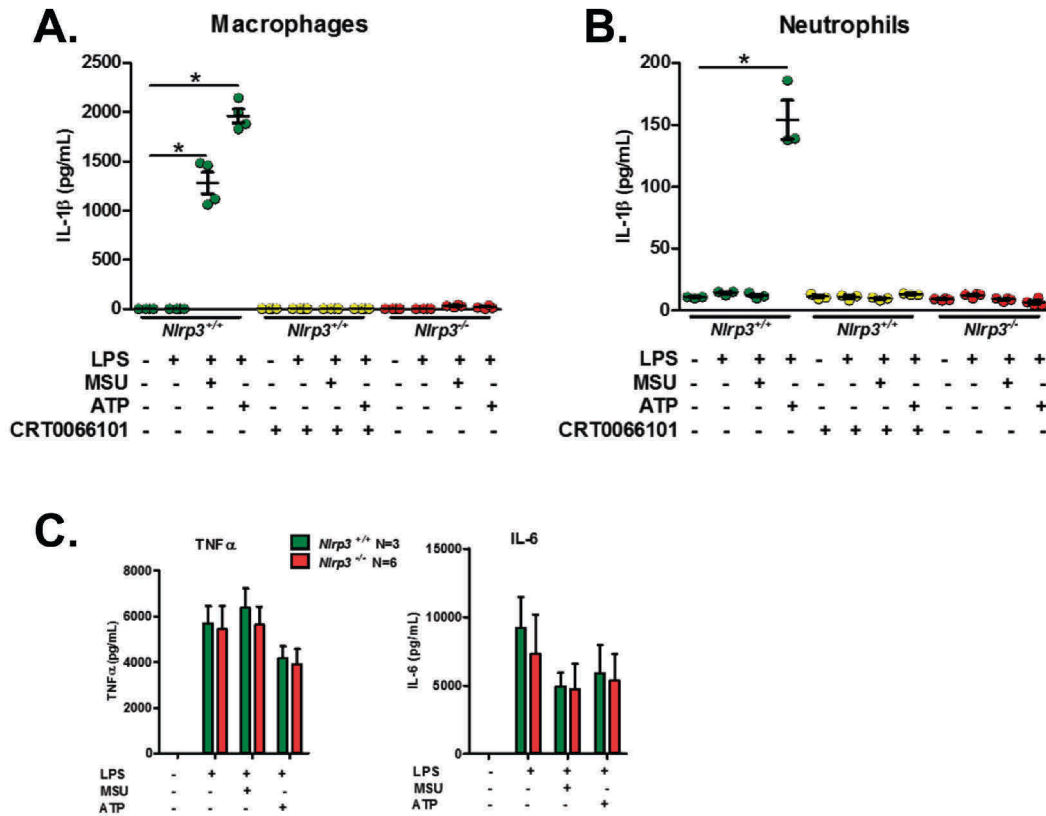
Par ailleurs, il a été montré récemment que les kinases PKD (PKD1, 2 et 3) étaient impliquées dans la production d'IL-1 $\beta$  faisant suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (**Zhang, Z. et al. 2017**). Ainsi, l'usage du CRT0066101, un inhibiteur spécifique des PKD, conduit aux mêmes observations (**Figure RS5**) : la mesure de l'épaisseur des pattes (**Figure RS5A**), les scores cliniques (**Figure RS5B**), la mesure de la température (**Figure RS5C**), du taux d'IL-1 $\beta$  sérique à 24hpi (**Figure RS5D**), de la production d'IL-1 $\beta$  et de son clivage (**Figure RS5E et F**), du taux de MPO (**Figure RS5G**) et d'IL-6 (**Figure RS5H**) n'indiquent aucune différence. Les observations cliniques ont là aussi été reproduites à 3 reprises. Par ailleurs, la fonctionnalité de l'inhibiteur CRT0066101 et l'implication des PKD1, 2 et 3 dans l'activation de NLRP3 ont été vérifiés et confirmés dans les macrophages et les neutrophiles péritonéaux prétraités au LPS et stimulés au MSU ou à l'ATP (**Figure RS3A et B**). Ainsi, nous pouvons conclure que l'axe PKD-NLRP3 ne semble donc pas impliqué dans ce modèle d'inflammation aiguë *in vivo*.

Si l'inflammation aiguë uratique induite par l'injection de cristaux de MSU en sous-cutané est un modèle mentionné dans la littérature, les modèles par injection de cristaux dans le péritoine des souris ou bien dans une poche à l'air dorsale sont aussi souvent employés. En effet, ils permettent de réaliser des lavages ainsi que la quantification des cellules infiltrées par cytométrie en flux. Ainsi, nous avons opté pour ce modèle afin d'y analyser également la dépendance de NLRP3. Pour cela, un milligramme de cristaux de MSU ont été injectés par voie intra-péritonéale et le contenu a alors été récupéré par lavage péritonéal puis analysé par cytométrie en flux 6 heures plus tard. Les neutrophiles (7-AAD<sup>-</sup>Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) et les monocytes (7-AAD<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>Gr1<sup>-</sup>) ont été dénombrés, les pourcentages parmi les cellules récupérées et les nombres absolus sont présentés dans la **Figure RS6**. D'une manière similaire aux résultats obtenus avec les injections sous-cutanées, nous n'avons pas non plus obtenu de différence au niveau des cellules totales (**Figure RS6B**), des neutrophiles (**Figure RS6C**) ou des monocytes (**Figure RS6D**). De même, le TNF $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  ne sont pas décrets en contexte *Nlrp3*<sup>-/-</sup> relativement aux animaux Wt (**Figure RS6E et F**). Au final, nos données n'indiquent vraisemblablement pas de contribution de l'inflammasome NLRP3 dans l'inflammation induite par les cristaux de MSU *in vivo*, contrairement à ce que nous avons observé *in vitro* (**Figure RS3**).



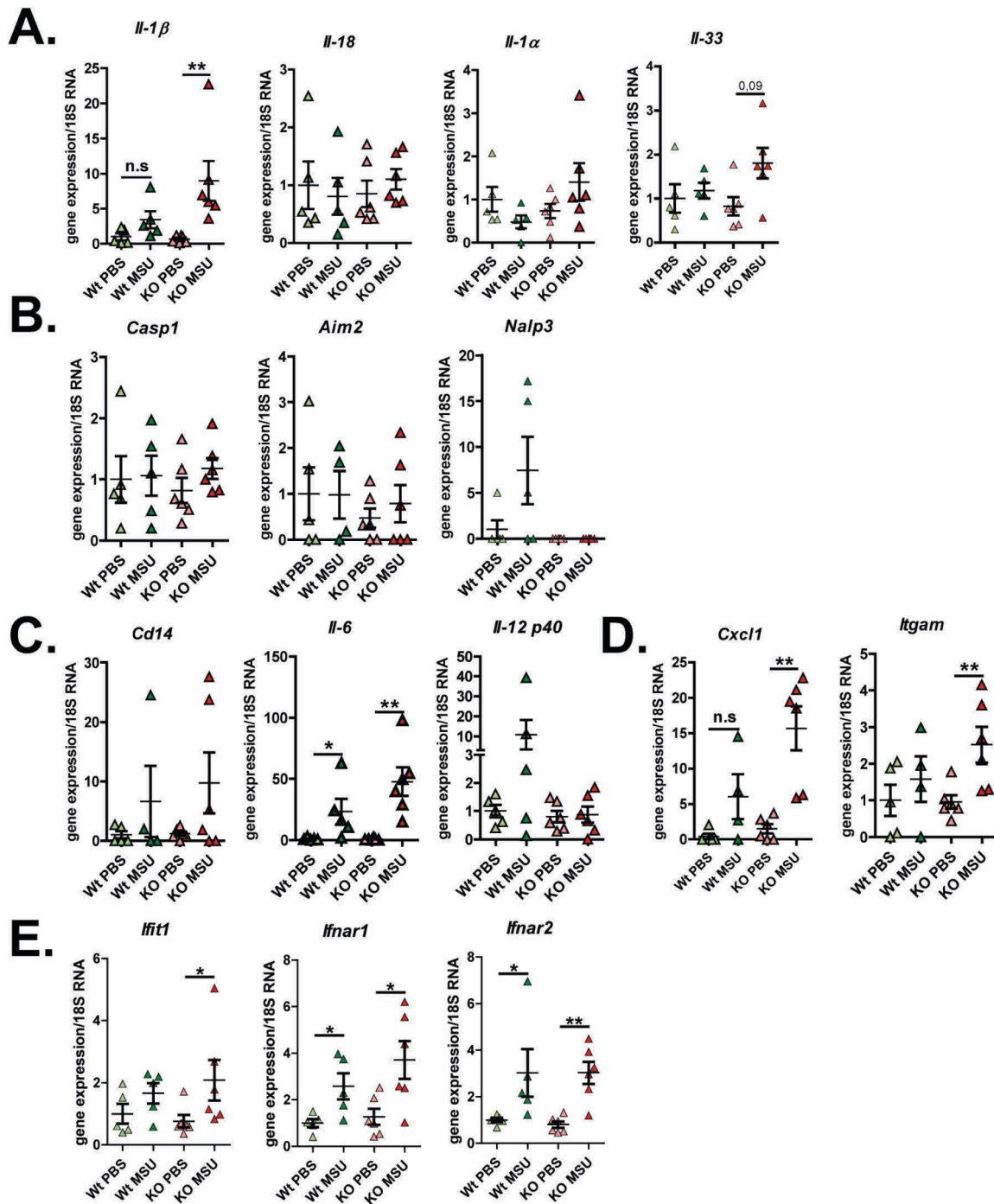
**Figure R1:** L'inflammasome NLRP3 n'est pas requis pour la maturation de l'IL-1β et l'inflammation qui en découle dans le modèle sous-cutané d'inflammation aiguë uratique.

A-F. Des souris *Nlrp3<sup>+/+</sup>* et *Nlrp3<sup>-/-</sup>* ont été soumises à une inflammation aiguë uratique et suivies sur une période de 7 jours (n = 11 à 13 dans chaque groupe). **A.** Epaisseur des pattes, **B.** scores cliniques, **C.** température corporelle et **D.** IL-1β sérique à 24hpi mesurée par ELISA. **E-G.** Analyse *in situ* des pattes pour la production/maturation de l'IL-1β et quantification de la MPO. **E.** 24 heures post-injection, les pattes ont été collectées, broyées et un western blot a été réalisé sur les extraits protéiques (75μg de protéines déposés) afin de déterminer la production de la pro-IL-1β (31kDa) et son clivage en IL-1β mature (17kDa) ; la tubuline est utilisée comme contrôle de charge (n = 4 *Nlrp3<sup>+/+</sup>*, n = 8 *Nlrp3<sup>-/-</sup>*). **F.** l'IL-1β totale ainsi que la MPO (**G.**) ont également été quantifiées par ELISA dans des extraits réalisés à partir de pattes collectées 8 (n = 5 à 6) et 24hpi (n = 7 et 9). Les observations cliniques présentées ici ont été reproduites sur 5 cohortes de souris indépendantes. Chaque symbole représente une souris (pictogrammes verts pour les souris *Nlrp3<sup>+/+</sup>* et rouges pour les *Nlrp3<sup>-/-</sup>*), les lignes horizontales et les barres d'erreurs correspondent à la moyenne +/- SEM. Les résultats sont analysés par le test de Mann-Whitney, \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001, ns = non significatif.

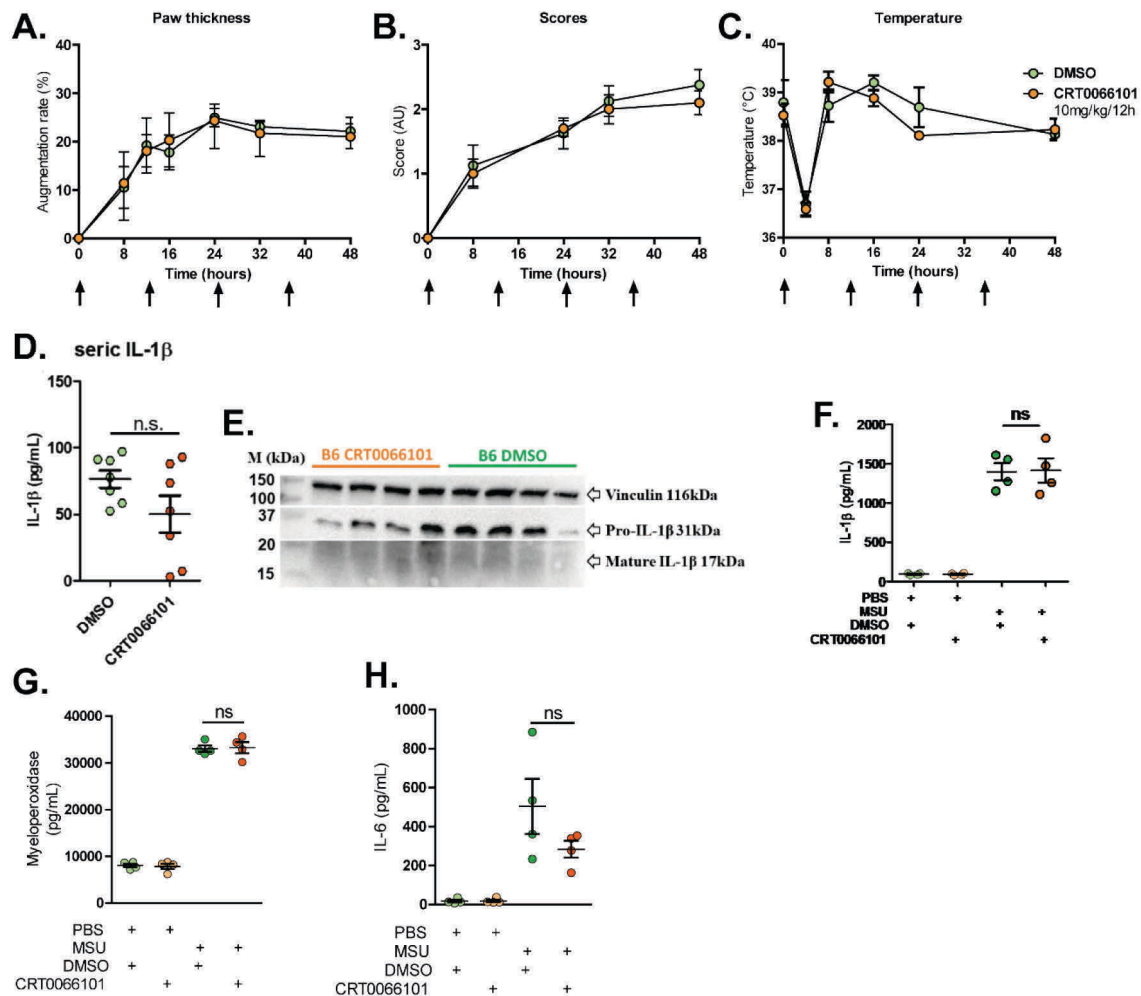


**Figure RS3: L'axe PKD-NLRP3 est crucial pour la maturation de l'IL-1 $\beta$  *in vitro*.**

**A.** Des macrophages péritonéaux provenant de souris *Nlrp3*<sup>+/+</sup> et *Nlrp3*<sup>-/-</sup> ont été mis en culture à raison de 5x10<sup>5</sup> cellules/puits puis stimulés avec du LPS (1 $\mu$ g/mL pendant 3h) seul ou avec des cristaux de MSU (250 $\mu$ g/ml, 6h) ou de l'ATP (2mM, 1h). Des macrophages *Nlrp3*<sup>+/+</sup> ont été traités avec l'inhibiteur CRT0066101 (10 $\mu$ M, pictogrammes jaunes) ou bien avec du DMSO (Di-méthylsulfoxyde) (pictogrammes verts) une heure avant et tout au long des stimulations, les macrophages *Nlrp3*<sup>-/-</sup> ont également été traités au DMSO (pictogrammes rouges). L'IL-1 $\beta$  a été quantifiée par ELISA **B.** La même expérience a été réalisée avec des neutrophiles murins à raison de 1x10<sup>6</sup> neutrophiles/puits. **C.** Des macrophages péritonéaux issus de souris *Nlrp3*<sup>+/+</sup> et *Nlrp3*<sup>-/-</sup> ont été mis en culture puis stimulés à l'aide de LPS, LPS+MSU ou LPS+ATP. L'IL-6 et le TNF $\alpha$  ont été quantifiés par ELISA. **A. et B.** n = 3 à 4 dans chaque groupe, **C.** n = 3 à 6 par groupe. Chaque symbole représente les cellules issues d'une souris, les lignes horizontales et les barres d'erreurs correspondent à la moyenne +/- SEM. Les résultats sont analysés par le test de Mann-Whitney, \* = p < 0,05, ns = non significatif.

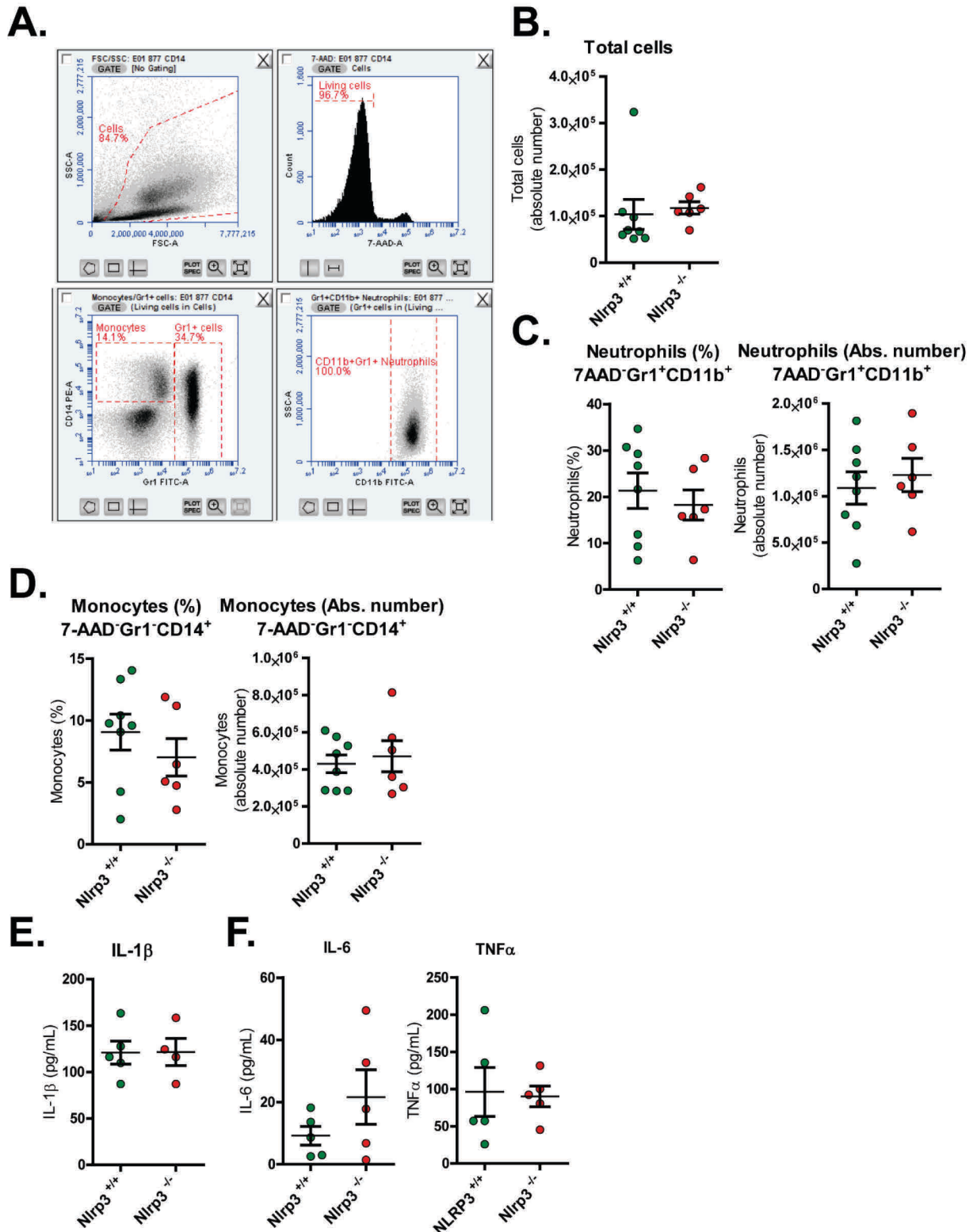


**Figure RS4:** NLRP3 n'a pas d'impact sur l'expression de plusieurs gènes marqueurs de l'inflammation. Une inflammation aiguë uratique a été induite chez des souris *Nlrp3*<sup>+/+</sup> et *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (n = 5 and 6 respectivement) et les pattes ont été collectées après sacrifice à 8hpi, broyées puis l'expression de plusieurs gènes a été analysée par RT-qPCR. **A.** Quelques cytokines de la famille *Il1b*, **B.** *Casp1*, *Aim2* et *Nlrp3*, des composants des inflammasomes **C.** *Cd14*, *Il6* et *Il12* (en lien avec les fonctions des monocytes/macrophages), **D.** *Cxcl1* et *Itgam* (recrutement des neutrophiles), **E.** des gènes de la réponse interféron. Les valeurs présentées ont été obtenues par la méthode du 2<sup>-( $\Delta\Delta C_t$ )</sup> puis normalisées à un groupe de référence (groupe PBS *Nlrp3*<sup>+/+</sup> = 1). Chaque symbole représente une souris (pictogrammes verts pour les souris *Nlrp3*<sup>+/+</sup> et rouges pour les *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, couleurs claires pour les pattes PBS, vives pour les pattes MSU), les lignes horizontales et les barres d'erreurs correspondent à la moyenne +/- SEM. Les résultats sont analysés par le test de Mann-Whitney, \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, ns = non significatif.



**Figure RS5:** L'inhibition pharmacologique de l'axe PKD-NLRP3 n'impacte pas le développement de l'inflammation aiguë uratique à l'instar d'une ablation de NLRP3.

Des souris C57BL/6J ont été traitées avec l'inhibiteur de PKDs CRT0066101 à raison de 10mg/kg toutes les douze heures ou bien avec un véhicule (DMSO) avant de déclencher l'inflammation aiguë uratique. **A-C.** Données cliniques recueillies sur 48h. **A.** Epaisseur des pattes, **B.** scores cliniques, **C.** température corporelle. L'IL-1β a été mesurée à 24hpi par ELISA (**D.**). **E.-H.** Les pattes ont été collectées puis broyées et les extraits protéiques soumis à un western blot anti-IL-1β (**E.**) ou à des tests ELISA afin de quantifier l'IL-1β (**F.**), la MPO (**G.**) et l'IL-6 (**H.**). n = 4 à 5 (données cliniques), n = 7 dans chaque groupe pour IL-1β sérique, n = 4 pour les analyses *in situ* des cytokines et MPO. Les observations cliniques présentées ont été répliquées à l'aide de trois cohortes de souris indépendantes. Chaque symbole représente une souris, les lignes horizontales et les barres d'erreurs correspondent à la moyenne +/- SEM. Les résultats sont analysés par le test de Mann-Whitney, ns = non significatif.



**Figure RS6:** NLRP3 n'est pas requis lors des péritonites au MSU.

Des péritonites ont été induites chez des souris *Nlrp3*<sup>+/+</sup> et *Nlrp3*<sup>-/-</sup> par l'injection d'un milligramme de cristaux de MSU par voie intra-péritonéale. **A.D.** Une analyse par cytométrie en flux a été réalisée sur les exsudats péritonéaux récupérés par lavage 6h après l'injection des cristaux (n = 6 à 8). **A.** Stratégie de *gating* employée pour déterminer les pourcentages de neutrophiles et de monocytes vivants parmi les cellules totales. Brièvement, les cellules sont distinguées des débris cellulaires sur la base de leur profil SSC/FSC, les cellules vivantes sont ensuite sélectionnées (7-AAD négatives). Parmi celles-ci,

les cellules Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> sont identifiées comme les neutrophiles et les CD14<sup>+</sup>Gr1<sup>-</sup> comme les monocytes. **B.** Nombre de cellules totales, **C.** pourcentages et nombres absolus de neutrophiles, **D.** pourcentages et nombres absolus de monocytes. **E-F.** Quantification des cytokines par ELISA dans les lavages péritonéaux, **E.** l'IL-1 $\beta$  est mesurée 2h après l'injection de 3mg de MSU, **F.** l'IL-6 et le TNF $\alpha$  sont quantifiés dans les lavages réalisés 6h après injection d'un milligramme de MSU (même protocole que lors de la cytométrie). Chaque symbole représente une souris (pictogrammes verts pour les souris *Nlrp3*<sup>+/+</sup> et rouges pour les *Nlrp3*<sup>-/-</sup>), les lignes horizontales et les barres d'erreurs correspondent à la moyenne +/- SEM. Les résultats sont analysés par le test de Mann-Whitney, ns = non significatif.

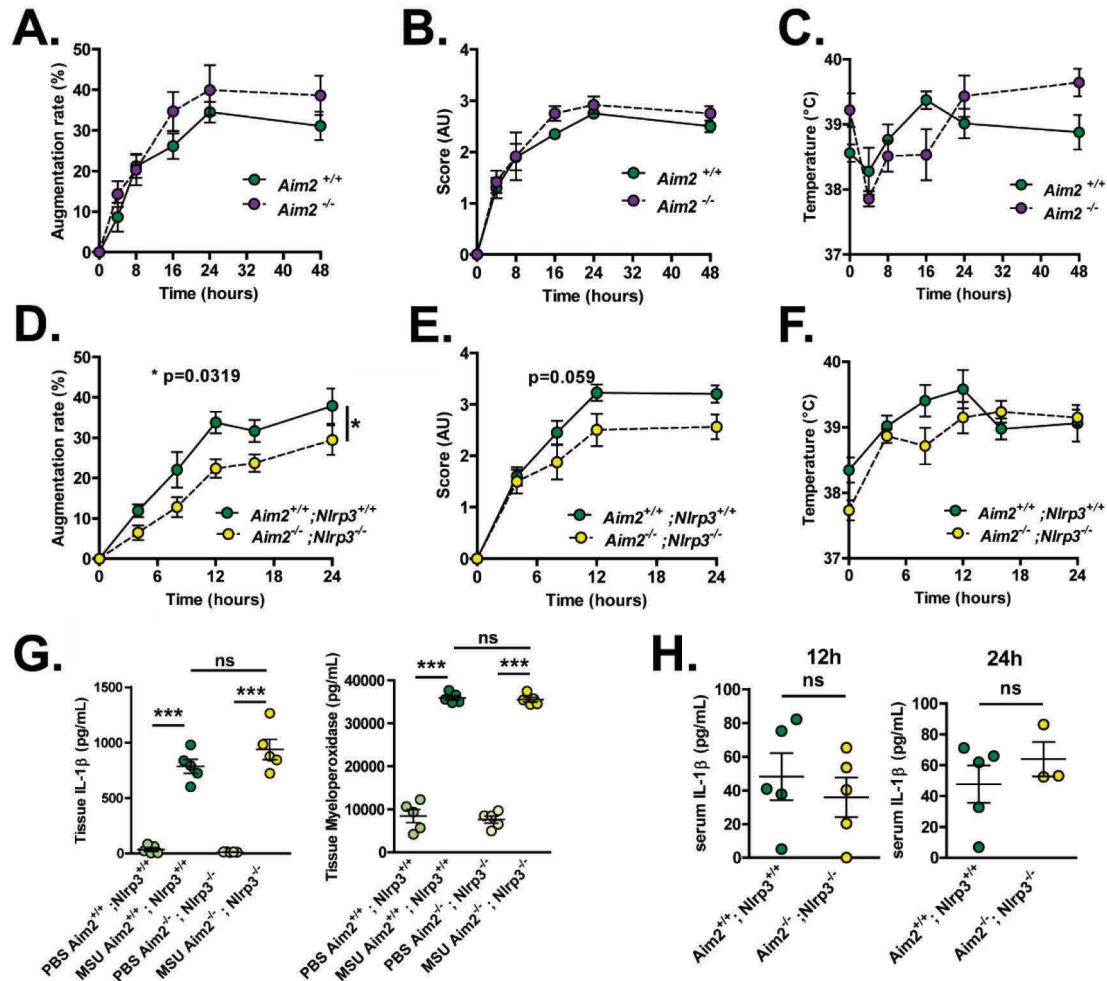


### C. Qu'en est-il pour les autres inflammasomes ?

NLRP3 est connu pour s'activer en réponse aux cristaux de MSU, toutefois, plusieurs autres inflammasomes ont été caractérisés et peuvent aussi induire une production d'IL-1 $\beta$ . Un de ces inflammasomes – AIM2 – a été découvert en 2009 et est impliqué dans la réponse à l'ADN double-brin. Un article mentionnant l'activation conjointe de NLRP3 et d'AIM2 par des cristaux d'hémozoiné liés à l'ADN génomique du parasite *Plasmodium falciparum* (Kalantari, P. *et al.* 2014), nous avons alors émis l'hypothèse que le relargage d'ADN double-brin issu de sources variées (NETose, activée par les cristaux de MSU) pourrait activer AIM2 localement et contribuer à la production d'IL-1 $\beta$ . Ainsi, afin de rendre compte de l'importance éventuelle d'AIM2 dans l'inflammation induite par les cristaux de MSU, nous avons obtenu des souris *Aim2*<sup>-/-</sup> de l'équipe de Veit Hornung, et ensuite généré des souris *Aim2*<sup>-/-</sup> ; *Nlrp3*<sup>-/-</sup>. Toutefois, l'usage des souris mutées pour *Aim2* ou *Aim2* et *Nlrp3* s'est soldé par une absence totale de différence avec les individus sauvages. Ni AIM2 (Figure R2A-C), ni NLRP3 ne semblent impliqués au cours de cette pathologie expérimentale, leur coparticipation n'explique pas non plus la production d'IL-1 $\beta$ /recrutement des neutrophiles et l'apparition de l'inflammation (Figure R2D-H). Par la suite, nous avons réalisé des expériences de co-cultures (Figure R3B) de macrophages et de neutrophiles. L'activation avec le LPS et les cristaux de MSU donna lieu à une forte production d'IL-1 $\beta$  par les macrophages, plus faibles chez les neutrophiles et toutes deux abolies en fond *Aim2*<sup>-/-</sup> ; *Nlrp3*<sup>-/-</sup>. Par ailleurs, aucune production d'IL-1 $\beta$  ne fut obtenue lorsque les cellules ont été exposées au MSU (signal II seul), ou au LPS (signal I seul), la présence de neutrophiles éventuellement phagocytés par les macrophages ne semble donc pas contribuer à l'activation de la production d'IL-1 $\beta$  en tant que signal I comme de signal II dans nos conditions expérimentales. Finalement, l'emploi de souris *Casp1*<sup>-/-</sup> ; *Casp11*<sup>-/-</sup> n'a permis d'observer qu'une baisse limitée des signes cliniques (Figure RS7A-C) sans modification du taux l'IL-1 $\beta$  sérique (Figure RS7D) confirmant que ce modèle est visiblement indépendant (au moins partiellement) des inflammasomes.

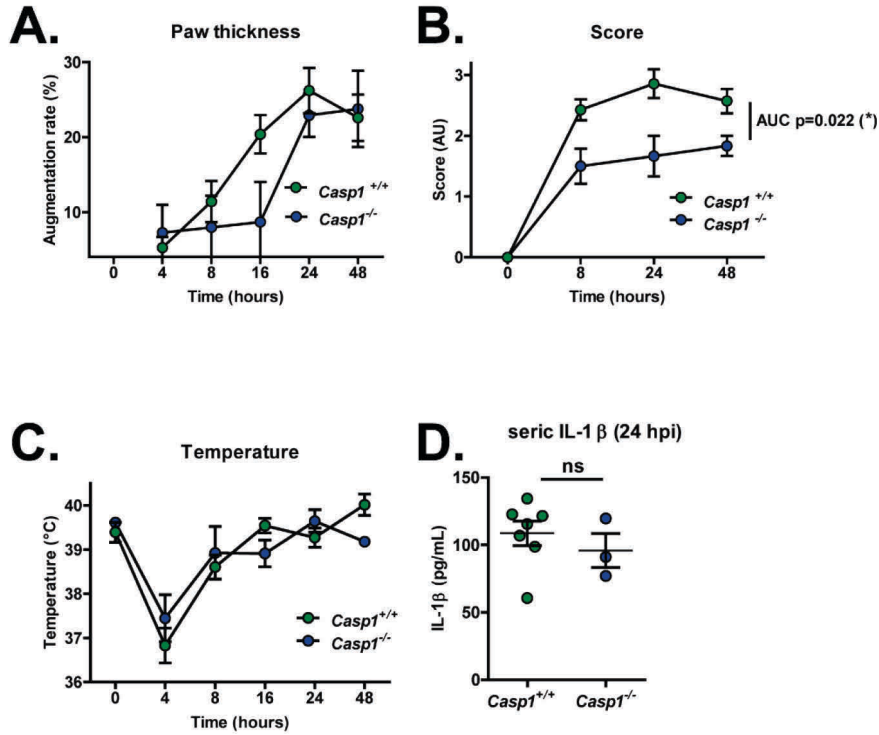
Toutes ces données semblent donc montrer que l'inflammasome NLRP3 mais aussi les autres inflammasomes (AIM2) employant les caspases 1 et 11 ne semblent pas impliqués dans ce modèle. Il est ainsi vraisemblable que l'inflammation aiguë induite par l'injection sous cutanée de cristaux de MSU soit davantage dépendante de la production d'IL-1 $\beta$  par d'autres moyens. La piste des protéases extracellulaires a été avancée depuis très longtemps et semble largement probable dans la mesure où cette inflammation requiert le recrutement d'un grand

nombre de neutrophiles, dont nombre de protéases dérivent (PR3, cathepsines). Les mastocytes et la chymase qui en est dérivée semblent aussi être de bons candidats dans ce processus.



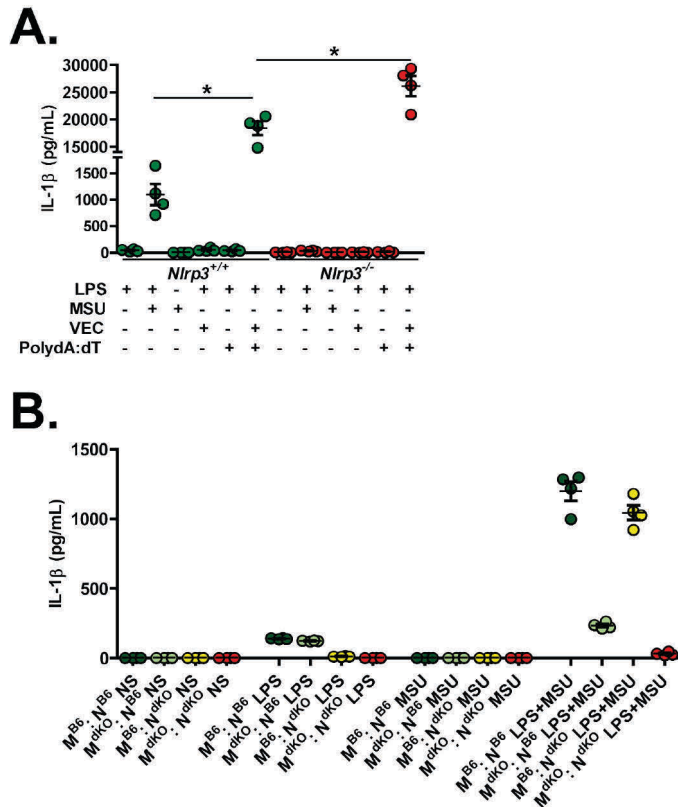
**Figure R2 :** *Aim2* n'a pas de rôle privilégié dans l'inflammation aiguë uratique et ne compense pas la perte de *Nlrp3*.

A-C. Des souris *Aim2*<sup>+/+</sup> et *Aim2*<sup>-/-</sup> ont été employées lors d'une expérience d'inflammation aiguë uratique et suivies sur 48h (n = 3 à 5). **A.** Epaisseur des pattes, **B.** scores cliniques et **C.** température corporelle. **D-H.** Afin d'exclure une compensation entre les inflammasomes NLRP3 et AIM2, des souris *Aim2*<sup>-/-</sup>; *Nlrp3*<sup>-/-</sup> et les contrôles correspondant (*Aim2*<sup>+/+</sup>; *Nlrp3*<sup>+/+</sup>) ont été générées par croisement. L'inflammation aiguë uratique a été réalisée sur ces deux groupes de souris, les observations cliniques ont été faites sur 24h : **D.** Epaisseur des pattes, **E.** scores cliniques, **F.** Température corporelle (n = 8 à 10, données représentatives de deux expériences indépendantes). **G-H.** La quantification *in situ* de l'IL-1β et de la MPO (**G.**, n = 5 par groupe) ainsi que celle de l'IL-1β circulante à 12hpi et 24hpi (gauche et droite respectivement, n = 3 à 5 par groupe) (**H.**) ont été réalisées par ELISA. Chaque symbole représente une souris (pictogrammes verts pour les souris contrôles (*Aim2*<sup>+/+</sup> ou *Aim2*<sup>+/+</sup>; *Nlrp3*<sup>+/+</sup>), violets pour les *Aim2*<sup>-/-</sup> et jaunes pour les *Aim2*<sup>-/-</sup>; *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, couleurs claires pour les pattes PBS, vives pour les pattes MSU (**G.**)), les lignes horizontales et les barres d'erreurs correspondent à la moyenne +/- SEM. Les résultats sont analysés par le test de Mann-Whitney sur les jeux de données présentés ou bien sur les AUC (Aire sous la courbe) pour les figures **D** et **E.**, \* = p < 0,05, \*\*\* = p < 0,001, ns = non significatif.



**Figure RS7 :** L'inflammation aiguë uratique par injection sous-cutanée de MSU peut se développer indépendamment des caspases 1 et 11.

Des souris *Casp1*<sup>-/-</sup> (également invalidées pour la *Casp11* du fait d'une mutation ponctuelle) ont été soumises à une inflammation aiguë uratique et les données cliniques ont été collectées sur 48h. **A.** Epaisseur des pattes, **B.** scores cliniques, **C.** température corporelle. L'IL-1β sérique (24hpi) a été mesurée par ELISA (**D.**). (n = 3 à 7). Chaque symbole représente une souris (pictogrammes verts pour les souris *Casp1*<sup>+/+</sup> et bleus pour les *Casp1*<sup>-/-</sup>), les lignes horizontales et les barres d'erreurs correspondent à la moyenne +/- SEM. Les résultats sont analysés par le test de Mann-Whitney, \* = p < 0,05, ns = non significatif.



**Figure R3 :** La présence des neutrophiles ne favorise pas la production d’IL-1β par les macrophages.

**A.** Activation de l’inflammasome AIM2 dans des macrophages péritonéaux de souris *Nlrp3*<sup>+/+</sup> ou *Nlrp3*<sup>-/-</sup>. Les macrophages ont été mis en culture à raison de 5x10<sup>5</sup> cellules/puits puis stimulés avec (de gauche à droite) 1) du LPS (1μg/mL pendant 3h) seul, 2) LPS puis des cristaux de MSU (250μg/ml, 6h), 3) du MSU seul, 4) LPS avec un vecteur de transfection vide, 5) LPS avec du poly-dA:dT non vectorisé et 6) LPS avec du poly-dA:dT vectorisé. L’IL-1β a été quantifiée par ELISA, les macrophages péritonéaux de chaque groupe sont issus de 4 souris différentes (n = 4). **B.** Une expérience de co-culture a été réalisée avec 5x10<sup>5</sup> macrophages péritonéaux/puits et des neutrophiles murins à raison de 1x10<sup>6</sup> neutrophiles/puits ; les neutrophiles (N) et macrophages (M) utilisés sont soit *Aim2*<sup>+/+</sup> ; *Nlrp3*<sup>+/+</sup> (abrégiés B6) soit *Aim2*<sup>-/-</sup> ; *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (abrégiés double-KO : dKO) et ainsi utilisés en quatre combinaisons (Mac B6 : Neutro B6 ; Mac dKO : Neutro B6 ; Mac B6 : Neutro dKO ; Mac dKO : Neutro dKO). Ces cellules sont ensuite soit laissées non stimulées (NS), stimulées au LPS 1μg/mL (LPS, 27h), aux cristaux de MSU 250μg/mL (MSU, 24h) ou bien par la conjonction de LPS et de MSU (LPS seul pendant 3h puis ajout de MSU pendant 24h). L’IL-1β a été quantifiée par ELISA. n = 4 dans chaque groupe. Chaque symbole représente une souris, les lignes horizontales et les barres d’erreurs correspondent à la moyenne +/- SEM. Les résultats sont analysés par le test de Mann-Whitney, \* = p < 0,05, ns = non significatif.

#### D. L'imiquimod, un moyen topique de cibler l'IL-1 $\beta$

Nos données suggèrent que le modèle d'inflammation aiguë uratique par injection sous-cutané de cristaux de MSU est indépendant des inflammasomes. Toutefois, il s'associe à une forte production d'*Il1b* dès 8hpi et de la protéine correspondante sous 24hpi ; de plus, l'ensemble des modèles d'inflammation uratique aiguë connus à ce jour sont dépendants de la production d'IL-1 $\beta$ . Dans notre cas, l'Anakinra semble donner lieu à une baisse de l'inflammation, au moins lors de la phase précoce. Ainsi, à l'instar de l'Anakinra et du Canakinumab, dont l'efficacité est avérée chez l'Homme, toute stratégie visant à abroger la production et/ou les effets de l'IL-1 $\beta$  serait probablement intéressante dans ce modèle. Récemment, **Nehmar, R. et al. (2017)** ont montré dans notre laboratoire que l'application topique d'imiquimod – contenu dans la crème ALDARA® – était efficace dans plusieurs modèles de polyarthrite murine, où l'IL-1 est aussi contributive. De même, parmi les effets de cette crème, une baisse de la production d'*Il1b* et d'*Il6* était constatée *in situ* lors d'analyse par RT-qPCR. Ainsi, au vu du rôle très probable de l'axe IL-1 $\beta$ -IL-1R dans notre modèle et plus largement dans l'accès goutteux, nous nous sommes intéressés au potentiel thérapeutique que l'imiquimod topique pourrait apporter.

L'imiquimod, anciennement appelé R-837, est une molécule appartenant à la famille des imidazoquinolines, avec le gardiquimod et le resiquimod (**Chi, H. et al. 2017**). L'imiquimod possède une structure chimique analogue à celle de l'adénine et a été étudiée en premier lieu – à la fin des années 1980 – pour sa capacité à réduire la sévérité des infections génitales induites par l'infection de cochons d'Inde avec le virus HSV-2. L'application intra-vaginale d'imiquimod peut bloquer la réplication locale du virus et entraver la formation de lésions (**Harrison, C.J. et al. 1988**). Dans le même contexte, l'immunisation à l'aide de la glycoprotéine d'HSV-2 est accrue par l'administration d'imiquimod (**Bernstein, D.I. et al. 1995**). Plus largement, l'imiquimod est efficace pour engager une réponse antitumorale que ce soit dans des modèles de cancers cutanés (carcinomes à cellules squameuses, carcinomes basocellulaires). Ces effets seraient imputables à de nombreux mécanismes tels que la synthèse d'interférons (IFN) de type I, l'activation de cellules cytotoxiques ou encore l'apoptose des cellules cancéreuses (**Chi, H. et al. 2017**). En 2002, une équipe montra alors que l'imiquimod et le R-848 (resiquimod) engagent leurs effets à travers le récepteur TLR7 en initiant une signalisation via Myd88 menant à l'activation de NF $\kappa$ B et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, la production d'IL-6, IL-12 et TNF $\alpha$ , induite par l'imiquimod est abolie chez les macrophages *Tlr7<sup>-/-</sup>* ; de même la prolifération des splénocytes

et la maturation des cellules dendritiques induites par le R-848 *in vitro*. *In vivo*, la production systémique d'IL-12, IL-6 et d'IFN $\alpha$  induite par le R-848 est aussi abrogée dans les contextes *Tlr7<sup>-/-</sup>* et *Myd88<sup>-/-</sup>* (Hemmi, H. et al. 2002). Localement, les effets antitumoraux de l'imiquimod sont dépendants de TLR7 mais aussi du récepteur aux IFN de type I, IFNAR1. Ceci permet alors l'attraction locale de cellules dendritiques plasmacytoïdes et leur différenciation en cellules cytotoxiques (Drobits, B. et al. 2012). Ces mécanismes expliquent ainsi l'efficacité de l'imiquimod dans l'élimination de certaines formes de cancers cutanés lorsque celui-ci est appliqué sous forme de crème comme ALDARA®. Toutefois, il est également important de noter que l'application de cette crème est aussi en mesure d'engendrer l'apparition de changements cutanés (acanthose, parakératose) ainsi qu'une inflammation (infiltrats avec présence de neutrophiles) constituant alors un modèle de psoriasis lors d'une application chronique sur de la peau saine. De manière intéressante, ces réactions sont partiellement indépendantes de TLR7 et des IFN de type I (Walter, A. et al. 2013). Par ailleurs, l'imiquimod lui-même a été montré comme activant l'inflammasome NLRP3 (Groß, C.J. et al. 2016).

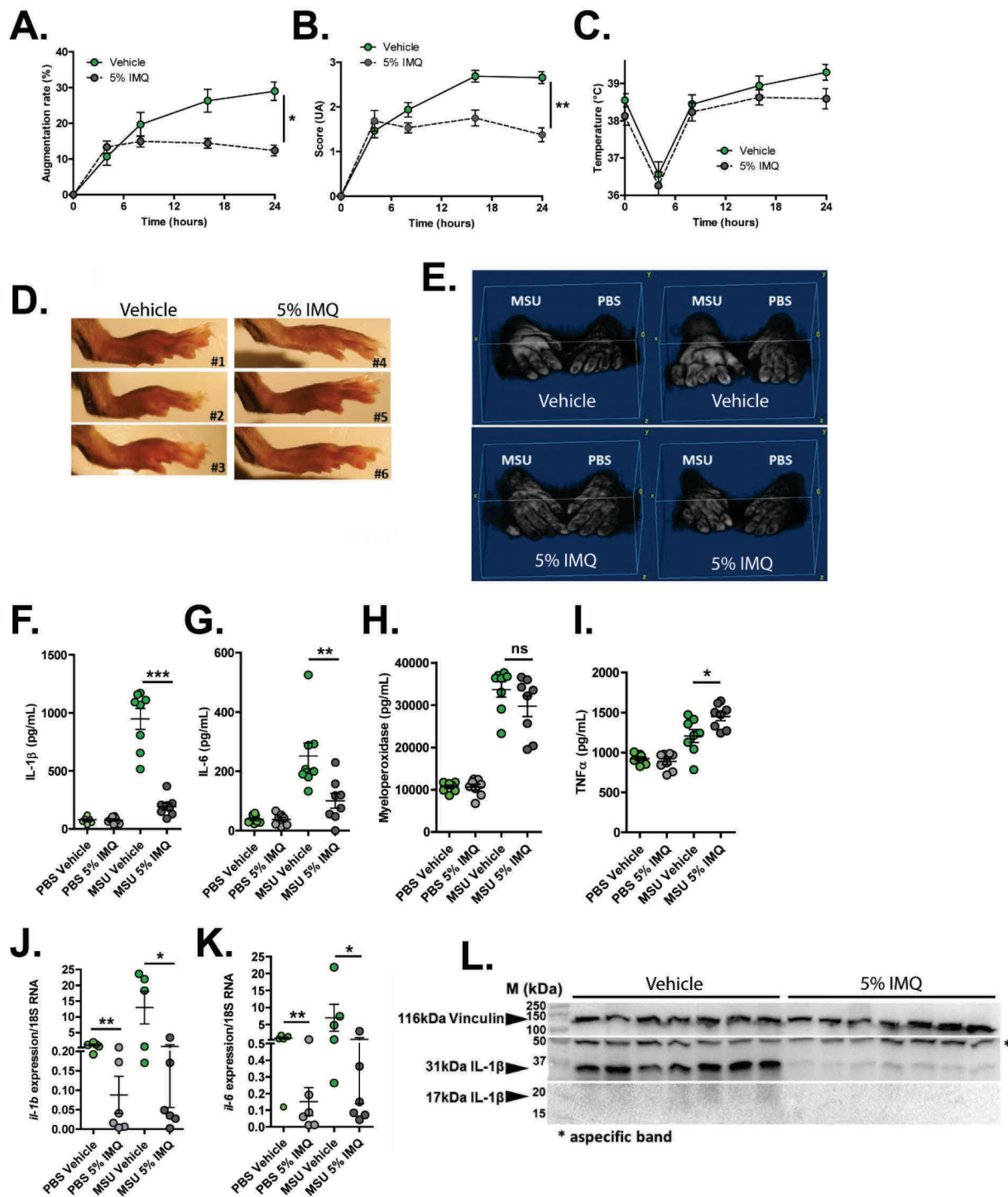
Dans le cas présent, nous avons opté pour une stratégie visant à traiter la crise inflammatoire à son commencement. Ainsi, l'application de la crème commerciale ALDARA® à raison de 20-25mg/patte (soit 1-1,25mg d'Imiquimod) a été réalisée juste après l'injection des cristaux de MSU ou de PBS (pattes contrôles). Il s'agit ici d'un traitement préventif. Ces souris ont été comparées à d'autres souris, traitées cette fois-ci avec une crème contrôle, contenant tous les excipients de la crème commerciale ALDARA® à l'exception du principe actif : l'imiquimod. Cette dernière est pourvue des mêmes propriétés physico-chimiques que l'ALDARA® et constitue donc un contrôle approprié.

Rapidement, nous avons constaté que l'épaisseur des pattes (due à l'œdème) est très nettement décrie chez les animaux traités avec l'imiquimod topique (Figure R4A) et nous avons fait la même observation pour les scores cliniques (Figure R4B). Il est également intéressant de noter que les pattes injectées avec le PBS ne montrent aucune inflammation ou réaction apparente due à l'imiquimod topique ou à la crème contrôle. La température corporelle ne montre pas de baisse significative (Figure R4C). Cet effet clinique a été répliqué à l'aide de 4 cohortes de souris indépendantes avec des réductions tout aussi consistantes dès 16hpi. Les images présentées dans la Figure R4D rendent compte de cet effet et il en va de même pour les représentations volumétriques (après IRM) (Figure R4E).

Afin d'analyser au mieux les effets de l'imiquimod topique, ces animaux ont été sacrifiés à 24hpi et leur pattes broyées afin de réaliser une analyse *in situ* par western blot et ELISA. Tout d'abord, une très forte baisse de l'IL-1 $\beta$  est visualisée (passant de 947,6pg/mL à 192,7pg/mL,  $p < 0,001^{***}$ ) (**Figure R4F**). Conjointement, la cytokine IL-6 est également décruée significativement (251,9 contre 100,5pg/mL,  $p < 0,01^{**}$ , **Figure R4G**). En revanche, le TNF $\alpha$  est légèrement augmenté (**Figure R4I**), la MPO n'est pas affectée rendant compte d'un afflux similaire de neutrophiles dans les pattes traitées à l'imiquimod relativement aux pattes contrôles (**Figure R4H**). Ainsi, l'IL-1 $\beta$  et secondairement l'IL-6, semblent être décruées d'une manière majeure ; le kit ELISA ne différenciant pas l'IL-1 $\beta$  mature de sa pro-forme, nous avons réalisé un western blot sur ces échantillons.

Comme présenté à la **Figure R4L**, une perte majeure de la pro-forme de l'IL-1 $\beta$  est observée chez toutes les souris traitées avec l'imiquimod topique. La forme mature, difficile à visualiser, semble aussi décruée mais nous ne statuerons pas sur cette différence potentielle au vu de la mauvaise qualité des bandes observées. Enfin, l'analyse de l'expression de l'*Il1b* et de l'*Il6* par RT-qPCR a été réalisée à 24hpi sur les pattes des souris traitées avec l'imiquimod topique ou avec la crème contrôle. Une baisse profonde de ces deux même gènes ( $p < 0,05^*$ ) avec une magnitude de 25 fois pour l'*Il1b* et de 15 fois pour l'*Il6* est observée (**Figure R4J et K.**) dans les pattes PBS comme MSU d'ailleurs.

Toutes ces données montrent donc un effet majeur de l'imiquimod topique sur l'expression de l'*Il1b* et ainsi sur la production de pro-forme de l'IL-1 $\beta$  ; l'*Il-6* est également décruée. Cette régulation est probablement causale dans la forte réduction des signes cliniques.



**Figure R4:** L'application topique d'imiquimod 5% décroît fortement la sévérité de l'inflammation aiguë uratique en abaissant l'expression de l'*Il1b* et de l'*Il6*.

**A-D.** Des souris C57BL/6J ont été soumises à une expérience d'inflammation aiguë uratique et immédiatement traitées avec de l'imiquimod topique (IMQ 5%) ou avec une crème contrôle (contenant tous les excipients). Les observations cliniques ont été réalisées sur 24 heures (n = 8 souris par groupe, résultats répliqués dans 4 cohortes de souris indépendantes). **A.** Epaisseur des pattes, **B.** scores cliniques, **C.** température corporelle, **D.** photographies représentatives prises à 16hpi. **E.** Une cohorte de souris a été sacrifiée à 24hpi et les pattes ont été imagées par IRM (T2, élimination des tissus gras) et une représentation volumétrique a été générée à l'aide de 3D viewer. **E.-G., L.** Les pattes de souris traitées comme ci-dessus ont été collectées après sacrifice et des extraits ont été générés et



analysés par ELISA IL-1 $\beta$  (F.), IL-6 (G.), MPO (H.) et TNF $\alpha$  (I.) ou bien soumis à un western blot anti-IL-1 $\beta$  (L.) ; la vinculine est utilisée comme contrôle de charge. **J.-K.** comme en E.-G., des pattes de souris ont été collectées après sacrifice, broyées et les ARNs ont été extraits et des RT-qPCR ont été réalisées pour les gènes *Il1b* et *Il6* (n = 5 à 6). Les valeurs présentées ont été obtenues par la méthode du  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  puis normalisées à un groupe de référence (groupe PBS crème contrôle = 1). Chaque symbole représente une souris (pictogrammes verts pour les souris ayant reçu la crème contrôle et gris pour celles traitées avec l'imiquimod topique), les lignes horizontales et les barres d'erreurs correspondent à la moyenne +/- SEM. Les résultats sont analysés par le test de Mann-Whitney à partir des jeux de données présentés ou bien des AUC (aires sous la courbe pour les figures **A** et **B**), \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001, ns = non significatif.

### E. L'application d'imiquimod topique montre un effet clair à l'IRM

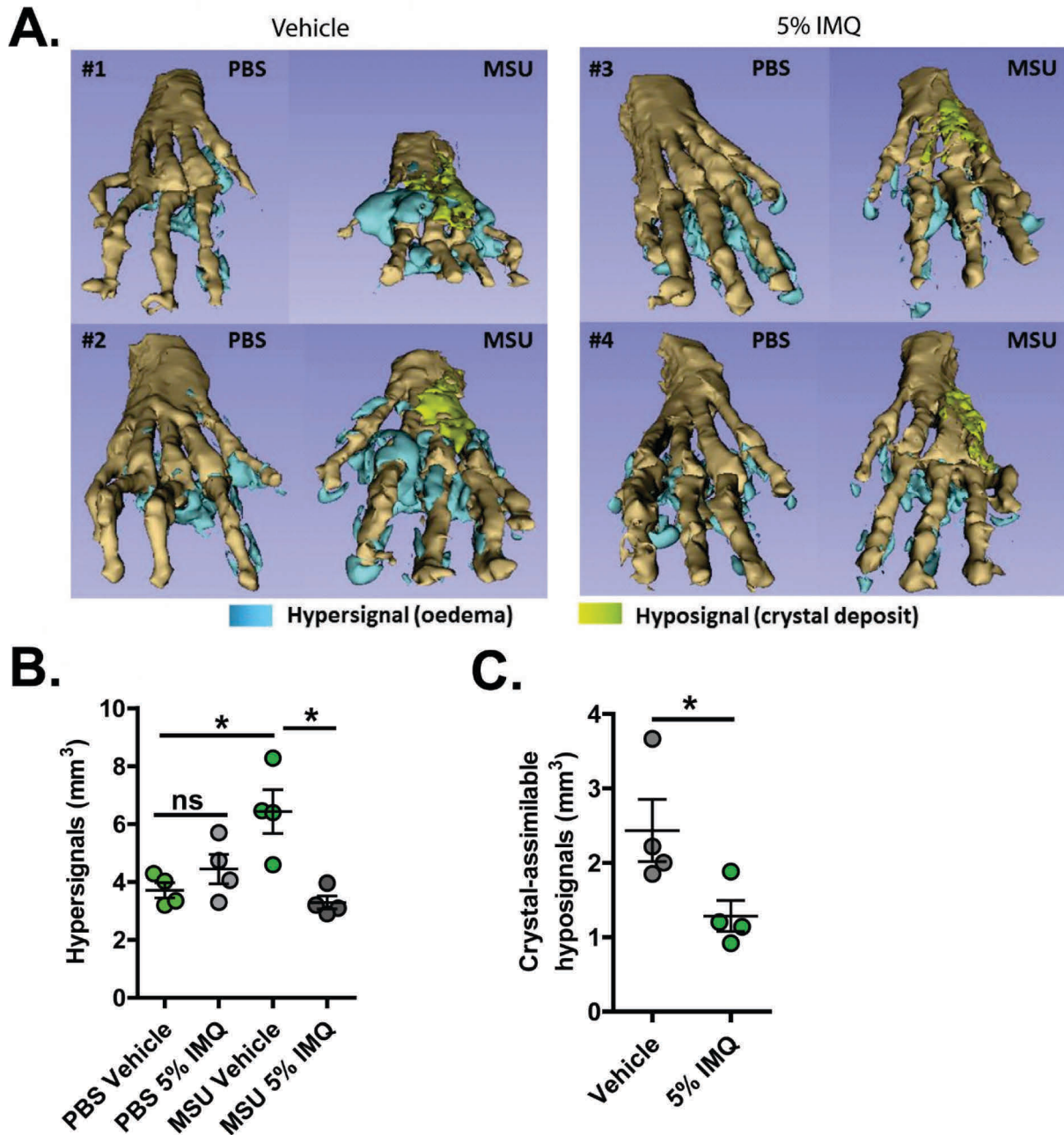
Nous avons précédemment montré que l'Imagerie à résonance magnétique (IRM) donnait des indications tout à fait satisfaisantes quant à l'inflammation en place dans notre modèle par injections sous-cutanées de MSU (**Figure S1**). Afin d'objectiver l'effet de l'imiquimod sur l'inflammation dans ce modèle, nous avons donc eu recours à cette technique.

Une cohorte de souris a été traitée selon les modalités précédentes, les souris ont ensuite été passées à l'IRM en *post-mortem* (immédiatement après le sacrifice). Les images obtenues nous ont ensuite permis de réaliser des mesures précises des volumes d'hyper-sigaux, imputables à la formation d'œdèmes locaux. Des reconstructions en 3 dimensions ont également été faites à l'aide du logiciel *3D slicer* afin de montrer sur les mêmes images les volumes suivants : structures osseuses, volume associé aux cristaux (hypo-sigaux) et œdème (hyper-sigaux). Tout d'abord, une nette différence d'ordre volumétrique est observée sur les reconstructions faites à l'aide de *3D viewer* (**Figure R4E**). En effet, chez les souris dont les pattes ont été traitées avec la crème contrôle, les pattes MSU (à gauche) montrent un volume nettement supérieur à celui des pattes PBS (à droite). En revanche, chez les souris dont les pattes ont reçu l'imiquimod topique, cette différence est pratiquement abrogée, les rendant presque identiques. Les reconstructions 3D étayent ce constat d'une manière très claire (**Figure R5A**) avec une réduction apparente de l'œdème (bleu) dans les pattes MSU – imiquimod topique relativement aux pattes MSU – crème contrôle ; l'imiquimod ne semble pas affecter la constitution d'œdèmes dans les pattes PBS où des hyper-sigaux sont tout de même retrouvés (reliquats). Par la suite, la quantification du volume d'hyper-sigaux montre très clairement une hausse dans la condition MSU crème contrôle relativement aux pattes PBS crème contrôle (p<0,05\*) et PBS imiquimod (toutefois NS) ; l'imiquimod topique est alors capable de réduire ce volume, le ramenant au niveau de celui des pattes PBS (réduction, p<0,05\*) (**Figure R5B**). Si l'on réalise un ratio, pour chaque souris, des pattes MSU/pattes

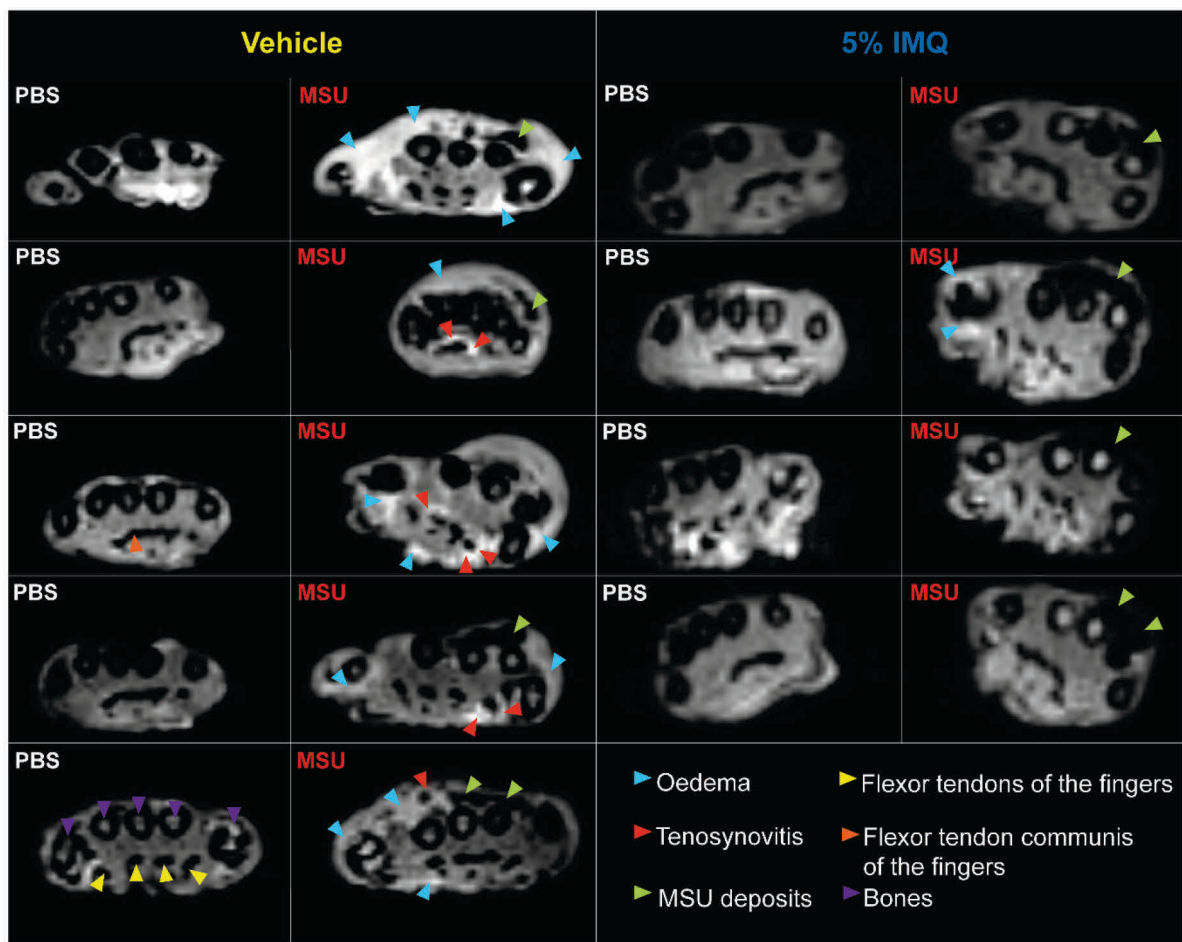
PBS, ce dernier est nettement décru chez les souris traitées avec l'imiquimod topique (1,79 contre 0,78,  $p = 0,057$ , **non montré**). Enfin, le volume associé aux cristaux (hypo-signaux) est décru significativement dans les pattes traitées avec l'imiquimod topique mais il est important de noter que sa quantification n'est pas aussi aisée que celle des hyper-signaux. Néanmoins, ceci pourrait indiquer que la formation d'amas de cristaux (+/- cellules infiltrées) serait également freinée après application topique d'imiquimod (**Figure R5C**).

L'analyse de ces mêmes séquences en détail a ensuite montré que la réduction des hyper-signaux concernait à la fois les zones sous-cutanées où ceux-ci prédominent mais aussi les tendons (téno-synovites). Le réglage manuel des images a été fait de la même manière pour chaque souris (patte PBS – patte MSU) mais n'est toutefois pas absolument constant d'une souris à l'autre, il faut donc toujours considérer la différence entre les pattes MSU et PBS. Ainsi, on peut très clairement voir ici que les pattes MSU – crème contrôle présentent des hyper-signaux de localisation sous cutanée (flèches bleues) mais aussi plus profonde (au niveau des tendons) réalisant ce que l'on peut qualifier de téno-synovites. Les pattes MSU – imiquimod ne présentent pas de telles modifications à l'IRM (**Figure RS8**). Ces résultats ont été analysés et confirmés par un expert en rhumatologie (le Dr. Emmanuel CHATELUS, service de rhumatologie des HUS).

Ces données d'imagerie montrent donc sans équivoque que l'application topique d'imiquimod est capable de décroître l'inflammation dans ce modèle d'inflammation aiguë uratique en bloquant la formation œdémateuse sous-cutanée mais aussi péri-tendineuse.



**Figure R5 :** L'imiquimod topique empêche totalement la formation d'œdèmes. Une cohorte de souris a été soumise à une inflammation aiguë uratique avec traitement à l'imiquimod topique (IMQ 5%) ou contrôle (n = 4 par groupe). Ces dernières ont été sacrifiées à 24hpi et passées en IRM (T2, élimination des tissus gras). **A.** les images obtenues ont été l'objet d'une segmentation suivie d'une reconstruction tridimensionnelle à l'aide du logiciel *3D slicer* et sous les conseils du Dr. Christelle PO (iCube). Les volumes bleus correspondent aux hyper-signaux (œdèmes) tandis que les volumes jaunes correspondent aux hypo-signaux, imputables au volume pris par les cristaux. **B.-C.** Les volumes d'hyper-signaux (**B.**) et d'hypo-signaux (**C.**) sont présentés dans des histogrammes. Chaque symbole représente une souris (pictogrammes verts pour les souris ayant reçu la crème contrôle et gris pour celles traitées avec l'imiquimod topique), les lignes horizontales et les barres d'erreurs correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM. Les résultats sont analysés par le test de Mann-Whitney, \* =  $p < 0,05$ , ns = non significatif.



**Figure RS8 : L'imiquimod topique résout les œdèmes sous-cutanés mais aussi les ténosynovites.**

Les images présentées ici sont issues de la même cohorte que celle de la figure 5 ; les 8 souris employées figurent dans ce panel. Des sections représentatives ont été sélectionnées. Le contraste a été réglé manuellement pour chaque paire de pattes PBS – MSU (chaque souris), il faut donc toujours interpréter chaque patte MSU en regard de la patte PBS correspondante. Les pictogrammes triangulaires indiquent des éléments anatomiques ou anatomopathologiques (voir légende en bas à droite). Les deux colonnes de gauche correspondent aux souris traitées avec la crème contrôle (5 images représentatives de 4 souris, les deux images supérieures qualifient le même animal, présentant simultanément des œdèmes sous cutanés massifs et une ténosynovite du flechisseur commun des doigts) ; les deux colonnes de droite correspondent aux souris traitées avec l'imiquimod topique (1 image représentative par souris).

## F. L'imiquimod pourrait réduire l'expression de la pro-IL-1 $\beta$ via la synthèse d'IFN $\beta$

Appliquée de manière préventive (juste après l'injection des cristaux de MSU), l'imiquimod topique est capable de décroître l'inflammation locale très probablement à travers une baisse d'ordre transcriptionnelle de l'*Il1b*, engendrant une carence en pro-IL-1 $\beta$  nécessaire à la synthèse d'IL-1 $\beta$  mature. Afin de comprendre comment l'imiquimod topique pouvait engendrer cela, nous avons effectué une série d'expériences *in vitro* et *in vivo*.

Nous avons initialement tenté de modéliser cet effet *in vitro*. L'interface cutanée trouve toute sa place dans l'action de l'imiquimod puisque celui-ci est administré de manière topique. Ainsi, nous avons mis en place un système incorporant des fibroblastes (mimant des cellules du derme) et des macrophages qui sont à l'origine d'une forte production d'IL-1 $\beta$  *in vitro* en réponse aux cristaux de MSU.

Dans ce système, l'Imiquimod (IMQ) a été d'abord mis au contact des fibroblastes (MEF, *mouse embryonic fibroblasts*) pendant 6h puis le surnageant a été transféré sur des macrophages péritonéaux pendant 12h. De manière concomitante, le LPS a été employé à 0,1 $\mu$ g/mL pour d'induire la synthèse de la pro-IL-1 $\beta$ , la sécrétion de la forme mature a ensuite été induite par les cristaux de MSU ou l'ATP (**Figure R6A**). Dans ce contexte, la production d'IL-1 $\beta$  est induite avec succès chez les macrophages ayant reçu le surnageant transféré de MEF non-stimulés (MEF-(none) Sn) en réponse au MSU comme à l'ATP. Cependant, elle est atténuée chez les macrophages ayant reçu le surnageant de MEF stimulés à l'IMQ (MEF-(IMQ) Sn). Lorsque l'analyse a été conduite en calculant des pourcentages d'inhibition, cette baisse était significative ( $p < 0,05^*$ , **Figure R6B**). Par ailleurs, l'IL-6 n'est pas affectée (**Figure R6C**) et cette différence n'est pas non plus retrouvée lorsque l'IMQ est appliqué directement sur les macrophages (**non montré**).

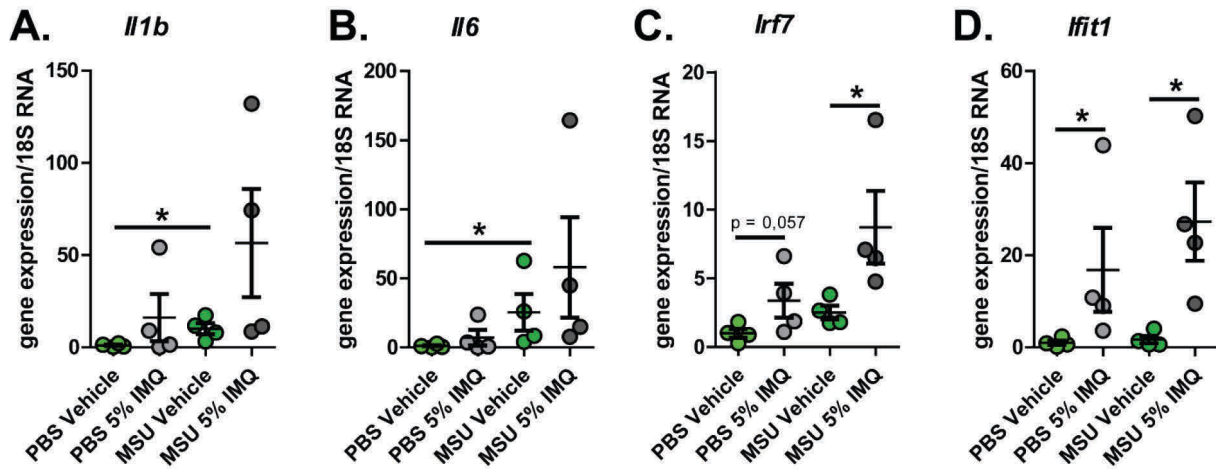
De manière intéressante, plusieurs résultats obtenus par **Nehmar, R. et al. (2017)** avaient montré que l'imiquimod topique exerçait ses effets *in vivo* via les récepteurs TLR7 et IFNAR1, impliqués respectivement dans la liaison de l'imiquimod et des interférons (IFN) de type I. Dans notre contexte, la réalisation de RT-qPCR sur des pattes broyées à 8hpi (temps antérieur à la réduction des signes cliniques) avait montré une nette hausse de l'expression des gènes de la signature interféron *Irf7* et *Ifit1* ( $p < 0,05^*$ ) dans les pattes ayant reçu l'imiquimod topique relativement à celles ayant reçu la crème contrôle (**Figure RS9C et D**) alors que l'expression des gènes *Il1b* et *Il6* n'était pas encore affectée à ce stade (non significatif, **Figures RS9A et B**). La réponse interféron semble donc se mettre en place dès 8hpi et ainsi précéder la baisse importante de l'*Il1b* consécutive à l'emploi de l'imiquimod topique, faisant

d'elle un élément de poids. Conjointement à ces données, il a été montré que l'IL-10, produite en réponse aux interférons de type I recombinants (IFN $\beta$  par exemple), pouvait décroître la production de pro-IL-1 $\beta$  chez des macrophages *in vitro* et qu'un tel effet pouvait se traduire *in vivo* (réduction de la sévérité de péritonites à l'alum suite à l'induction des IFN-I via l'agoniste de TLR3 poly-I:C) (Guarda, G. *et al.* 2011). La piste des IFN-I nous est alors apparue plausible. Nous avons alors entrepris de doser l'IFN $\beta$  dans les surnageants des macrophages stimulés après transfert (expérience de la **Figure R6**). Curieusement, l'IFN $\beta$  n'est pas produit par l'adjonction d'IMQ sur les MEF (pratiquement pas d'IFN $\beta$  dans la condition MEF-(IMQ) sur macrophages non stimulés) ; toutefois, les surnageants MEF-(IMQ) sont capables d'enclencher une forte production d'IFN $\beta$  par les macrophages receveurs stimulés au LPS (100-150 pg/mL). La production d'IFN $\beta$  est significativement plus faible lors que des surnageants MEF-(none) sont transférés sur des macrophages ayant été traités au LPS (**Figure R6D**). Cela montre donc que les conditions de culture associées à une baisse de la production d'IL-1 $\beta$  sont aussi celles où l'IFN $\beta$  est produit en plus forte quantité.

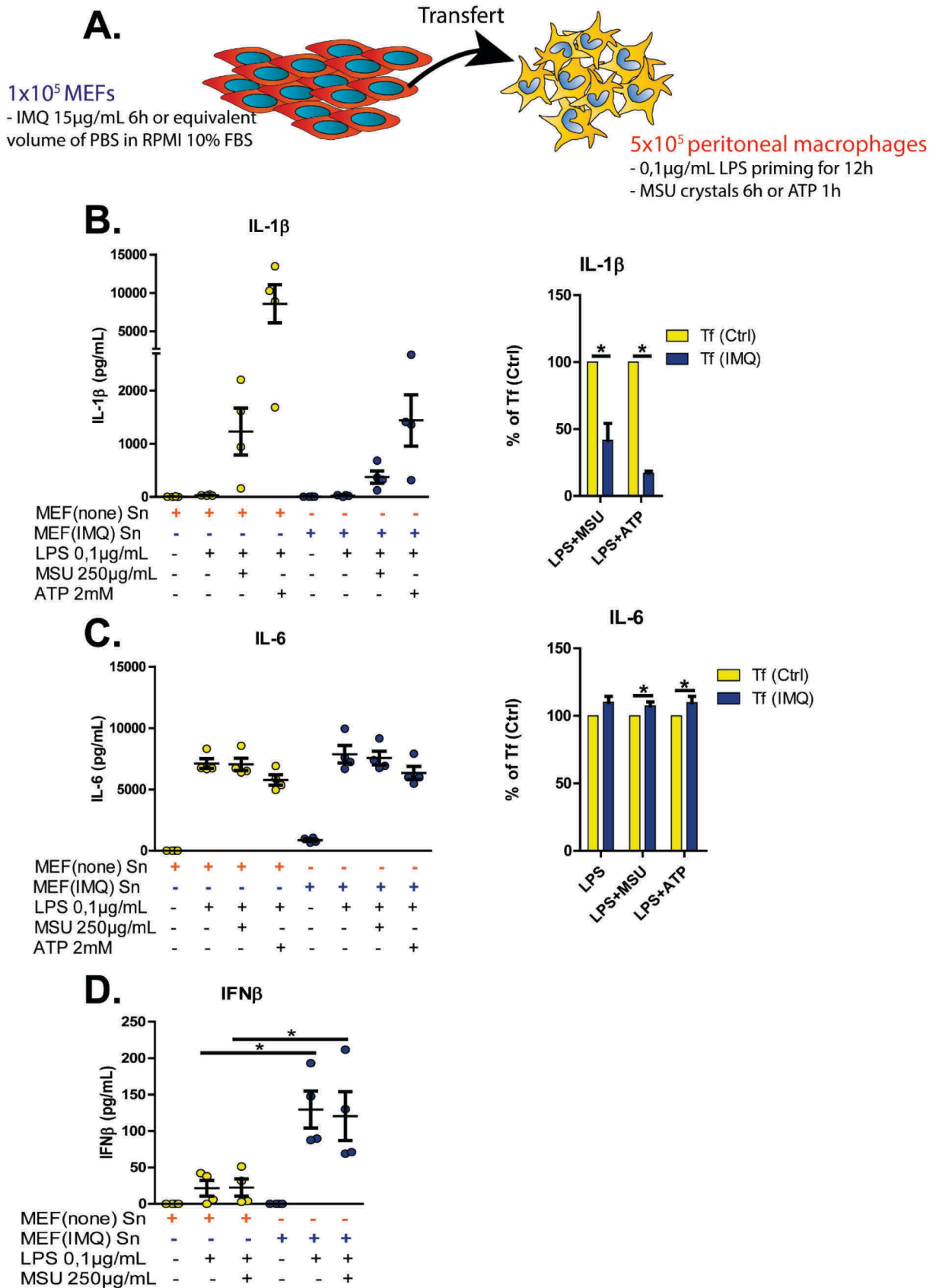
Si l'IFN $\beta$ , ou d'autres IFN de type I, est véritablement responsable de cet effet, l'ablation du récepteur IFNAR1 devrait abroger ce dernier. Nous avons alors reproduit l'expérience de transfert avec des macrophages péritonéaux receveurs *Ifnar1*<sup>+/+</sup> ou *Ifnar1*<sup>-/-</sup> où le récepteur aux IFN-I (IFNAR1) est soit intact soit absent. Les observations précédentes ont été reproduites dans le contexte *Ifnar1*<sup>+/+</sup>, en revanche, cette baisse est totalement abolie chez les macrophages *Ifnar1*<sup>-/-</sup> (**Figure R7A**) confirmant ainsi un rôle des IFN-I dans ce mécanisme. Ces données semblent donc impliquer les IFN-I (potentiellement l'IFN $\beta$ ) dans ce mécanisme. En vue de compléter cette démonstration, nous avons entrepris d'utiliser de l'IFN $\beta$  recombinant directement sur les macrophages péritonéaux ou des monocytes humains THP1 au cours du *priming* au LPS. L'IFN $\beta$  recombinant humain comme murin a été employé sous la forme d'une gamme allant de doses élevées (100 ng/mL) à des doses plus faibles (10 et 100 pg/mL), similaires à celles mesurées précédemment. La production d'IL-1 $\beta$  est totalement effondrée par l'emploi de l'IFN $\beta$  chez les macrophages péritonéaux avec des doses aussi basses que 100 pg/mL et affectée avec 10 pg/mL (**Figure R7B**). En parallèle, la lyse des cellules et la réalisation d'un western blot anti-IL-1 $\beta$  a permis de visualiser une très nette baisse de la pro-IL-1 $\beta$ , totale avec de fortes doses, amorcée avec 10 pg/mL (**Figure R7C**). Des observations très similaires ont été faites sur les monocytes THP1 (**Figure R6D et E**).

Au final, mes données semblent indiquer que les IFN-I pourraient jouer un rôle dans la réponse *in vitro* induite par l'IMQ. Cet effet, passerait par la synthèse précoce d'IFN $\beta$ ,

activant alors le récepteur IFNAR1 et engendrant une baisse de la production de la pro-forme de l'IL-1 $\beta$  ; cela culminerait en une baisse massive de la production d'IL-1 $\beta$  mature par manque de pro-forme, de manière concordante avec ce qui fut observé *in vivo*.



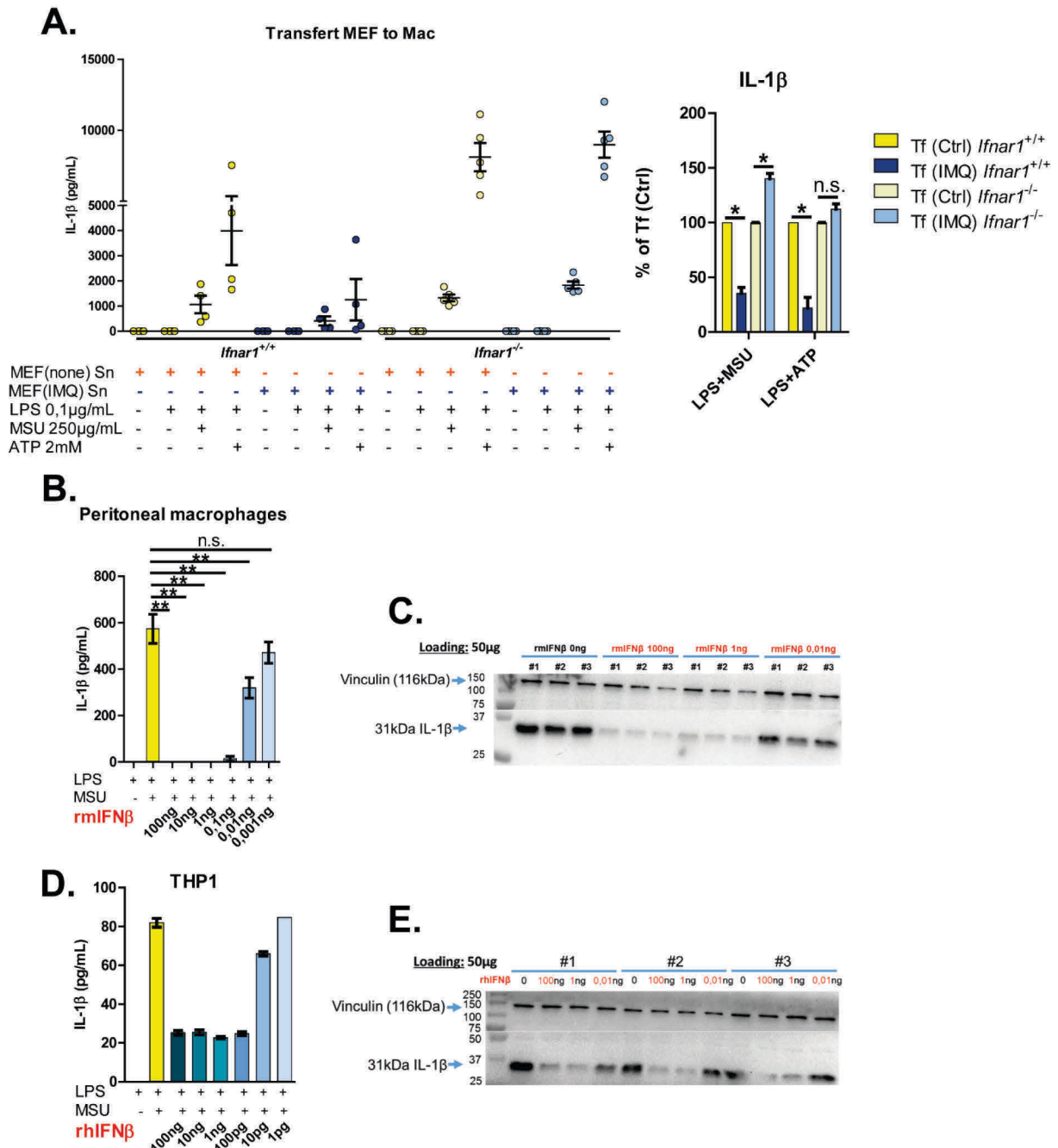
**Figure RS9:** L'imiquimod topique induit l'expression de gènes de la réponse interféron à 8hpi. Une inflammation aiguë uratique avec traitement à l'imiquimod topique (IMQ 5%)/crème contrôle a été réalisée chez des souris C57BL/6J (n = 4 par groupe) et les pattes ont été collectées après le sacrifice à 8hpi, broyées puis l'expression de plusieurs gènes a été analysée par RT-qPCR. **A.** *Il1b*, **B.** *Il6*, **C.** *Irf7* et **D.** *Ifit1*. Les valeurs présentées ont été obtenues par la méthode du  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  puis normalisées à un groupe de référence (groupe PBS crème contrôle = 1). Chaque symbole représente une souris (pictogrammes verts pour les souris ayant reçu la crème contrôle et gris pour celles traitées avec l'imiquimod topique, couleurs claires pour les pattes PBS et foncées pour les pattes MSU), les lignes horizontales et les barres d'erreurs correspondent à la moyenne +/- SEM. Les résultats sont analysés par le test de Mann-Whitney, \* = p < 0,05, ns = non significatif.



**Figure R6 :** L'imiquimod, peut décroître indirectement la sécrétion d'IL-1β dans un système *in vitro*.



Une expérience de transfert de surnageants a été réalisée.  $1 \times 10^5$  MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) ont été mis en culture et stimulés à l'aide de RPMI 10% SVF contenant  $15 \mu\text{g/mL}$  d'imiquimod (IMQ) ou avec du RPMI 10% SVF sans IMQ pendant 6h. Le surnageant a ensuite été centrifugé puis transféré sur  $5 \times 10^5$  macrophages péritonéaux murins et co-incubé 12h avec  $0,1 \mu\text{g/mL}$  de LPS ou non. Les macrophages ont ensuite été stimulés avec des cristaux de MSU ( $250 \mu\text{g/mL}$  6h) ou de l'ATP (2 mM 1h) afin d'enclencher la sécrétion d'IL-1 $\beta$ . A-C. l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IFN $\beta$  ont été dosés par ELISA. En A. et B. les résultats ont également été analysés en pourcentage de réduction (graphique à droite). Chaque symbole représente les cellules issues d'une souris (pictogrammes jaunes pour les conditions concernées par le transfert de surnageants issus de MEFs non traités et bleu pour les conditions concernées par le transfert de surnageants issus de MEFs traités à l'IMQ). Les lignes horizontales et les barres d'erreurs correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM. Les résultats sont analysés par le test de Mann-Whitney, \* =  $p < 0,05$ , ns = non significatif.



**Figure R7: l'effet de l'IMQ est dépendant du récepteur IFNAR1 et peut être reproduit par l'emploi d'IFN $\beta$  recombinant.**

**A.** La même expérience qu'à la Figure 6A a été reproduite avec des macrophages *Ifnar1*<sup>+/+</sup> (couleurs vives) ou *Ifnar1*<sup>-/-</sup> (couleurs claires). Les données sont présentées en valeurs brutes issues du dosage ELISA IL-1 $\beta$  (à gauche) ou sous forme de pourcentages d'inhibition (à droite). n = 4 à 5.

**B.** Des macrophages péritonéaux isolés de souris (n = 6) ont été stimulés soit 1) à l'aide de LPS 0,1  $\mu$ g/mL pendant 12h, 2) LPS puis MSU 250  $\mu$ g/mL pendant 6h ou 3) LPS conjointement à différentes doses d'IFN $\beta$  recombinant murin (de gauche à droite : 100 ng/mL, 10 ng/mL, 1 ng/mL, 100 pg/mL, 10 pg/mL et 1 pg/mL) pendant 12h puis au MSU pendant 6h. La sécrétion d'IL-1 $\beta$  a été mesurée par ELISA. **C.** Les cellules ont été lysées et 50 $\mu$ g de protéines ont été analysées par un western blot anti-IL-1 $\beta$ , la vinculine est employée comme contrôle de charge. De gauche à droite : LPS+MSU, LPS/IFN $\beta$  100 ng/mL + MSU, LPS/IFN $\beta$  1 ng/mL + MSU, LPS/IFN $\beta$  10 pg/mL + MSU ; #1-#3 indiquent les extraits réalisés à l'aide des cellules issues de trois souris (1, 2 et 3).

**D.** Même expérience qu'en B. mais avec des monocytes THP1 et de l'IFN $\beta$  recombinant humain. L'expérience présentée montre 6 répliquas techniques (6 puits de culture cellulaires, n = 1). Le western blot correspondant est présenté à la figure E., #1-#3 correspondent à des numéros de répliquas. Chaque symbole représente les cellules issues d'une souris (**A.**) (pictogrammes jaunes pour les conditions concernées par le transfert de surnageants issus de MEFs non traités et bleu pour les conditions concernées par le transfert de surnageants issus de MEFs traités à l'IMQ). Les lignes horizontales et les barres d'erreurs correspondent à la moyenne +/- SEM. Les résultats sont analysés par le test de Mann-Whitney, \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, ns = non significatif.

**G. Analyse transcriptomique des effets induits par l'imiquimod topique**

L'effet de l'imiquimod topique fait visiblement intervenir les IFN-I et l'engagement du récepteur IFNAR1, connu pour engager en aval la voie STAT1 et l'activation d'une myriade de gènes cibles. Néanmoins, la connexion entre cette voie et la baisse de l'*Il1b* mérite de plus amples investigations. L'emploi d'analyses transcriptomiques par séquençage d'ARN (RNAseq) a alors fait suite. Nous nous sommes placés à 24hpi où la différence clinique est nettement présente et effectué deux types de comparaisons : 1) MSU-crème contrôle contre PBS-crème contrôle, nous permettant de décrire le transcriptome activé par les cristaux de MSU et 2) MSU-crème contrôle contre MSU-imiquimod, afin de qualifier les effets de l'imiquimod topique sur l'expression des gènes.

L'analyse a été conduite par l'emploi du logiciel en ligne REACTOME (<https://reactome.org/>) mais aussi d'IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*, Qiagen).

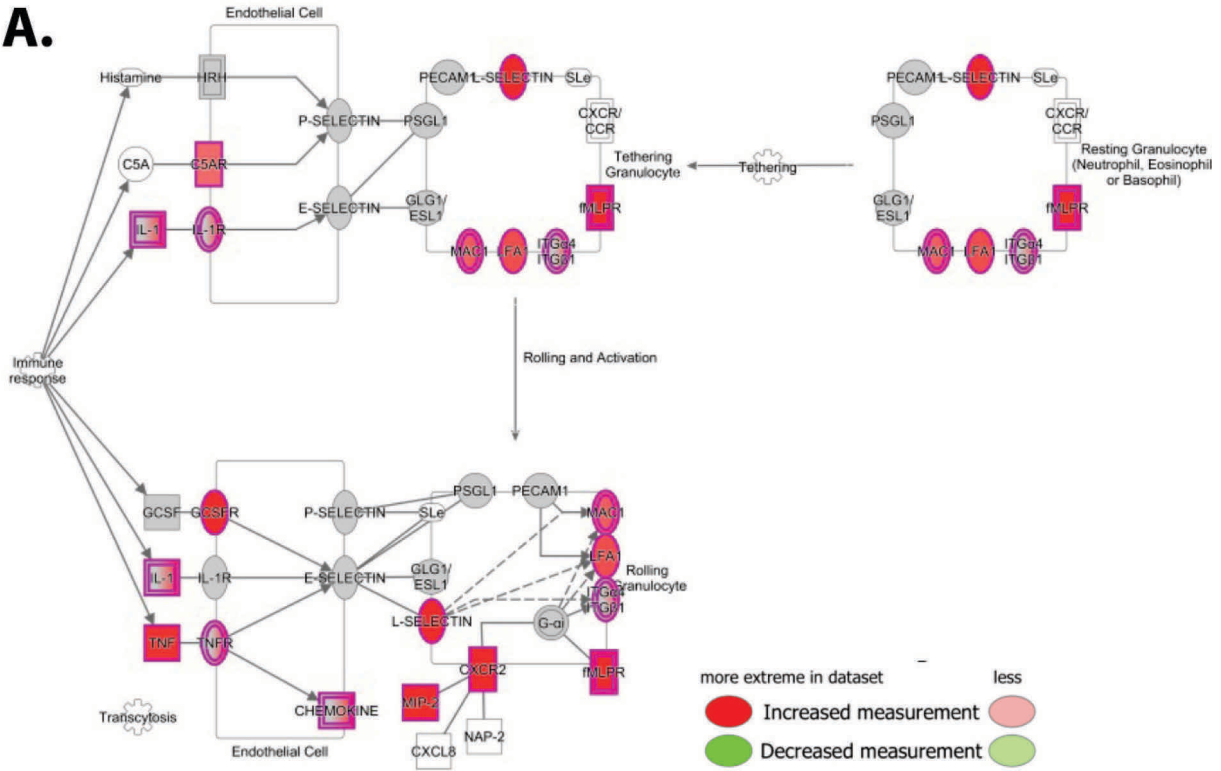
La première comparaison nous a d'abord permis d'observer un enrichissement très net des gènes associés aux fonctions des neutrophiles (adhésion, diapédèse et dégranulation) et ce d'une manière très significative (p = 2,53x10<sup>-24</sup>) (**Figure RS10A et C.**). Conjointement à ceci, les gènes codant les TLR1, 2 et 6 s'en sont également retrouvés très fortement enrichis (*Tlr6*, p = 7,67x10<sup>-10</sup>; *Tlr1*, p = 5,77x10<sup>-9</sup>; *Tlr2*, p = 4,81x10<sup>-6</sup>) là où *Tlr3*, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13

étaient inchangés et *Tlr9* était accru mais bien plus modestement. Les gènes *Il1b* mais aussi *Nlrp3* se sont également montrés accrus dans ces conditions ( $7,38 \times 10^{-15}$  et  $5,59 \times 10^{-11}$  respectivement).

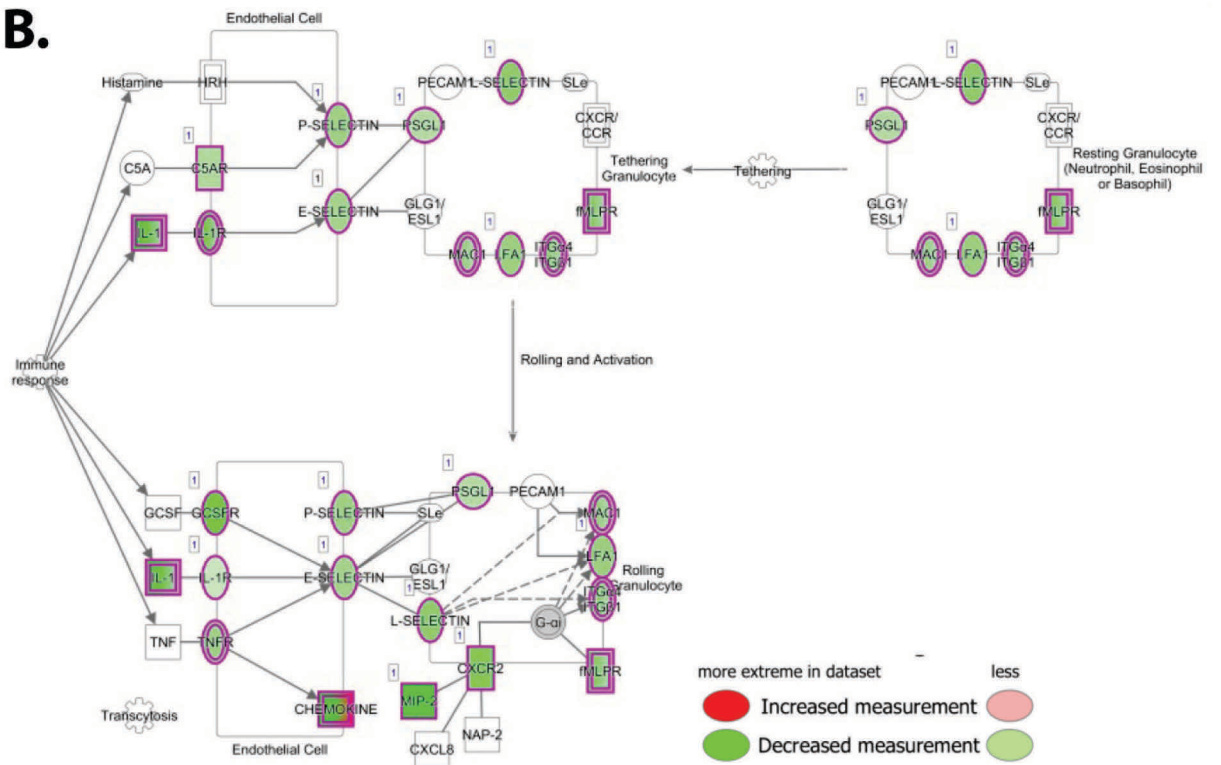
De manière intéressante, la seconde comparaison – imiquimod topique contre crème contrôle – nous a clairement permis de montrer une réversion totale des effets transcriptomiques décrits ci-dessus de manière conjointe à une signature IFN. Une baisse conséquente de la voie associée aux fonctions de dégranulation, adhésion et diapédèse des neutrophiles (**Figure RS10B. et D.**), majeure de l'*Il1b* ( $p = 4,31 \times 10^{-19}$ ) et de *Nlrp3* ( $p = 2,12 \times 10^{-28}$ ), des *Tlr1*, 2 et 6 ( $3,5 \times 10^{-11}$  pour *Tlr6*, significative pour *Tlr1* et 2) fut ainsi observée. Le modèle proposé par IPA (condition MSU contre PBS) présentait des connexions étroites entre les gènes associés aux fonctions des neutrophiles et la voie Syk-PI3K, la majorité des acteurs y figurant étaient alors franchement décrus dans la condition comparant l'application topique d'imiquimod (MSU) à celle de la crème contrôle (MSU) (**Figure RS11**). Par ailleurs, plusieurs voies furent négativement affectées lors de l'emploi de l'imiquimod topique comme la voie RUNX3 mais aussi la voie IL-10-STAT3 ; *Runx3* lui-même fut abaissé d'une manière très significative ( $2,92 \times 10^{-9}$ ) en faisant un candidat d'intérêt, d'autant plus qu'il a été connecté à la régulation transcriptionnelle de l'*Il1b* directement. Outre ces gènes, de nombreux autres furent diminués parmi lesquels *Cd14*,  $p = 5,79 \times 10^{-28}$  ; *Cxcr2*,  $p = 2,63 \times 10^{-20}$  ; *Cxcl2*,  $p = 1,15 \times 10^{-51}$  ; *S100a8*,  $p = 3,87 \times 10^{-18}$  ; *S100a9*,  $p = 8,14 \times 10^{-25}$ , tous reliés au recrutement des neutrophiles ou à l'inflammation lors de précédentes études des mécanismes impliqués dans la crise de goutte.

Au final, l'application topique d'imiquimod semble totalement réverser le transcriptome induit par les cristaux de MSU au moment où l'atténuation clinique de l'inflammation aiguë uratique est la plus marquée. La baisse de l'*Il1b* est confirmée et s'associe à une nette réduction des voies RUNX3 et IL-10-STAT3, de la voie Syk-PI3K et des gènes reliés à la dégranulation des neutrophiles. De manière surprenante, la forte hausse d'expression des gènes *Tlr1*, 2 et 6 par les cristaux – abolie par l'imiquimod topique – semble indiquer un rôle important ceux-ci, possiblement en amont de la production d'IL-1 $\beta$ .

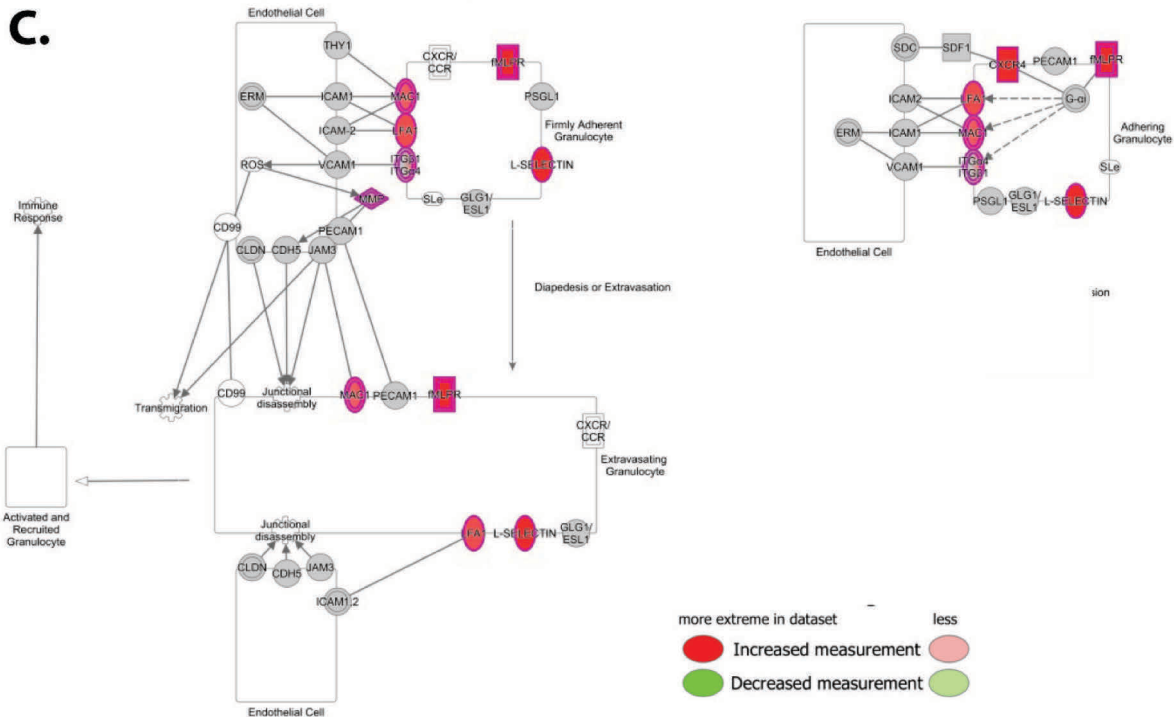
**A.**



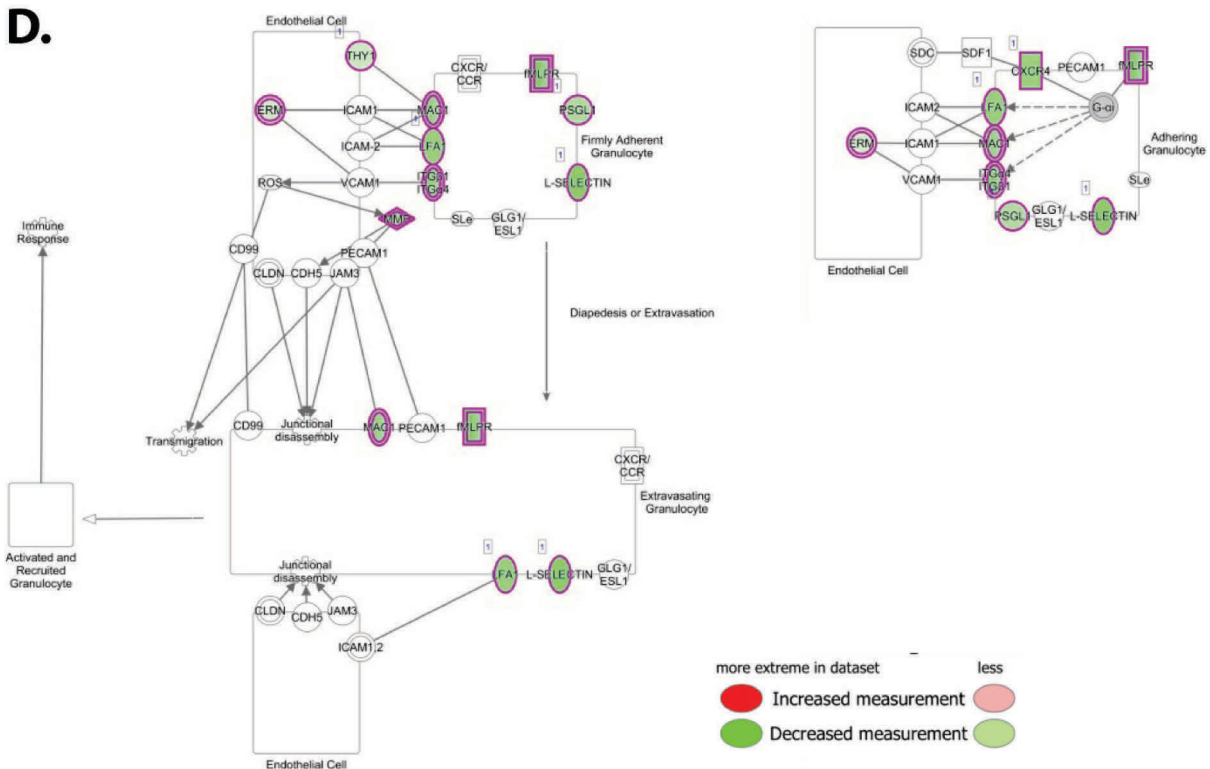
**B.**



C.



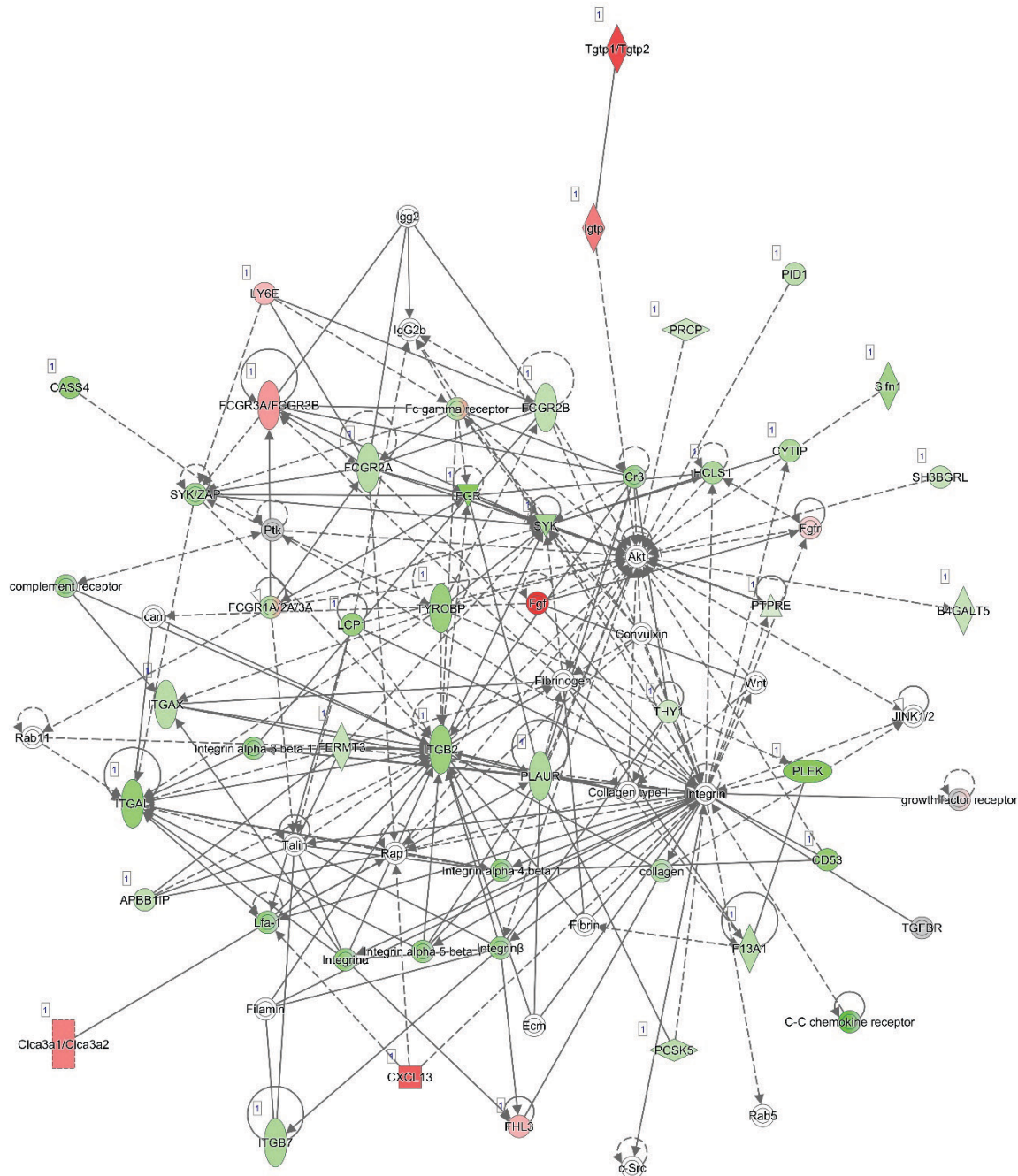
D.



**Figure RS10 :** Les voies d'adhésion et de diapédèse des neutrophiles sont activées par les cristaux de MSU, décruées par l'imiquimod topique.

Les images présentées ont été obtenues à l'aide du logiciel IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*) sur la base des gènes les plus fortement régulés ( $p < 0,0001$ ). Les panels A. et B. montrent les voies d'adhésion des neutrophiles tandis que les panels C. et D. montrent les voies impliquées dans

l'adhésion ferme et la diapédèse des neutrophiles. **A.** et **C.** montrent les gènes différentiellement exprimés dans la condition MSU-crème contrôle contre PBS-crème contrôle, **B.** et **D.** dans la condition MSU-imiquimod topique contre MSU-crème contrôle. Les pictogrammes verts montrent les gènes sous-exprimés, les pictogrammes rouges ceux qui sont surexprimés. Les flèches et traits pleins indiquent les interactions directes entre les acteurs qui sont reliés par ces derniers et les flèches et traits pointillés représentent les interactions indirectes.



© 2000-2019 QIAGEN. All rights reserved.

**Figure RS11:** L'imiquimod topique module une constellation de gènes intervenant dans l'adhésion des neutrophiles et la voie Syk-PI3K.

Les 666 gènes les plus différentiellement exprimés ( $p < 0,0001$ ), lors des expériences de RNAseq, entre les conditions MSU-crème contrôle et MSU-imiquimod topique ont été analysés avec IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*, Qiagen) ; la figure présentée montre un réseau de gènes interconnectés,

proposé par IPA. Les flèches et traits pleins indiquent les interactions directes entre les acteurs qui sont reliés par ces derniers et les flèches et traits pointillés représentent les interactions indirectes. Les pictogrammes verts qualifient des gènes sous-exprimés et les rouges, des gènes sur-exprimés dans les pattes traitées avec l'imiquimod topique relivement à celles traitées avec la crème contrôle.

Pour plus d'informations, voici le lien suivant :  
[http://qiagen.force.com/KnowledgeBase/articles/Basic\\_Technical\\_Q\\_A/Legend](http://qiagen.force.com/KnowledgeBase/articles/Basic_Technical_Q_A/Legend).

## DISCUSSION

Si la responsabilité des cristaux de MSU est désormais indéniable dans le déclenchement des crises de goutte, ainsi démontré depuis très longtemps (**McCarthy, D.J. and Hollander, J.L. 1961 ; Faires, J. and McCarthy, D. 1962 ; McCarthy, D.J. 1962**), les mécanismes physiopathologiques ne sont compris que depuis quelques décennies. Des preuves accumulées jusqu'alors montrent sans équivoque que l'IL-1 est une cytokine majeure dans cette pathologie inflammatoire et la preuve de concept la plus probante reste l'efficacité de l'Anakinra chez l'Homme (**So, A. et al. 2007 ; Loustau, C. et al. 2018**). Bien que l'IL-1 $\alpha$  ait également été incriminée, l'IL-1 $\beta$  semble davantage impliquée dans cette maladie et la réponse clinique au Canakinumab – la ciblant spécifiquement – chez l'Homme est ainsi venue étayer ce postulat (**So, A. et al. 2010 ; Schlesinger, N. et al. 2011**).

Si l'IL-1 $\beta$  est bien la cytokine phare de la phase inflammatoire goutteuse, la question de sa source est néanmoins bien moins renseignée. Ainsi, un mécanisme a principalement été avancé à la suite d'une large série d'articles rendant compte de la formation de structures moléculaires dénommées « inflammasomes » dans diverses conditions dont l'exposition *in vitro* aux cristaux de MSU. L'étude de **Martinon, F. et al.**, publiée en 2006, montra alors que chaque composant de l'inflammasome NLRP3 était strictement requis pour la production d'IL-1 $\beta$  en réponse au MSU par les macrophages *in vitro*. Ces résultats ont été répliqués et sont désormais bien admis dans la littérature mais ne reposent toutefois que sur l'analyse de cellules isolées, parties-intégrantes de systèmes beaucoup plus complexes. Ces résultats ont d'ailleurs été vivement contestés par plusieurs études ne retrouvant pas cette dépendance chez l'animal (**Joosten, L.A.B. et al. 2011**) (voir tableau à la **Figure 20**, page 105). Toutefois, la participation de NLRP3 est encore mise au premier plan dans de nombreux articles traitant de la goutte et cela se traduit actuellement pour le fort engouement de nombreuses équipes pour développer des inhibiteurs spécifiques de NLRP3 dans cette pathologie.

Dans le présent travail, nous proposons ainsi une analyse visant à rendre compte de la nécessité de NLRP3 et plus largement des inflammasomes dans un modèle murin d'inflammation aiguë uratique.

### *Un modèle reproduisant certaines caractéristiques de l'accès goutteux*

Nous avons opté pour un modèle publié dans la littérature (**Schauer, C. et al. 2014**) mais toutefois peu documenté, dans lequel 3mg de cristaux de MSU sont injectés par voie sous-cutanée sur la face supérieure des pattes-arrières. Ce modèle présente de nombreux avantages



comme la facilité d'administration (et la reproductibilité), l'atteinte des tissus mous (aussi retrouvée chez l'Homme) et le développement de crises à la cinétique comparable à celle de l'Homme. En effet, de nombreux autres modèles présentent des cinétiques courtes (quelques heures à quelques jours), peu compatibles avec la goutte humaine. Je me suis d'abord attelé à définir ce modèle en montrant successivement qu'il s'agissait d'une inflammation impliquant la production d'IL-1 $\beta$ , d'abord au niveau transcriptionnel (8hpi) puis sous forme de pro-IL-1 $\beta$  et son produit de clivage (IL-1 $\beta$  mature, 17kDa) vers 24hpi. Cette inflammation est marquée par la production de *Cxcl1* (chimiokine attirant les neutrophiles) à 8hpi et finalement par le recrutement des neutrophiles, corroborant ainsi les observations faites dans de nombreux modèles. Cliniquement parlant, outre la cinétique, ce modèle reproduit avec succès les symptômes d'une crise de goutte (rougeur, gonflement, élévation de la température corporelle) mais aussi les caractéristiques visibles à l'imagerie (œdème des tissus mous et ténosynovites à l'IRM). A notre connaissance, nous sommes jusqu'alors les seuls à avoir employé l'IRM pour de telles investigations. Enfin, sa caractérisation pharmacologique m'a permis de décrire ce modèle comme sensible à la colchicine, tout comme la goutte humaine. La colchicine est en effet le traitement le plus employé pour traiter les crises de goutte et il est particulièrement efficace en bloquant la migration des neutrophiles vers le foyer inflammatoire. Le caractère IL-1-dépendant semble être également effectif ici puisque l'Anakinra – une version recombinante de l'IL-1Ra – a donné lieu à une réduction précoce des signes cliniques chez nos souris. Toutefois, cet effet est de courte durée, et plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour l'expliquer. Dans un premier temps, l'Anakinra est connu comme ayant une élimination rénale particulièrement rapide, diminuant sa biodisponibilité (demi-vie courte) (**Liebner, R. et al. 2014**) ; de plus, des doses nettement plus fortes que les nôtres ont parfois été employées dans la littérature afin d'obtenir un effet probant (**Joosten, L.A.B. et al. 2016**, 400mg/kg), la « barrière de l'espèce » est également à prendre en compte (Anakinra est en effet de l'IL-1Ra recombinant humain). L'emploi de souris déficientes pour l'IL-1 $\beta$  ou l'IL-1R1 aurait pu donner de meilleurs résultats comme dans la publication de **Reber, L. et al. 2014**. De manière intéressante, notre modèle ne répond absolument pas à l'administration d'étaNERCEPT, un récepteur soluble séquestrant le TNF $\alpha$ , et d'ordinaire employé dans la polyarthrite rhumatoïde, une pathologie bien plus TNF-dépendante que la goutte. Ce fait est intéressant dans la mesure où une publication a montré que l'injection de cristaux de MSU par voie intra-articulaire donnait lieu à une inflammation qui pouvait être abrogée par l'étaNERCEPT (**Amaral, F. et al. 2015**), rendant ce dernier discordant par rapport à la maladie humaine. Le modèle que j'ai mis en œuvre dans mon

travail de thèse semble donc remplir l'ensemble des caractéristiques de la goutte humaine. Il s'agit ici aussi d'une inflammation des tissus mous périarticulaires accompagnée d'un recrutement de neutrophiles, IL-1-dépendante, à son acmé sous 24h et répondant fortement à la colchicine.

### *Une physiopathologie indépendante des inflammasomes*

Ce modèle étant compatible avec l'accès goutteux humain, j'ai alors utilisé des souris *Nlrp3*<sup>-/-</sup> afin d'adresser la question de la dépendance de NLRP3. De manière surprenante, NLRP3 n'a aucun effet clinique au cours des différentes expériences menées bien que nous confirmions sa nécessité absolue *in vitro*. Ni le recrutement des neutrophiles, ni l'expression d'un panel de gènes inflammatoires ni la production d'IL-1 $\beta$  ni même son clivage n'ont été affectés laissant alors supposer que la maturation de l'IL-1 $\beta$  pourrait se faire de manière indépendante de NLRP3. Ces résultats sont également étayés par l'emploi d'un inhibiteur des protéines kinases D (PKD) – abrogeant totalement la production d'IL-1 $\beta$  *in vitro* en réponse au MSU – qui n'a aucun effet sur le développement de l'inflammation aiguë uratique. Dans un autre modèle fréquemment décrit dans la littérature et que j'ai également utilisé, les péritonites au MSU, la production de plusieurs cytokines dont l'IL-1 $\beta$  et le recrutement des neutrophiles et des monocytes ne sont pas non plus affectés par la perte de NLRP3. Tout ceci semble donc montrer que l'inflammation induite par les cristaux de MSU serait indépendante de NLRP3. J'ai répliqué ces observations sur plusieurs cohortes de souris. Par ailleurs, plusieurs articles publiés avaient d'ores et déjà suggéré que NLRP3 n'était pas réellement nécessaire *in vivo* dans plusieurs modèles d'arthrite induite par les cristaux de MSU : injections intra-articulaires de MSU et d'acides gras C18 (Joosten, L.A.B. *et al.* 2010) et injections intra-articulaires de MSU dans la cheville (Reber, L.L. *et al.* 2014) mais aussi dans le modèle de péritonite au MSU (Joosten, L.A.B. *et al.* 2011). Nos données confortent donc très largement ces dernières études.

NLRP3 est certes connu pour enclencher la production d'IL-1 $\beta$  en réponse à de nombreux types de particules (nanoparticules, cristaux divers) mais il n'est toutefois pas exclu qu'un autre inflammasome puisse être activé en réponse aux dommages induits par le MSU.

En 2009, l'inflammasome AIM2 a été découvert et caractérisé comme coordonnant la production d'IL-1 $\beta$  à la détection de l'ADN cytosolique (Hornung, V. *et al.* 2009 ; Fernandes-Alnemri, T. *et al.* 2009 ; Roberts, T.L. *et al.* 2009 ; Burckstummer, T. *et al.* 2009). AIM2 est en effet pourvu d'un domaine HIN liant directement l'ADN double-brin et d'un domaine pyrine établissant un contact avec ASC et indirectement avec la caspase 1.

Récemment, un article a montré que les cristaux d'Hémozoïne (Hz) – un dérivé d'hémoglobine produit par *Plasmodium* – pouvaient se retrouver fixés à l'ADN génomique et activer conjointement les deux inflammasomes NLRP3 et AIM2 (Kalantari, P. *et al.* 2014) ; ces deux inflammasomes sont aussi nécessaires à la production d'IL-1 $\beta$  par la lignée THP1 exposée à *Porphyromonas gingivalis* (Park, E. *et al.* 2014). De manière similaire, AIM2 et NLRP3 ont été supposés capables de former un inflammasome commun lors de la stimulation par le cGAMP, un second messenger impliqué dans la réponse antivirale (Svanson, K.V. *et al.* 2017) ou en réponse à *Aspergillus fumigatus* (Karki, R. *et al.* 2015). Tout ceci illustre donc le fait qu'AIM2 et NLRP3 peuvent être requis dans la même situation. De plus, l'hypothèse stipulant que de l'ADN pourrait se lier à des agents cristallins, être alors phagocyté puis libéré dans le cytosol après rupture lysosomale (comme avec l'Hz) nous est apparue séduisante. Il est également intéressant de noter qu'une pléthore de travaux ont montré que les cristaux de MSU pouvaient enclencher la mort cellulaire par NETose (Schauer, C. *et al.* 2014 ; Chatfield, S.M. *et al.* 2018) mais aussi par nécroptose, culminant en l'émission de filaments d'ADN dans le milieu extracellulaire (Desai, J. *et al.* 2017). Ces derniers auraient ainsi pu être impliqués dans l'activation de l'inflammasome AIM2. De plus, l'activation d'AIM2 a été montrée comme indépendante de la présence de *Nlrp3*, un résultat que nous avons reproduit *in vitro* (Figure 3A). Néanmoins, *in vivo*, ni la perte d'*Aim2* ni la déficience conjointe en *Nlrp3* et *Aim2* n'est capable de décroître conséquemment l'inflammation dans notre modèle d'inflammation aiguë uratique. Une petite baisse a été observée mais ne se traduit toutefois pas au niveau de la production d'IL-1 $\beta$ , ni locale ni systémique.

Ceci est ainsi en accord avec nos données de culture cellulaire ne montrant pas de production d'IL-1 $\beta$  particulière lorsque les neutrophiles sont co-cultivés avec des macrophages et activés avec du LPS (signal I seul) ou du MSU (Signal II seul). Kalantari, P. *et al.* (2014) avaient montré que l'ADNg de *Plasmodium*, lié aux cristaux d'Hémozoïne, pouvait activer TLR9 (en agissant en tant que signal I) puis AIM2 (en tant que signal II). Dans nos expériences, la présence de neutrophiles et de leur ADN externalisé (NETose induite par le MSU) ne semble pas remplir ces rôles, ainsi le MSU seul n'active pas de production d'IL-1 $\beta$  dans cette co-culture. Ceci invalide ainsi notre hypothèse initiale selon laquelle la phagocytose des neutrophiles en NETose pourrait activer la production d'IL-1 $\beta$  via AIM2.

Enfin, l'emploi de cristaux de MSU co-incubés avec du poly-dA:dT, un ADN activant AIM2, ne s'est pas avéré capable d'activer la production d'IL-1 $\beta$  par des macrophages péritonéaux *Nlrp3*<sup>-/-</sup> prétraités au LPS (non montré) excluant ainsi l'action des cristaux en tant qu'agent

permettant l'entrée de l'ADN vers le cytosol où AIM2 est localisé. AIM2 ne semble donc pas requis dans ces conditions.

En parallèle, la perte conjointe des caspases 1 et 11 (*Casp1<sup>-/-</sup>Casp11<sup>-/-</sup>*) n'eut que peu d'impact sur cette pathologie expérimentale suggérant que les inflammasomes ne seraient pas déterminants dans celle-ci. En effet, les inflammasomes connus à ce jour requièrent tous la caspase 1 et/ou 11 en vue de cliver la pro-IL-1 $\beta$  en sa forme mature.

La conclusion de cette partie est donc que ce modèle ne dépend pas particulièrement des inflammasomes. De manière intéressante, ceci rejoint des observations réalisées dans certains modèles d'arthrite aiguë où l'inflammation, à prédominance neutrophilique, ne nécessitait pas l'intervention de la caspase 1 (Joosten, L.A.B. *et al.* 2009, Guma, M. *et al.* 2009, Kolly, L. *et al.* 2009). Ceci est également en phase avec certaines de nos données confirmant que les neutrophiles n'étaient pas des producteurs majeurs d'IL-1 $\beta$  en réponse aux cristaux de MSU comparé aux macrophages. Tous mes résultats montrent – conjointement à plusieurs travaux publiés – que l'inflammation aiguë goutteuse n'est pas strictement dépendante de l'action des inflammasomes. L'IL-1 $\beta$  reste une cytokine majeure mais sa maturation n'est pas uniquement réalisée au moyen des caspases 1 et 11, intégrées dans un inflammasome. Il est intéressant de noter que de très nombreux travaux ont montré que l'IL-1 $\beta$  pouvait être clivée par des protéases différentes comme la chymase des mastocytes ou encore la protéinase 3 des neutrophiles *in vitro*. De plus, Reber, L.L. *et al.* 2014 ont montré que les mastocytes étaient importants pour la production d'IL-1 $\beta$  dans un modèle d'arthrite goutteuse et Guma, M. *et al.* 2009 ont réussi à décroître l'arthrite à l'aide d'inhibiteurs de chymase et d'élastase dans le modèle STA (arthrite par transfert de sérum de souris KBxN). L'emploi de souris déficientes pour la PR3 et à la caspase 1 bloquée a également confirmé leurs rôles conjoints dans un modèle d'arthrite induite par injection de parois de streptocoques (SCW) (Joosten, L.A.B. *et al.* 2009). Des enzymes comme les MMPs (Schönbeck, U. *et al.* 1998), le granzyme A (Irmler, M. *et al.* 1995) ou encore la plasmine (Matsushima, K. *et al.* 1986) ont été aussi impliquées dans le clivage de l'IL-1 $\beta$  en produits fonctionnels *in vitro*. D'une manière plus générale, une publication de l'équipe de Charles Dinarello a montré avec succès que l'administration d'une protéine de fusion  $\alpha$ 1-antitrypsine-Fc dans un modèle d'arthrite goutteuse par injection intra-articulaire de MSU et d'acide gras C16 donnait lieu à une baisse drastique de l'inflammation locale (Joosten, L.A.B. *et al.* 2016) ; ceci atteste donc d'un rôle marqué des protéases extracellulaires dans ce processus. De manière intéressante, si ces enzymes pourraient régir l'activité de l'IL-1 $\beta$ , il a été montré que certaines pourraient aussi

procéder à son inactivation *in vitro* (Schönbeck, U. *et al.* 1998) mais aussi *in vivo* lorsque libérées au cours de la NETose (Schauer, C. *et al.* 2014). Ainsi, les granulocytes (neutrophiles et probablement mastocytes) s'avèrent cruciaux dans la goutte et leur implication semble effective tant dans le déclenchement de l'inflammation goutteuse – maturation de l'IL-1 $\beta$  – que dans la résolution de cette dernière. La contribution de la caspase 1 et des inflammasomes est ainsi probablement masquée dans ce contexte *in vivo*, bien qu'elle soit très claire lorsque des macrophages isolés sont employés *in vitro*.

Quant à la nécessité de NLRP3 et des inflammasomes chez l'Homme, la question reste ouverte mais l'efficacité de l'OLT1177 (Dapansutrile, en cours d'essai clinique) semble indiquer une participation de ce dernier. Ceci pourrait notamment illustrer les différences entre les modèles murins et la pathologie telle qu'elle est connue chez l'Homme.

### *La synthèse d'IL-1 $\beta$ est une étape centrale*

Si la question du clivage de la pro-IL-1 $\beta$  en sa forme mature est évidemment importante dans cette pathologie, les mécanismes conduisant à la synthèse de la pro-forme revêtent également une position centrale. En effet, la pro-IL-1 $\beta$  est le substrat nécessaire à toute genèse d'IL-1 $\beta$  mature, qu'elle découle d'un clivage dépendant des caspases 1/11 intégrées dans un inflammasome ou bien dépendant d'autres protéases dérivées de plusieurs types de cellules (polynucléaires).

Dans nos travaux, nous avons tenté d'apporter une réponse au paradigme qui s'est constitué autour de la production de cette pro-cytokine. *In vitro*, sa synthèse est en effet artificiellement induite par du LPS ou d'autres agonistes des voies TLR dont la relevance physiologique n'est pas justifiée. Ainsi, l'usage de cristaux de MSU – traités thermiquement afin d'éliminer les substances pyrogènes – sans prétraitement préalable n'induit aucune sécrétion que ce soit par des macrophages ou bien par des neutrophiles en culture. *In vivo*, certains articles ont aussi montré que ces cristaux ne pouvaient pas induire d'inflammation lorsqu'injectés seuls dans le genou (intra-articulaire) chez la souris. L'adjonction d'acides gras C18 ou bien C16 était alors nécessaire pour induire une inflammation (clinique et histologique), ce mécanisme fut documenté comme dépendant de TLR2 (Joosten, L.A.B. *et al.* 2010, Joosten, L.A.B. *et al.* 2016). Cette nécessité ne semble toutefois pas retrouvée lorsque les cristaux sont injectés à d'autres localisations.

Nos données montrent que lorsque les cristaux sont injectés par voie sous-cutanée, la production d'IL-1 $\beta$  est effective d'abord au niveau de l'expression génique à 8hpi (*IIIb*, **Figure RS4A mais aussi RS9A**) puis au niveau traductionnel dès 24hpi (**Figure RS1E et**

**F.**); l'induction transcriptionnelle est maintenue forte à ce point de temps (données de RNAseq). Par ailleurs, nos cristaux n'activent en rien la production d'IL-1 $\beta$  par les macrophages *in vitro*, même s'ils furent mis en contact de ces derniers pendant des temps longs (24h, **Figure 3B**); cela montre donc qu'un mécanisme induisant la synthèse d'IL-1 $\beta$  aurait lieu spécifiquement *in vivo* après l'injection des cristaux.

De manière intéressante, lors de l'analyse du transcriptome induit par les cristaux de MSU (comparaison MSU contre PBS), nous avons retrouvé une très forte hausse des gènes codant pour TLR1 et surtout TLR2 et TLR6 parmi environ 200 gènes dont l'expression était très significativement modulée ( $p < 0,0001$ ). En revanche, aucun gène codant pour un autre TLR n'a été retrouvé modulé d'une telle manière dont *Tlr4*, classiquement activé par l'emploi de LPS *in vitro*. Ainsi, cela semblerait donc indiquer un rôle pour ces quelques TLR (1, 2 et 6), liant typiquement des lipopeptides, dans la détection d'un signal pouvant éventuellement enclencher la production d'IL-1 $\beta$ , une cible du facteur de transcription NF $\kappa$ B, engagé en aval de tous les récepteurs TLRs.

Ce fait est particulièrement saisissant dans la mesure où de nombreux articles tendent à lier les lipides comme certains acides gras à la pro-inflammation en jeu dans la maladie goutteuse (**Joosten, L.A.B. et al. 2010, Hall, C.J. et al. 2018**). Dans ce dernier article, il a été montré que la production de ROS – induite par les cristaux de MSU – pouvait être réalisée à partir d'acides gras et d'une manière dépendante de l'enzyme CAD (*cis-aconitic acid decarboxylase*) codée par le gène *Irg1*; cette dernière est accrue dans les monocytes THP1 stimulés au MSU adjoint à des acides gras C18 mais aussi dans notre transcriptome où *Irg1* occupe le 10<sup>ème</sup> rang par ordre de significativité (MSU contre PBS,  $p = 1,23 \times 10^{-19}$ ). Ensemble, ces données pourraient donc indiquer un rôle pour ces biomolécules dans le présent modèle. Des substances ayant une propension à lier TLR2 pourraient ainsi être des lipides ou des lipopeptides dont l'origine pourrait être le microbiote (comme cela fut montré pour l'acétate dans un modèle d'arthrite goutteuse) (**Vieira, A.T. et al. 2015**) ou plus probablement endogène (libération de lipides lors des dommages tissulaires induits par les cristaux). Au final, mes données semblent donc impliquer les TLR1, 2 et 6 dans la détection d'un signal mis en jeu dans notre contexte mais d'autres investigations devront étayer ces quelques résultats afin de déterminer 1) la véracité de l'activation de cette voie et 2) la ou les substances qui en sont à l'origine.

### *Interférer avec la production de pro-IL-1 $\beta$ pour réduire l'inflammation*

Si la maturation de l'IL-1 $\beta$  semble réalisée par de nombreux acteurs moléculaires, intégrés ou non dans des inflammasomes, la pro-IL-1 $\beta$  demeure la pierre angulaire de cette cascade. En effet, son ciblage thérapeutique permettrait en outre de s'absoudre de la question des protéases en charge de son clivage. Récemment, une étude publiée par notre laboratoire a montré que l'application topique d'ALDARA® – une crème contenant 5% d'imiquimod, employée en dermatologie – était capable de réduire l'inflammation articulaire dans plusieurs modèles murins d'arthrite (STA, arthrite CIA et TgTNF) avec un franc succès (**Nehmar, R. et al. 2017**). Parmi les différents effets de l'application locale de cette crème, une forte baisse de l'expression des cytokines *Il6* mais aussi *Il1b* fut constatée. Compte-tenu du rôle majeur de l'IL-1 $\beta$  dans la goutte, nous nous sommes interrogés sur ses possibles effets dans notre modèle.

Nous avons pu constater que l'application topique d'imiquimod suivant immédiatement l'injection des cristaux était en mesure de décroître significativement l'inflammation dans ce modèle avec une réduction marquée des signes cliniques. Même si nous n'en avons pas fait la comparaison lors d'une même expérience, cet effet semble voisin de celui obtenu avec la colchicine lors de la validation pharmacologique du modèle.

L'emploi de l'IRM a également confirmé les effets de l'imiquimod topique en témoignant d'une réduction pratiquement totale des œdèmes sous-cutanés mais aussi des inflammations péri-tendineuses (téno-synovites). De manière totalement inattendue, les hypo-signaux imputables aux cristaux semblaient aussi décrus mais l'explication n'est pas très claire. En effet, la formation de structures similaires à des tophus sous-cutané (d'emblée visibles à l'œil nu) semble avoir lieu dans ce modèle et la contribution des cellules infiltrées dans ce processus est également probable. Dans la littérature, plusieurs publications mentionnent en effet l'arrivée massive de neutrophiles et le déclenchement de la NETose, deux phénomènes associés à la formation des tophus (**Schauer, C. et al. 2014**). Les effets anti-inflammatoires de l'imiquimod topique pourraient donc entrer en jeu dans cette réduction. Toutefois, cette baisse du volume associé aux cristaux après application d'imiquimod est à interpréter avec précaution car la proximité entre les structures osseuses et les dépôts d'urate de sodium n'est pas sans rendre la reconstruction tridimensionnelle des volumes de cristaux difficile. Nous préférons ainsi conclure à une action majeure de l'imiquimod topique sur les manifestations inflammatoires induites par les cristaux de MSU.

La réalisation d'analyses *in situ* de la production de médiateurs inflammatoires a ensuite montré que l'IL-1 $\beta$  voyait ses taux effondrés par un facteur 5 avec une baisse majeure de la pro-IL-1 $\beta$ , ainsi visualisé par western blot ; la forme mature est en revanche plus difficile à interpréter au vu de la faible qualité des bandes obtenues. De plus, l'IL-6 fut aussi abaissée par un facteur 3 alors que la myéloperoxydase (MPO) et le TNF- $\alpha$  demeuraient stable et légèrement accru respectivement. Ainsi, les cytokines IL-6 et IL-1 $\beta$  dont l'expression est accrue dans les temps précoces (8hpi au niveau de l'ARNm), semblent être des cibles privilégiées de l'imiquimod, en revanche, l'infiltrat de neutrophiles semble tout de même se mettre en place. Il est ainsi probable que les effets permis par l'imiquimod topique nécessitent l'induction de médiateurs dont l'action est ultérieure à l'arrivée des neutrophiles.

L'analyse de l'expression des gènes dans les pattes traitées à l'imiquimod topique a révélé l'induction de plusieurs gènes appartenant à la signature interféron (IFN) (*Ifit1*, *Irf7*) à 8hpi puis une baisse profonde de l'expression des cytokines *Il1b* et *Il6* par des facteurs 25 et 15 respectivement à 24hpi. Cela montre ainsi que la baisse de ces cytokines au niveau protéique trouve très probablement une cause transcriptionnelle, la signature IFN intervient ici d'une manière précoce. Cela est ainsi à mettre en relation avec des études ayant montré que les effets dermatologiques de l'imiquimod (élimination de tumeurs cutanées) mais aussi ses effets antiarthritiques étaient dépendant du récepteur TLR7 – auquel l'imiquimod se lie – et du récepteur aux IFN de type I, IFNAR1 (**Drobits, B. et al. 2012** ; **Nehmar, R. et al. 2017**).

Afin d'étayer l'hypothèse selon laquelle l'imiquimod topique induirait la synthèse précoce d'IFN-I, alors responsables de la baisse de l'expression de l'*Il1b*, j'ai réalisé plusieurs expériences *in vitro*. J'ai ainsi montré que les surnageants de fibroblastes stimulés à l'imiquimod (IMQ) – le principe actif de la crème – pouvaient induire la synthèse d'IFN $\beta$  chez des macrophages receveurs stimulés au LPS. Ceci culminait alors en une réduction importante de l'IL-1 $\beta$  sécrétée par ces macrophages en réponse au MSU d'une manière qui dépendait du récepteur IFNAR1. L'implication potentielle de l'IFN $\beta$  est davantage étayée par l'emploi d'IFN $\beta$  recombinant, capable d'abroger la production de pro-IL-1 $\beta$  et la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  par des macrophages péritonéaux et monocytes THP1 en réponse au MSU. Une réduction totale est d'ailleurs obtenue chez les macrophages péritonéaux avec des doses d'IFN $\beta$  voisines de celles mesurées précédemment lors des expériences de transferts de surnageants. L'ensemble de mes résultats rejoignent ainsi la description faite par **Greta Guarda et al.** où l'adjonction d'IFN-I (IFN $\beta$  par exemple) pouvait décroître la pro-forme d'une manière IFNAR1 dépendante.



La réalisation ultérieure d'un transcriptome (RNA-seq) a ensuite indiqué la présence de plusieurs signatures majoritaires et significatives dans les pattes ayant reçu l'imiquimod topique à 24hpi relativement aux pattes traitées avec la crème contrôle.

Tout d'abord, les gènes associés aux fonctions des neutrophiles (adhésion, diapédèse, dé-granulation) sont apparus nettement décrus conjointement à la voie Syk-PI3K qui y fut associée par le logiciel IPA. Ceci est à relier à plusieurs articles de la littérature ayant connecté la voie Syk-PI3K à l'activation des neutrophiles par les cristaux de MSU (**Popa-Nita, O. et al. 2007**). D'une manière générale, l'activation de la voie Syk a été très largement impliquée en aval de plusieurs récepteurs (CD16/CD11b (**Barabé, F. et al. 1998**), CD14 (**Scott, P. et al. 2006**), Clec12a (**Neumann, K. et al. 2014**)) – possiblement engagés par ces cristaux – ou bien après liaison directe de la membrane plasmique par ces derniers (**Ng, G. et al. 2008**).

Par ailleurs, le fait que l'imiquimod puisse décroître l'activation des neutrophiles est une information importante dans la mesure où la MPO, calquant le recrutement des neutrophiles, n'était pas abaissée alors que notre pathologie expérimentale était cliniquement inactive. Cette interférence avec les fonctions des neutrophiles pourrait donc l'expliquer. Il est fortement probable que les mécanismes entravant l'activation des neutrophiles sur place se produisent dans des temps ultérieurs à leur recrutement, expliquant ainsi leur présence égale mais l'absence de signes cliniques à 24hpi. Effectivement, aucune réduction de ceux-ci n'est clairement visible avant 16hpi.

L'inhibition de la dé-granulation des neutrophiles pourrait trouver sa cause dans le déficit en IL-1 $\beta$  mis en évidence *in vivo* ; en effet, certaines publications ont attribué un rôle dose-dépendant de l'IL-1 dans la dé-granulation des neutrophiles (**Smith, R.J. et al. 1985**). L'IL-1 $\beta$  est également montrée comme capable de majorer le relargage d'élastase induit par l'IL-8 par des neutrophiles humains, ce qui est abrogé par l'emploi d'IL-1ra (**Brandolini, L. et al. 1996**). Cette littérale carence en *Il1b* pourrait donc expliquer une partie de ce phénomène.

La baisse de l'*Il1b* est retrouvée en RNAseq mais également par RT-qPCR, d'une manière profonde et significative à l'aide de ces deux techniques. De manière intéressante, le gène codant le facteur de transcription RUNX3 (retrouvé par IPA et Reactome) est fortement abaissé après emploi de l'imiquimod topique et cela trouve un sens tout particulier dans la mesure où RUNX3 semble régir en partie la transcription de l'*Il1b* (**Lim, B. et al. 2011**). Cela est également suggéré par la base de données ENCODE.

Paradoxalement, la voie IL-10 et STAT3, retrouvée également par les deux logiciels

employés, est décrué significativement dans nos conditions. Cela viendrait ainsi en défaveur des résultats publiés par **Guarda, G. et al. (2011)** où l'IL-10 et la signalisation en aval (STAT3) ont été décrits comme activés par les IFN de type I comme l'IFN $\beta$ , abaissant *in fine* la synthèse de pro-IL-1 $\beta$ . Cependant, cela n'exclut pas son éventuelle contribution dans la baisse constatée de l'*Il1b* ; le cadre temporel, le caractère uniquement transcriptomique de l'analyse ou encore l'occurrence d'un phénomène de rétrocontrôle négatif pourraient expliquer ceci. De même, nos données obtenues *in vitro* semblaient tout à fait en ligne avec cette publication.

Un éclaircissement (par la réalisation d'une analyse protéomique ou d'un transcriptome plus précoce) sera sans doute nécessaire afin de comprendre au mieux ces différences. Enfin, la signalisation *Tlr1, 2 et 6* – mise en évidence en comparant l'injection des cristaux de MSU à celle de PBS – s'est avérée totalement décrué lors de l'application topique de l'imiquimod. Si cette voie a effectivement un rôle causal dans la synthèse d'*Il1b* en réponse aux cristaux de MSU, sa modulation par l'imiquimod topique pourrait partiellement expliquer la baisse observée de cette cytokine.

Ensemble, ces données transcriptomiques montrent bien un effet profond de l'imiquimod mais tout ceci ne peut en l'état affirmer la dépendance d'une voie ou d'une autre. La certitude tient davantage au rôle des IFN-I dans ce processus et d'une baisse d'expression marquée de l'*Il1b* en aval, engendrant alors un déficit en pro-IL-1 $\beta$  ; *in fine*, cela culmine en l'abrogation de la production d'IL-1 $\beta$  mature. Néanmoins, la voie RUNX3 apparaît ici telle une belle perspective pour des études ultérieures.

#### *Modèle d'action de l'imiquimod topique*

Bien que plusieurs points méritent encore d'être éclaircis, les informations recueillies nous permettent de proposer le modèle suivant (voir **Figure D1**).

- L'imiquimod contenu dans l'ALDARA® engendre d'abord la production d'IFN de type I après liaison de TLR7 menant alors à la production précoce d'IFN-I engageant en aval le récepteur IFNAR1.
- La désactivation de la voie RUNX3, mais aussi possiblement la production d'IL-10 et l'engagement de la voie STAT3 en aval, conduirait à une baisse majeure d'expression de l'*Il1b* au niveau transcriptionnel entre 8 et 24hpi.

- La pro-IL-1 $\beta$  se retrouverait alors produite en quantité trop faible pour être à l'origine d'une production substantielle d'IL-1 $\beta$  mature après clivage (caspases et autres protéases).
- Finalement, la déplétion en IL-1 $\beta$  ne permettrait pas à l'inflammation locale de s'enclencher et l'activation et la dégranulation des neutrophiles s'en retrouveraient entravées.

La participation de l'imiquimod topique en abaissant la voie Syk-PI3K ou en réduisant l'activation des TLR1, 2 et 6 semblerait aussi possible mais d'autres données sont assurément nécessaires afin de l'affirmer.

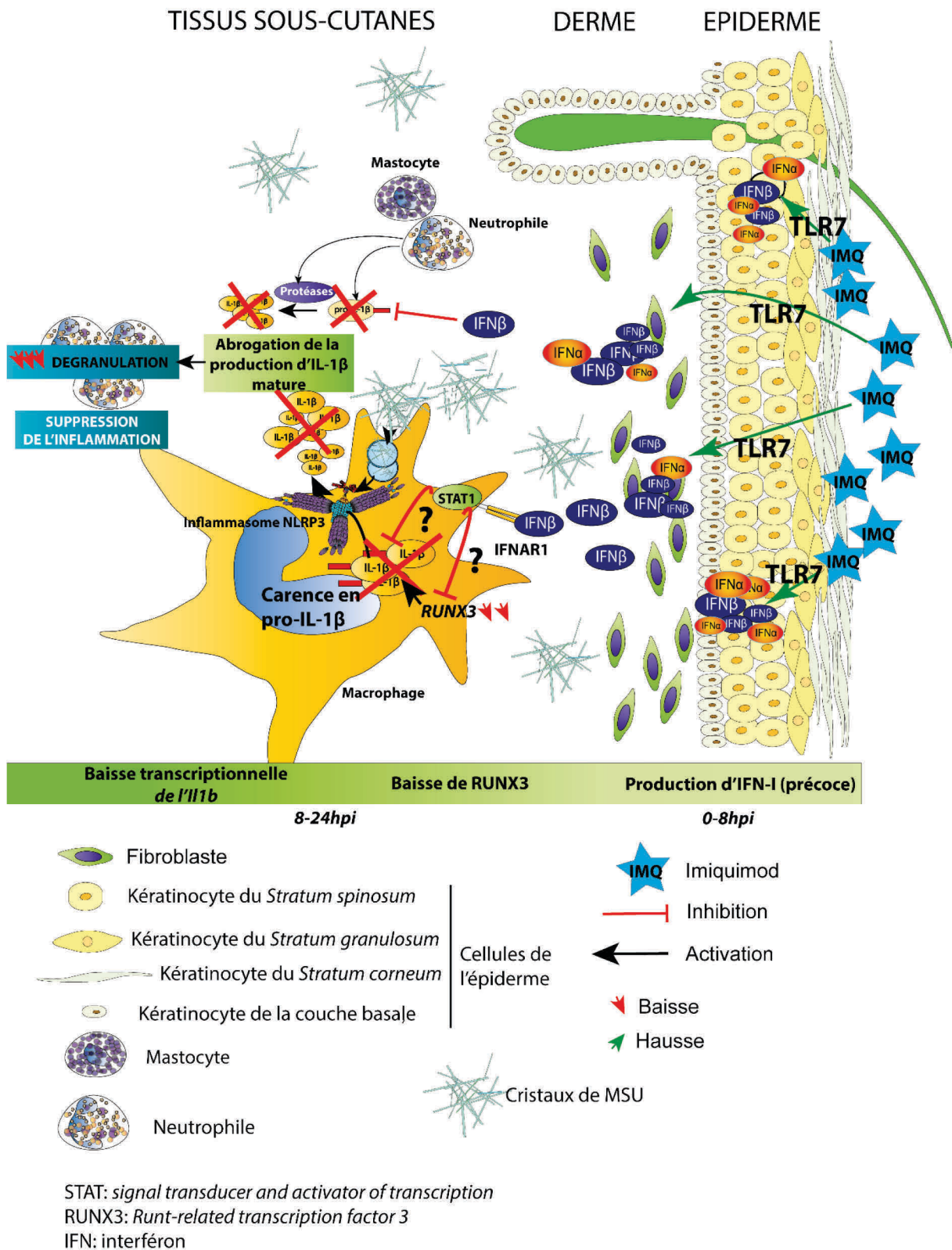
### *Un moyen thérapeutique local*

Au final, nos travaux montrent donc que l'emploi d'imiquimod topique semble bien constituer un moyen local d'abolir la production d'IL-1 $\beta$  directement au niveau transcriptionnel. Cet effet est de plus assez rapide dans la mesure où l'expression clinique de cette pathologie expérimentale est très fortement atténuée dès 16hpi. Il est intéressant de noter que l'emploi de thérapies anti-IL-1 (anakinra par exemple) donne lieu à une réponse clinique dès 24h en moyenne, ce qui est déjà rapide (So, A. *et al.* 2010). De surcroît, l'effet documenté par mes travaux repose également sur l'emploi d'une dose unique (1-1,25mg final l'Imiquimod/patte) et illustre ainsi son fort potentiel anti-inflammatoire dans ces conditions. Au cours de mes expériences, aucun effet secondaire particulier n'a été noté, contrairement à l'emploi de la colchicine chez les souris (asthénie notamment) et l'imiquimod topique n'a pas induit d'effets cutanés évidents (rougeurs par exemple). Ceci laisse ainsi supposer un bon profil de sécurité pour ce traitement topique dans une telle indication. De même, la crème ALDARA® est approuvée aux Etats-Unis depuis 1997 et en France depuis 1998 et est connue pour générer des effets secondaires majoritairement cutanés (sensations de picotements, de brûlure sous la peau par exemple) et assez peu de signes généraux (fatigue, maux de tête et symptômes pseudo-grippaux ont été reportés) (Cantisani, C. *et al.* 2012).

### *Conclusion*

A travers ce travail, j'ai ainsi montré que l'injection de cristaux de MSU par voie sous-cutanée était tout à fait capable de reproduire les caractéristiques clinico-biologiques de la crise de goutte humaine. L'analyse réalisée à l'aide de souris déficientes pour plusieurs composants des inflammasome et NLRP3 lui-même a indiqué que les inflammasomes ne joueraient pas un rôle majeur dans la production d'IL-1 $\beta$  bioactive dans ce modèle murin.

Mes travaux permettent de proposer un moyen topique (imiquimod 5%) très efficace pour décroître la production locale d'IL-1 $\beta$  directement au niveau transcriptionnel. Ce moyen thérapeutique préclinique pourrait s'avérer intéressant pour un nombre important de patients répondant insuffisamment aux thérapies conventionnelles ou bien chez les patients difficile à traiter (comorbidités).



**Figure D1:** Schéma du mode d'action supposé de l'imiquimod topique dans l'inflammation aiguë uratique induite par injection sous-cutanée de MSU.

L'application cutanée d'imiquimod engage le récepteur TLR7 et enclenche la production d'IFN-I (IFN $\beta$  par exemple). Les IFN-I pourront alors lier le récepteur IFNAR1 et initier une signalisation en aval, régulant alors négativement l'expression de l'*Il1b* d'une manière potentiellement dépendante de la baisse de *Runx3*. Conjointement, la régulation d'autres voies comme IL-10-STAT3, Syk-PI3K et TLR1, 2 et 6 pourrait intervenir. Cela culmine alors en une baisse drastique de la pro-IL-1 $\beta$  et l'absence d'IL-1 $\beta$  mature après clivage, que celui-ci soit Caspase 1-dépendant ou -indépendant. La dégranulation et d'autres fonctions des neutrophiles recrutés précocement sont alors fortement décruës, ainsi que les signes inflammatoires. L'induction de la signature interféron est un évènement précoce (0-8hpi) tandis que la baisse de l'*Il1b* survient après 8hpi et les signes cliniques ne disparaissent qu'à partir de 16hpi.



# **RESULTATS COMPLEMENTAIRES**

L'implication de NLRP12 dans la réponse inflammatoire aux cristaux d'urate monosodique

**Introduction**

**Résultats**

**Conclusion et perspectives**





## Résultats complémentaires: l'implication de NLRP12 dans la réponse inflammatoire aux cristaux d'urate monosodique

### *Introduction*

NLRP12 (*NACHT, LRR and pyrin containing 12*) appartient à la famille des NLR, dont 22 membres sont connus à jour. NLRP12 est codé par le gène *Nalp12* et est présent à la fois chez l'Homme (chromosome 19) et chez la souris (chromosome 7). NLRP12 est une protéine de 120 kDa (1062 acides-aminés) comprenant un domaine LRR en position C-terminale, un NBD et un domaine Pyrine à son extrémité N-terminale, présentant ainsi une structure assez proche de celle de NLRP3. Le gène est exprimé principalement par les neutrophiles mais aussi par les monocytes CD14<sup>+</sup>, les macrophages, éosinophiles, cellules dendritiques immatures ainsi que dans quelques tissus comme la moelle osseuse, le foie et la rate (**Tuncer, S. et al. 2014**).

Cependant, si NLRP3 est connu pour avoir une fonction déterminante en s'engageant dans la formation d'un inflammasome, la littérature est bien moins claire quant à NLRP12. En effet, ce dernier a été originellement décrit pour former son propre inflammasome en s'associant avec la protéine adaptatrice ASC et la protéase caspase 1. Ceci a ainsi été démontré en 2002, NLRP12 – autrement nommée PYPAF7 (*Pyrin-containing APAF-1 like protein 7*) – pouvait alors s'associer à la caspase 1 et ASC et engendrer la production d'IL-1 $\beta$  lorsque ces différents éléments étaient transfectés dans des cellules COS7L. Cette production était toutefois impossible si la caspase 1 était dépourvue de domaine PYRIN ou si celui-ci était muté ou bien après usage d'un inhibiteur de la caspase 1, le z-WEHD. Dans cet article, ASC fut également relié à l'activation de la caspase 1 de manière dose dépendante (**Wang, L. et al. 2002**) attestant donc de la capacité de NLRP12 à engager la formation de son propre inflammasome. Néanmoins, de nombreuses données de la littérature ont davantage associé NLRP12 à des fonctions régulatrices, contexte-dépendantes, de l'inflammation.

Egalement dénommée Monarch-1, PYPAF7 ou encore RNO (*responsive to nitric oxid*), NLRP12 émerge actuellement dans le domaine de l'inflammation mais ses fonctions demeurent encore incertaines. Nous proposons ici un rapide tour d'horizon des ses rôles biologiques.

## 1. Des fonctions régulatrices

Depuis une dizaine d'années, plusieurs publications ont décrit NLRP12 comme ayant des fonctions davantage inhibitrices de l'inflammation avec notamment un rôle régulateur sur la signalisation de NFκB. Essentiel dans l'activation de nombreuses cellules immunitaires et dans la production des cytokines pro-inflammatoires et de certaines chimiokines, NFκB est un facteur de transcription central dans les processus inflammatoires. Dans les cellules myéloïdes, NFκB est activé en aval de nombreux PRRs comme les TLRs et les récepteurs NOD, de nombreuses autres voies (TNF par exemple) culminent également en son activation. Une étude de 2005 a ainsi montré que l'expression de NLRP12 est abaissée lors de la stimulation de granulocytes ou de la fraction adhérente des PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique) par des agonistes de TLR2 et 4. Il fut ensuite montré que NLRP12 pouvait, via son domaine NACHT, interagir avec IRAK1, bloquant alors sa phosphorylation et l'activation en aval de NFκB. Cette démonstration conclut alors par l'emploi d'ARN interférents ciblant NLRP12 dans les monocytes THP1 montrant alors une hausse de la production d'IL-6 en l'absence de NLRP12 (**Williams, K.L. et al. 2005**). D'autres études ont ensuite montré un rôle de NLRP12 dans la voie non canonique de NFκB (signalisation via NIK, *NFκB-inducing kinase*) en s'associant avec la kinase NIK via son domaine NACHT, bloquant alors cette voie. Ainsi, l'usage d'ARN interférents dirigés contre NLRP12 dans les monocytes THP1 donna lieu à une hausse des gènes dépendants de la voie NFκB non-canonique (*CXCL12*, *CXCR4*, *CXCL13*) (**Lich, J.D. et al. 2007**). Outre ses effets sur les voies NFκB, NLRP12 affecte également l'expression d'autres cytokines comme l'IL-18. Ainsi, dans les kératinocytes, certains allergènes chimiques ont été montrés comme enclenchant la production d'IL-18 et cela était vraisemblablement permis par une hausse de *Blimp1* (*B-lymphocyte-induced maturation protein 1*) corrélée à une baisse de NLRP12 (**Papale, A. et al. 2017**).

## 2. Des rôles dans l'établissement de l'inflammation

Si NLRP12 était plus anciennement connu comme anti-inflammatoire, régulateur de certaines voies, des données récentes semblent lui attribuer un rôle réellement inflammatoire dans plusieurs circonstances. Ainsi, **Ulland, T.K. et al.**, en 2016, ont comparé deux souches de souris C57BL/6 – C57BL/6J (laboratoires Jackson, développée dans les années 1920) et C57BL/6N (National Institutes of Health, établie en 1951) – sur le plan du recrutement des neutrophiles. De manière très intéressante, les souris B6J, contrairement au B6N, possèdent une variation d'un seul nucléotide (SNP) dont le résultat est l'apparition d'une arginine en

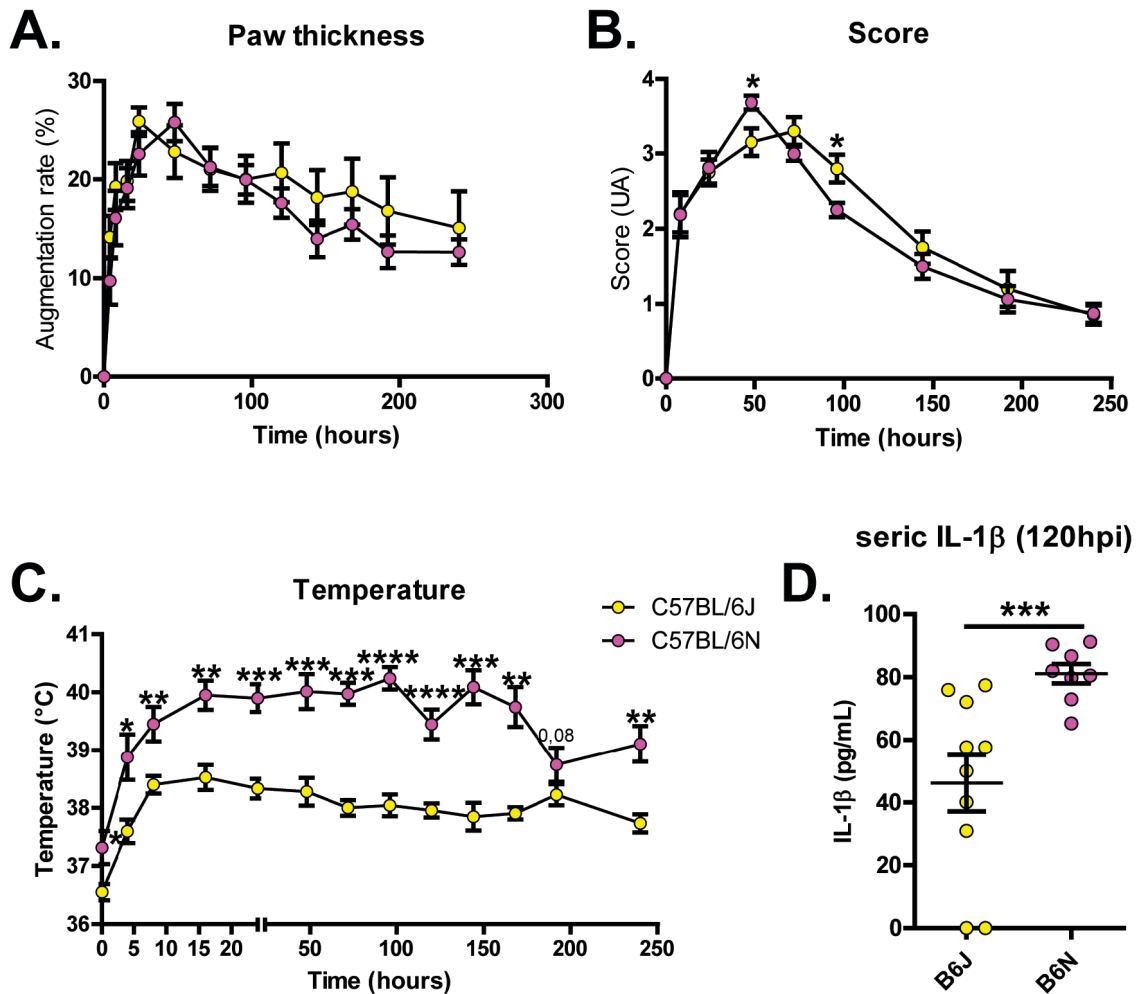
lieu et place d'une lysine (R1034K) et fonctionnellement une perte partielle du recrutement pulmonaire des neutrophiles en réponse au LPS ou à la bactérie *Franciscella tularensis in vivo*. Les souris *Nlrp12<sup>-/-</sup>* reproduisent ce phénotype et montrent un déficit de production de la chimiokine CXCL1 par les macrophages (Ulland, T.K. *et al.* 2016).

Une autre étude a également confirmé la nécessité de NLRP12 pour la production de CXCL1 et avait illustré cela dans le cadre d'infections par la bactérie pathogène *Klebsiella pneumoniae* (Cai, S. *et al.* 2015). Sur le versant infectieux, NLRP12 a aussi été démontrée comme importante lors de l'infection par *Yersinia pestis* (Vladimer, G.I. *et al.* 2012). Néanmoins, certaines études n'ont pas retrouvé de rôle de NLRP12 dans les infections par *K. pneumoniae* et *Mycobacterium tuberculosis* (Allen, I.C. *et al.* 2013) et même un rôle délétère de NLRP12 dans le cadre de l'infection par *Salmonella typhimurium* (Zaki, M.H. *et al.* 2011). Au final, NLRP12 semble donc visiblement important pour la production de la chimiokine CXCL1 et pourrait ainsi être requis afin d'orchestrer la défense contre de nombreux pathogènes. Cependant, il est important de noter que ceci contraste très vivement avec les données initiales montrant que NLRP12 était davantage un régulateur négatif de l'inflammation. Ainsi, l'implication biologique de NLRP12 est actuellement loin d'être claire.

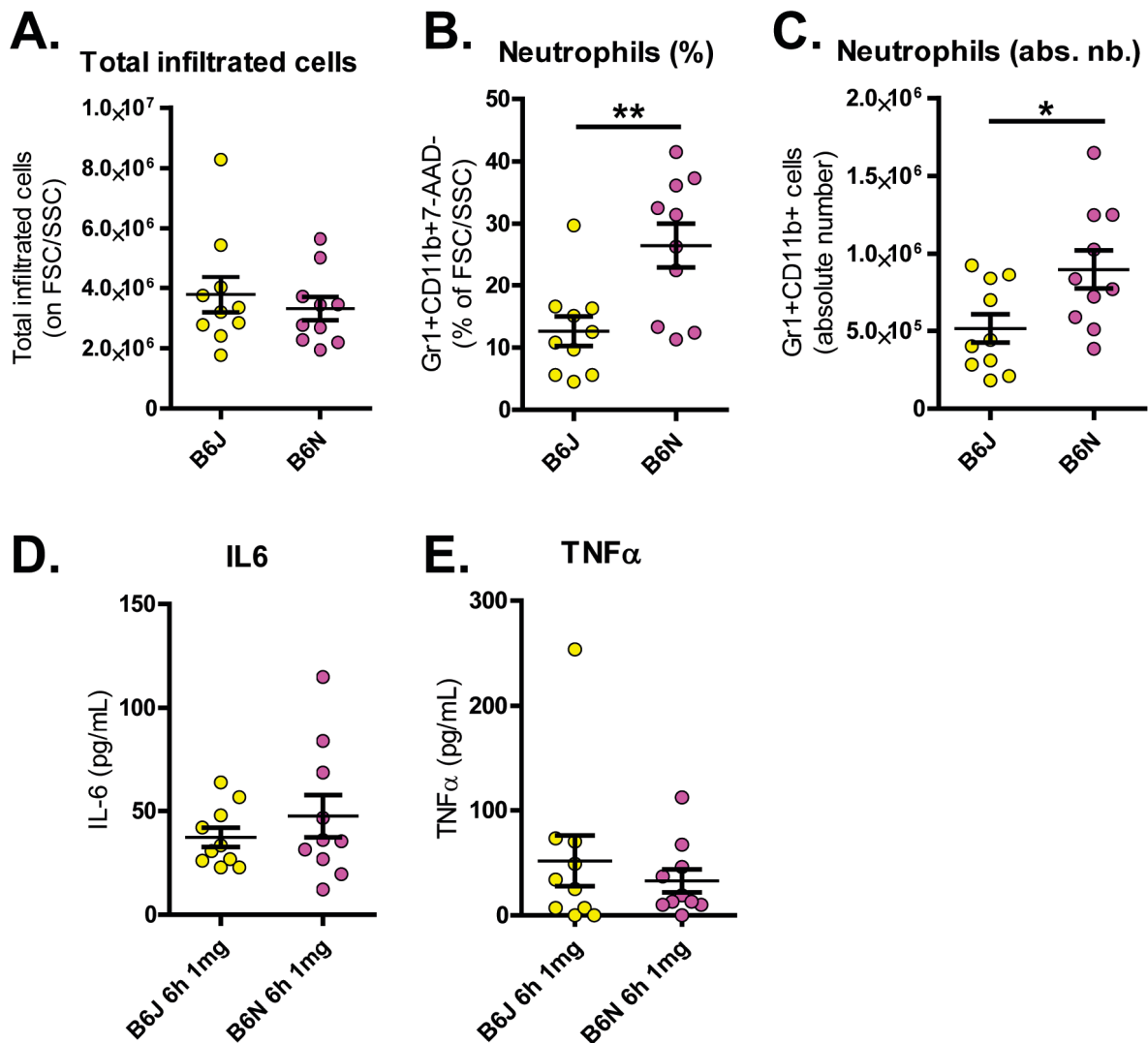
### 3. Vers de nouveaux questionnements ?

Si le rôle de NLRP12 n'est actuellement pas très clair dans les situations infectieuses, il ne l'est pas non plus vis-à-vis des inflammations stériles. Or, il est intéressant de mentionner que des mutations de type « perte de fonction » de NLRP12 sont également responsables d'une maladie auto-inflammatoire dénommée FCAS2 ou NLRP12-AD (*NLRP12-associated auto-inflammatory disease*) (Shen, M. *et al.* 2016). Cette pathologie s'avère cliniquement similaire au FCAS (*Familial cold auto-inflammatory syndrome*) retrouvé lors de mutations de NLRP3 ; biologiquement parlant, il fut d'abord montré que des cellules NEK293T transfectées avec les versions mutées de *NALP12* (issues des patients FCAS2) étaient nettement moins capables de décroître l'activité de NFκB que *NALP12* Wt (Jeru, I. *et al.* 2008). La même équipe montra ensuite que les PBMC issus de ces patients produisaient spontanément des cytokines pro-inflammatoires (IL-1β notamment) (Jeru, I. *et al.* 2011) *in vitro*. Ces données semblent donc montrer que les mutations de NLRP12 présentes chez les patients atteints de FCAS2 affectent des voies retrouvées chez les patients atteints par le FCAS1 classique (production accrue d'IL-1β). Ainsi, cela soulève donc la question de l'implication de NLRP12 dans les contextes stériles. Ayant caractérisé le modèle d'inflammation aiguë uratique par injection sous cutanée

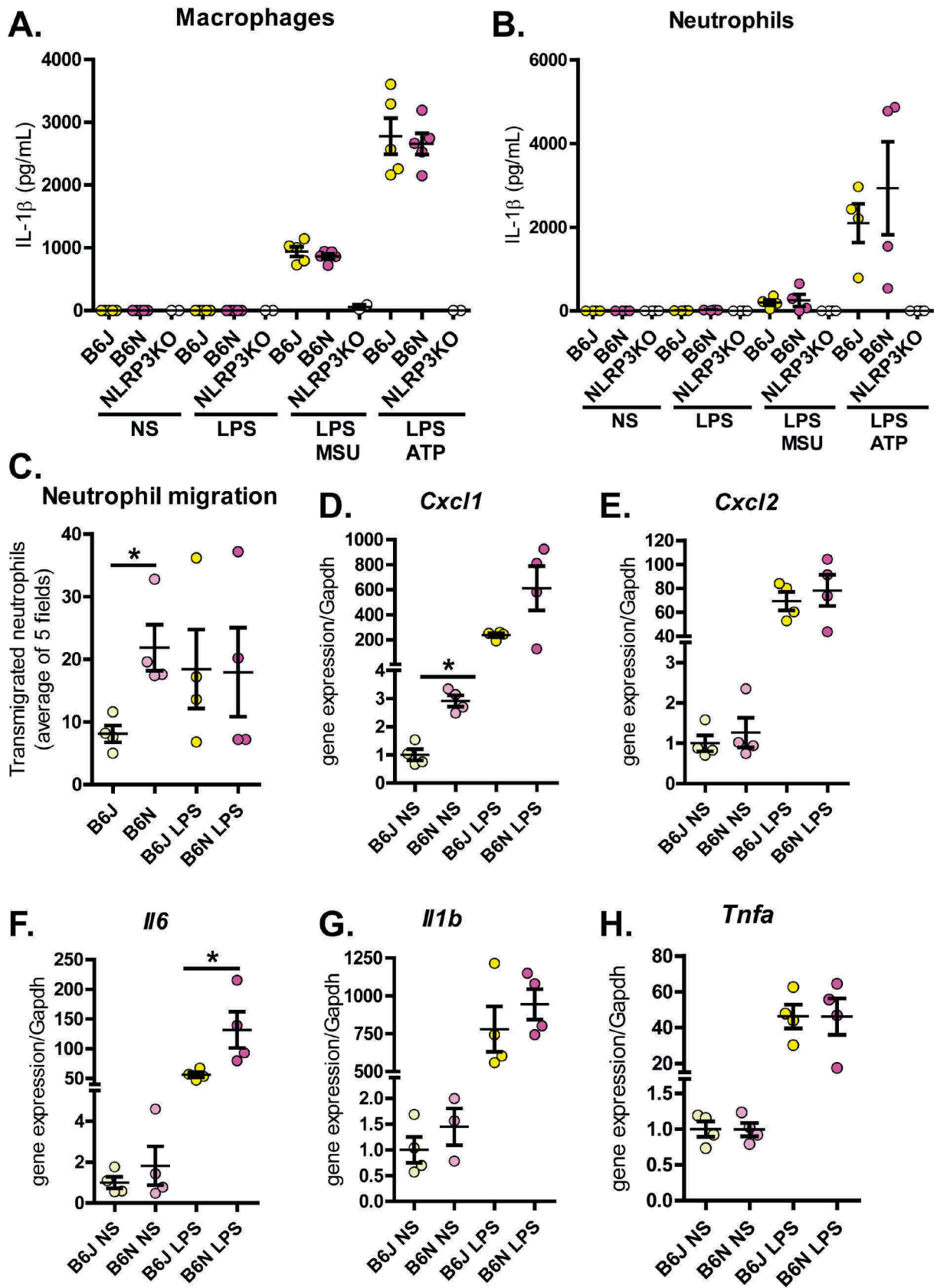
de cristaux de MSU, nous nous sommes ainsi interrogé sur l'impact de NLRP12 dans ce contexte.



**Figure NLRP12-1.** La fonctionnalité de NLRP12 dans la souche B6N engendre une forte pyrexie déclenchée par l'injection de cristaux de MSU par voie sous-cutanée. Une expérience d'inflammation aiguë uratique a été réalisée sur des souris C57BL/6N (*Nlrp12* fonctionnel) et C57BL/6J (*Nlrp12* altéré par la mutation R1034K) en leur injectant 3mg de cristaux de MSU par voie sous-cutanée. A-C. L'inflammation aiguë uratique a été suivie par des mesures régulières de l'épaisseur des pattes (A.) et par l'établissement de scores cliniques (B.) et la mesure de la température corporelle (C.). En parallèle, le sang a été prélevé à 120hpi et l'IL-1β circulante a été dosée par ELISA (D.). Les résultats ont été obtenus avec 8 à 10 souris par groupe, les barres représentent la moyenne +/- SEM. L'analyse statistique est réalisée par le test de Mann-Whitney, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  et \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ , ns = non significatif. Chaque point représente une souris individuelle dans le graphique D, les courbes représentent les cohortes (C57BL/6J en jaune, C57BL/6N en violet).



**Figure NLRP12-2.** Le fond génétique B6N est associé à un recrutement accru de neutrophiles dans le modèle de péritonite au MSU. Afin d'étudier le recrutement des neutrophiles chez les souris B6N et B6J, des expériences de péritonites au MSU ont été faites sur des souris C57BL/6N (*Nlrp12* fonctionnel) et C57BL/6J (*Nlrp12* altéré par la mutation R1034K) par injection d'un milligramme de cristaux de MSU en intra-péritonéal. Les exsudats péritonéaux ont été analysés par cytométrie en flux et par ELISA 6h après l'injection des cristaux. **A-C.** Les cellules totales (déterminées sur la base du FSC/SSC) (**A.**) et le pourcentage de neutrophiles (Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> par les cellules vivantes) (**B.**) ont été déterminés par cytométrie en flux. L'influx total de neutrophiles a été calculé en multipliant le nombre de cellules totales comptées dans les lavages péritonéaux par les pourcentages de neutrophiles obtenus (**C.**). **D, E.** IL-6 (**D.**) et TNF $\alpha$  (**E.**) ont été dosé par ELISA dans les lavages péritonéaux. Les résultats ont été obtenus avec 10 souris par groupe, les barres représentent la moyenne  $\pm$  SEM. L'analyse statistique est réalisée par le test de Mann-Whitney, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ . Chaque point représente une souris individuelle (C57BL/6J en jaune, C57BL/6N en violet).



**Figure NLRP12-3.** Le fond génétique B6N est associé à une plus forte expression de *Cxcl1* et à un recrutement accru de neutrophiles. **A. et B.** Des macrophages (**A.**) et des neutrophiles (**B.**) isolés des souris C57BL/6N, C57BL/6J ou *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (en fond C57BL/6J) ont été mis en culture à raison de 5x10<sup>5</sup> et 1x10<sup>6</sup> cellules/puits respectivement et laissés sans stimulation (NS) ou stimulés pendant 3h avec 1 µg/mL de LPS (LPS) puis en y ajoutant 250 µg/mL de MSU 6h (LPS+MSU) ou de l'ATP 5 mM 1h (LPS+ATP). L'IL-1β a ensuite été dosée par ELISA dans les surnageants de culture. **C.** Des tests de migration des neutrophiles ont ensuite été réalisés en plaçant dans des plaques de 24 puits, 1) 5x10<sup>5</sup> macrophages (B6N ou B6J, stimulés ou non avec du LPS et 2) au fond d'une chambre de Boyden avec à l'intérieur 3x10<sup>4</sup> neutrophiles (B6J). La migration a été effectuée à 37°C 5% CO<sub>2</sub> pendant 24h puis arrêtée et les cellules ont été fixées, marquées au DAPI et le compte des cellules ayant transmigré réalisé. Les données comprennent le nombre moyen de neutrophiles ayant transmigré (moyenne de 5 champs microscopiques). **D.-H.** Des macrophages isolés de souris C57BL/6N et C57BL/6J ont été mis en culture à raison de 5x10<sup>5</sup> macrophages/puits et ont été stimulés par du LPS 1µg/mL pendant 90 min. L'analyse de l'expression des chimiokines *Cxcl1* (**D.**), *Cxcl2* (**E.**), *Il6* (**F.**), *Il1b* (**G.**) et *Tnfa* (**H.**) a été ensuite réalisée par RT-qPCR. Les valeurs d'expression génique ont été obtenues par la méthode du 2<sup>-(ΔΔCt)</sup> puis par normalisation à un groupe de référence (B6J, non stimulé = 1). Les résultats ont été obtenus avec des cellules issues de 4 à 5 souris par groupe sauf pour les macrophages *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (n = 2), les barres représentent la moyenne +/- SEM. L'analyse statistique est réalisée par le test de Mann-Whitney, \* = p < 0,05. Chaque point représente une souris individuelle (C57BL/6J en jaune, C57BL/6N en violet, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> en blanc ; non-stimulé en couleur claire et stimulé en couleur vive).

## Résultats

Afin d'analyser la contribution du gène *Nlrp12* dans un contexte stérile, nous avons ainsi opté pour le modèle d'inflammation aiguë uratique par injection sous-cutanée de cristaux de MSU. En effet, ce modèle donne lieu à une forte inflammation locale avec un recrutement certain de neutrophiles et une production conséquente de cytokines comme l'IL-1β et l'IL-6 (voir **Figure RS1**). Le choix des souris a été principalement guidé par la publication récente d'Ulland, T.K. *et al.* 2016 ayant montré que les souris C57BL/6N étaient en réalité porteuses d'une mutation faux-sens dans le locus *Nlrp12* affectant sa fonction. Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont confirmé l'absence d'autres mutations susceptible d'affecter le recrutement des neutrophiles, une fonction centrale également dans notre modèle d'inflammation aiguë uratique. J'ai donc employé des souris C57BL/6N fonctionnellement suffisantes en *Nlrp12* et des souris C57BL/6J, déficientes.

L'activation de l'inflammation par l'injection sous cutanée des cristaux de MSU a été suivie pendant 10 jours. Tout d'abord, aucune différence dans le développement de l'inflammation n'a été observée, ni à la phase aiguë (48 premières heures), ni lors de la phase de résolution (jusqu'à 240hpi) (**Figure NLRP12-1A et 1B**). Néanmoins, et de manière tout à fait inattendue, les souris C57BL/6N ont développé une pyrexie particulièrement forte (plus de 40°C) et soutenue tout au long de la cinétique, avec des différences très significatives pour



chaque point de temps considéré relativement aux C57BL/6J (38,04°C contre 40,24°C,  $p < 0,0001^{****}$  à 96h, **Figure NLRP12-1C**). La fièvre pouvant être causée par plusieurs cytokines (les pyrogènes) dont l'IL-1 $\beta$  est la mieux connue, nous avons réalisé un dosage de l'IL-1 $\beta$  sérique à 120hpi, un point où la fièvre était maintenue très forte chez les B6N. Une forte hausse de la production d'IL-1 $\beta$  chez les B6N relativement aux B6J ( $p < 0,001^{***}$ , **Figure NLRP12-1D**) a pu être observée. Ainsi, l'inflammation aiguë uratique ne semble pas favorisée par la présence d'un gène *Nlrp12* fonctionnel ; contrairement à la température corporelle et la production d'IL-1 $\beta$  circulante qui sont plus élevées dans ce fond génétique.

Pour compléter ces observations, j'ai utilisé un autre modèle : celui des péritonites induites par les cristaux de MSU chez des animaux B6N et B6J. De manière intéressante, alors que le nombre de cellules totales était inchangé (**Figure NLRP12-2A**), le pourcentage de neutrophiles et ainsi l'influx de neutrophiles total fut significativement décri chez les souris B6J relativement aux B6N (**Figure NLRP12-2B et 2C**). Par contre, aucun changement dans la production d'IL-6 et de TNF $\alpha$  dans les lavages péritonéaux n'a été observé, indiquant vraisemblablement l'absence de rôle de *Nlrp12* sur ces médiateurs (**Figure NLRP12-2D et 2E**). La mesure de l'IL-1 $\beta$  serait par ailleurs intéressante.

J'ai ensuite poursuivi mes investigations *in vitro* sur deux grands axes. Le premier visait principalement à trouver l'origine de l'excès d'IL-1 $\beta$  sérique visualisé lors de l'inflammation aiguë uratique. Le second était davantage centré sur l'analyse du recrutement des neutrophiles. A cet effet, j'ai mis en culture des neutrophiles et macrophages issus de souris B6N et B6J et les cellules ont été stimulées avec les cristaux de MSU ou de l'ATP (activateurs de NLRP3) après une étape de priming au LPS. De manière intéressante, je n'ai pas observé de différence (macrophages, **Figure NLRP12-3A**, neutrophiles, **Figure NLRP12-3B**) dans la production d'IL-1 $\beta$  indiquant que le fond génétique B6N ou J n'aurait potentiellement pas d'impact sur la synthèse de pro-IL-1 $\beta$  et/ou l'activation de NLRP3. Cependant, des investigations supplémentaires (western blot anti-IL-1 $\beta$  par exemple pour la pro-forme de l'IL-1 $\beta$  ou RT-qPCR) sont nécessaires pour conclure en ce sens.

La réalisation de tests de migration a donné un résultat très intéressant, montrant que la transmigration des neutrophiles était accrue lorsque les macrophages provenaient de souris B6N. Cela était constaté à l'état basal mais cette différence n'était plus observée après activation des macrophages (**Figure NLRP12-3C**). Conjointement à ces données, j'ai pu mesurer une hausse de la production de la chimiokine *Cxcl1* par les macrophages de souris B6N relativement à ceux de B6J (3 fois plus,  $p < 0,05^*$ , **Figure NLRP12-3D**) par RT-qPCR.

Cette hausse n'était plus significative lorsque les macrophages étaient activés au LPS mais la tendance demeurait présente (folds de 237 (B6J) contre 611 (B6N)). L'analyse de l'expression d'autres gènes comme *Cxcl2*, *Il1b* et *Tnfa* n'a montré aucune différence, ni à l'état basal ni après activation par le LPS (**Figure NLRP12-3E., G. et H.**). Par contre, l'expression de *Il6* fait exception en étant accrue après le traitement au LPS (131 contre 56,  $p < 0,05^*$ ) (**Figure NLRP12-3F**).

Toutes ces données suggèrent que la différence de fond génétique entre les souris B6N et B6J (reflétant la fonctionnalité de *Nlrp12*) se répercute sur la production de *Cxcl1* et le recrutement des neutrophiles *in vitro*. Néanmoins, les données concernant la production des médiateurs inflammatoires ne permettent pas de tirer des conclusions claires et il semblerait que l'IL-1 $\beta$  ne soit pas davantage produite dans le fond B6N ; l'activation de l'inflammasome NLRP3 n'est pas non plus affectée chez ces animaux.

### ***Conclusion et perspectives***

Le statut fonctionnel de *Nlrp12*, à travers une comparaison des souris C57BL/6J et C57BL/6N, semble effectivement affecter l'inflammation. Ainsi, j'ai principalement observé deux effets prédominants :

- 1) une pyrexie forte et soutenue ainsi qu'une hausse de l'IL-1 $\beta$  circulante au cours de l'inflammation aiguë uratique.
- 2) une tendance à un plus fort recrutement de neutrophiles observée *in vitro* et *in vivo* (péritonites au MSU).

Dans le premier cas, la pyrexie est très largement documentée comme causée par des cytokines dites pyrogènes (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN-I) et il est probable que la hausse de l'IL-1 $\beta$  en soit la cause. Toutefois, j'ai été surpris de ne pas constater de hausse significative des signes cliniques chez les souris B6N en relation avec une production d'IL-1 $\beta$  éventuellement accrue localement. Une analyse détaillée de la production de cette cytokine (ELISA, western blot) et de l'IL-6 ainsi qu'une mesure de la MPO (calquant l'infiltrat de neutrophiles) seront ainsi nécessaires afin de mieux comprendre ces discordances. De même, dans le modèle de péritonite, la production d'IL-1 $\beta$  devra être mesurée.

Au vu des résultats obtenus *in vivo*, nous avons tenté de comprendre l'origine de cette production anormalement accrue d'IL-1 $\beta$ . A cet effet, nous avons entrepris des expériences de culture cellulaire sur des macrophages et des neutrophiles issus de ces deux souches de souris.

Cependant, aucune différence notable n'est apparue, que ce soit au niveau de la transcription de l'*Il1b* (mesures par RT-qPCR) ou de l'activation de NLRP3 par les cristaux de MSU. Ainsi, la production accrue d'IL-1 $\beta$  lors de l'induction de l'inflammation aiguë uratique demeure largement énigmatique et je n'ai pas à ce jour d'explication satisfaisante.

Concernant le recrutement des neutrophiles, mes données sont plus informatives. En effet, j'ai observé une différence phénotypique entre les souris B6N et B6J *in vivo* (péritonites au MSU) et *in vitro* (tests de migration). De plus, l'analyse de l'expression des chimiokines *Cxcl1* et *Cxcl2* a révélé une hausse significative de la première par les macrophages de souris B6N relativement aux B6J. Cette différence est principalement observée à l'état basal et il en est de même pour les différences intéressant le recrutement des neutrophiles. Ceci semblerait donc indiquer que la présence d'un gène *Nlrp12* fonctionnel serait associée à une hausse de la chimiokine *Cxcl1* et ainsi à un recrutement favorisé des neutrophiles.

Par ailleurs, ces données sont en accord avec celles de la littérature qui indiquent que *Nlrp12* est requis pour le recrutement des neutrophiles sur place via la production de *Cxcl1* dans des conditions infectieuses. Mes travaux suggèrent que ce mécanisme pourrait aussi avoir lieu dans des conditions stériles, lors des crises de goutte.

Par ailleurs, la perte de *Nlrp12* chez les souris B6J ne semble pas non plus induire une forte production des cytokines comme le TNF $\alpha$  et l'IL-6 dans le modèle de péritonite au MSU. Cela contraste avec plusieurs études, réalisées surtout *in vitro*, montrant que NLRP12 est capable de réguler négativement NF $\kappa$ B, un facteur régissant l'expression de ces cytokines

Au final, toutes ces données semblent montrer que *Nlrp12* pourrait contribuer à l'inflammation en réponse aux cristaux de MSU mais ce projet nécessite encore de nombreuses investigations afin d'établir un message clair. Des analyses transcriptomiques et l'emploi de souris *Nlrp12*<sup>-/-</sup>, afin de diminuer les interférences inhérentes aux fonds génétiques propres de ces deux souches de souris, seront ici cruciales.

Note relative au projet Nlrp3 : Il est important également de noter que la mutation de *Nlrp12* présente chez les souris B6J exclu la possibilité que NLRP12 soit un facteur complémentant la perte de NLRP3 chez les souris *Nlrp3*<sup>-/-</sup>. En effet, les souris *Nlrp3*<sup>-/-</sup> sont en réalité *Nlrp3*<sup>-/-</sup> *Nlrp12*<sup>B6J/B6J</sup> soit doublement-déficientes ainsi vérifié par séquençage de nos animaux.

# **MATERIELS & METHODES**



## Matériels et méthodes

### 1. Animaux et réactifs.

#### **Animaux.**

Dans le cadre de nos études, les animaux utilisés ont été issus de l'animalerie du centre d'Hématologie et d'Immunologie (1 place de l'Hôpital, site de la Faculté de Médecine de Strasbourg). Ces animaux y ont été hébergés et élevés dans une animalerie conventionnelle agréée par les services vétérinaires du Bas-Rhin (n° agrément : B67-482-33). Les souris y sont maintenues à température et hygrométrie constante (21°C, 50% humidité), en conditions SPF (*specific pathogen-free*). Chacune des cohortes utilisées était composée d'individus âgés de 12-16 semaines et du même sexe (femelles). Aucune des souches de souris employées (B6J, B6N, *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, *Ifnar1*<sup>-/-</sup>, *Aim2*<sup>-/-</sup>, *Aim2*<sup>-/-</sup>*Nlrp3*<sup>-/-</sup>) ne nécessitent de conditions particulières d'élevage. Les souris *Casp1*<sup>-/-</sup>*Casp11*<sup>-/-</sup> nous ont été sympathiquement données par l'équipe de Roméo Ricci (IGMBC) mais n'ont toutefois pas fait l'objet d'un maintien de lignée. Les procédures réalisées sont inscrites dans le cadre d'une saisine portant le n° 2018083014133041.

#### **Réactifs.**

##### A) Préparation des cristaux d'urate de sodium mono-hydratés.

Afin d'engendrer une pathologie murine reproduisant les caractéristiques de la crise de goutte humaine, les cristaux d'urate de sodium mono-hydratés (MSU en anglais pour *Mono-Sodium Urate crystals*) ont été cristallisés au laboratoire selon le protocole de **Schiltz, C et al. 2002**. 1,68g d'acide urique (Sigma Aldrich, U2875-5G) sont dissous à environ 73-75°C dans une solution de soude (NaOH) 0,01M et le pH a été équilibré entre 7,1 et 7,2. Le tout est laissé à température ambiante sous légère agitation jusqu'à obtention d'une épaisse couche de cristaux. Une fois la couche de cristaux obtenue, ils sont récoltés puis centrifugés (2000g, 5 min). Le culot de cristaux est repris dans de l'alcool pur et re-centrifugé afin d'effectuer un lavage. Cette étape est répétée, le surnageant éliminé au ¾, puis les cristaux sont disposés dans un bécher dont la large ouverture va alors permettre d'optimiser l'étape suivante : le séchage. Le bécher contenant les cristaux baignant dans quelques millilitres d'alcool est disposé dans un bain marie à 60°C pendant 2h environ afin d'évaporer l'éthanol ; Ce procédé a été accéléré par un pipetage prudent de l'alcool résiduel. Totalement secs, les cristaux sont pesés à l'aide d'une balance de précision (précise à 0,1mg près) et transvidés dans une bouteille de verre épais de 100mL fermée par un film en aluminium propre. La bouteille est

passée au four (250°C pendant 1h : dé-pyrogénéation) afin d'éliminer les éventuelles traces de substances pyrogènes (lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycanes) et les cristaux sont ensuite re-suspendus dans du dPBS stérile à une concentration de 25mg/mL. Après l'étape de dé-pyrogénéation, les cristaux sont soniqués à la faculté de Pharmacie (Laboratoire de biovectorologie) à l'aide d'un bain à sonication afin d'en diminuer la taille, les rendant adéquats en vue d'injections avec des aiguilles fines. Une validation au microscope optique est ensuite réalisée afin de s'assurer que tous les cristaux sont d'une taille convenable (moins de 50µm, vers 10µm de grand axe en moyenne). Ces derniers sont systématiquement manipulés de manière stérile et stockés à -20°C jusqu'à utilisation afin d'éviter toute contamination.

## B) Autres réactifs.

Au cours de ma thèse, d'autres réactifs ont été utilisés : les lipopolysaccharides (LPS) purs provenant de *Salmonella enterica abortus equi* (Sigma Aldrich), de l'Adénosine triphosphate (ATP) provenant de tissus musculaire (A5394, Sigma-Aldrich) et du poly-dA:dT, un ADN double-brin synthétique (tlrl-patn, Invivogen) lors des activations des inflammasomes NLRP3 et AIM2 *in vitro*. *In vivo*, nous avons fait usage de colchicine (C9754-100MG, Sigma-Aldrich), d'un inhibiteur des trois isoformes de PKD (CRT0066101, Tocris biosciences, Ref. 4975 (R&D)), d'une crème contenant 5% d'Imiquimod (ALDARA®, Meda pharma) ainsi que d'Etanercept (Enbrel, Pfizer) – un récepteur soluble au TNF $\alpha$  – qui nous a été fourni par le Dr. Christian Von Frenckel. L'Anakinra (Kineret®) a été obtenu grâce à Sullimann Omarjee (Equipe d'Alexandre Belot, Université de Lyon).

## 2. Le modèle d'inflammation aiguë uratique

Afin d'éliciter une « crise de goutte » similaire à celle retrouvée chez les patients, j'ai réalisé des injections sous-cutanées de cristaux de MSU produits selon le protocole détaillé ci-dessus (cf. section « réactifs »). Les cristaux sont injectés à raison de 3mg repris dans un volume de 70µL de dPBS (*phosphate buffered saline*) (Gibco) au niveau des faces dorsales des pattes de souris. Une patte est injectée avec les cristaux et la patte contra-latérale avec 70µL de dPBS comme contrôle interne. Ces injections sont réalisées sous anesthésie générale à l'aide d'un mélange de kétamine (80mg/kg) et de Xylazine (10mg/kg) injecté par voie intramusculaire. Ces injections sont réalisées avec des seringues à insuline (324892, Beckton-Dickinson) avec une gauge de 330µm.

Les souris développent successivement 1) une inflation importante à T0, d'origine mécanique

(due au volume injecté), 2) un retour à la normale (résorption du volume) sous 4h, 3) une inflammation intense (dès 8h, à son acmé entre 16 et 48-72h) puis 4) une phase de résolution de l'inflammation (après 72h, résolution quasi-totale entre 240 et 360h). Les cristaux finissent par disparaître totalement sous 30 jours en raison de la très faible uricémie des rongeurs (2-4mg/dL). La sévérité de l'inflammation aiguë uratique est suivie par des mesures réalisées à l'aide d'un pied à coulisse. Chaque patte est systématiquement mesurée plusieurs fois jusqu'à ce qu'une mesure X soit retrouvée 3 fois. Les pourcentages d'augmentation sont calculés, pour chaque souris, relativement à la mesure à T<sub>0</sub> (Augmentation à T<sub>X</sub> = ((Mesure à T<sub>X</sub> - mesure à T<sub>0</sub>)/mesure à T<sub>0</sub>) x 100).

En parallèle, un score clinique est attribué par deux expérimentateurs indépendants (l'un en aveugle) ; ce score tient compte de la rougeur de la patte considérée ainsi que du gonflement global. Des mesures de température corporelle ont aussi été systématiquement réalisées à l'aide d'un thermomètre à infra-rouge sur le bas du thorax au préalable rasé à J-1 des souris ; trois mesures ont été faites et la moyenne a été comptabilisée. La température moyenne d'une souris est de 37°C environ mais celle-ci peut atteindre plus de 40°C lors du pic inflammatoire (habituellement 39°C).

Lors des cinétiques d'inflammation aiguë uratique, les animaux sont suivis sur les points de temps précoces (0, 4, 8h), le pic (16, 24, 48 et 72h) ainsi que les phases décroissantes (96, 120, 144, 168, 192, 216 et 240h). Les analyses de l'expression des gènes inflammatoires sont effectuées sur des échantillons prélevés 8h post-injection, là où l'inflammation germe faisant suite à la phase de résorption (œdème d'origine mécanique) ; pour les analyses par western blot (immunoempreintes), celles-ci sont préférentiellement réalisées à 24h post-injection, temps où l'IL-1 $\beta$  est davantage exprimée. Pour ces deux expériences, les animaux sont d'abord euthanasiés selon les bonnes pratiques d'expérimentation animale (dislocation cervicale) puis les pattes-arrières sont sectionnées au-dessus de la cheville et congelées immédiatement dans des cryotubes plongés dans de la carboglace. Les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à analyse.

Par ailleurs, des collections de sang sont fréquemment réalisées, sous anesthésie générale (même posologie que pour l'induction de l'inflammation aiguë uratique), par voie rétro-orbitaire. Un volume de 250 $\mu$ L de sang est prélevé dans des microvettes (Sarstedt), centrifugé et le sérum est aliquoté dans des tubes *protein-low-bind* de 500 $\mu$ L (Eppendorf) et enfin congelé à -80°C jusqu'au jour de l'ELISA IL-1 $\beta$ .



**Traitements :** afin d'interférer avec le développement de l'inflammation aiguë uratique, plusieurs agents thérapeutiques ont été employés.

- La colchicine ou du PBS (solvant) a été employée à 1mg/kg à J0 puis 0,5mg/kg à J1 et injectée par voie sous-cutanée en accord avec la publication de **Torres, R. et al. 2009**.
- L'anakinra (ou du PBS) a été injecté à J0 et J1 à raison de 100mg/kg par voie intra-péritonéale
- L'Etanercept a été injecté à J0 à raison de 10mg/kg par voie intra-péritonéale en accord avec **Amaral, F. et al. 2016**.
- Le CRT0066101 a été injecté par voie intra-péritonéale à raison de 10mg/kg toutes les 12h jusqu'à 36h à commencer d'une heure avant le déclenchement de l'inflammation aiguë uratique (h-1, h12, h24, h36).
- La crème ALDARA® (imiquimod topique) a été appliquée, avec un léger massage, sur les pattes des souris à raison de 1/10 à 1/12<sup>ème</sup> de sachet (soit 20 à 25mg de crème) par patte soit 1 à 1,25mg d'imiquimod par patte. Cette application est réalisée directement après l'injection des cristaux et donc également sous les effets de l'anesthésie laissant le temps à la crème de pénétrer la peau. Cette procédure est réalisée à l'aide d'un stylo inclus dans un gant afin de réaliser l'application d'une manière sécurisée pour l'expérimentateur (à la manière de **Nehmar, R. et al. 2017**).

### 3. Analyse de l'inflammation locale par IRM

Afin de caractériser au mieux d'inflammation dans notre modèle d'inflammation aiguë uratique et de déterminer l'effet de la l'imiquimod topique (voir partie consacrée), nous avons utilisé l'imagerie par résonance magnétique (IRM) anatomique, réalisée sur 1 souris (Figure RS1) et 8 souris (Figure R5 et RS8) *ex-vivo*. Vingt-quatre heures avant l'examen par IRM, l'inflammation aiguë uratique est induite par injection de 3mg de MSU ou du dPBS par voie sous-cutanée dans les pattes gauches et droites respectivement. Dans le cadre de la manipulation incluant un traitement à l'imiquimod topique, quatre souris ont été traitées et les 4 autres souris ont reçu la crème contrôle. Les souris ont été sacrifiées sous anesthésie à l'isofluorane juste avant l'IRM. L'IRM est réalisée à l'aide d'un système 7/30 Biospec (Bruker Biospin, Ettlingen, Allemagne). La transmission est réalisée à l'aide d'un résonateur à volume de quadrature (diamètre interne de 86mm) et une bobine de surface (environ 10mm), installée sur la face inférieure des pattes, est utilisée pour la réception du signal (Bruker BioSpin, Ettlingen, Allemagne). Les expériences d'IRM sont réalisées avec le logiciel

ParaVision 6.0.1. Les jeux de données T2WI sont acquis en utilisant des séquences RARE-3D et en utilisant les paramètres suivants : FOV: 15 x 15 x 8 mm<sup>3</sup>, matrix 150 x 150 x 80, TE eff = 26.7 ms, TR = 2 s, N avg = 1, RARE-Factor = 14.

**Analyse des données.** Le biais de signal des jeux de données T2WI, induit par la bobine de surface utilisée, est corrigé à l'aide de 'N4 biais correction' (Advanced Normalization Tools, ANTs). Les pattes sont automatiquement co-enregistrées sur la base des os d'une souris contrôle en utilisant le programme FLIRT (FMRIB Software Library, Oxford, UK). Les régions inflammatoires sont automatiquement segmentées en utilisant le programme FAST (FMRIB Software Library, Oxford, UK). Les images volumétriques sont obtenues à l'aide du module *3D viewer* d'Image J. Les reconstructions 3D sont conduites à l'aide du logiciel *3D Slicer* : les hyper-signaux sont utilisés pour reconstruire les volumes d'œdème (sélection des pixels dont la valeur était égale à 1, la plus élevée), les hypo-signaux non assimilables à de l'os (cristaux de MSU) et les os eux-mêmes sont sélectionnés manuellement afin de construire les volumes de cristaux et les structures osseuses respectivement.

#### 4. Le modèle de péritonite au MSU

Dans ce modèle, les souris reçoivent une injection intra-péritonéale d'un milligramme de cristaux de MSU dilués dans 500µL de dPBS stérile. Cette injection est ensuite suivie, 6h plus tard, d'un lavage péritonéal sous anesthésie générale (Kétamine/xylazine par voie i.m.).

Pour ce lavage, les souris anesthésiées sont injectées avec 5mL de dPBS stérile dans la cavité péritonéale, puis, le liquide est collecté à l'aide d'une seringue de 5mL coiffée d'une aiguille de gauge 23G (aiguilles bleues). Les collections de liquide sont plongées dans la glace. Par la suite, les lavages péritonéaux sont centrifugés à 300g 4°C pendant 10min ; un millilitre de chaque surnageant est systématiquement collecté afin de réaliser des tests ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) (IL-6 et TNFα). Les culots sont repris dans du tampon FACS (dPBS 2% SVF (sérum de veau fœtal) 1mM EDTA (*ethylene-diamine tetra-acétique acid*), filtré avec une unité de filtration de porosité 0,2µm) et le tout passé sur un tamis de 40µm (Corning). Les préparations de cellules sont centrifugées à 300g 4°C 10min et les culots repris dans 3mL. La sévérité des péritonites est évaluée par la profondeur du recrutement de neutrophiles et la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNFα).

Pour la mesure de l'IL-1 $\beta$ , la procédure est un peu différente. Des péritonites sont réalisées par injection de 3mg de MSU par voie intra-péritonéale et le lavage est réalisé avec 2mL de dPBS 2h plus tard. Les collections sont centrifugées et les surnageants collectés dans des tubes eppendorf *protein-low-bind* de 1,5mL et congelés à -80°C jusqu'au jour de l'ELISA IL-1 $\beta$ .

## 5. Cytométrie en flux

Afin de quantifier proprement le recrutement des neutrophiles et des monocytes dans la cavité péritonéale dans le modèle de péritonite décrit ci-dessus, des expériences de cytométrie en flux ont été réalisées à l'aide du cytomètre BD Accuri C6.

A chaque fois, 200 $\mu$ L d'une préparation de cellules (passées sur tamis) sont disposés dans une plaque 96 puits à fonds coniques qui est centrifugée à 300g 4°C 10min afin de culoter les cellules. La plaque est ensuite renversée et on ajoute aux cellules 100 $\mu$ L de tampon FACS contenant 2 $\mu$ L de Fc block (anti-CD16/CD32, clone 2.4G2, 553142, BD bioscience) afin d'empêcher une fixation aspécifique des anticorps de marquage aux récepteurs RFc. Les cellules sont incubées avec cette solution pendant 15min à 4°C ; à l'issue de ce blocage, un mix d'anticorps de marquage est ajouté (anti-CD14, anti-GR1 et anti-CD11b, références voir **table 1**) et le tout est incubé à 4°C et à l'obscurité pendant 30min. A l'issue de ce marquage, la plaque est centrifugée comme précédemment et les culots re-suspendus dans du tampon FACS (200 $\mu$ L) et cette étape est répétée afin d'effectuer un cycle de lavage. Les tubes sont passés successivement au cytomètre, conjointement à 50 $\mu$ L de la préparation cellulaire initiale non marquée (compte des cellules totales).

Le passage des cellules non marquées permet d'obtenir un **nombre absolu de cellules** : Ainsi, si X cellules ont été comptées dans 50 $\mu$ L de la préparation de cellules, alors la cavité péritonéale contenait originellement  $X \times (60 \times 5/V)$  cellules ; V étant le volume collecté pendant le lavage, 5 correspondant aux 5mL de dPBS utilisés pour le lavage, 60 correspondant au facteur de correction (sachant que l'on compte 50 $\mu$ L sur 3mL soit 60 fois moins).

Le pourcentage de neutrophiles ou de monocyte est alors multiplié par le nombre obtenu ci-dessus pour donner le nombre total de neutrophiles/monocytes.

**Nombre absolu de Neutrophiles = % NEUTROPHILES x nombre absolu de cellules.**

La quantification des **neutrophiles (pourcentage)** par cytométrie en flux est faite sur la base de la positivité aux deux marqueurs CD11b et Gr1 parmi les cellules vivantes (7-AAD (7-amino-actinomycine D) négatives). Dans ce cas, une région logique est tout d'abord placée en FSC/SSC afin de discriminer les débris cellulaires et les globules rouges. Dans cette région (gate) est alors déterminée la population de cellules vivantes (7-AAD<sup>-</sup>) qui sont analysées pour ces deux marqueurs. Les neutrophiles infiltrés correspondent aux cellules CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>. Les monocytes infiltrés correspondaient aux cellules vivantes CD14<sup>+</sup>Gr1<sup>-</sup>.

## 6. Collecte des neutrophiles et macrophages péritonéaux de souris

Afin d'étudier, au niveau cellulaire, la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , nous avons dérivé des neutrophiles et des macrophages à partir de souris du génotype souhaité. Pour cela, les souris sont injectées avec 2mL d'une solution de thioglycolate 4% (BD) par voie intra-péritonéale ; de par ses propriétés irritantes, ce produit permet tout d'abord un influx de polynucléaires neutrophiles (premier jour), qui sont remplacés par des macrophages, laissant une population pratiquement pure à 72h. Ainsi, selon le point de temps auquel le prélèvement est effectué, nous pouvons soit récolter des neutrophiles (18h) soit des macrophages péritonéaux, en nombres très conséquents (20 à 50 millions de cellules). Les macrophages péritonéaux sont collectés après 72h de thioglycolate par un lavage péritonéal effectué sous anesthésie générale (Kétamine/Xylazine) par injection/ponction de 5mL de dPBS. Le liquide de ponction est mis sur glace, centrifugé à 300g 4°C 10min afin de culoter les cellules, les globules rouges sont lysés (Tampon de lyse : NH<sub>4</sub>Cl 0,83% (p/v), NaHCO<sub>3</sub> 0,1% (p/v), EDTA 0,1mM) et le culot est repris dans du milieu RPMI (*Roswell park memorial institute medium*) (Gibco, 72400-021) 10% SVF dé-complémenté (Dutscher) contenant de la pénicilline (100U/mL) et streptomycine (100 $\mu$ g/mL) (PS) (Sigma, P0781-100ML) et Amphotéricine B (F) (Fungisone, Gibco, 15290-018). Les cellules sont ensuite dénombrées à l'aide du bleu trypan (Gibco).

Pour les neutrophiles péritonéaux, le liquide de ponction est collecté 18h après injection selon la même procédure que ci-dessus. Le liquide est toutefois été complété jusqu'à 12mL et disposé (très doucement), dans un tube Falcon 50mL, sur 9mL de Ficoll paque (17-1440-03, GE Healthcare) ; le tout est centrifugé à 500g pendant 30min à 24°C sans frein ni accélération. A l'issue de cette étape, le surnageant est éliminé et le culot contenant les neutrophiles alors récupéré, lavé avec du RPMI 10% SVF (PS+F) ; Une lyse des globules rouges est éventuellement réalisée si quelques traces de sang se présentent lors du lavage

péritonéal (Tampon de lyse). Les cellules sont ensuite reprises dans du RPMI 10% SVF (PS+F) et dénombrées au bleu trypan. La pureté des cellules atteint 92% après cette procédure, ainsi évalué par des cytopins avec coloration au May Grünwald Giemsa (service d'Hématologie, Nouvel Hopital Civil, Strasbourg).

## 7. Culture des monocytes THP1 et des MEFs

Les monocytes THP1 sont cultivés dans du RPMI 10% SVF (+PS/F) à une densité de  $2,5 \times 10^5$  à  $1 \times 10^6$  cellules/mL dans des flasks de 25cm<sup>2</sup> (BD Falcon), les cellules sont passées régulièrement par centrifugation à 150g 5min 4°C etensemencées à une densité appropriée à leur croissance. En dehors des passages, du milieu est simplement ajouté aux flasks afin de remplacer les éléments nutritifs consommés par les cellules. Les MEFs sont cultivées dans des flasks de 25cm<sup>2</sup> avec du DMEM (*Dulbecco modified Eagle medium*) (Gibco, 31966-021) 10% SVF (+PS/F) et passées une fois la confluence atteinte. A cet effet, les cellules sont d'abord lavées avec du PBS puis incubées 5min avec un analogue de trypsine (Gibco, Triple express, 12605-010), centrifugées à 300g 10min 4°C puisensemencées dans de nouvelles flasks.

## 8. Activation des inflammasomes NLRP3 et AIM2

L'évaluation de l'activité des inflammasomes NLRP3 et AIM2 est réalisée sur les macrophages péritonéaux et celle de NLRP3 sur macrophages et neutrophiles péritonéaux. A cet effet, les cellules collectées selon le protocole détaillé dans la section précédente sont disposées sur une plaque de 24 puits à raison de  $5 \times 10^5$  cellules/mL (macrophages ou THP1) ou  $1 \times 10^6$  cellules/mL (neutrophiles). Les neutrophiles sont classiquement utilisés immédiatement tandis que les macrophages sont disposés sur plaque la veille et le milieu est changé 3h après.

### A) Activation de l'inflammasome NLRP3

L'activation de l'inflammasome NLRP3 est réalisée en changeant le milieu de culture pour du milieu RPMI 10% SVF (PS+F) contenant 1µg/mL de LPS et celui-ci est laissé tout le long de l'activation. Cette première étape correspond à une étape de « priming » durant laquelle le LPS permet l'activation du facteur de transcription NFκB à travers la signalisation TLR4. Les activateurs de l'inflammasome NLRP3 – ATP ou MSU – sont ensuite ajoutés 3h après l'ajout du LPS. L'ATP a été ajouté de sorte à obtenir une concentration finale de 2 ou 5mM selon les expériences, 250µg/mL final pour le MSU en général. L'ATP est ajouté pour des temps plutôt

courts (1h), le MSU est laissé 6h au contact des cellules afin d'obtenir une activation convenable.

Dans certaines expériences, le priming est plus long mais avec des doses plus faibles de LPS (0,1µg/mL). C'est le cas notamment pour les traitements à l'IFNβ (IFNβ humain recombinant (R&D, 8499-IF) et IFNβ murin recombinant (R&D, 8234-MB)) ; l'IFNβ est alors ajouté en même temps que le LPS 0,1µg/mL et ce pendant 12h, l'ajout de MSU est réalisé à l'issue de ce priming.

#### B) Activation de l'inflammasome AIM2

L'activation de l'inflammasome AIM2 est identique pour la première étape (LPS). Toutefois, au bout de 3h de prétraitement, les cellules sont transfectées au contact d'un mélange de poly-dA:dT (0,5µg) et de lipofectamine (kit lipofectamine 3000, L3000-015, thermo scientific) constitué selon les indications du fabricant. L'activation avec cette substance est réalisée sur 8h. Brièvement, le kit lipofectamine 3000 permet la transfection en utilisant la lipofectamine, un lipide cationique qui forme des liposomes autour de la substance à transférer. A cet effet, j'ai préparé deux mélanges : 1) lipofectamine dans du milieu Opti-MEM (*modified Eagle medium*) (Gibco, 31985-062), 2) ADN à transférer, 2µL de réactif P3000/µg d'ADN transfectant, le tout dans du milieu Opti-MEM ; le mélange 2) est ensuite ajouté en milieu 1) et le tout incubé à température ambiante pendant 15min. 50 microlitres de ce mélange sont alors ajoutés au milieu de culture contenant les macrophages alors prétraités.

A l'issue de la stimulation, les surnageants sont collectés, centrifugés à 2000g 4°C pendant 5min puis les surnageants (alors sans cellules) sont congelés à -80°C. Ces derniers sont analysés par des tests ELISA.

### 9. Tests de migration des neutrophiles

Afin d'évaluer la migration des neutrophiles en réponse aux stimuli générés par les macrophages, activés ou non, une expérience de migration a été réalisée. A cet effet,  $5 \times 10^5$  macrophages péritonéaux sont disposés au fond des puits d'une plaque de 24 puits (milieu RPMI 10% SVF) pendant une nuit. Le lendemain, les neutrophiles péritonéaux sont purifiés selon la méthode décrite précédemment (6.). Un système dénommé « chambres de Boyden » ou « système *transwell* » (8µm de porosité, Greiner, 662638) est ensuite employé et placé dans le puit en question, suspendu grâce à trois petits crochets en plastique.  $3 \times 10^4$  neutrophiles sont ensuite placés dans les chambres et ce dans du milieu RPMI sans SVF.

Dans les conditions NS, le milieu RPMI 10% SVF est changé pour du RPMI 10% SVF frais avant de poser la chambre de Boyden ; dans les conditions LPS, ce milieu est changé pour du RPMI 10% SVF 1µg/mL LPS. Les plaques sont ensuite laissées 24h à 37°C 5% CO<sub>2</sub>.

Après 24h, les différentes chambres de Boyden sont récupérées, trempées dans du PBS afin de rincer les dispositifs puis fixées au méthanol pur pendant 5min. Les chambres sont ensuite placées dans de l'eau mili-Q afin d'éliminer l'excès l'alcool puis marquées avec du DAPI (1/50 000<sup>ème</sup>) pendant 10min. Un dernier rinçage est ensuite effectué avec de l'eau. A chaque fois, ces incubations sont réalisées à température ambiante et dans des cuves en verre aux dimensions compatibles avec le rinçage concomitant de 16 chambres. Le comptage des neutrophiles est réalisé à l'aide d'un microscope inversé, 5 champs microscopiques aléatoires sont comptés et la moyenne est comptabilisée.

## 10. Expériences de transferts de surnageants

Des expériences de transferts de surnageants sont réalisées afin de rendre compte des effets de l'Imiquimod *in vitro*. Dans ce contexte, des fibroblastes murins (MEFs) sont mis en culture à une densité de 1x10<sup>5</sup> cellules/puits dans du DMEM 10% SVF (+PS/F) dans des plaques 24 puits de sorte à avoir assez de surnageant à transférer (1mL de surnageant pour un puit de macrophages receveurs). Les MEFs sont alors incubées pendant 4h à 37°C 5% CO<sub>2</sub> afin de les laisser adhérer.

Pendant ce temps, les macrophages péritonéaux sont préparés dans des plaques de 24 puits selon les modalités décrites dans la section ci-dessus.

Une fois toutes les MEFs adhérentes au plastique, le milieu est changé pour du RPMI 10% SVF (+PS/F) contenant 15µg/mL d'Imiquimod ou un volume équivalent de PBS pour une durée de 6h. Les surnageants sont ensuite collectés (rassemblés dans un falcon 50mL) et centrifugés à 2000g pendant 5min afin de culoter les débris cellulaires. Le surnageant est prélevé.

Ensuite, le milieu de culture des macrophages péritonéaux est éliminé et remplacé par le milieu issu des MEFs stimulés ou non. Le LPS est préalablement ajouté dans le milieu à transférer à une dose de 0,1µg/mL permettant ainsi d'effectuer l'étape de priming conjointement à l'incubation du surnageant transféré sur les cellules receveuses (macrophages). Cela permet ainsi d'observer l'interférence des surnageants transférés avec les

étapes de priming (production de la pro-forme de l'IL-1 $\beta$  par exemple). Les surnageants transférés (+/- LPS) sont incubés pendant 12h avec les macrophages receveurs, suivi de la stimulation avec les cristaux de MSU (250 $\mu$ g/mL) pendant 6h ou avec de l'ATP (2mM) pendant 1h; les surnageants sont alors collectés. Ils sont centrifugés individuellement à 2000g pendant 5min à 4°C et aliquotés afin de faire des surnageant *cell-free* et congelés à -80°C jusqu'au jour de l'ELISA.

## 11. Western blot

Afin de caractériser la production de l'IL-1 $\beta$  sous ses formes 1) mature de 17kDa ou 2) pro-forme de 31kDa, des *western-blot* sont réalisés sur des surnageants de culture cellulaire ou bien sur des tissus broyés dans un tampon adapté.

### a) Préparation des échantillons

Concernant les pattes de souris, j'ai procédé à un broyage des tissus. Tout d'abord, les pattes sont découpées congelées à l'aide d'un scalpel puis broyées dans 1mL de tampon lyse NP40 (150mM NaCl, 50mM Tris pH8, 1% NP40, 10% glycérol, 0,5mM EDTA et inhibiteur de protéases 1X (Roche, 11697498001)) à l'aide d'un broyeur à tissus (tissue-master 125, Omni international). Le lysat est ensuite placé sur glace pendant 45min avant d'être centrifugé à 12 000g 4°C pendant 20min. Le surnageant obtenu est collecté dans des tubes *protein-low-bind* et conservé à -80°C.

Pour les cellules, la lyse est réalisée par l'ajout direct du tampon de lyse NP40 sur les cellules et des allers-retours à l'aide d'une micropipette. Après 30min sous agitation et à 4°C, le tout est centrifugé à 12 000g pendant 20min puis les surnageants sont collectés dans des tubes *protein-low-bind* et conservés à -80°C.

### b) Quantification des protéines

Afin de déposer une quantité fixe de protéines sur gel, celles-ci sont dosées par la méthode BCA (*Bicinchoniniqu acid assay*) basée sur la réaction de l'acide bicinchoniniqu avec les protéines de l'échantillon, en présence d'ions cuivre.

Pour cela, une gamme est réalisée avec de la BSA (*bovine serum albumine*) : 0 à 1,25mg/mL ; 2,5 $\mu$ L de chaque échantillon (dilués au 1/20<sup>ème</sup>) ainsi que des différents points de gamme disposés (en dupliquas) dans une plaque 96 puits à fond plat. Ensuite, 22,5 $\mu$ L d'eau mili-Q puis 200 $\mu$ L d'une solution d'ions cuivre sont ajoutés et le tout est placé à 37°C pendant 30min. A l'issue de cette incubation, la plaque est mise à température ambiante pendant 5min



puis la densité optique à 570nm est lue. La quantité de protéines est ensuite déterminée à l'aide d'équation  $y = ax + b$  où  $y$  correspond à la quantité de protéine de l'échantillon,  $x$  au coefficient directeur de la courbe étalon et  $b$  l'ordonnée à l'origine de celle-ci.

#### c) Migration sur gel

Une fois la quantité de protéines déterminée, une dose constante de protéines est déposée sur gel. La dose déposée et la teneur en polyacrylamide du gel dépend du matériel biologique et de la protéine à détecter. Pour l'IL-1 $\beta$ , mesurée dans les tissus broyés, 75-100 $\mu$ g de protéines sont chargés afin d'avoir suffisamment de matériel en vue d'une détection optimale; pour les lysats cellulaires, 50 $\mu$ g sont suffisants. Pour cette protéine, des gels contenant 12% de polyacrylamide (1mm d'épaisseur) sont appropriés (Biorad, 161-0184). La migration est réalisée avec les paramètres suivants : 80V pendant 25min afin de permettre aux protéines d'entrer doucement dans le gel de concentration, puis 150V pendant 40min selon leur taille. La migration est réalisée dans un tampon tris-glycine SDS.

#### d) Transfert

A l'issue de la migration, les protéines contenues dans le gel de polyacrylamide sont transférées sur une membrane de PVDF (*poly-vinylidene Di-fluoride*) au cours d'un transfert liquide. A cet effet, un tampon Tris-Glycine Méthanol est utilisé et le transfert se déroule selon les paramètres suivant : 100V pendant 40min.

#### e) Saturation et marquage

Les membranes sont alors 1) marquées au rouge ponceau (5min sous agitation, 3 décolorations avec de l'eau) afin de vérifier l'homogénéité du dépôt, 2) saturées avec une solution de TBST (*Tris buffered saline*) 5% lait puis 3) marquées à l'aide d'un anticorps primaire puis secondaire contenus dans du TBST 5% lait, sur la nuit à 4°C et 1h à température ambiante respectivement. Les concentrations, les références ainsi que les conditions d'incubation des différents anticorps sont présentées dans la **table 1**. Entre chaque étape de marquage, 3 lavages de 20min chacun sont réalisés à l'aide de TBST.

#### f) Révélation

La révélation est effectuée à l'aide de deux kits différents : 1) ECL clarity (Biorad, 170-5061) et 2) Supersignal West-Femto (Thermo scientific, 34095) selon le marquage réalisé. Pour la forme mature de l'IL-1 $\beta$  (17kDa), le kit Femto est systématiquement employé, pour la pro-forme (31kDa), pour la tubuline et la vinculine, le premier kit est bien souvent suffisant.

Rapidement, les membranes sont coupées (ex : proforme et IL-1 $\beta$  mature, coupure au niveau de la bande 25kDa) puis séchées grossièrement avec un papier absorbant et couvertes immédiatement avec le substrat de révélation choisi. Cinq minutes plus tard, le gel est lu à l'aide de l'appareil ChemiDoc (Biorad). Le gel est d'abord imagé à l'aide du programme « *colorimetrics* » afin d'obtenir le gel avec le marqueur de taille puis à l'aide du programme « *Chemi-Hi-resolution* » afin d'en imagier les bandes. Le programme « *merge* » nous a permis de superposer les deux images afin d'obtenir les figures.

Une section BLOTS ENTIERS est présente dans les annexes du manuscrit ([Annexe 3](#)).

## 12. Tests ELISA

Afin de mesurer les taux d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6, de TNF $\alpha$  et de myéloperoxydase (MPO), des ELISA ont été pratiqués sur les surnageants de culture ou sur des tissus broyés. Ces tests ELISA sont réalisés à l'aide de kit DuoSet™ (R&D) utilisant une méthode dite « en sandwich »: des anticorps de « capture » sont fixés au fond des puits afin de lier leur cible contenue dans l'échantillon à doser. Des anticorps biotinylés (de révélation) reconnaissant alors cette dernière sont ajoutés, après quoi l'addition d'HRP (peroxydase de raifort) couplée à la streptavidine permet la liaison de l'enzyme aux anticorps de révélation. L'ajout du substrat (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine ou TMB) permet alors la révélation grâce à l'apparition d'une couleur bleue absorbant à 450 nm. La réaction est arrêtée simultanément pour tous les puits à l'aide d'acide chlorhydrique dénaturant l'enzyme et bloquant la transformation du TMB. Les échantillons sont dosés relativement à la gamme après application du calcul suivant :

**Concentration en pg/mL = (aDO (après correction) + b) x D**

- DO (après correction) = (DO<sub>450</sub>-DO<sub>570</sub>) échantillon-(DO<sub>450</sub>-DO<sub>570</sub>) 0pg (gamme)
- "a" correspond au coefficient directeur de la courbe étalon et "b" à l'ordonnée à l'origine.
- D correspond au facteur de dilution employé pour les échantillons testés

Pour réaliser le dosage ELISA mIL-1 $\beta$ , par exemple, des plaques de 96 puits (Thermo scientific) sont d'abord « coatées » par les anticorps de capture dilués au 1/120<sup>em</sup> (v/v) dans du PBS à raison de 100  $\mu$ L par puits. La plaque est ensuite laissée à température ambiante toute la nuit puis lavée à trois reprises à l'aide de tampon PBS 0,05% de Tween20 (v/v) (Sigma). Par la suite, les puits sont saturés avec 200  $\mu$ L de PBS contenant 1% (p/v) d'albumine bovine sérique (BSA) (Sigma) pendant 1h et à température ambiante. Après 3

lavages, les échantillons ainsi que la gamme (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 et 0 pg/mL d'IL-1 $\beta$ ) sont incubés pendant 2h à température ambiante. Après 3 lavages, du PBS 1% BSA contenant les anticorps biotinylés au 1/60<sup>ème</sup> (v/v) est ajouté à raison de 100  $\mu$ L par puits et la plaque est incubée pendant 2h à température ambiante. Après 3 lavages, 100  $\mu$ L de HRP-streptavidine diluée au 1/200<sup>ème</sup> (v/v) dans du PBS 1% BSA sont ajoutés et incubés pendant 20 min, puis 100  $\mu$ L de TMB (Thermo scientific) sont placés dans chaque puits et la réaction est arrêtée une fois la coloration bleue obtenue à l'aide de 50  $\mu$ L d'acide chlorhydrique 1N. La lecture de la plaque est réalisée sur un lecteur de plaque (Multiscan Ex, Thermo scientific) et à des longueurs d'onde de 450 et 570 nm.

### 13. Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR

#### a) Extraction des ARN totaux par la méthode Trizol-Chloroforme

Les extractions d'ARN totaux ont été réalisées à partir de deux types de matériels biologiques : 1) cellules ou 2) tissus complets. Alors que la lyse initiale des cellules est réalisée à l'aide de 800 $\mu$ L de Trizol en pratiquant quelques allers-retours avec la pipette, la lyse des tissus est plutôt analogue à celle réalisée pour l'extraction des protéines (section 11a). Pour cela, les pattes sont émincées à l'aide d'un scalpel et les morceaux transférés dans un tube en polypropylène de 5mL. Puis, un millilitre de Trizol est ajouté et le tissu est broyé à l'aide d'un appareil « Tissue master » permettant l'homogénéisation totale du tissu en question. Le tout est transféré en tube eppendorf 1,5mL.

Une fois la lyse réalisée, les échantillons sont traités de la même manière pour les étapes suivantes : Premièrement, 250 $\mu$ L de chloroforme sont ajoutés et le tout vortexé vigoureusement pendant 15-20 secondes ; après 3 minutes d'incubation à température ambiante, les tubes sont centrifugés à 12 000g pendant 15min à 4°C. A l'issue de cette centrifugation, trois phases sont distinctes : une phase protéique (inférieure), une phase aqueuse (supérieure) et une phase médiane contenant l'ADN génomique. La phase aqueuse est prélevée doucement (400-500 $\mu$ L) et collectée dans un nouveau tube eppendorf (*DNA low-bind, RNase free*) de 1,5mL. On ajoute 500 $\mu$ L d'isopropanol puis le tout est incubé à -20°C pendant 30min avant d'être centrifugé à 12 000g pendant 15min à 4°C. La présence d'un culot (massif si à partir de pattes) est alors souvent repérable. La phase liquide d'isopropanol est ensuite éliminée par renversement, laissant le culot d'ARN. Deux lavages à l'éthanol 75% sont réalisés, suivis d'une centrifugation à 7500g 5min 4°C. Enfin, l'éthanol est éliminé, le

culot partiellement séché et repris dans 15-20 $\mu$ L (si provenant de culots cellulaires) ou dans 60 $\mu$ L (pattes broyées) d'eau *RNase-free*. Les échantillons sont conservés à -80°C.

#### b) Dosage au Nanodrop et RT-PCR

La quantité d'ARN contenue dans les échantillons ainsi que leur pureté est déterminée par un dosage au NanoDrop 2000. Un ratio  $DO_{260nm}/DO_{280nm}$  supérieur à 1,6 est considéré comme acceptable. Une digestion à la DNase I est réalisée (Roche, 04716728001) en accord avec les instructions du fabricant (10U pour < 10 $\mu$ g d'ARN totaux, incubation à 25°C pendant 30min puis 5min à 75°C afin d'inactiver l'enzyme). L'étape de rétro-transcription est ensuite réalisée. Pour cela, les ARNs sont dilués (1 $\mu$ g d'ARN totaux dans 16 $\mu$ L d'eau DEPC (*di-éthyl pyro-carbonate*)) et on ajoute 4 $\mu$ L d'un mix contenant la transcriptase inverse, les oligo-dT et amorces dégénérées et les autres réactifs nécessaires à la réaction de PCR (Tampon, MgCl<sub>2</sub>, nucléotides) : kit *iScript ready-to-use cDNA synthesis* (Biorad, 1708841). La réaction est faite avec le programme suivant : 25°C pendant 5min afin d'activer l'enzyme, 46°C pendant 30min (élongation) et 95°C pendant 1min en vue de son inactivation. Les 20 $\mu$ L de réactifs obtenus sont conservés à -20°C jusqu'au moment de la qPCR.

#### c) qPCR et analyse

L'étape de PCR quantitative (qPCR) est réalisée sur des échantillons rétro-transcrits. Dans notre cas, ce procédé est réalisé à l'aide de Sybr-Green, une substance fluorescente capable de se lier au petit sillon de l'ADN ; dans ces conditions, chaque cycle d'amplification conduit à un doublement de la quantité d'ADN et donc de la fluorescence correspondante.

Chaque réaction est réalisée dans un volume final de 20 $\mu$ L contenant 10 $\mu$ L de Sybr-Green (Biorad, 172-5274), 8 $\mu$ L d'eau DEPC, 0,5 $\mu$ L de chacune des deux amorces utilisées et 1 $\mu$ L de l'échantillon à doser. A chaque fois, les gènes d'intérêt sont quantifiés en regard de l'ARN 18S, un gène de ménage fiable et fréquemment utilisé. Les réactions de qPCR ont été conduites à l'aide d'un thermocycleur Rotor Gene (Corbett research) avec un programme incluant une étape initiale de dénaturation à 95°C (30 secondes) suivie de 40 cycles (95°C pour la dénaturation (5s) et 60°C pour la phase d'élongation (20 secondes)).

Les amorces utilisées sont présentées dans la **table 2**.

Les résultats bruts sont analysés par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  afin de générer un « Fold Change » (FC). Pour cela, les résultats obtenus en CT (« *cycle threshold* ») des échantillons sont normalisés par rapport au gène de référence (ARN 18S) permettant le calcul d'un  $\Delta Ct$ . Un

$\Delta\Delta\text{CT}$  est ensuite calculé en soustrayant au  $\Delta\text{CT}$  de chaque échantillon, le  $\Delta\text{CT}$  moyen des échantillons contrôles correspondant. Le FC fut ensuite obtenu par la formule suivante :  $\text{FC} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ . Ce dernier correspond alors à l'augmentation de l'ARNm étudié dans une condition par rapport à une condition de référence; il affiche une valeur comprise entre 0 et 1 si l'expression du gène d'intérêt est réduite, 1 si elle est stable et  $>1$  en cas d'expression augmentée.

#### 14. Séquençage d'ARN

Le séquençage d'ARN a été réalisé à partir des ARN totaux extraits à partir des pattes de souris (pattes MSU et PBS) ayant reçu de l'imiquimod topique ( $n = 5$ ) ou de la crème contrôle ( $n = 5$ ). L'intégrité de l'ARN total est déterminée à l'aide du kit *Agilent total RNA Pico Kit* sur un Bio-analyseur 2100 (Agilent Technologies, Paolo Alto, USA). La construction des libraires est faite avec le kit *"SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit v2 - Pico Input Mammalian"* (TaKaRa Bio USA, Inc., Mountain View, CA, USA) avec un multiplexage final de 11 librairies en accord avec les instructions du fabricant. Le pool de librairies est alors dénaturé en accord avec le protocole Illumina *"Denature and Dilute Libraries Guide"* et ensuite déposé à une concentration finale de 1,3pM afin d'être séquençé sur NextSeq 500 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA).

Un jeu de données de transcriptome, composé des différents « reads » de séquençage, a alors été généré. L'objectif principal fut ici d'identifier les gènes différenciellement exprimés entre deux conditions expérimentales analysées (traitement et contrôle).

Pour chaque échantillon, un contrôle de qualité a été réalisé avec NGS Core Tools FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Les séquences des « reads » sont alignées à l'aide de STAR (Dobin, A. *et al.* 2013) et les « reads » non alignés l'ont été à nouveau à l'aide de Bowtie2 (Langmead, B. *et al.* 2012) en utilisant une l'option « *very sensitive local* ».

Les « reads » alignés totaux sont finalement disponibles en format BAM (*Binary Alignment Map*) pour ensuite extraire les données de comptage brutes. Ces comptes ont alors été réalisés par l'outil *htseq-count* de la librairie Python HTSeq (Anders, S. *et al.* 2015) avec les paramètres réglés par défaut afin de générer une matrice d'abondance. A l'étape finale, les analyses différentielles furent conduites à l'aide de DESEQ2 (Love, M.I. *et al.* 2014) de la suite de librairies « Bioconductor ». Les gènes différenciellement surexprimés et sous-

exprimés furent sélectionnés sur la base de leur valeur p ajustées et de l'estimation d'expression différentielle (fold-change).

## 15. Analyses statistiques et logiciels utilisés

### a) Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de GraphPad Prism 5 et incluent des tests de Mann-Whitney, réalisés en raison du nombre plutôt faible d'échantillons (moins de 10 en général, excepté pour certaines expériences (jusqu'à 15)). Ce test permet ainsi de comparer les échantillons de manière non paramétrique (sans hypothèse de répartition statistique au préalable).

### b) Logiciels utilisés

Les logiciels utilisés sont : **GraphPad Prism 5** pour la réalisation des graphiques et leurs statistiques associées ; **Adobe Illustrator CS6** pour les schémas (tous « fait-maison »), **BD Accuri C6** software pour les analyses de cytométrie en flux et **Image Lab** pour les *western-blot*. **3D Slicer** et **3D viewer** (ImageJ) ont été employés pour les analyses d'IRM.

**Table 1 : anticorps et kits ELISA**

Anticorps	référence	Clone	Dilution
Fc block	553142, BD biosciences	2,4G2	1µg/test
Gr1-FITC	11-5931-82, eBioscience	RB6-8C5	0,125µg/test
CD14-PE	12-0141-82, eBioscience	Sa2-8	0,2µg/test
CD11b-APC	17-0112-82, eBioscience	M1/70	0,125µg/test
Marqueur de mort	référence		Dilution
7-AAD	00-6993-50, eBioscience		3µL/test

1 test = cellules dans 100µL de Tp FACS

Anticorps	référence	Dilution	Incubation
Anti-IL-1β	AF-401 (R&D)	1/1000 <sup>ème</sup>	Sur la nuit à 4°C
Anti-vinculine	V9131, clone hVIN1 (Sigma)	1/200 <sup>ème</sup>	1h à RT
Anti-tubuline	DMT1 (Abcam, Ab7291)	1/2000 <sup>ème</sup>	1h à RT
Ac secondaire Goat anti-mouse- HRP	170-6516 (Biorad)	1/5000 <sup>ème</sup>	1h à RT
Ac donkey anti- goat - HRP	HAF109 (R&D)	1/1000 <sup>ème</sup>	1h à RT

kits ELISA	Références
IL-1β souris	DY401, R&D
IL-6 souris	DY406, R&D
TNFα souris	DY410, R&D
MPO souris	DY3667, R&D
IFNβ souris	42400-1, Pbl assay science
IL-1β humain	DY201, R&D

**Table 2 : Amorces employées lors des mesures par RT-qPCR**

<b>Gènes</b>	<b>Amorces sens (5' --&gt; 3')</b>	<b>Amorces antisens (5'--&gt;3')</b>
<i>ARN18S</i>	GGGAGCCTGAGAAACGGC	GGGTCGGGAGTGGGTAATTT
<i>Gapdh</i>	GTGAACGGATTTGGCCG	TCGCTCCTGGAAGATGG
<i>Aim2</i>	AGGCAGTGGGAACAAGACAG	AAACTTCCTGACGCCACCC
<i>Casp1</i>	CTTGGAGACATCCTGTCAAGG	AGTCACAAGACCAGGCATATTC
<i>Cd14</i>	GGAAGCCAGAGAACCATC	CCAGAAGCAACAGCAACAAG
<i>Cxcl1</i>	GGCTGGGATTCACCTCAAGAACAT	AAGCCTCGCGACCATTCTTGA
<i>Cxcl2</i>	CTGAACAAAGGCAAGGCTAACTGAC	CTTCCCGGGTGCTGTTTGT
<i>Ifit1</i>	CAACTGAGGACATCCCGAAACA	ATGTGGGCCTCAGTTTCAAAGT
<i>Ifna2</i>	TGTGCTTTCCTCGTGATGCTGA	AAGGCCCTCTTGTTCTGAGGTTA
<i>Ifna4</i>	CCTGGTAATGATGAGCTACTACTGGT	ATTTCTTCCAGGACTGTCAAGGC
<i>Ifnar1</i>	CCGCTGACTGTGTACTGTG	ATTTCCAGACGCTCCTCAA
<i>Ifnar2</i>	TCTCTGCCGTCGGTCTCCT	AGGCTCGCAGACACCACAAG
<i>Ifnb</i>	TCCAAGAAAGGACGAACATTTCG	TGAGGACATCTCCACGTCAA
<i>Il1a</i>	TGAGTTTTGGTGTTTCTGGC	TCGGGAGGAGACGACTCTAA
<i>Il1b</i>	AATTGGTCATAGCCCCTCACT	AAGCAATGTGCTGGTGCTTC
<i>Il6</i>	ATGAACAACGATGATGCACTTG	TATCCAGTTTGGTAGCATCCAT
<i>Il12</i>	CGCCACACAAATGGATGCAA	TGGCACGATGGAACCTGTCT
<i>Il18</i>	TCCTTGAAGTTGACGCAAGA	CTTCTGCAACCTCCAGCATC
<i>Il28</i>	AGGGTGCCATCGAGAAGAG	GTGGTCAGGGCTGAGTCATT
<i>Il33</i>	GGCTGCATGCCAACGACAAGG	AAGGCCTGTTCCGGAGGCCGA
<i>Irf7</i>	CCCATCTTCGACTTCAGCAC	TGTAGTGTGGTGACCCTTGC
<i>Irgam</i>	TGCTGCGAAGATCCTAGTTG	CCCCAATTACGTAGCGAATG
<i>Mx1</i>	CCAGGTCCTGCTCCACAC	TCTGAGGAGAGCCAGACGAT
<i>Mx2</i>	CAGGGAGTCGATGAGGTCAA	CTTACCCAGTGGAGAGACGG
<i>Nlrp3</i>	ATCAACAGGCGAGACCTCTG	GTCCTCCTGGCATACCATAG
<i>Tnfa</i>	CTACTCCAGGTTCTCTTCAA	GCAGAGAGGAGGTTGACTTTC

# **BIBLIOGRAPHIE**





## Bibliographie

- Abate, M., Schiavone, C., Salini, V., and Andia, I. (2013). Occurrence of tendon pathologies in metabolic disorders. *Rheumatology (Oxford)* 52, 599–608.
- Abhishek, A., Roddy, E., and Doherty, M. (2017). Gout – a guide for the general and acute physicians. *Clinical Medicine* 17, 54–59.
- Adamopoulos, I.E., and Mellins, E.D. (2015). Alternative pathways of osteoclastogenesis in inflammatory arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 11, 189–194.
- Adriaansen, J., Kuhlman, R.R., Holten, J.V., Kaynor, C., Vervoordeldonk, M.J.B.M., and Tak, D.P.P. (2006). Intraarticular Interferon- $\beta$  Gene Therapy Ameliorates Adjuvant Arthritis in Rats. *Human Gene Therapy* 17, 985–996.
- Aganna, E., Martinon, F., Hawkins, P.N., Ross, J.B., Swan, D.C., Booth, D.R., Lachmann, H.J., Gaudet, R., Woo, P., Feighery, C., et al. (2002). Association of mutations in the NALP3/CIAS1/PYPAF1 gene with a broad phenotype including recurrent fever, cold sensitivity, sensorineural deafness, and AA amyloidosis. *Arthritis & Rheumatism* 46, 2445–2452.
- 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.
- Alivernini, S., Gremese, E., McSharry, C., Tolusso, B., Ferraccioli, G., McInnes, I.B., and Kurowska-Stolarska, M. (2017). MicroRNA-155 at the Critical Interface of Innate and Adaptive Immunity in Arthritis. *Front Immunol* 8, 1932.
- Allaey, I., Rusu, D., Picard, S., Pouliot, M., Borgeat, P., and Poubelle, P.E. (2011). Osteoblast retraction induced by adherent neutrophils promotes osteoclast bone resorption: implication for altered bone remodeling in chronic gout. *Laboratory Investigation* 91, 905–920.
- Allen, I.C., McElvania-TeKippe, E., Wilson, J.E., Lich, J.D., Arthur, J.C., Sullivan, J.T., Braunstein, M., and Ting, J.P.Y. (2013). Characterization of NLRP12 during the in vivo host immune response to *Klebsiella pneumoniae* and *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* 8, e60842.

- Amaral, F.A., Costa, V.V., Tavares, L.D., Sachs, D., Coelho, F.M., Fagundes, C.T., Soriani, F.M., Silveira, T.N., Cunha, L.D., Zamboni, D.S., et al. (2012). NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B4 in a murine model of gout. *Arthritis & Rheumatism* *64*, 474–484.
- Amaral, F.A., Bastos, L.F.S., Oliveira, T.H.C., Dias, A.C.F., Oliveira, V.L.S., Tavares, L.D., Costa, V.V., Galvão, I., Soriani, F.M., Szymkowski, D.E., et al. (2016). Transmembrane TNF- $\alpha$  is sufficient for articular inflammation and hypernociception in a mouse model of gout: Innate immunity. *European Journal of Immunology* *46*, 204–211.
- An, L.-L., Mehta, P., Xu, L., Turman, S., Reimer, T., Naiman, B., Connor, J., Sanjuan, M., Kolbeck, R., and Fung, M. (2014). Complement C5a potentiates uric acid crystal-induced IL-1 $\beta$  production: Innate immunity. *European Journal of Immunology* *44*, 3669–3679.
- Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* *31*, 166–169.
- Arend, W.P., Palmer, G., and Gabay, C. (2008). IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunological Reviews* *223*, 20–38.
- Barabé, F., Gilbert, C., Liao, N., Bourgoin, S.G., and Naccache, P.H. (1998). Crystal-induced neutrophil activation VI. Involvement of Fc $\gamma$ RIIIB (CD16) and CD11b in response to inflammatory microcrystals. *FASEB J.* *12*, 209–220.
- Bardin, T., and Richette, P. (2017). Impact of comorbidities on gout and hyperuricaemia: an update on prevalence and treatment options. *BMC Med* *15*.
- Barnett, R. (2012). Bitter medicine: gout and the birth of the cocktail. *The Lancet* *379*, 1384–1385.
- Bartok, B., and Firestein, G.S. (2010). Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* *233*, 233–255.
- Bassoy, E.Y., Towne, J.E., and Gabay, C. (2018). Regulation and function of interleukin-36 cytokines. *Immunological Reviews* *281*, 169–178.
- Bauernfeind, F., Rieger, A., Schildberg, F.A., Knolle, P.A., Schmid-Burgk, J.L., and Hornung, V. (2012). NLRP3 Inflammasome Activity Is Negatively Controlled by miR-223. *The Journal of Immunology* *189*, 4175–4181.

- Baum, R., Sharma, S., Carpenter, S., Li, Q.-Z., Busto, P., Fitzgerald, K.A., Marshak-Rothstein, A., and Gravallesse, 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.
- Bernstein, D.I., Harrison, C.J., Tepe, E.R., Shahwan, A., and Miller, R.L. (1995). Effect of imiquimod as an adjuvant for immunotherapy of genital HSV in guinea-pigs. *Vaccine* *13*, 72–76.
- Bhattacharjee, S. (2009). A brief history of gout. *International Journal of Rheumatic Diseases* *12*, 61–63.
- Bottini, N., and Firestein, G.S. (2013). Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol* *9*, 24–33.
- Boutet, M.-A., Najm, A., Bart, G., Brion, R., Touchais, S., Trichet, V., Layrolle, P., Gabay, C., Palmer, G., Blanchard, F., et al. (2017). IL-38 overexpression induces anti-inflammatory effects in mice arthritis models and in human macrophages in vitro. *Annals of the Rheumatic Diseases* *76*, 1304–1312.
- Bowen-Davies, Z., Muller, S., Mallen, C.D., Hayward, R.A., and Roddy, E. (2018). Gout Severity, Socioeconomic Status, and Work Absence: A Cross-Sectional Study in Primary Care. *Arthritis Care & Research* *70*, 1822–1828.
- Brandolini, L., Bertini, R., Bizzarri, C., Sergi, R., Caselli, G., Zhou, D., Locati, M., and Sozzani, S. (1996). IL-1 $\beta$  primes IL-8-activated human neutrophils for elastase release, phospholipase D activity, and calcium flux. *Journal of Leukocyte Biology* *59*, 427–434.
- 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. *Nature Immunology* *10*, 266–272.
- Cai, S., Batra, S., Del Piero, F., and Jeyaseelan, S. (2016). NLRP12 modulates host defense through IL-17A–CXCL1 axis. *Mucosal Immunology* *9*, 503–514.
- Campillo-Gimenez, L., Renaudin, F., Jalabert, M., Gras, P., Gosset, M., Rey, C., Sarda, S., Collet, C., Cohen-Solal, M., Combes, C., et al. (2018). Inflammatory Potential of Four Different

Phases of Calcium Pyrophosphate Relies on NF- $\kappa$ B Activation and MAPK Pathways. *Front Immunol* 9, 2248.

Cavalli, G., Koenders, M., Kalabokis, V., Kim, J., Tan, A.C., Garlanda, C., Mantovani, A., Dagna, L., Joosten, L.A.B., and Dinarello, C.A. (2016). Treating experimental arthritis with the innate immune inhibitor interleukin-37 reduces joint and systemic inflammation. *Rheumatology* 55, 2220–2229.

Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kronheim, S.R., Druck, T., and Cannizzaro, L.A. (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256, 97–100.

Chang, S.-J., Chen, C.-J., Tsai, F.-C., Lai, H.-M., Tsai, P.-C., Tsai, M.-H., and Ko, Y.-C. (2008). Associations between gout tophus and polymorphisms 869T/C and -509C/T in transforming growth factor beta1 gene. *Rheumatology (Oxford)* 47, 617–621.

Chapman, P.T., Yarwood, H., Harrison, A.A., Stocker, C.J., Jamar, F., Gundel, R.H., Peters, A.M., and Haskard, D.O. (1997). Endothelial activation in monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. In vitro and in vivo studies on the roles of tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-1. *Arthritis & Rheumatism* 40, 955–965.

Chatfield, S.M., Grebe, K., Whitehead, L.W., Rogers, K.L., Nebl, T., Murphy, J.M., and Wicks, I.P. (2018). Monosodium Urate Crystals Generate Nuclease-Resistant Neutrophil Extracellular Traps via a Distinct Molecular Pathway. *The Journal of Immunology* ji1701382.

Chen, C.-J. (2006). MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *Journal of Clinical Investigation* 116, 2262–2271.

Chen, K.W., Bezbradica, J.S., Groß, C.J., Wall, A.A., Sweet, M.J., Stow, J.L., and Schroder, K. (2016). The murine neutrophil NLRP3 inflammasome is activated by soluble but not particulate or crystalline agonists. *Eur. J. Immunol.* 46, 1004–1010.

Chhana, A., and Dalbeth, N. (2015). The gouty tophus: a review. *Curr Rheumatol Rep* 17, 19.

Chi, H., Li, C., Zhao, F.S., Zhang, L., Ng, T.B., Jin, G., and Sha, O. (2017). Anti-tumor Activity of Toll-Like Receptor 7 Agonists. *Front Pharmacol* 8, 304.

- Choi, H.K., Ford, E.S., Li, C., and Curhan, G. (2007). Prevalence of the metabolic syndrome in patients with gout: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis Rheum.* *57*, 109–115.
- Choi, H.K., Niu, J., Neogi, T., Chen, C.A., Chaisson, C., Hunter, D., and Zhang, Y. (2015). Nocturnal Risk of Gout Attacks: Time of Day and Risk of Gout Attacks. *Arthritis & Rheumatology* *67*, 555–562.
- Clancy, D.M., Henry, C.M., Sullivan, G.P., and Martin, S.J. (2017). Neutrophil extracellular traps can serve as platforms for processing and activation of IL-1 family cytokines. *The FEBS Journal* *284*, 1712–1725.
- Coeshott, C., Ohnemus, C., Pilyavskaya, A., Ross, S., Wieczorek, M., Kroona, H., Leimer, A.H., and Cheronis, J. (1999). presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *6*.
- Cruz, C.M., Rinna, A., Forman, H.J., Ventura, A.L.M., Persechini, P.M., and Ojcius, D.M. (2007). ATP Activates a Reactive Oxygen Species-dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 2871–2879.
- Dagenais, M., Skeldon, A., and Saleh, M. (2012). The inflammasome: in memory of Dr. Jurg Tschopp. *Cell Death & Differentiation* *19*, 5–12.
- Dalbeth, N., Smith, T., Nicolson, B., Clark, B., Callon, K., Naot, D., Haskard, D.O., McQueen, F.M., Reid, I.R., and Cornish, J. (2008). Enhanced osteoclastogenesis in patients with tophaceous gout: Urate crystals promote osteoclast development through interactions with stromal cells. *Arthritis & Rheumatism* *58*, 1854–1865.
- Dalbeth, N., Pool, B., Shaw, O.M., Harper, J.L., Tan, P., Franklin, C., House, M.E., Cornish, J., and Naot, D. (2015). Role of miR-146a in regulation of the acute inflammatory response to monosodium urate crystals. *Ann. Rheum. Dis.* *74*, 786–790.
- Dalbeth, N., Merriman, T.R., and Stamp, L.K. (2016). Gout. *The Lancet* *388*, 2039–2052.
- de Almeida, L., Khare, S., Misharin, A.V., Patel, R., Ratsimandresy, R.A., Wallin, M.C., Perlman, H., Greaves, D.R., Hoffman, H.M., Dorfleutner, A., et al. (2015). The PYRIN Domain-only Protein POP1 Inhibits Inflammasome Assembly and Ameliorates Inflammatory Disease. *Immunity* *43*, 264–276.

- Desai, J., Foresto-Neto, O., Honarpisheh, M., Steiger, S., Nakazawa, D., Popper, B., Buhl, E.M., Boor, P., Mulay, S.R., and Anders, H.-J. (2017). Particles of different sizes and shapes induce neutrophil necroptosis followed by the release of neutrophil extracellular trap-like chromatin. *Scientific Reports* 7.
- Desaulniers, P., Fernandes, M., Gilbert, C., Bourgoin, S.G., and Naccache, P.H. (2001). Crystal-induced neutrophil activation. VII. Involvement of Syk in the responses to monosodium urate crystals. *J. Leukoc. Biol.* 70, 659–668.
- Di Giovine, F.S., Malawista, S.E., Nuki, G., and Duff, G.W. (1987). Interleukin 1 (IL 1) as a mediator of crystal arthritis. Stimulation of T cell and synovial fibroblast mitogenesis by urate crystal-induced IL 1. *J. Immunol.* 138, 3213–3218.
- Di Micco, A., Frera, G., Lugrin, J., Jamilloux, Y., Hsu, E.-T., Tardivel, A., De Gassart, A., Zaffalon, L., Bujisic, B., Siegert, S., et al. (2016). AIM2 inflammasome is activated by pharmacological disruption of nuclear envelope integrity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, E4671–E4680.
- Dinarello, C.A. (1986). Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *Journal of Experimental Medicine* 163, 1433–1450.
- Dinarello, C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095–2147.
- Dinarello, C.A., and Bernheim, H.A. (1982). Ability of Human Leukocytic Pyrogen to Stimulate Brain Prostaglandin Synthesis In Vitro. *Journal of Neurochemistry* 37, 702–708.
- Dinarello, C., Arend, W., Sims, J., Smith, D., Blumberg, H., O’Neill, L., Goldbach-Mansky, R., Pizarro, T., Hoffman, H., Bufler, P., et al. (2010). IL-1 family nomenclature. *Nat Immunol* 11, 973.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21.
- Dostert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B.T., and Tschopp, J. (2008). Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica. *Science* 320, 674–677.

- Dostert, C., Guarda, G., Romero, J.F., Menu, P., Gross, O., Tardivel, A., Suva, M.-L., Stehle, J.-C., Kopf, M., Stamenkovic, I., et al. (2009). Malarial Hemozoin Is a Nalp3 Inflammasome Activating Danger Signal. *PLoS ONE* 4, e6510.
- Drobits, B., Holcmann, M., Amberg, N., Swiecki, M., Grundtner, R., Hammer, M., Colonna, M., and Sibilica, M. (2012). Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J. Clin. Invest.* 122, 575–585.
- 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.
- Elliott, E.I., and Sutterwala, F.S. (2015). Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. *Immunological Reviews* 265, 35–52.
- Ellwanger, K., and Hausser, A. (2013). Physiological functions of protein kinase D *in vivo*. *IUBMB Life* 65, 98–107.
- Faires, J., and Mccarty, D. (1962). Acute arthritis in man and dog after intrasynovial injection of sodium urate crystals. *The Lancet* 280, 682–685.
- 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.
- Fields, T.R., Abramson, S.B., Weissmann, G., Kaplan, A.P., and Ghebrehiwet, B. (1983). Activation of the alternative pathway of complement by monosodium urate crystals. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 26, 249–257.
- Gabay, C., Smith, M.F., Eidlen, D., and Arend, W.P. (1997). Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. *Journal of Clinical Investigation* 99, 2930–2940.
- Gabay, C., Marinova-Mutafchieva, L., Williams, R.O., Gigley, J.P., Butler, D.M., Feldmann, M., and Arend, W.P. (2001). Increased production of intracellular interleukin-1 receptor antagonist type I in the synovium of mice with collagen-induced arthritis: A possible role in the resolution of arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 44, 451–462.
- Gabay, C., Lamacchia, C., and Palmer, G. (2010). IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nature Reviews Rheumatology* 6, 232–241.



Gaidt, M.M., Ebert, T.S., Chauhan, D., Ramshorn, K., Pinci, F., Zuber, S., O'Duill, F., Schmid-Burgk, J.L., Hoss, F., Buhmann, R., et al. (2017). The DNA Inflammasome in Human Myeloid Cells Is Initiated by a STING-Cell Death Program Upstream of NLRP3. *Cell* *171*, 1110–1124.e18.

Giclas, P.C., Ginsberg, M.H., and Cooper, N.R. (1979). Immunoglobulin G independent activation of the classical complement pathway by monosodium urate crystals. *J. Clin. Invest.* *63*, 759–764.

Girard-Guyonvarc'h, C., Palomo, J., Martin, P., Rodriguez, E., Troccaz, S., Palmer, G., and Gabay, C. (2018). Unopposed IL-18 signaling leads to severe TLR9-induced macrophage activation syndrome in mice. *Blood* *131*, 1430–1441.

Goldberg, E.L., Asher, J.L., Molony, R.D., Shaw, A.C., Zeiss, C.J., Wang, C., Morozova-Roche, L.A., Herzog, R.I., Iwasaki, A., and Dixit, V.D. (2017).  $\beta$ -Hydroxybutyrate Deactivates Neutrophil NLRP3 Inflammasome to Relieve Gout Flares. *Cell Rep* *18*, 2077–2087.

Gordon, T.P., Kowanko, I.C., James, M., and Roberts-Thomson, P.J. (1985). Monosodium urate crystal-induced prostaglandin synthesis in the rat subcutaneous air pouch. *Clin. Exp. Rheumatol.* *3*, 291–296.

Gray, E.E., Winship, D., Snyder, J.M., Child, S.J., Geballe, A.P., and Stetson, D.B. (2016). The AIM2-like Receptors Are Dispensable for the Interferon Response to Intracellular DNA. *Immunity* *45*, 255–266.

Grenier, J.M., Wang, L., Manji, G.A., Huang, W.-J., Al-Garawi, A., Kelly, R., Carlson, A., Merriam, S., Lora, J.M., Briskin, M., et al. (2002). Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF- $\kappa$ B and caspase-1. *FEBS Letters* *530*, 73–78.

Greten, F.R., Arkan, M.C., Bollrath, J., Hsu, L.-C., Goode, J., Miething, C., Göktuna, S.I., Neuenhahn, M., Fierer, J., Paxian, S., et al. (2007). NF- $\kappa$ B Is a Negative Regulator of IL-1 $\beta$  Secretion as Revealed by Genetic and Pharmacological Inhibition of IKK $\beta$ . *Cell* *130*, 918–931.

Groß, C.J., Mishra, R., Schneider, K.S., Médard, G., Wettmarshausen, J., Dittlein, D.C., Shi, H., Gorke, O., Koenig, P.-A., Fromm, S., et al. (2016). K<sup>+</sup> Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. *Immunity* *45*, 761–773.

- 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.
- Guarda, G., Dostert, C., Staehli, F., Cabalzar, K., Castillo, R., Tardivel, A., Schneider, P., and Tschopp, J. (2009). T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes. *Nature* 460, 269–273.
- Guarda, G., Braun, M., Staehli, F., Tardivel, A., Mattmann, C., Förster, I., Farlik, M., Decker, T., Du Pasquier, R.A., Romero, P., et al. (2011). Type I Interferon Inhibits Interleukin-1 Production and Inflammasome Activation. *Immunity* 34, 213–223.
- Guerne, P.-A., Terkeltaub, R., Zuraw, B., and Lotz, M. (1989). Inflammatory microcrystals stimulate interleukin-6 production and secretion by human monocytes and synoviocytes. *Arthritis & Rheumatism* 32, 1443–1452.
- 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 & Rheumatism* 60, 3642–3650.
- Hall, C.J., Sanderson, L.E., Lawrence, L.M., Pool, B., van der Kroef, M., Ashimbayeva, E., Britto, D., Harper, J.L., Lieschke, G.J., Astin, J.W., et al. (2018). Blocking fatty acid–fueled mROS production within macrophages alleviates acute gouty inflammation. *Journal of Clinical Investigation* 128, 1752–1771.
- Harris, J., Hartman, M., Roche, C., Zeng, S.G., O’Shea, A., Sharp, F.A., Lambe, E.M., Creagh, E.M., Golenbock, D.T., Tschopp, J., et al. (2011). Autophagy Controls IL-1 $\beta$  Secretion by Targeting Pro-IL-1 $\beta$  for Degradation. *Journal of Biological Chemistry* 286, 9587–9597.
- Harrison, C.J., Janski, L., Voychekovski, T., and Bernstein, D.I. (1988). Modification of immunological responses and clinical disease during topical R-837 treatment of genital HSV-2 infection. *Antiviral Res.* 10, 209–223.

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.

Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 3, 196–200.

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. *Nature Genetics* 29, 301–305.

Hoffman, H.M., Scott, P., Mueller, J.L., Misaghi, A., Stevens, S., Yancopoulos, G.D., Murphy, A., Valenzuela, D.M., and Liu-Bryan, R. (2010). Role of the leucine-rich repeat domain of cryopyrin/NALP3 in monosodium urate crystal-induced inflammation in mice. *Arthritis Rheum.* 62, 2170–2179.

van Holten, J., Reedquist, K., Sattonet-Roche, P., Smeets, T.J.M., Plater-Zyberk, C., Vervoordeldonk, M.J., and Tak, P.P. (2004). Treatment with recombinant interferon-beta reduces inflammation and slows cartilage destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 6, R239-249.

Hornung, V., and Latz, E. (2010). Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation. *European Journal of Immunology* 40, 620–623.

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. *Nature Immunology* 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.

Hu, B., Jin, C., Li, H.-B., Tong, J., Ouyang, X., Cetinbas, N.M., Zhu, S., Strowig, T., Lam, F.C., Zhao, C., et al. (2016). The DNA-sensing AIM2 inflammasome controls radiation-induced cell death and tissue injury. *Science* 354, 765–768.

Huang, Y., Jiang, H., Chen, Y., Wang, X., Yang, Y., Tao, J., Deng, X., Liang, G., Zhang, H., Jiang, W., et al. (2018). Tranilast directly targets NLRP3 to treat inflammasome-driven diseases. *EMBO Mol Med* 10.

- Ichinohe, T., Pang, I.K., and Iwasaki, A. (2010). Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nature Immunology* *11*, 404–410.
- Ip, W.K.E., and Medzhitov, R. (2015). Macrophages monitor tissue osmolarity and induce inflammatory response through NLRP3 and NLRC4 inflammasome activation. *Nat Commun* *6*, 6931.
- Irmeler, M., Hertig, S., MacDonald, H.R., Sadoul, R., Becherer, J.D., Proudfoot, A., Solari, R., and Tschopp, J. (1995). Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. *J. Exp. Med.* *181*, 1917–1922.
- Ittner, A., Block, H., Reichel, C.A., Varjosalo, M., Gehart, H., Sumara, G., Gstaiger, M., Krombach, F., Zarbock, A., and Ricci, R. (2012). Regulation of PTEN activity by p38 $\delta$ -PKD1 signaling in neutrophils confers inflammatory responses in the lung. *The Journal of Experimental Medicine* *209*, 2229–2246.
- 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.
- Jamilloux, Y., Bourdonnay, E., Gerfaud-Valentin, M., Py, B.F., Lefeuvre, L., Barba, T., Broussolle, C., Henry, T., and Sève, P. (2018). [Interleukin-1, inflammasome and autoinflammatory diseases]. *Rev Med Interne* *39*, 233–239.
- Jansen, T.L. (2015). Gout: cartoonized and bagatellized and still left untreated. Time to change. *Clinical Rheumatology* *34*, 1317–1319.
- Jéru, I., Duquesnoy, P., Fernandes-Alnemri, T., Cochet, E., Yu, J.W., Lackmy-Port-Lis, M., Grimprel, E., Landman-Parker, J., Hentgen, V., Marlin, S., et al. (2008). Mutations in NALP12 cause hereditary periodic fever syndromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 1614–1619.
- Jéru, I., Hentgen, V., Normand, S., Duquesnoy, P., Cochet, E., Delwail, A., Grateau, G., Marlin, S., Amselem, S., and Lecron, J.-C. (2011). Role of interleukin-1 $\beta$  in NLRP12-associated autoinflammatory disorders and resistance to anti-interleukin-1 therapy. *Arthritis Rheum.* *63*, 2142–2148.
- Jhang, J.-J., Cheng, Y.-T., Ho, C.-Y., and Yen, G.-C. (2015). Monosodium urate crystals trigger Nrf2- and heme oxygenase-1-dependent inflammation in THP-1 cells. *Cellular & Molecular Immunology* *12*, 424–434.

- Jiang, H., He, H., Chen, Y., Huang, W., Cheng, J., Ye, J., Wang, A., Tao, J., Wang, C., Liu, Q., et al. (2017). Identification of a selective and direct NLRP3 inhibitor to treat inflammatory disorders. *The Journal of Experimental Medicine* 214, 3219–3238.
- Jin, H.M., Kim, T.-J., Choi, J.-H., Kim, M.-J., Cho, Y.-N., Nam, K.-I., Kee, S.-J., Moon, J.B., Choi, S.-Y., Park, D.-J., et al. (2014). MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator via SHIP-1 down-regulation in acute gouty arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 16, R88.
- 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.
- 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.
- Joosten, L.A.B., Netea, M.G., Mylona, E., Koenders, M.I., Malireddi, R.K.S., Oosting, M., Stienstra, R., van de Veerdonk, F.L., Stalenhoef, A.F., Giamarellos-Bourboulis, E.J., et al. (2010). Engagement of fatty acids with toll-like receptor 2 drives interleukin-1 $\beta$  production via the ASC/caspase 1 pathway in monosodium urate monohydrate crystal-induced gouty arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 62, 3237–3248.
- Joosten, L.A.B., Ea, H.-K., Netea, M.G., and Busso, N. (2011). Interleukin-1 $\beta$  activation during acute joint inflammation: A limited role for the NLRP3 inflammasome in vivo. *Joint Bone Spine* 78, 107–110.
- Joosten, L.A.B., Crişan, T.O., Azam, T., Cleophas, M.C.P., Koenders, M.I., van de Veerdonk, F.L., Netea, M.G., Kim, S., and Dinarello, C.A. (2016). Alpha-1-anti-trypsin-Fc fusion protein ameliorates gouty arthritis by reducing release and extracellular processing of IL-1 $\beta$  and by the induction of endogenous IL-1Ra. *Annals of the Rheumatic Diseases* 75, 1219–1227.
- Jorch, S.K., and Kubes, P. (2017). An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nature Medicine* 23, 279–287.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* 287, 36617–36622.

- Kahlenberg, J.M., Carmona-Rivera, C., Smith, C.K., and Kaplan, M.J. (2013). Neutrophil Extracellular Trap-Associated Protein Activation of the NLRP3 Inflammasome Is Enhanced in Lupus Macrophages. *The Journal of Immunology* *190*, 1217–1226.
- Kalantari, P., DeOliveira, R.B., Chan, J., Corbett, Y., Rathinam, V., Stutz, A., Latz, E., Gazzinelli, R.T., Golenbock, D.T., and Fitzgerald, K.A. (2014). Dual Engagement of the NLRP3 and AIM2 Inflammasomes by Plasmodium-Derived Hemozoin and DNA during Malaria. *Cell Reports* *6*, 196–210.
- Kaplan, M.J. (2013). Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Res. Ther.* *15*, 219.
- Karki, R., Man, S.M., Malireddi, R.K.S., Gurung, P., Vogel, P., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2015). Concerted activation of the AIM2 and NLRP3 inflammasomes orchestrates host protection against *Aspergillus* infection. *Cell Host Microbe* *17*, 357–368.
- Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., Walle, L.V., 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.
- Khameneh, H.J., Ho, A.W.S., Laudisi, F., Derks, H., Kandasamy, M., Sivasankar, B., Teng, G.G., and Mortellaro, A. (2017). C5a Regulates IL-1 $\beta$  Production and Leukocyte Recruitment in a Murine Model of Monosodium Urate Crystal-Induced Peritonitis. *Front Pharmacol* *8*, 10.
- Khare, S., Ratsimandresy, R.A., de Almeida, L., Cuda, C.M., Rellick, S.L., Misharin, A.V., Wallin, M.C., Gangopadhyay, A., Forte, E., Gottwein, E., et al. (2014). The PYRIN domain-only protein POP3 inhibits ALR inflammasomes and regulates responses to infection with DNA viruses. *Nature Immunology* *15*, 343–353.
- Kile, R.L., and Rusk, H.A. (1940). A case of cold urticaria with an unusual family history. *JAMA* *114*, 1067–1068.
- Kolly, L., Karababa, M., Joosten, L.A.B., Narayan, S., Salvi, R., Petrilli, V., Tschopp, J., van den Berg, W.B., So, A.K.-L., and Busso, N. (2009). Inflammatory Role of ASC in Antigen-Induced Arthritis Is Independent of Caspase-1, NALP-3, and IPAF. *The Journal of Immunology* *183*, 4003–4012.

- Köttgen, A., Albrecht, E., Teumer, A., Vitart, V., Krumsiek, J., Hundertmark, C., Pistis, G., Ruggiero, D., O’Seaghdha, C.M., Haller, T., et al. (2013). Genome-wide association analyses identify 18 new loci associated with serum urate concentrations. *Nat. Genet.* *45*, 145–154.
- Kuo, C.-F., Grainge, M.J., Zhang, W., and Doherty, M. (2015). Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. *Nat Rev Rheumatol* *11*, 649–662.
- Lamacchia, C., Rodriguez, E., Palmer, G., Vigne, S., Martin, P., Talabot-Ayer, D., Seemayer, C.A., and Gabay, C. (2012). Articular inflammation is controlled by myeloid cell-derived interleukin 1 receptor antagonist during the acute phase of arthritis in mice. *Annals of the Rheumatic Diseases* *71*, 281–287.
- Landis, R.C., Yagnik, D.R., Florey, O., Philippidis, P., Emons, V., Mason, J.C., and Haskard, D.O. (2002). Safe disposal of inflammatory monosodium urate monohydrate crystals by differentiated macrophages. *Arthritis & Rheumatism* *46*, 3026–3033.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* *9*, 357–359.
- Lee, G.-S., Subramanian, N., Kim, A.I., Aksentijevich, I., Goldbach-Mansky, R., Sacks, D.B., Germain, R.N., Kastner, D.L., and Chae, J.J. (2012). The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca<sup>2+</sup> and cAMP. *Nature* *492*, 123–127.
- Lee, S.-J., Nam, K.-I., Jin, H.-M., Cho, Y.-N., Lee, S.-E., Kim, T.-J., Lee, S.-S., Kee, S.-J., Lee, K.-B., Kim, N., et al. (2011). Bone destruction by receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand-expressing T cells in chronic gouty arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *13*, R164.
- Leung, Y.Y., Yao Hui, L.L., and Kraus, V.B. (2015). Colchicine—Update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* *45*, 341–350.
- Lich, J.D., Williams, K.L., Moore, C.B., Arthur, J.C., Davis, B.K., Taxman, D.J., and Ting, J.P.-Y. (2007). Monarch-1 suppresses non-canonical NF- $\kappa$ B activation and p52-dependent chemokine expression in monocytes. *J. Immunol.* *178*, 1256–1260.
- Liebner, R., Mathaes, R., Meyer, M., Hey, T., Winter, G., and Besheer, A. (2014). Protein HESylation for half-life extension: synthesis, characterization and pharmacokinetics of HESylated anakinra. *Eur J Pharm Biopharm* *87*, 378–385.

- Lim, B., Ju, H., Kim, M., and Kang, C. (2011). Increased genetic susceptibility to intestinal-type gastric cancer is associated with increased activity of the RUNX3 distal promoter. *Cancer* *117*, 5161–5171.
- Lioté, F. (2019). Gout furunculosis. *Joint Bone Spine* *86*, 103.
- Lioté, F., Prudhommeaux, F., Schiltz, C., Champy, R., Herbelin, A., Ortiz-Bravo, E., and Bardin, T. (1996). Inhibition and prevention of monosodium urate monohydrate crystal-induced acute inflammation in vivo by transforming growth factor  $\beta$ 1. *Arthritis & Rheumatism* *39*, 1192–1198.
- Liu, L., Xue, Y., Zhu, Y., Xuan, D., Yang, X., Liang, M., Wang, J., Zhu, X., Zhang, J., and Zou, H. (2016). Interleukin 37 limits monosodium urate crystal-induced innate immune responses in human and murine models of gout. *Arthritis Res. Ther.* *18*, 268.
- Liu, R., O’Connell, M., Johnson, K., Pritzker, K., Mackman, N., and Terkeltaub, R. (2000). Extracellular signal-regulated kinase 1/extracellular signal-regulated kinase 2 mitogen-activated protein kinase signaling and activation of activator protein 1 and nuclear factor  $\kappa$ B transcription factors play central roles in interleukin-8 expression stimulated by monosodium urate monohydrate and calcium pyrophosphate crystals in monocytic cells. *Arthritis & Rheumatism* *43*, 1145.
- Liu, R., Lioté, F., Rose, D.M., Merz, D., and Terkeltaub, R. (2004). Proline-rich tyrosine kinase 2 and Src kinase signaling transduce monosodium urate crystal-induced nitric oxide production and matrix metalloproteinase 3 expression in chondrocytes: Urate Crystals and PYK-2. *Arthritis & Rheumatism* *50*, 247–258.
- Liu-Bryan, R., Scott, P., Sydlaske, A., Rose, D.M., and Terkeltaub, R. (2005). Innate immunity conferred by toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis & Rheumatism* *52*, 2936–2946.
- Loeb, J.N. (1972). The influence of temperature on the solubility of monosodium urate. *Arthritis Rheum.* *15*, 189–192.
- Loustau, C., Rosine, N., Forien, M., Ottaviani, S., Juge, P.-A., Lioté, F., Bardin, T., Richette, P., Dieudé, P., Richez, C., et al. (2018). Effectiveness and safety of anakinra in gout patients with stage 4–5 chronic kidney disease or kidney transplantation: A multicentre, retrospective study. *Joint Bone Spine* *85*, 755–760.



- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* *15*, 550.
- 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., Nakamura, T., Inouye, K., Li, J., Tang, Y., Lundbäck, P., Valdes-Ferrer, S.I., Olofsson, P.S., Kalb, T., Roth, J., et al. (2012). Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* *488*, 670–674.
- Lugrin, J., and Martinon, F. (2018). The AIM2 inflammasome: Sensor of pathogens and cellular perturbations. *Immunological Reviews* *281*, 99–114.
- Madouri, F., Guillou, N., Fauconnier, L., Marchiol, T., Rouxel, N., Chenuet, P., Ledru, A., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Chamaillard, M., et al. (2015). Caspase-1 activation by NLRP3 inflammasome dampens IL-33-dependent house dust mite-induced allergic lung inflammation. *Journal of Molecular Cell Biology* *7*, 351–365.
- Marchetti, C., Swartzwelter, B., Gamboni, F., Neff, C.P., Richter, K., Azam, T., Carta, S., Tengesdal, I., Nemkov, T., D'Alessandro, A., et al. (2018a). OLT1177, a  $\beta$ -sulfonyl nitrile compound, safe in humans, inhibits the NLRP3 inflammasome and reverses the metabolic cost of inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *115*, E1530–E1539.
- Marchetti, C., Swartzwelter, B., Koenders, M.I., Azam, T., Tengesdal, I.W., Powers, N., de Graaf, D.M., Dinarello, C.A., and Joosten, L.A.B. (2018b). NLRP3 inflammasome inhibitor OLT1177 suppresses joint inflammation in murine models of acute arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *20*, 169.
- Martillo, M.A., Nazzari, L., and Crittenden, D.B. (2014). The Crystallization of Monosodium Urate. *Curr Rheumatol Rep* *16*, 400.
- Martin, W.J., Shaw, O., Liu, X., Steiger, S., and Harper, J.L. (2011). Monosodium urate monohydrate crystal-recruited noninflammatory monocytes differentiate into M1-like proinflammatory macrophages in a peritoneal murine model of gout. *Arthritis & Rheumatism* *63*, 1322–1332.

- 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., Agostini, L., Meylan, E., and Tschopp, J. (2004). Identification of Bacterial Muramyl Dipeptide as Activator of the NALP3/Cryopyrin Inflammasome. *Current Biology* *14*, 1929–1934.
- 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.
- Matsukawa, A., Yoshimura, T., Maeda, T., Ohkawara, S., Takagi, K., and Yoshinaga, M. (1995). Neutrophil accumulation and activation by homologous IL-8 in rabbits. IL-8 induces destruction of cartilage and production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in vivo. *J. Immunol.* *154*, 5418–5425.
- Matsukawa, A., Yoshimura, T., Maeda, T., Takahashi, T., Ohkawara, S., and Yoshinaga, M. (1998). Analysis of the cytokine network among tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, interleukin-8, and interleukin-1 receptor antagonist in monosodium urate crystal-induced rabbit arthritis. *Lab. Invest.* *78*, 559–569.
- Matsuo, H., Takada, T., Ichida, K., Nakamura, T., Nakayama, A., Ikebuchi, Y., Ito, K., Kusanagi, Y., Chiba, T., Tadokoro, S., et al. (2009). Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: a function-based genetic analysis in a Japanese population. *Sci Transl Med* *1*, 5ra11.
- Matsuo, H., Nakayama, A., Sakiyama, M., Chiba, T., Shimizu, S., Kawamura, Y., Nakashima, H., Nakamura, T., Takada, Y., Oikawa, Y., et al. (2014). ABCG2 dysfunction causes hyperuricemia due to both renal urate underexcretion and renal urate overload. *Sci Rep* *4*, 3755.
- Matsushima, K., Taguchi, M., Kovacs, E.J., Young, H.A., and Oppenheim, J.J. (1986). Intracellular localization of human monocyte associated interleukin 1 (IL 1) activity and release of biologically active IL 1 from monocytes by trypsin and plasmin. *J. Immunol.* *136*, 2883–2891.
- 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. *Nature Immunology* *8*, 497–503.

- McCarty, D.J. (1994). Crystals and arthritis. *Disease-a-Month* 40, 258–299.
- Mccarty, D.J., and Hollander, J.L. (1961). Identification of urate crystals in gouty synovial fluid. *Ann. Intern. Med.* 54, 452–460.
- McGonagle, D., and McDermott, M.F. (2006). A proposed classification of the immunological diseases. *PLoS Med.* 3, e297.
- McQueen, F.M., Doyle, A., Reeves, Q., Gao, A., Tsai, A., Gamble, G.D., Curteis, B., Williams, M., and Dalbeth, N. (2014). Bone erosions in patients with chronic gouty arthropathy are associated with tophi but not bone oedema or synovitis: new insights from a 3 T MRI study. *Rheumatology* 53, 95–103.
- Mizutani, H., Schechter, N., Lazarus, G., Black, R.A., and Kupper, T.S. (1991). Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 beta (IL-1 beta) to an active IL-1 species by human mast cell chymase. *J. Exp. Med.* 174, 821–825.
- Morrone, S.R., Matyszewski, M., Yu, X., Delannoy, M., Egelman, E.H., and Sohn, J. (2015). Assembly-driven activation of the AIM2 foreign-dsDNA sensor provides a polymerization template for downstream ASC. *Nat Commun* 6, 7827.
- Muckle, T.J., and Wellsm, null (1962). Urticaria, deafness, and amyloidosis: a new heredo-familial syndrome. *Q. J. Med.* 31, 235–248.
- Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B.L., Rajendiran, T.M., and Núñez, G. (2013). K<sup>+</sup> Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity* 38, 1142–1153.
- Nakahira, K., Haspel, J.A., Rathinam, V.A.K., Lee, S.-J., Dolinay, T., Lam, H.C., Englert, J.A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H.P., et al. (2011). Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nature Immunology* 12, 222–230.
- Nakayama, A., Matsuo, H., Nakaoka, H., Nakamura, T., Nakashima, H., Takada, Y., Oikawa, Y., Takada, T., Sakiyama, M., Shimizu, S., et al. (2015). Common dysfunctional variants of ABCG2 have stronger impact on hyperuricemia progression than typical environmental risk factors. *Scientific Reports* 4.
- Narayan, S., Pazar, B., Ea, H.-K., Kolly, L., Bagnoud, N., Chobaz, V., Lioté, F., Vogl, T., Holzinger, D., Kai-Lik So, A., et al. (2011). Octacalcium phosphate crystals induce

inflammation in vivo through interleukin-1 but independent of the NLRP3 inflammasome in mice. *Arthritis & Rheumatism* 63, 422–433.

Nehmar, R., Alsaleh, G., Voisin, B., Flacher, V., Mariotte, A., Saferding, V., Puchner, A., Niederreiter, B., Vandamme, T., Schabbauer, G., et al. (2017). Therapeutic Modulation of Plasmacytoid Dendritic Cells in Experimental Arthritis. *Arthritis & Rheumatology* (Hoboken, N.J.) 69, 2124–2135.

Neogi, T., Chen, C., Niu, J., Chaisson, C., Hunter, D.J., and Zhang, Y. (2014). Alcohol quantity and type on risk of recurrent gout attacks: an internet-based case-crossover study. *Am. J. Med.* 127, 311–318.

Neumann, K., Castiñeiras-Vilariño, M., Höckendorf, U., Hanneschläger, N., Lemeer, S., Kupka, D., Meyermann, S., Lech, M., Anders, H.-J., Kuster, B., et al. (2014). Clec12a Is an Inhibitory Receptor for Uric Acid Crystals that Regulates Inflammation in Response to Cell Death. *Immunity* 40, 389–399.

Ng, G., Sharma, K., Ward, S.M., Desrosiers, M.D., Stephens, L.A., Schoel, W.M., Li, T., Lowell, C.A., Ling, C.-C., Amrein, M.W., et al. (2008). Receptor-Independent, Direct Membrane Binding Leads to Cell-Surface Lipid Sorting and Syk Kinase Activation in Dendritic Cells. *Immunity* 29, 807–818.

Nguyen, C., Ea, H.-K., Palazzo, E., and Lioté, F. (2010). Tophaceous gout: an unusual cause of multiple fractures. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 39, 93–96.

Nishimura, A., Akahoshi, T., Takahashi, M., Takagishi, K., Itoman, M., Kondo, H., Takahashi, Y., Yokoi, K., Mukaida, N., and Matsushima, K. (1997). Attenuation of monosodium urate crystal-induced arthritis in rabbits by a neutralizing antibody against interleukin-8. *J. Leukoc. Biol.* 62, 444–449.

Orlowski, G.M., Colbert, J.D., Sharma, S., Bogyo, M., Robertson, S.A., and Rock, K.L. (2015). Multiple Cathepsins Promote Pro-IL-1 $\beta$  Synthesis and NLRP3-Mediated IL-1 $\beta$  Activation. *The Journal of Immunology* 195, 1685–1697.

Palmer, G., and Gabay, C. (2011). Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases. *Nature Reviews Rheumatology* 7, 321–329.

- Palmer, G., Talabot-Ayer, D., Szalay-Quinodoz, I., Maret, M., Arend, W.P., and Gabay, C. (2003). Mice transgenic for intracellular interleukin-1 receptor antagonist type 1 are protected from collagen-induced arthritis. *European Journal of Immunology* 33, 434–440.
- Palomo, J., Dietrich, D., Martin, P., Palmer, G., and Gabay, C. (2015). The interleukin (IL)-1 cytokine family – Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. *Cytokine* 76, 25–37.
- Papale, A., Kummer, E., Galbiati, V., Marinovich, M., Galli, C.L., and Corsini, E. (2017). Understanding chemical allergen potency: role of NLRP12 and Blimp-1 in the induction of IL-18 in human keratinocytes. *Archives of Toxicology* 91, 1783–1794.
- Park, E., Na, H.S., Song, Y.-R., Shin, S.Y., Kim, Y.-M., and Chung, J. (2014). Activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes by *Porphyromonas gingivalis* infection. *Infect. Immun.* 82, 112–123.
- Pascart, T., and Lioté, F. (2019). Gout: state of the art after a decade of developments. *Rheumatology (Oxford)* 58, 27–44.
- Paul, H., Reginato, A.J., and Schumacher, H.R. (1983). Morphological characteristics of monosodium urate: a transmission electron microscopic study of intact natural and synthetic crystals. *Annals of the Rheumatic Diseases* 42, 75–81.
- Perez-Ruiz, F., Martínez-Indart, L., Carmona, L., Herrero-Beites, A.M., Pijoan, J.I., and Krishnan, E. (2014). Tophaceous gout and high level of hyperuricaemia are both associated with increased risk of mortality in patients with gout. *Annals of the Rheumatic Diseases* 73, 177–182.
- Pétrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., and Tschopp, J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death & Differentiation* 14, 1583–1589.
- Pimentel, T.A., Sampaio, A.L.F., D'Acquisto, F., Perretti, M., and Oliani, S.M. (2011). An essential role for mast cells as modulators of neutrophils influx in collagen-induced arthritis in the mouse. *Laboratory Investigation* 91, 33–42.
- Popa-Nita, O., Rollet-Labelle, E., Thibault, N., Gilbert, C., Bourgoin, S.G., and Naccache, P.H. (2007). Crystal-induced neutrophil activation. IX. Syk-dependent activation of class Ia phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Leukocyte Biology* 82, 763–773.

Prieur, A.-M., Griscelli, C., Lampert, F., Truckenbrodt, H., Guggenheim, M.A., Lovell, D.J., Pelkonen, P., Chevrant-Breton, J., and Ansell, B.M. (1987). A Chronic, Infantile, Neurological, Cutaneous and Articular (CINCA) Syndrome. A Specific Entity Analysed in 30 Patients. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 16, 57–68.

Ratsimandresy, R.A., Chu, L.H., Khare, S., de Almeida, L., Gangopadhyay, A., Indramohan, M., Misharin, A.V., Greaves, D.R., Perlman, H., Dorfleutner, A., et al. (2017). The PYRIN domain-only protein POP2 inhibits inflammasome priming and activation. *Nature Communications* 8, 15556.

Reber, L.L., Marichal, T., Sokolove, J., Starkl, P., Gaudenzio, N., Iwakura, Y., Karasuyama, H., Schwartz, L.B., Robinson, W.H., Tsai, M., et al. (2014). Contribution of Mast Cell-Derived Interleukin-1 $\beta$  to Uric Acid Crystal-Induced Acute Arthritis in Mice: MC-Derived IL-1 $\beta$  in Mice With MSU Crystal-Induced Arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 66, 2881–2891.

Reber, L.L., Gaudenzio, N., Starkl, P., and Galli, S.J. (2016). Neutrophils are not required for resolution of acute gouty arthritis in mice. *Nature Medicine* 22, 1382–1384.

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.

Roughley, M.J., Belcher, J., Mallen, C.D., and Roddy, E. (2015). Gout and risk of chronic kidney disease and nephrolithiasis: meta-analysis of observational studies. *Arthritis Res Ther* 17.

Rozengurt, E. (2011). Protein Kinase D Signaling: Multiple Biological Functions in Health and Disease. *Physiology* 26, 23–33.

Ryckman, C., McColl, S.R., Vandal, K., de Médicis, R., Lussier, A., Poubelle, P.E., and Tessier, P.A. (2003). Role of S100A8 and S100A9 in neutrophil recruitment in response to monosodium urate monohydrate crystals in the air-pouch model of acute gouty arthritis: S100 Proteins in Neutrophil Recruitment in Acute Gouty Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 48, 2310–2320.

Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M.H., Uematsu, S., Yang, B.-G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., et al. (2008). Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. *Nature* 456, 264–268.

- Sander, L.E., Davis, M.J., Boekschoten, M.V., Amsen, D., Dascher, C.C., Ryffel, B., Swanson, J.A., Müller, M., and Blander, J.M. (2011). Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature* 474, 385–389.
- Scanu, A., Oliviero, F., Gruaz, L., Sfriso, P., Pozzuoli, A., Frezzato, F., Agostini, C., Burger, D., and Punzi, L. (2010). High-density lipoproteins downregulate CCL2 production in human fibroblast-like synoviocytes stimulated by urate crystals. *Arthritis Res Ther* 12, R23.
- Scanu, A., Luisetto, R., Oliviero, F., Gruaz, L., Sfriso, P., Burger, D., and Punzi, L. (2015). High-density lipoproteins inhibit urate crystal-induced inflammation in mice. *Annals of the Rheumatic Diseases* 74, 587–594.
- Schauer, C., Janko, C., Munoz, L.E., Zhao, Y., Kienhöfer, D., Frey, B., Lell, M., Manger, B., Rech, J., Naschberger, E., et al. (2014). Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nature Medicine* 20, 511–517.
- Schett, G., Schauer, C., Hoffmann, M., and Herrmann, M. (2015). Why does the gout attack stop? A roadmap for the immune pathogenesis of gout. *RMD Open* 1, e000046.
- Schiltz, C., Lioté, F., Prudhommeaux, F., Meunier, A., Champy, R., Callebert, J., and Bardin, T. (2002). Monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in vivo: Quantitative histomorphometric analysis of cellular events: MSU Crystal-Induced Inflammation in Vivo. *Arthritis & Rheumatism* 46, 1643–1650.
- Schlesinger, N., Mysler, E., Lin, H.-Y., De Meulemeester, M., Rovensky, J., Arulmani, U., Balfour, A., Krammer, G., Sallstig, P., and So, A. (2011). Canakinumab reduces the risk of acute gouty arthritis flares during initiation of allopurinol treatment: results of a double-blind, randomised study. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 1264–1271.
- Schönbeck, U., Mach, F., and Libby, P. (1998). Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J. Immunol.* 161, 3340–3346.
- Schorn, C., Janko, C., Latzko, M., Chaurio, R., Schett, G., and Herrmann, M. (2012). Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front Immunol* 3, 277.
- Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell* 140, 821–832.

- Schumacher, H.R., Phelps, P., and Agudelo, C.A. (1974). Urate crystal induced inflammation in dog joints: sequence of synovial changes. *J. Rheumatol.* *1*, 102–113.
- Scott, P., Ma, H., Viriyakosol, S., Terkeltaub, R., and Liu-Bryan, R. (2006). Engagement of CD14 Mediates the Inflammatory Potential of Monosodium Urate Crystals. *The Journal of Immunology* *177*, 6370–6378.
- Sharma, D., and Kanneganti, T.-D. (2016). The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *The Journal of Cell Biology* *213*, 617–629.
- Sharp, F.A., Ruane, D., Claass, B., Creagh, E., Harris, J., Malyala, P., Singh, M., O'Hagan, D.T., Pétrilli, V., Tschopp, J., et al. (2009). Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *106*, 870–875.
- Shen, M., Tang, L., Shi, X., Zeng, X., and Yao, Q. (2017). NLRP12 autoinflammatory disease: a Chinese case series and literature review. *Clinical Rheumatology* *36*, 1661–1667.
- Shi, C.-S., Shenderov, K., Huang, N.-N., Kabat, J., Abu-Asab, M., Fitzgerald, K.A., Sher, A., and Kehrl, J.H. (2012). Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nature Immunology* *13*, 255–263.
- Shi, H., Wang, Y., Li, X., Zhan, X., Tan, 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., Gao, W., and Shao, F. (2017). Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends in Biochemical Sciences* *42*, 245–254.
- Shi, Y., Evans, J.E., and Rock, K.L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* *425*, 516–521.
- 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.
- Sil, P., Wicklum, H., Surell, C., and Rada, B. (2017). Macrophage-derived IL-1 $\beta$  enhances monosodium urate crystal-triggered NET formation. *Inflammation Research* *66*, 227–237.



- Sims, J.E., Pan, Y., Smith, D.E., Nicklin, M.J., Barton, J.L., Bazan, J.F., Kastelein, R.A., Busfield, S.J., Ford, J.E., Lin, H., et al. (2001). A new nomenclature for IL-1-family genes. *Trends in Immunology* 22, 536–537.
- Smith, R.J., Speziale, S.C., and Bowman, B.J. (1985). Properties of Interleukin-1 as a complete secretagogue for human neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 130, 1233–1240.
- So, A., De Smedt, T., Revaz, S., and Tschopp, J. (2007). A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. *Arthritis Research & Therapy* 9, R28.
- So, A., De Meulemeester, M., Pikhak, A., Yücel, A.E., Richard, D., Murphy, V., Arulmani, U., Sallstig, P., and Schlesinger, N. (2010). Canakinumab for the treatment of acute flares in difficult-to-treat gouty arthritis: Results of a multicenter, phase II, dose-ranging study. *Arthritis & Rheumatism* 62, 3064–3076.
- Sohn, J., and Hur, S. (2016). Filament assemblies in foreign nucleic acid sensors. *Current Opinion in Structural Biology* 37, 134–144.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* 277, 21119–21122.
- Stehlik, C. (2009). Multiple interleukin-1 $\beta$ -converting enzymes contribute to inflammatory arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 60, 3524–3530.
- Stehlik, C., and Dorfleutner, A. (2007). COPs & POPs: Modulators of Inflammasome Activity. *J Immunol* 179, 7993–7998.
- Steiger, S., and Harper, J.L. (2013). Neutrophil cannibalism triggers transforming growth factor  $\beta$ 1 production and self regulation of neutrophil inflammatory function in monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in mice. *Arthritis & Rheumatism* 65, 815–823.
- Steinberg, G.R., and Kemp, B.E. (2009). AMPK in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 89, 1025–1078.
- Storey, G.D. (2001). Alfred Baring Garrod (1819-1907). *Rheumatology (Oxford)* 40, 1189–1190.

- Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., and Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature* *481*, 278–286.
- Sugawara, S., Uehara, A., Nochi, T., Yamaguchi, T., Ueda, H., Sugiyama, A., Hanzawa, K., Kumagai, K., Okamura, H., and Takada, H. (2001). Neutrophil Proteinase 3-Mediated Induction of Bioactive IL-18 Secretion by Human Oral Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* *167*, 6568–6575.
- Swanson, K.V., Junkins, R.D., Kurkjian, C.J., Holley-Guthrie, E., Pendse, A.A., El Morabiti, R., Petrucelli, A., Barber, G.N., Benedict, C.A., and Ting, J.P.-Y. (2017). A noncanonical function of cGAMP in inflammasome priming and activation. *The Journal of Experimental Medicine* *214*, 3611–3626.
- Terkeltaub, R. (2017). What makes gouty inflammation so variable? *BMC Medicine* *15*.
- Terkeltaub, R., Tenner, A.J., Kozin, F., and Ginsberg, M.H. (1983). Plasma Protein Binding by Monosodium Urate Crystals. *Arthritis & Rheumatism* *26*, 775–783.
- Terkeltaub, R., Zachariae, C., Santoro, D., Martin, J., Peveri, P., and Matsushima, K. (1991a). Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 is a potential mediator of crystal-induced inflammation. *Arthritis & Rheumatism* *34*, 894–903.
- Terkeltaub, R., Baird, S., Sears, P., Santiago, R., and Boisvert, W. (1998). The murine homolog of the interleukin-8 receptor CXCR-2 is essential for the occurrence of neutrophilic inflammation in the air pouch model of acute urate crystal-induced gouty synovitis. *Arthritis & Rheumatism* *41*, 900–909.
- Terkeltaub, R.A., Dyer, C.A., Martin, J., and Curtiss, L.K. (1991b). Apolipoprotein (apo) E inhibits the capacity of monosodium urate crystals to stimulate neutrophils. Characterization of intraarticular apo E and demonstration of apo E binding to urate crystals in vivo. *Journal of Clinical Investigation* *87*, 20–26.
- de Torre-Minguela, C., Mesa Del Castillo, P., and Pelegrín, P. (2017). The NLRP3 and Pyrin Inflammasomes: Implications in the Pathophysiology of Autoinflammatory Diseases. *Front Immunol* *8*, 43.
- Torres, R., Macdonald, L., Croll, S.D., Reinhardt, J., Dore, A., Stevens, S., Hylton, D.M., Rudge, J.S., Liu-Bryan, R., Terkeltaub, R.A., et al. (2009). Hyperalgesia, synovitis and multiple

biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1 inhibition in a novel animal model of gouty arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68, 1602–1608.

Tramontini, N., Huber, C., Liu-Bryan, R., Terkeltaub, R.A., and Kilgore, K.S. (2004). Central role of complement membrane attack complex in monosodium urate crystal-induced neutrophilic rabbit knee synovitis. *Arthritis & Rheumatism* 50, 2633–2639.

Tuncer, S., Fiorillo, M.T., and Sorrentino, R. (2014). The multifaceted nature of NLRP12. *Journal of Leukocyte Biology* 96, 991–1000.

Turner, J.D., and Filer, A. (2015). The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis pathogenesis: *Current Opinion in Rheumatology* 27, 175–182.

Turner, M., Chantry, D., Katsikis, P., Berger, A., Brennan, F.M., and Feldmann, M. (1991). Induction of the interleukin 1 receptor antagonist protein by transforming growth factor-beta. *Eur. J. Immunol.* 21, 1635–1639.

Ulland, T.K., Jain, N., Hornick, E.E., Elliott, E.I., Clay, G.M., Sadler, J.J., Mills, K.A.M., Janowski, A.M., Volk, A.P.D., Wang, K., et al. (2016). Nlrp12 mutation causes C57BL/6J strain-specific defect in neutrophil recruitment. *Nat Commun* 7, 13180.

Vande Walle, L., Van Opdenbosch, N., Jacques, P., Fossoul, A., Verheugen, E., Vogel, P., Beyaert, R., Elewaut, D., Kanneganti, T.-D., van Loo, G., et al. (2014). Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis. *Nature* 512, 69–73.

Vervoordeldonk, M.J., Aalbers, C.J., and Tak, P.P. (2009). Interferon beta for rheumatoid arthritis: new clothes for an old kid on the block. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 157–158.

Vieira, A.T., Macia, L., Galvão, I., Martins, F.S., Canesso, M.C.C., Amaral, F.A., Garcia, C.C., Maslowski, K.M., De Leon, E., Shim, D., et al. (2015). A Role for Gut Microbiota and the Metabolite-Sensing Receptor GPR43 in a Murine Model of Gout. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 67, 1646–1656.

Vieira, A.T., Galvão, I., Macia, L.M., Sernaglia, É.M., Vinolo, M.A.R., Garcia, C.C., Tavares, L.P., Amaral, F.A., Sousa, L.P., Martins, F.S., et al. (2017). Dietary fiber and the short-chain fatty acid acetate promote resolution of neutrophilic inflammation in a model of gout in mice. *Journal of Leukocyte Biology* 101, 275–284.

Villiger, P.M., Terkeltaub, R., and Lotz, M. (1992). Production of monocyte chemoattractant protein-1 by inflamed synovial tissue and cultured synoviocytes. *J. Immunol.* 149, 722–727.

- 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.
- Wahl, S.M., Costa, G.L., Corcoran, M., Wahl, L.M., and Berger, A.E. (1993). Transforming growth factor-beta mediates IL-1-dependent induction of IL-1 receptor antagonist. *J. Immunol.* 150, 3553–3560.
- Walter, A., Schäfer, M., Cecconi, V., Matter, C., Urosevic-Maiwald, M., Belloni, B., Schönewolf, N., Dummer, R., Bloch, W., Werner, S., et al. (2013). Aldara activates TLR7-independent immune defence. *Nat Commun* 4, 1560.
- Wang, B., and Yin, Q. (2017). AIM2 inflammasome activation and regulation: A structural perspective. *Journal of Structural Biology* 200, 279–282.
- Wang, L., Manji, G.A., Grenier, J.M., Al-Garawi, A., Merriam, S., Lora, J.M., Geddes, B.J., Briskin, M., DiStefano, P.S., and Bertin, J. (2002). PYPAF7, a Novel PYRIN-containing Apaf1-like Protein That Regulates Activation of NF- $\kappa$ B and Caspase-1-dependent Cytokine Processing. *Journal of Biological Chemistry* 277, 29874–29880.
- Wang, Y., Viollet, B., Terkeltaub, R., and Liu-Bryan, R. (2016). AMP-activated protein kinase suppresses urate crystal-induced inflammation and transduces colchicine effects in macrophages. *Annals of the Rheumatic Diseases* 75, 286–294.
- Williams, K.L., Lich, J.D., Duncan, J.A., Reed, W., Rallabhandi, P., Moore, C., Kurtz, S., Coffield, V.M., Accavitti-Loper, M.A., Su, L., et al. (2005). The CATERPILLER Protein Monarch-1 Is an Antagonist of Toll-like Receptor-, Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -, and *Mycobacterium tuberculosis* -induced Pro-inflammatory Signals. *Journal of Biological Chemistry* 280, 39914–39924.
- Wright, H.L., Moots, R.J., and Edwards, S.W. (2014). The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 10, 593–601.
- Yan, Y., Jiang, W., Spinetti, T., Tardivel, A., Castillo, R., Bourquin, C., Guarda, G., Tian, Z., Tschopp, J., and Zhou, R. (2013). Omega-3 Fatty Acids Prevent Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome Activation. *Immunity* 38, 1154–1163.

- Yang, G., Yeon, S.H., Lee, H.E., Kang, H.C., Cho, Y.Y., Lee, H.S., and Lee, J.Y. (2018). Suppression of NLRP3 inflammasome by oral treatment with sulforaphane alleviates acute gouty inflammation. *Rheumatology* 57, 727–736.
- Yazdi, A.S., Guarda, G., Riteau, N., Drexler, S.K., Tardivel, A., Couillin, I., and Tschopp, J. (2010). Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 19449–19454.
- Yin, Q., Sester, D.P., Tian, Y., Hsiao, Y.-S., Lu, A., Cridland, J.A., Sagulenko, V., Thygesen, S.J., Choubey, D., Hornung, V., et al. (2013). Molecular Mechanism for p202-Mediated Specific Inhibition of AIM2 Inflammasome Activation. *Cell Reports* 4, 327–339.
- Yokose, K., Sato, S., Asano, T., Yashiro, M., Kobayashi, H., Watanabe, H., Suzuki, E., Sato, C., Kozuru, H., Yatsushashi, H., et al. (2018). TNF- $\alpha$  potentiates uric acid-induced interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) secretion in human neutrophils. *Modern Rheumatology* 28, 513–517.
- Zaki, M.H., Man, S.M., Vogel, P., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2014). Salmonella exploits NLRP12-dependent innate immune signaling to suppress host defenses during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 385–390.
- Zhang, Q.-B., Qing, Y.-F., Yin, C.-C., Zhou, L., Liu, X.-S., Mi, Q.-S., and Zhou, J.-G. (2018). Mice with miR-146a deficiency develop severe gouty arthritis via dysregulation of TRAF 6, IRAK 1 and NALP3 inflammasome. *Arthritis Res. Ther.* 20, 45.
- Zhang, Z., Meszaros, G., He, W., Xu, Y., de Fatima Magliarelli, H., Mailly, L., Mihlan, M., Liu, Y., Puig Gámez, M., Goginashvili, A., et al. (2017). Protein kinase D at the Golgi controls NLRP3 inflammasome activation. *The Journal of Experimental Medicine* 214, 2671–2693.
- Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I., and Tschopp, J. (2010). Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nature Immunology* 11, 136–140.
- Zhou, W., Wang, Y., Wu, R., He, Y., Su, Q., and Shi, G. (2017). MicroRNA-488 and -920 regulate the production of proinflammatory cytokines in acute gouty arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 19, 203.
- Zhu, Y., Pandya, B.J., and Choi, H.K. (2011). Prevalence of gout and hyperuricemia in the US general population: The National Health and Nutrition Examination Survey 2007–2008. *Arthritis & Rheumatism* 63, 3136–3141.

Zip, C.M., Ross, J.B., Greaves, M.W., Scriver, C.R., Mitchell, J.J., and Zoar, S. (1993). Familial cold urticaria. *Clinical and Experimental Dermatology* 18, 338–341.

## Autres ouvrages

Firestein, G.S., Budd, R.C., Gabriel, E.G., McInnes, I.B. and O'Dell, J.R. *Kelley's textbook of rheumatology*, 9<sup>th</sup> edition. (2013). ISBN: 978-1-4377-1738-9

Galtier-Boissière, Allard, F., Badin, C., Barré, A., Berthet, A., Bertillon, A. *et al.* (1921). *Larousse Médical Illustré*. Librairie Larousse – Paris.



# ANNEXES

## I. Manuscrit principal:

NLRP3- and AIM2-autonomy in a mouse model of gouty arthritis *in vivo* highlights targeting of *Il-1 $\beta$*  expression as efficient therapeutic strategy

## II. Manuscripts publiés:

- Therapeutic modulation of plasmacytoid dendritic cells in experimental arthritis
  
- Therapeutic perspectives for interferons and plasmacytoid dendritic cells in rheumatoid arthritis
  
- Anti-inflammatory effect of active nanofibrous polymeric membrane bearing nanocontainers of atorvastatin complexes
  
- DICER1: a key player in rheumatoid arthritis, at the crossroads of cellular stress, innate immunity and chronic inflammation in aging

## III. Annexe 3 – Western blot entiers





## **NLRP3- and AIM2-autonomy in a mouse model of acute uratic inflammation *in vivo* highlights targeting of *Il-1 $\beta$* expression as efficient therapeutic strategy.**

Alexandre Mariotte <sup>1,2</sup>, Aurore De Cauwer <sup>1,2</sup>, Zhirong Zhang <sup>3</sup>, Chrystelle Po <sup>4</sup>, Chérine Abou-Faycal <sup>1,2</sup>, Angélique Pichot <sup>1,2</sup>, Nicodème Paul <sup>1,2</sup>, Raphael Carapito <sup>1,2</sup>, Benoit Frisch <sup>5</sup>, Cécile Macquin <sup>1,2</sup>, Emmanuel Chatelus <sup>6</sup>, Jean Sibilia <sup>1,2,6</sup>, Jean-Paul Armspach <sup>4</sup>, Roméo Ricci <sup>3</sup>, Seiamak Bahram <sup>1,2</sup> and Philippe Georgel <sup>1,2,\*</sup>.

1 Université de Strasbourg, INSERM, ImmunoRhumatologie Moléculaire UMR\_S 1109, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Faculté de Médecine. F-67000 Strasbourg, France.

2 Fédération Hospitalo-Universitaire, OMICARE, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, 67085 Strasbourg, France.

3 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR7104, INSERM UMR7104, Université de Strasbourg, France.

4 ICube, University of Strasbourg, CNRS, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS)

5 Laboratoire de Conception et Applications des Molécules Bioactives, Faculté de Pharmacie, UMR 7199 CNRS/Université de Strasbourg

6 Centre de Référence des Maladies Autoimmunes Rares, Service de Rhumatologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

\* corresponding author : [pgeorgel@unistra.fr](mailto:pgeorgel@unistra.fr)

### **Abstract**

#### **Introduction**

Gout is a painful inflammatory arthritis which exhibits worldwide increased prevalence, thereby representing a public health issue (Elfishawi et al., 2017). While systemic hyperuricemia leading to the accumulation of monosodium urate (MSU) crystals is a well-established etiological cause of the disease, the precise understanding of the molecular and cellular mechanisms driving joint inflammation is not yet achieved. Indeed, genome-wide association studies (GWAS) performed in Japanese patients and controls evidenced variants in genes encoding proteins involved in urate transport and metabolism (Nakayama et al., 2017). The prominent role of urate transporters was confirmed in various populations (Dalbeth et al., 2017). More recently, a GWAS realized on Taiwanese patients revealed 36 loci associated with gout, among which rs2231142 in the ABCG2 gene exhibited the strongest linkage (Chen et al., 2018). Of note, ABCG2 knock-down in endothelial cells induces increased secretion of the neutrophil chemoattractant IL-8, which might provide some mechanistic insights into gout pathophysiology. Surprisingly, none of these pan-genomic studies - some of which were performed in considerable cohorts (e.g. 70,000 patients (Kottgen et al., 2013)) - revealed any linkage with genes encoding components of the NLRP3 inflammasome. Besides, gain-of-function mutations in *NLRP3* are responsible of cryopyrin-associated autoinflammatory syndrome (CAPS) characterized by systemic inflammation (fever and urticaria-like rash) not evocative of acute gout attack, although arthralgia and periarticular swelling can also be described (Kuemmerle-Deschner et al., 2017). This appears in sharp contrast with the standard model which stipulates that

MSU crystals triggers activation of the NLRP3 inflammasome, ultimately leading to IL-1 $\beta$  secretion (So and Martinon, 2017). Indeed, a large body of evidence indicates that NLRP3 deficiency prevents IL-1 $\beta$  secretion by murine macrophages following MSU crystals stimulation (Martinon et al., 2006). Human mononuclear cells also respond to MSU crystals which, in synergy with lipopolysaccharide (LPS), enhance IL-1 $\beta$  production (Giamarellos-Bourboulis et al., 2009). However, these experiments require the presence of lipopolysaccharide (LPS) as a “priming signal” necessary for optimal IL-1 $\beta$  release, a component which is likely absent in gouty patients. Recently, neutrophils, which are abundant in the inflamed synovial fluid of acute patients, also appeared as major players in gouty arthritis (Maueroder et al., 2015). Moreover, these cells are also involved during the resolutive phase through NETosis (Schauer et al., 2014). In the present work, we sought to gain more insights into cellular and molecular interactions driving gouty inflammation and for this, we performed subcutaneous injections of MSU crystals in the hind paws of mice, which accurately mimics the human gouty crises. In this setting, we observed that both the NLRP3 and AIM2 inflammasomes are, at best, only partially required for the full development of the disease *in vivo*. This likely indicates that multiple pathways may act redundantly to promote the release of bioactive IL-1 $\beta$  and highlights the necessity to target *Il-1 $\beta$*  gene expression for efficient therapeutic purposes. We next analyzed this complex MSU-induced inflammatory response *in vivo* by genome-wide RNAseq and observed predominantly a marked overexpression of genes involved in granulocytes adhesion and diapedesis (e.g. *Itgam*, chemoattractants such as *Ccl3* or *Cxcl3*), as well as genes participating in the NLRP3 inflammasome pathway (*Nlrp3*, *Il-1 $\beta$* ). Similarly to our previous observation in various models of murine polyarthritis (Nehmar et al., 2017), we next demonstrate that type I interferon anti-inflammatory effects can be mobilized through topical application of the TLR7 agonist imiquimod on inflamed paws in our gout model. The resulting lowered expression of inflammasome-related genes, including *Il-1 $\beta$*  and neutrophils recruitment players, correlated with a drastic reduction of the MSU-induced inflammation, both at the clinical and biological levels. Furthermore, our transcriptomic analyses uncovered previously unsuspected players (RUNX3) accounting for this type I IFN-dependent anti-inflammatory response. More importantly, pathway analysis of RNAseq data provided evidence for TLR1/2/6 signaling in MSU crystals-induced inflammatory responses, pointing to a potential involvement of endogenous lipids as the - still elusive - signal I in gouty patients. Altogether, our results offer novel therapeutic opportunities, particularly for gouty patient with kidney dysfunctions in which colchicine and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), the standard of care, might be inadvisable.

## Results

### Sub cutaneous injection of MSU crystal in mice recapitulates human gouty crises

To investigate molecular and cellular relationships that participate in gouty inflammation, we used a mouse model in which monosodium urate (MSU) crystals are subcutaneously injected on the dorsal face of hind paws. As seen in Suppl. Fig. 1 A-B, mice subjected to this protocol develop an oedema which can reach the ankle area within 24h (acute phase). However, inflammation gradually decreases within days and MSU crystals can be visible under the skin as tophi-like structures. Magnetic resonance imaging (MRI, panel C) of MSU-injected paws revealed peri-tendinous and subcutaneous oedemas and crystal deposits which are absent in PBS-injected contralateral paws. These manifestations are correlated with peak production of mature (17 kDa) IL-1 $\beta$  at 24h post injection (p.i) of MSU crystals detected by western blot in protein extract of paws (Panel D). Of note, the

thickness of the paw, as well as the inflammatory score (which depends on both redness and swelling) are significantly reduced when mice are treated with colchicine, the standard of care for human gout. Increased body temperature, reflecting the systemic effects of MSU injection, is also impacted by colchicine therapy (Suppl. Fig. 2A-D). Furthermore, this model is responsive to the IL-1 receptor antagonist anakinra (Suppl. Fig. 2E-F), at least during the initial phase of the disease (which probably reflects its limited half-life (Liebner et al., 2014)), while the TNF- $\alpha$  blocker Etanercept appears inefficient (Suppl. Fig. 2G-H). Altogether, these data ascertain the s.c injection of MSU crystals in mice as a relevant model of acute gouty crisis.

### **The PKD - NLRP3 axis is dispensable for acute uratic inflammation in mice**

NLRP3 is described as a sensor of MSU crystals in macrophages (Martinon et al., 2006) and considered a major player in the development of gout in various *in vivo* models (Amaral et al., 2012; Castelblanco et al., 2018). However, this dogma regarding the central role of NLRP3 in gout has been challenged (Joosten et al., 2011; Joosten et al., 2010), although IL-1 $\beta$  remains a crucial cytokine in the development of the disease. In our model, *Nlrp3* deficient mice exhibited similar joint swelling and clinical score compared with littermates controls (Fig. 1 A, B), despite showing reduced fever 24 h after MSU challenge (Panel C). We therefore checked IL-1 $\beta$  expression in our model. Both pro and mature forms were similarly detected by western blot in the paws of mutant and wild-type mice during the acute phase (24h) after MSU injection (Fig. 1D). Accordingly, quantification of IL-1 $\beta$  by tissue ELISA (which detects both pro and mature forms) showed equivalent amounts in paws from MSU-stimulated *Nlrp3* mutants and controls 24h post MSU injection (Fig. 1E). Finally, myeloperoxidase quantification revealed similar neutrophil infiltrate in the paws of *Nlrp3*<sup>-/-</sup> and wild-type animals following MSU injection (Fig. 1F). Similar results were obtained following pharmacological (using CRT0066101) inhibition of Protein kinase D (PKD), an essential component enabling NLRP3 inflammasome activation (Zhang et al., 2017) (Suppl. Fig. 3 A-E). To check the validity of the genetic and pharmacological inhibition of NLRP3, we performed *in vitro* experiments. In line with published reports (Martinon et al., 2006; Zhang et al., 2017), macrophages and neutrophils harvested from *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice or wild type cells treated with CRT0066101 fail to secrete IL-1 $\beta$  upon MSU or ATP stimulation following LPS priming (Suppl. Fig 4 A, B), while TNF- $\alpha$  and IL-6 secretion remains unaffected (Suppl. Fig. 4C). We also noted that neutrophils, as opposed to macrophages, appear unresponsive to a particular trigger (e.g. MSU crystals) compared to a soluble one (such as ATP) for NLRP3-dependent IL-1 $\beta$  production, a feature that has been observed by others (Chen et al., 2016).

Furthermore, we performed intraperitoneal injection of MSU and observed that this inflammation model is also *Nlrp3*-independent (Suppl. Fig. 5), as judged by the similar number of infiltrating neutrophils and macrophages in the peritoneal cavity of wild-type and mutant mice 6h upon MSU injection (panels B-D) and the comparable amount of IL-1 $\beta$  in the peritoneal fluid (panel E). Our data, while confirming that the NLRP3 inflammasome is mandatory in isolated cells (macrophages, neutrophils) to respond to MSU, also suggest that this inflammasome is dispensable for *in vivo* MSU crystals-induced inflammation initiation following s.c injection of urate crystals. To gain more insights into the early response (acute phase) in the paws following MSU s.c injection, we performed a genome-wide RNAseq analysis in MSU-injected paws compared to those receiving PBS as control at 24hpi. A comparison of 211 differentially expressed genes (showing a highly statistically significant difference between PBS- and MSU-injected paws  $p < 0.0001$ ) using Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Qiagen) and Reactome (<https://reactome.org/>) revealed significant ( $p = 2.53E-24$ ) enrichment in genes

required for granulocytes adhesion, diapedesis and degranulation (see IPA Network in Suppl. Fig. 6A). Interestingly, we also noted that *Tlr1*, *Tlr2* and *Tlr6* are significantly overexpressed following MSU challenge, pointing to a role for endogenous lipids as possible inducers of the signal I activating NF- $\kappa$ B signaling (Joosten et al., 2010). Such signal is generally provided by LPS during experimental *in vitro* models of inflammasome activation by MSU crystals, but its physiological relevance is even more questionable in light of our data showing that *Tlr4* expression remains unaffected in MSU-challenged mice. Finally, *Ccl3* strong overexpression might also account for the high fever observed upon MSU crystals injection (Soares et al., 2009).

### **MSU crystal-induced inflammation can develop autonomously from both NLRP3 and AIM2 inflammasomes**

Neutrophilic infiltration and subsequent NETosis, a feature of inflamed joint in gout patients (Chatfield et al., 2018), exposes self-DNA, which is suspected - once phagocytosed - to induce AIM2-dependant IL-1 $\beta$  secretion (reviewed in (Lugrin and Martinon, 2018)). This prompted us to investigate the potential role of this alternative inflammasome in our model of acute experimental gout. However, similarly to *Nlrp3* mutants, mice lacking *Aim2* displayed inflammatory responses similar to those observed in controls following MSU crystals injections (Fig. 2 A-C). Next, to explore a possible redundancy between the two inflammasomes, we produced *Nlrp3*<sup>-/-</sup>; *Aim2*<sup>-/-</sup> mice. As seen in panels D-F, double KO mice exhibited slightly reduced clinical responses (with differences in the area under the curve of the measure of the paw swelling reaching statistical significance between wild type and double KO mice) upon MSU crystals s.c injection compared to wild-type animals. However, quantification of IL-1 $\beta$  and myeloperoxidase (MPO) by tissue ELISA in the paws of these animals 24h upon MSU challenge, as well as seric IL-1 $\beta$  dosage (12 and 24 h after MSU injection, Fig 2. G-H), confirmed that MSU-dependent rise in these biological inflammatory markers can occur independently from these two inflammasomes. Similar observations could be made from the analysis of *Caspase 1/11*-deleted mice (*Casp1*<sup>-/-</sup>, *11*<sup>-/-</sup>) in which MSU injection induced a weak reduction of the inflammatory symptoms, albeit without showing any effect on IL-1 $\beta$  production (Suppl. Fig. 7). Since *Nlrp3*-deleted macrophages can efficiently (and even more than controls) respond to transfected poly A:T a classical inducer of the AIM2 inflammasome (Fig. 3A), we tested the existence of a possible collaboration between neutrophils, in which MSU crystals is a poor inducer of IL-1 $\beta$  secretion (Suppl. Fig. 4) but a powerful trigger of DNA release through NETosis (Chatfield et al., 2018), and macrophages, major producers of IL-1 $\beta$  once triggered by AIM2-dependent signals. For this, we performed co-cultures of both cell types isolated from either wild-type or *Nlrp3*<sup>-/-</sup>; *Aim2*<sup>-/-</sup> double knock-out (dKO) animals. As seen in Fig. 3B, IL-1 $\beta$  release by control macrophages did not significantly differed whether they are cultured with neutrophils with or without MSU. This indicates that NETosis triggered by MSU ((Chatfield et al., 2018; Schauer et al., 2014) and our own observation) did not affect IL-1 $\beta$  release, thus suggesting that DNA exposure is not essential in this process and cannot provide the necessary signal I driving *Il-1 $\beta$*  transcription.

### **Imiquimod downmodulates *Il-1 $\beta$* gene expression and protects from experimental acute uratic inflammation**

We previously demonstrated the therapeutic effects of topical imiquimod, a known TLR7-dependent inducer of type I IFN responses in mouse models of rheumatoid arthritis (Nehmar et al., 2017) and its effect on neutrophils recruitment. Therefore, we questioned the potential benefits of this treatment in our present acute uratic inflammation model, which is characterized by a transcriptomic signature

revealing MSU-induced genes involved in granulocytes diapedesis and activation. Except for body temperature, a marked reduction of the clinical parameters (paw swelling, redness, see Fig. 4 A-E) was seen in mice challenged by s.c injection of MSU crystals followed by topical application of Aldara (containing imiquimod), compared to those in which a cream composed of only the excipients (control) was applied. Tissue ELISA revealed that imiquimod specifically reduced IL-1 $\beta$  and IL-6 secretion in the treated paws (Panels F-G), whereas neutrophils infiltration (visualized by MPO quantification, Panel H) and TNF- $\alpha$  production (panel I) remained unaffected. RTqPCR and western blot analysis further documented the negative effect of imiquimod on the transcription of the *Il-1 $\beta$*  and *Il-6* genes (Panels J-K) and IL-1 $\beta$  proform expression (Panel L). Finally, we used a state-of-the-art imaging approach (MRI, Fig. 5) similar to that which is currently applied to monitor patients suffering various arthritides, including gout, to quantify the beneficial effects of imiquimod. This enabled us to better demonstrate the significant reduction of oedema formation and crystal deposit in imiquimod-treated paws. MRI also enabled us to visualize the reduction of tenosynovitis in imiquimod-treated animals (Suppl. Fig 8).

Altogether, our data support the notion that the protective effect of TLR7 activation involves negative transcriptional control of genes encoding major pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$  and IL-6. To better describe, at the molecular level, the pathways that are modulated by IMQ, we performed genome-wide transcriptomic analysis by RNAseq on MSU-inflamed paws treated or not with imiquimod at 24 hpi. In agreement with the reported role of IMQ on its cognate receptor (TLR7), IPA identified a network of interconnected type I IFN-dependent genes. Interestingly, most genes involved in granulocytes adhesion and diapedesis, which were upregulated upon MSU stimulation, exhibited down-modulation in the samples from IMQ-treated paws (see Suppl. Fig. 6B). Of note, these genes are connected in a network (predicted by IPA) in which SYK/AKT fill a central position (Suppl. Fig. 9). Although IL-1 $\beta$  repression by type I IFN has been previously described (Thacker et al., 2010) and attributed to signaling through the IL-10 / STAT3 pathway (Guarda et al., 2011), our dataset do not clearly point to such connection. Rather, reduced *Tlr6* expression and downstream NF- $\kappa$ B signaling is supported by the genes network built by IPA to account for diminished *Il-1b* expression. Unexpectedly, Reactome identified a RUNX3 pathway in the IMQ-treated samples, which may also support low *Il-1b* expression. Indeed, RUNX3, which has been described as a transcriptional regulator of *Il-1b* (Lim et al., 2011) is significantly ( $p=2,92991E-09$ ) downmodulated by IMQ. Altogether, our data suggest that the therapeutic properties of imiquimod in our experimental setting are mediated by the ability of this compound to impair two major hallmarks of inflammation: neutrophils recruitment and/or activation and IL-1 $\beta$  production.

## Discussion

### **Inflammasomes triggered by MSU crystals and the nature of the priming inducer (signal I) *in vivo*.**

Gout is a frequent arthropathy whose etiology, i.e. MSU crystal deposition in the synovial fluid of patients, is known for a long time (McCarty and Hollander, 1961). However, despite the discovery of NLRP3 as a Pattern Recognition Receptor sensing homeostatic disturbances and subsequent IL-1 $\beta$  secretion, the molecular mechanisms driving inflammatory manifestations upon hyperuricemia are still poorly described. Several animal models have been developed to better understand the relationships between MSU crystals and IL-1 secretion, among which *ex vivo* culture of macrophages were instrumental in the identification of the NLRP3 inflammasome. In addition, *in vivo* injections of crystals in the peritoneal cavity or in directly inside the joint have also been used to investigate

neutrophils recruitment and inflammasome-dependent cytokine release. Most of these models exhibit important flaws and do not reproduce the physiopathological settings of human gout. For instance, inflammation triggered by intra-articular injection of MSU crystals in mice can be prevented anti-TNF $\alpha$  therapy (Amaral et al., 2016), which is inefficacious in humans. Here, we performed sub cutaneous injections of MSU crystals in mouse paws, an approach that induces clinical manifestations (soft tissues inflammation with tendinitis, as seen with relevant medical imaging techniques) that can be preventable with drugs (colchicine, anakinra) that are currently in use to treat gouty patients. Using this model in control and genetically-deficient mice, we demonstrated that, as opposed to previous observations in isolated macrophages, MSU-induced inflammation *in vivo* can occur independently from NLRP3. Therefore, we questioned whether other inflammasomes might also be involved in this process and possibly mask the NLRP3 effect. One current hypothesis postulates that neutrophils, following DNA release through NETosis (a process that can be activated by MSU crystals (Chatfield et al., 2018)), could provide a physiologically-relevant signal driving IL-1 $\beta$  secretion and inflammation. In this work, we tested the involvement of the AIM2 inflammasome and showed that mutant mice devoid of this DNA sensor, as well as animals in which both NLRP3 and AIM2 are lacking develop normal local and systemic inflammatory responses following MSU crystals injections. These experiments reveal the complexity of the MSU-induced inflammation and IL-1 $\beta$  secretion, which, in the absence of NLRP3 and AIM2, might be matured by neutrophils-derived proteases (Joosten et al., 2009). Furthermore, we also addressed the question of the nature of the signal I, which is necessary to activate the NF- $\kappa$ B pathway and induce *Il-1 $\beta$*  transcription. Using co-cultures of neutrophils and macrophages, we showed that NETotic neutrophils cannot drive IL-1 $\beta$  secretion by MSU-stimulated macrophages, indicating that extracellular DNA is not capable to substitute for LPS in this process. Therefore, even though we were unable to identify a physiologically-relevant primer, our RNAseq analysis, which revealed *Tlr1*, *2* and *6* overexpression upon MSU challenge, provides solid argument supporting a role for endogenous lipids or lipopeptides as physiopathological inducers of signal I-dependent NF- $\kappa$ B activation

### **Signaling pathways supporting anti-inflammatory effects of type I IFNs**

The anti-inflammatory effects of type I interferons is a matter of controversy, but can be supported by at least two lines of evidence: (i) sustained type I IFN production in chronic viral infections induces immunosuppression (Snell et al., 2017), as demonstrated in the LCMV model (Teijaro et al., 2013; Wang et al., 2012). (ii) IFN $\beta$  is an effective treatment against inflammation of the central nervous system in multiple sclerosis (Reich et al., 2018). However, precise mechanisms underlying this immunomodulatory effect are poorly understood. Using an alum-induced peritonitis model, the induction of the IL-10 / STAT3 axis in response to type I IFN and LPS signaling was proposed as a predominant event to explain subsequent immunosuppression (Guarda et al., 2011). In our dataset of imiquimod-modulated genes, several STAT3 targets (e.g. *Ccl2*, *Cxcr2*, *Socs3*) appeared significantly repressed, which indicates that this mechanism can be at play in response to imiquimod application. However, it is important to consider that our RNAseq approach does not enable the identification of protein modifications that could reveal the potential roles of transcription factors. A combined proteomic approach would help and probably refine the likely IL-10-dependent signaling and its contribution to imiquimod-based therapy. Furthermore, the timing (24 hpi) at which gene expression was quantified may also explain why transcripts encoding anti-inflammatory players, like IL-10, were not identified. Interestingly, RUNX3, another transcription factor involved in *Il-1 $\beta$*  gene regulation (Lim et al., 2011), was also evidenced in the analysis of our RNAseq data by the Reactome algorithm.

Although this information requires further experimental validation, it is also supported by datamining of the ENCODE database which indicates that, in addition to *Il-1b*, multiple cytokines genes (such as *Il-6*) can be targeted by this transcription factor.

### **Imiquimod, a powerful and promising alternative in gout patients**

The present work clearly demonstrates the potential benefits to use imiquimod to treat acute uratic inflammation. Indeed, for several patients exhibiting additional comorbidities, such as kidney dysfunction, the prescription of colchicine might be unadvisable and topical imiquimod might become an attractive alternative devoid of major side effects. As demonstrated in our animal model, a single topical application appears sufficient to reduce both neutrophils attraction and IL-1 $\beta$  secretion, thereby limiting the biological and clinical inflammatory symptoms that appear following MSU crystals injection. This dual activity of imiquimod appears even more attractive in view of the recent description of an inflammatory disorder (NOMID, neonatal-onset multisystem inflammatory disease) caused by GASDERMIN D (GSDMD) release and pyroptosis following inflammasome activation (Xiao et al., 2018). Indeed, some patients suffering cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS) such as NOMID appear resistant to IL-1 blocking agents. A future clinical trial will of course be necessary to evaluate the efficacy of topical imiquimod (Aldara) in humans. In addition, our work pointed to the multiplicity of actors (sensors, proteases) that are likely involved in the development of gout, which strongly advocates against the pharmacological targeting of only one of them, the NLRP3 sensor. Finally, even though our genome-wide transcriptional analysis did not precisely identify the exact molecular pathways linking imiquimod, type I interferons and reduced *Il-1 $\beta$*  expression, an essential genetic network that appeared targeted by imiquimod (and predicted by IPA) brings together many genes encoding granulocytes cell surface markers (such as integrins), connected to a hub composed of the kinases SYK and PI3K. Their activation by MSU crystals binding to the plasma membrane (Ng et al., 2008) thus appears as an important contributor to neutrophils recruitment and activation, which could be impaired by already existing inhibitors of these kinases that were developed for other pathologies, such as leukemia.

In conclusion, our *in vivo* model uncovers an unsuspected complexity of the pathogenesis of gout triggered by uric acid crystals, as illustrated by its independence from the NLRP3 inflammasome. In addition, novel insights emerge from our transcriptomic analyses, such as the possible role of Tlr1, 2 and/or 6 as sensors priming the NF- $\kappa$ B pathway. This observation paves the way for the search of lipids or lipoproteins which can be of endogenous or microbial (Liu et al., 2018) origin. Finally, our transcriptomic analyses reveal novel therapeutic targets, which will be necessary to develop in order to take care of an ever growing number of patients in ageing populations.

## **Materials and Methods**

### **Mice**

*Nlrp3*<sup>-/-</sup> and *Casp1/11*<sup>-/-</sup> mice were provided by Romeo Ricci (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire (IGBMC), Illkirch, France), *Aim2*<sup>-/-</sup> mice were obtained from Veit Hornung and *Ifnar1*<sup>-/-</sup> from Rolf Zinkernagel (University Hospital, Zurich); we generated the double knock out mice (*Aim2*<sup>-/-</sup>; *Nlrp3*<sup>-/-</sup>) in our animal care facility. Littermate controls are indicated by +/+ in all figures. All the mice used in those experiments were maintained under pathogen-free conditions in the animal care facility of our laboratory (Institut d'Hématologie et d'Immunologie, Strasbourg, France) and were sex and age-matched (12-16 weeks).



### **Study approval**

Handling of mice and experimental procedures were conducted in accordance with the French law for the protection of laboratory animals. The procedures were approved by the “service vétérinaire de la Préfecture du Bas-Rhin” (Strasbourg, France) and by the Regional ethical committee for animal experimentation (CREMEAS) of the Strasbourg University, under the authorization number 2018083014133041.

### **Reagents**

MSU crystals were generated as described (Schlitz, C. et al. 2002). Briefly, we dissolved 1,68g of uric acid (Sigma-Aldrich) into 500mL of PBS containing 0,01M of NaOH by heating at 70°C, pH was adjusted to 7,1-7,2. Then, the uric acid solution was left at room temperature until the crystals form under mild agitation. Crystals were then washed in ethanol, dried, weighted and thermally treated (250°C for an hour) and finally sonicated to obtain crystals <50µm in length. They were aliquoted in sterile PBS and frozen at -20°C until use.

Poly-(dA:dT) and Lipofectamine 3000 were purchased from Invivogen and Invitrogen; LPS (*Salmonella abortus equi*), ATP and Colchicine from Sigma-Aldrich; ELISA kits (IL-1β, IL-6, TNFα, MPO) from Biotechne. Thioglycolate was home-made from brewer’s thioglycolate (BD). The various antibodies used for western blot were from Biotechne (anti-mouse IL-1β, AF401, and secondary HAF-109) or from Abcam (anti-tubulin) and Sigma-Aldrich (anti-vinculin). Anti-Gr1, Anti-CD11b, anti-CD14 and 7-AAD were obtained from eBioscience. CRT0066101 was provided from the lab of Romeo Ricci; Anakinra was generously provided by Ommar S. Omarjee and Alexandre Belot (Lyon University) and Ethanercept by Christian Von Frenckel (Liege University).

### **Acute uratic inflammation model**

In this model, 3mg of preformed MSU crystals (described above) resuspended in 70µL of sterile PBS were injected by the subcutaneous route in the left hind paws of animals, the right was injected with PBS only as intrinsic control. Hind paw thickness was measured with a caliper and visual clinical scores were established on the basis of tarsal/ankle oedema and erythema presence (0 = no inflammation signs, 1 = slight swelling and/or erythema, 2 = moderate swelling/erythema, 3 = severe oedema/erythema and 4 = excessive oedema spanning all over the paw). Visual scores were made by two independent experimenters. Mice were also monitored for body temperature.

### **Topical application of IMQ**

Mice were anesthetized by intramuscular injection of Ketamine/Xylazine. The cream (ALDARA or vehicle control cream) was applied on the hind paws from the ankle to the tip of digits with a pen embedded into a latex glove. 250mg of ALDARA containing 5% IMQ were sufficient to treat 10-12 paws which approximately corresponds to 1-1,25mg of IMQ/paw (as described by Nehmar, R. et al. 2017).

### **MSU-induced peritonitis model**

One milligram of preformed MSU crystals was injected intraperitoneally at h0 and a peritoneal lavage was conducted 6h later, under anaesthesia, with cold PBS. Peritoneal fluid was subsequently analysed by flow cytometry and ELISA. Briefly, the liquid was filtered through a 40µm porosity strainer, centrifuged at 300g 5min 4°C and cells were stained with anti-Gr1-FITC, anti-CD11b-APC and

anti-CD14-PE antibodies to count the neutrophil and monocyte populations. Absolute numbers were also determined in peritoneal collections by multiplying the percentages of neutrophils/monocytes to the absolute numbers of cells in the lavage. Flow cytometry acquisitions were realized with the BD Accuri C6 cytometer (BD), data were analysed with the BD Accuri Software.

### **Magnetic resonance imagery (MRI)**

To detect and localize inflammation in paws, anatomical MRI was acquired in eight ex-vivo mice. The day before MRI exam, 3mg of MSU and PBS were injected subcutaneously in the left and right paw respectively. Topical imiquimod was applied on paws in four mice; control cream was applied on the other four. Mice were sacrificed under isoflurane anesthesia just before the MRI. MRI was performed on 7/30 Biospec system (Bruker Biospin, Ettlingen, Germany). Transmission was achieved with a quadrature volume resonator (inner diameter of 86 mm), and a surface coil (~ 10 mm), installed on paws, was used for signal reception (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany). MRI experiments were realized with ParaVision 6.0.1 software. T2WI anatomical dataset was acquired using RARE-3D sequence using following parameters: FOV: 15 x 15 x 8 mm<sup>3</sup>, matrix 150 x 150 x 80, TE eff = 26.7 ms, TR = 2 s, N avg = 1, RARE-Factor = 14.

### **MRI Data analysis and 3D reconstruction**

The signal bias of T2WI induced by the surface coil used was corrected with N4 bias correction (Advanced Normalization Tools, ANTs). Paws were automatically co-registered based on the bones to one of the control mouse using FLIRT (FMRIB Software Library, Oxford, UK). The inflammatory areas were automatically segmented using FAST (FMRIB Software Library, Oxford, UK). Volumetric images were obtained with the help of the 3D viewer module of Image J, 3D reconstruction were made using the 3D Slicer software.

### **Protein preparation from paws**

In order to quantify the cytokine production *in situ*, hind paws were collected from euthanized mice and stored at -80°C. Paws were first minced with a scalpel in a Petri dish placed on dry ice. Small tissue pieces were maintained in ice and 1mL of NP40 lysis buffer was added before homogenization with a tissue tearor (OMNI International Tissue MASTER 125). Tubes were then kept on ice for 45min and centrifuged at 12 000g 20min at 4°C; afterwards, the supernatants were collected in individual Eppendorf protein-low bind 1,5mL tubes (eppendorf) and stored at -80°C. Cytokine measurements were performed by ELISA and Western Blot.

### **RNA preparation from paws**

RNAs were prepared similarly to proteins (collection of paws, slicing) but tissues were homogenized in 2mL of Trizol (TRI-Reagent, Sigma-Aldrich) instead of NP40 lysis buffer. Homogenates were transferred in a nuclease-free 1,5mL Eppendorf tube and RNA was purified as previously described (Nehmar, R. et al. 2017). Total RNAs were quantified using a Nanodrop device and then treated with DNase I (Roche) according to the manufacturer's instructions.

### **Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)**

Total RNA was reverse transcribed using the cDNA synthesis kit (iScript ready-to-use cDNA supermix, Biorad). Real-time quantitative RT-qPCR was performed in a total volume of 20µL using the Sso-advanced universal SYBR-Green supermix (Biorad) and gene-specific primers presented in table 1.

After a denaturing step at 95°C for 30 seconds, 40 cycles were performed (95°C for 5s and 60°C for 20s) using a Rotor-Gene 6000 real-time PCR machine (Corbett Life Science). Results were obtained using the SDS Software (Perkin Elmer) and evaluated using Excel (Microsoft). Melting-curve analysis was performed to assess the specificity of PCR products. Relative expression was calculated using the comparative threshold cycle (Ct) method, normalized on a control group (see figures).

### **RNA-seq**

Total RNA integrity was determined with the Agilent total RNA Pico Kit on a 2100 Bioanalyzer instrument (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Library construction was performed with the "SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit v2 - Pico Input Mammalian" (TaKaRa Bio USA, Inc., Mountain View, CA, USA) with a final multiplexing of 11 libraries according to the manufacturer's instructions. The library pool was denatured according to the Illumina protocol "Denature and Dilute Libraries Guide" and then deposited at a final concentration of 1.3 pM to be sequenced on the NextSeq 500 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA).

### **Analysis of RNA-seq data**

The transcriptome data set, composed of sequencing reads, was generated by an Illumina NextSeq instrument. The objective was to identify genes that are differentially expressed between two experimental conditions, namely treatment and control.

For every sample, quality control was carried out and assessed with the NGS Core Tools FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Sequence reads are mapped using STAR (Dobin, A. et al. 2013) and unmapped reads are remapped with Bowtie2 (Langmead, B. et al. 2012) using with the very sensitive local option. The total reads mapped were finally available in BAM (Binary Alignment Map) format for raw read counts extraction. Read counts were found by the htseq-count tool of the Python package HTSeq (Anders, S. et al. 2015) with default parameters to generate an abundant matrix. At last, differential analyses were performed by the DESEQ2 (Love, M.I. et al. 2014) package of the Bioconductor framework. Up-regulated and down-regulated genes were selected based on the adjusted p-value and the fold-change information. IPA (Ingenuity pathway analysis, Qiagen) was then used for data analysis.

### **Western blot**

IL-1 $\beta$ -maturation quantification was performed by western blot from ground paw samples (see previous sections). Briefly, total proteins were quantified in paw extracts using the Bicinchoninic acid technique (BCA) and 75-100 $\mu$ g of proteins were loaded on 12% polyacrylamide gels (Biorad). The migration step was followed by a liquid transfer on PVDF membranes (100V 40min) and a blocking step for 1h with TBS-Tween 1% milk 5%. Membranes were then probed with AF-401 (IL-1 $\beta$ ), anti-vinculine (V9131, Sigma-Aldrich) or anti-tubulin (DM1A, Abcam) antibodies at 4°C overnight. HAF-109 and goat anti-mouse antibodies were subsequently used as secondary antibodies (1h, RT). Revelation was conducted with the Femto super-signal kit. Three washings were realized between each stage.

### **Cell culture**

Peritoneal macrophages were collected from peritoneal exudates 72h after the injection of 2mL of Thioglycolate 4%. Cells were washed, counted and plated at a density of 5x10<sup>5</sup> cells/well (24 well-plates) in RPMI 1640 (Gibco) 10% FBS (Dutcher); the medium was changed for a fresh one 3h later.

Peritoneal neutrophils were harvested after a short course of thioglycolate (18h) and purified using Ficoll Paque leading to a purity greater than 90%. Neutrophils were plated immediately at a density of  $1 \times 10^6$  cells/well in RPMI 1640 10% FCS.

### Inflammasome activation

In order to stimulate the production of pro-IL-1 $\beta$ , cells were pre-treated with LPS 1 $\mu$ g/mL for 3h and the NLRP3 inflammasome was then activated with 2mM ATP for 1h or with MSU crystals (250 $\mu$ g/mL) for 6h. The AIM2 inflammasome was activated by the transfection of 0,5 $\mu$ g of poly-dA:dT using the Lipofectamine 3000 kit, the medium was collected 8h after transfection. After each activation, the supernatants were collected, centrifuged at 2000g 5min 4°C to get rid of the cell debris and the supernatants were harvested in new tubes, all samples were kept a -80°C.

### Inhibitors

The CRT0066101 inhibitor was used *in vitro* at a dose of 10 $\mu$ M and introduced in the culture medium 1h prior to LPS priming and kept at this concentration all along the activation. DMSO was used as control, at a dose of 0,1%.

### Statistics

We analyzed the data with the Mann-Whitney test (two-tailed unpaired) to compare two independent groups using GraphPad 5.01 software. A probability (p) value of < 0.05 was considered to be significant. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

**Table 1: primer sequences**

Genes	Forward primers (5' --> 3')	Reverse primers (5'-->3')
18S RNA	GGGAGCCTGAGAAACGGC	GGGTCGGGAGTGGTAATTT
Aim2	AGGCAGTGGGAACAAGACAG	AAACTTCCTGACGCCACCC
Casp1	CTTGGAGACATCCTGTCAAGG	AGTCACAAGACCAGGCATATTC
Cd14	GGAAGCCAGAGAACACCATC	CCAGAAGCAACAGCAACAAG
Cxcl1	GGCTGGGATTCACCTCAAGAACAT	AAGCCTCGCGACCATTCTTGA
Cxcl2	CTGAACAAAGGCAAGGCTAACTGAC	CTTCCCGGGTGTCTTTTGT
Iffit1	CAACTGAGGACATCCCGAAACA	ATGTGGGCCTCAGTTTCAAAGT
Ifna2	TGTGCTTTTCTCGTGATGCTGA	AAGGCCCTCTTGTTCCTGAGGTTA
Ifna4	CCTGGTAATGATGAGCTACTACTGGT	ATTTCTTCCAGGACTGTCAAGGC
Ifnar1	CCGCTGACTGTGTAAGTGTG	ATTTCCAGACGCTCCTCAAA
Ifnar2	TCTCTGCCGTCCGTCTCCT	AGGCTCGCAGACACCACAAG
Ifnb	TCCAAGAAAGGACGAACATTTCG	TGAGGACATCTCCCACGTCAA
Il1a	TGAGTTTTGGTGTCTTCTGGC	TCGGGAGGAGACGACTCTAA
Il1b	AATTGGTCATAGCCCGCACT	AAGCAATGTGCTGGTGCTTC
Il6	ATGAACAACGATGATGCACTTG	TATCCAGTTTGGTAGCATCCAT
Il12	CGCCACACAAATGGATGCAA	TGGCACGATGGAACCTGTCT
Il18	TCCTTGAAGTTGACGCAAGA	CTTCTGCAACCTCCAGCATC
Il28	AGGGTGCCATCGAGAAGAG	GTGGTCAGGGCTGAGTCATT
Il33	GGCTGCATGCCAACGACAAGG	AAGGCCTGTTCCGGAGGCGA
Irf7	CCCATCTTCGACTTCAGCAC	TGTAGTGTGGTGACCCTTGC
Irgam	TGCTGCGAAGATCCTAGTTG	CCCCAATTACGTAGCGAATG
Mx1	CCAGGTCCTGCTCCACAC	TCTGAGGAGAGCCAGACGAT
Mx2	CAGGGAGTCGATGAGGTCAA	CTTACCCAGTGGAGAGACGG
Nlrp3	ATCAACAGGCGAGACCTCTG	GTCCTCCTGGCATAACCATAG
Tnfa	CTACTCCCAGGTTCTCTTCAA	GCAGAGAGGAGGTTGACTTTC

## Acknowledgements

## References

- Amaral, F.A., Bastos, L.F., Oliveira, T.H., Dias, A.C., Oliveira, V.L., Tavares, L.D., Costa, V.V., Galvao, I., Soriani, F.M., Szymkowski, D.E., *et al.* (2016). Transmembrane TNF-alpha is sufficient for articular inflammation and hypernociception in a mouse model of gout. *European journal of immunology* *46*, 204-211.
- Amaral, F.A., Costa, V.V., Tavares, L.D., Sachs, D., Coelho, F.M., Fagundes, C.T., Soriani, F.M., Silveira, T.N., Cunha, L.D., Zamboni, D.S., *et al.* (2012). NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of gout. *Arthritis and rheumatism* *64*, 474-484.
- Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* *31*, 166–169.
- Castelblanco, M., Lugin, J., Ehrchiou, D., Nasi, S., Ishii, I., So, A., Martinon, F., and Busso, N. (2018). Hydrogen sulfide inhibits NLRP3 inflammasome activation and reduces cytokine production both in vitro and in a mouse model of inflammation. *The Journal of biological chemistry* *293*, 2546-2557.
- Chatfield, S.M., Grebe, K., Whitehead, L.W., Rogers, K.L., Nebl, T., Murphy, J.M., and Wicks, I.P. (2018). Monosodium Urate Crystals Generate Nuclease-Resistant Neutrophil Extracellular Traps via a Distinct Molecular Pathway. *J Immunol* *200*, 1802-1816.
- Chen, C.J., Tseng, C.C., Yen, J.H., Chang, J.G., Chou, W.C., Chu, H.W., Chang, S.J., and Liao, W.T. (2018). ABCG2 contributes to the development of gout and hyperuricemia in a genome-wide association study. *Scientific reports* *8*, 3137.
- Chen, K.W., Bezbradica, J.S., Gross, C.J., Wall, A.A., Sweet, M.J., Stow, J.L., and Schroder, K. (2016). The murine neutrophil NLRP3 inflammasome is activated by soluble but not particulate or crystalline agonists. *European journal of immunology* *46*, 1004-1010.
- Dalbeth, N., Stamp, L.K., and Merriman, T.R. (2017). The genetics of gout: towards personalised medicine? *BMC medicine* *15*, 108.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* *29*, 15–21.
- Elfishawi, M.M., Zleik, N., Kvrjic, Z., Michet, C.J., Jr., Crowson, C.S., Matteson, E.L., and Bongartz, T. (2017). The Rising Incidence of Gout and the Increasing Burden of Comorbidities: A Population-based Study over 20 Years. *The Journal of rheumatology*.
- Giamarellos-Bourboulis, E.J., Mouktaroudi, M., Bodar, E., van der Ven, J., Kullberg, B.J., Netea, M.G., and van der Meer, J.W. (2009). Crystals of monosodium urate monohydrate enhance lipopolysaccharide-induced release of interleukin 1 beta by mononuclear cells through a caspase 1-mediated process. *Annals of the rheumatic diseases* *68*, 273-278.
- Guarda, G., Braun, M., Staehli, F., Tardivel, A., Mattmann, C., Forster, I., Farlik, M., Decker, T., Du Pasquier, R.A., Romero, P., *et al.* (2011). Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity* *34*, 213-223.
- Joosten, L.A., Ea, H.K., Netea, M.G., and Busso, N. (2011). Interleukin-1beta activation during acute joint inflammation: a limited role for the NLRP3 inflammasome in vivo. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* *78*, 107-110.
- Joosten, L.A., Netea, M.G., Fantuzzi, G., Koenders, M.I., Helsen, M.M., Sparrer, H., Pham, C.T., van der Meer, J.W., 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 and rheumatism* *60*, 3651-3662.
- Joosten, L.A., Netea, M.G., Mylona, E., Koenders, M.I., Malireddi, R.K., Oosting, M., Stienstra, R., van de Veerdonk, F.L., Stalenhoef, A.F., Giamarellos-Bourboulis, E.J., *et al.* (2010). Engagement of

fatty acids with Toll-like receptor 2 drives interleukin-1beta production via the ASC/caspase 1 pathway in monosodium urate monohydrate crystal-induced gouty arthritis. *Arthritis and rheumatism* 62, 3237-3248.

Kottgen, A., Albrecht, E., Teumer, A., Vitart, V., Krumsiek, J., Hundertmark, C., Pistis, G., Ruggiero, D., O'Seaghdha, C.M., Haller, T., *et al.* (2013). Genome-wide association analyses identify 18 new loci associated with serum urate concentrations. *Nature genetics* 45, 145-154.

Kuemmerle-Deschner, J.B., Ozen, S., Tyrrell, P.N., Kone-Paut, I., Goldbach-Mansky, R., Lachmann, H., Blank, N., Hoffman, H.M., Weissbarth-Riedel, E., Hugel, B., *et al.* (2017). Diagnostic criteria for cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS). *Annals of the rheumatic diseases* 76, 942-947.

Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357-359.

Liebner, R., Mathaes, R., Meyer, M., Hey, T., Winter, G., and Besheer, A. (2014). Protein HESylation for half-life extension: synthesis, characterization and pharmacokinetics of HESylated anakinra. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* 87, 378-385.

Lim, B., Ju, H., Kim, M., and Kang, C. (2011). Increased genetic susceptibility to intestinal-type gastric cancer is associated with increased activity of the RUNX3 distal promoter. *Cancer* 117, 5161-5171.

Liu, J., Cui, L., Yan, X., Zhao, X., Cheng, J., Zhou, L., Gao, J., Cao, Z., Ye, X., and Hu, S. (2018). Analysis of Oral Microbiota Revealed High Abundance of *Prevotella Intermedia* in Gout Patients. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 49, 1804-1812.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.

Lugrin, J., and Martinon, F. (2018). The AIM2 inflammasome: Sensor of pathogens and cellular perturbations. *Immunological reviews* 281, 99-114.

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

Maueroder, C., Kienhofer, D., Hahn, J., Schauer, C., Manger, B., Schett, G., Herrmann, M., and Hoffmann, M.H. (2015). How neutrophil extracellular traps orchestrate the local immune response in gout. *J Mol Med (Berl)* 93, 727-734.

McCarty, D.J., and Hollander, J.L. (1961). Identification of urate crystals in gouty synovial fluid. *Annals of internal medicine* 54, 452-460.

Nakayama, A., Nakaoka, H., Yamamoto, K., Sakiyama, M., Shaukat, A., Toyoda, Y., Okada, Y., Kamatani, Y., Nakamura, T., Takada, T., *et al.* (2017). GWAS of clinically defined gout and subtypes identifies multiple susceptibility loci that include urate transporter genes. *Annals of the rheumatic diseases* 76, 869-877.

Nehmar, R., Alsaleh, G., Voisin, B., Flacher, V., Mariotte, A., Saferding, V., Puchner, A., Niederreiter, B., Vandamme, T., Schabbauer, G., *et al.* (2017). Therapeutic Modulation of Plasmacytoid Dendritic Cells in Experimental Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 69, 2124-2135.

Ng, G., Sharma, K., Ward, S.M., Desrosiers, M.D., Stephens, L.A., Schoel, W.M., Li, T., Lowell, C.A., Ling, C.C., Amrein, M.W., *et al.* (2008). Receptor-independent, direct membrane binding leads to cell-surface lipid sorting and Syk kinase activation in dendritic cells. *Immunity* 29, 807-818.

Reich, D.S., Lucchinetti, C.F., and Calabresi, P.A. (2018). Multiple Sclerosis. *The New England journal of medicine* 378, 169-180.

Schauer, C., Janko, C., Munoz, L.E., Zhao, Y., Kienhofer, D., Frey, B., Lell, M., Manger, B., Rech, J., Naschberger, E., *et al.* (2014). Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nature medicine* 20, 511-517.

Schiltz, C., Lioté, F., Prudhommeaux, F., Meunier, A., Champy, R., Callebert, J., and Bardin, T. (2002). Monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in vivo: Quantitative

histomorphometric analysis of cellular events: MSU Crystal-Induced Inflammation in Vivo. *Arthritis & Rheumatism* **46**, 1643–1650.

Snell, L.M., McGaha, T.L., and Brooks, D.G. (2017). Type I Interferon in Chronic Virus Infection and Cancer. *Trends in immunology* **38**, 542-557.

So, A.K., and Martinon, F. (2017). Inflammation in gout: mechanisms and therapeutic targets. *Nature reviews Rheumatology* **13**, 639-647.

Soares, D.M., Figueiredo, M.J., Martins, J.M., Machado, R.R., Kanashiro, A., Malvar Ddo, C., Pessini, A.C., Roth, J., and Souza, G.E. (2009). CCL3/MIP-1 alpha is not involved in the LPS-induced fever and its pyrogenic activity depends on CRF. *Brain research* **1269**, 54-60.

Teijaro, J.R., Ng, C., Lee, A.M., Sullivan, B.M., Sheehan, K.C., Welch, M., Schreiber, R.D., de la Torre, J.C., and Oldstone, M.B. (2013). Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science* **340**, 207-211.

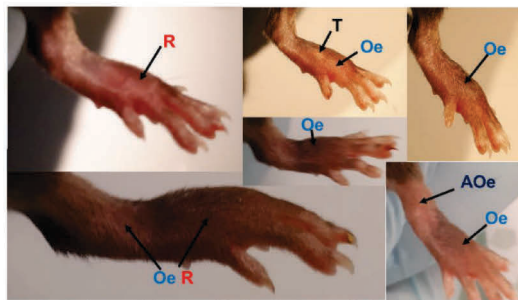
Thacker, S.G., Berthier, C.C., Mattinzoli, D., Rastaldi, M.P., Kretzler, M., and Kaplan, M.J. (2010). The detrimental effects of IFN-alpha on vasculogenesis in lupus are mediated by repression of IL-1 pathways: potential role in atherogenesis and renal vascular rarefaction. *J Immunol* **185**, 4457-4469.

Wang, Y., Swiecki, M., Cella, M., Alber, G., Schreiber, R.D., Gilfillan, S., and Colonna, M. (2012). Timing and magnitude of type I interferon responses by distinct sensors impact CD8 T cell exhaustion and chronic viral infection. *Cell host & microbe* **11**, 631-642.

Xiao, J., Wang, C., Yao, J.C., Alippe, Y., Xu, C., Kress, D., Civitelli, R., Abu-Amer, Y., Kanneganti, T.D., Link, D.C., *et al.* (2018). Gasdermin D mediates the pathogenesis of neonatal-onset multisystem inflammatory disease in mice. *PLoS biology* **16**, e3000047.

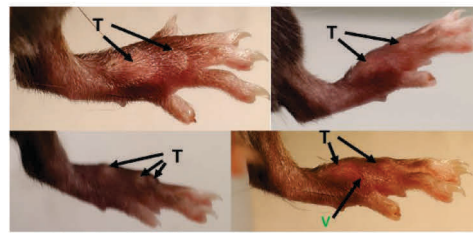
Zhang, Z., Meszaros, G., He, W.T., Xu, Y., de Fatima Magliarelli, H., Mailly, L., Mihlan, M., Liu, Y., Puig Gamez, M., Goginashvili, A., *et al.* (2017). Protein kinase D at the Golgi controls NLRP3 inflammasome activation. *The Journal of experimental medicine* **214**, 2671-2693.

**A. 24hpi gout attack (acute phase)**



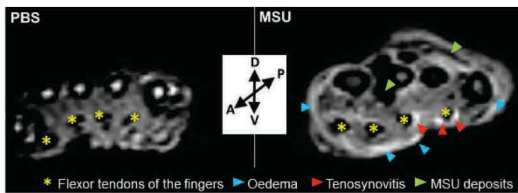
R: Redness, T: Tophus(i), Oe: Oedema, AOe: Ankle oedema

**B. 168hpi resolution phase**



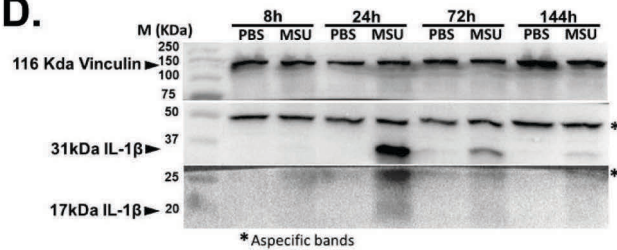
T: Tophus(i), V: Blood vessels

**C.**



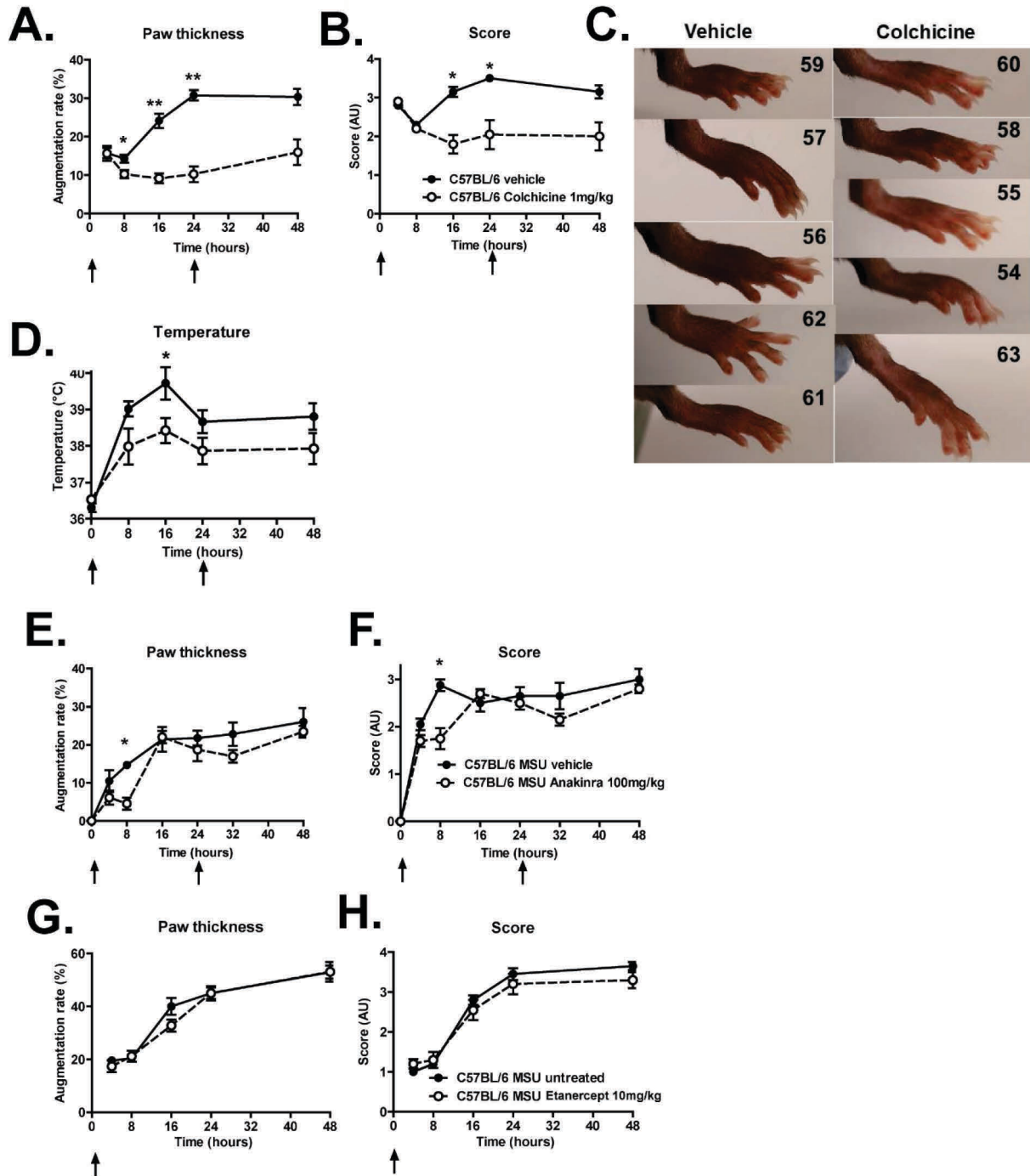
\* Flexor tendons of the fingers    ▶ Oedema    ▶ Tenosynovitis    ▶ MSU deposits

**D.**

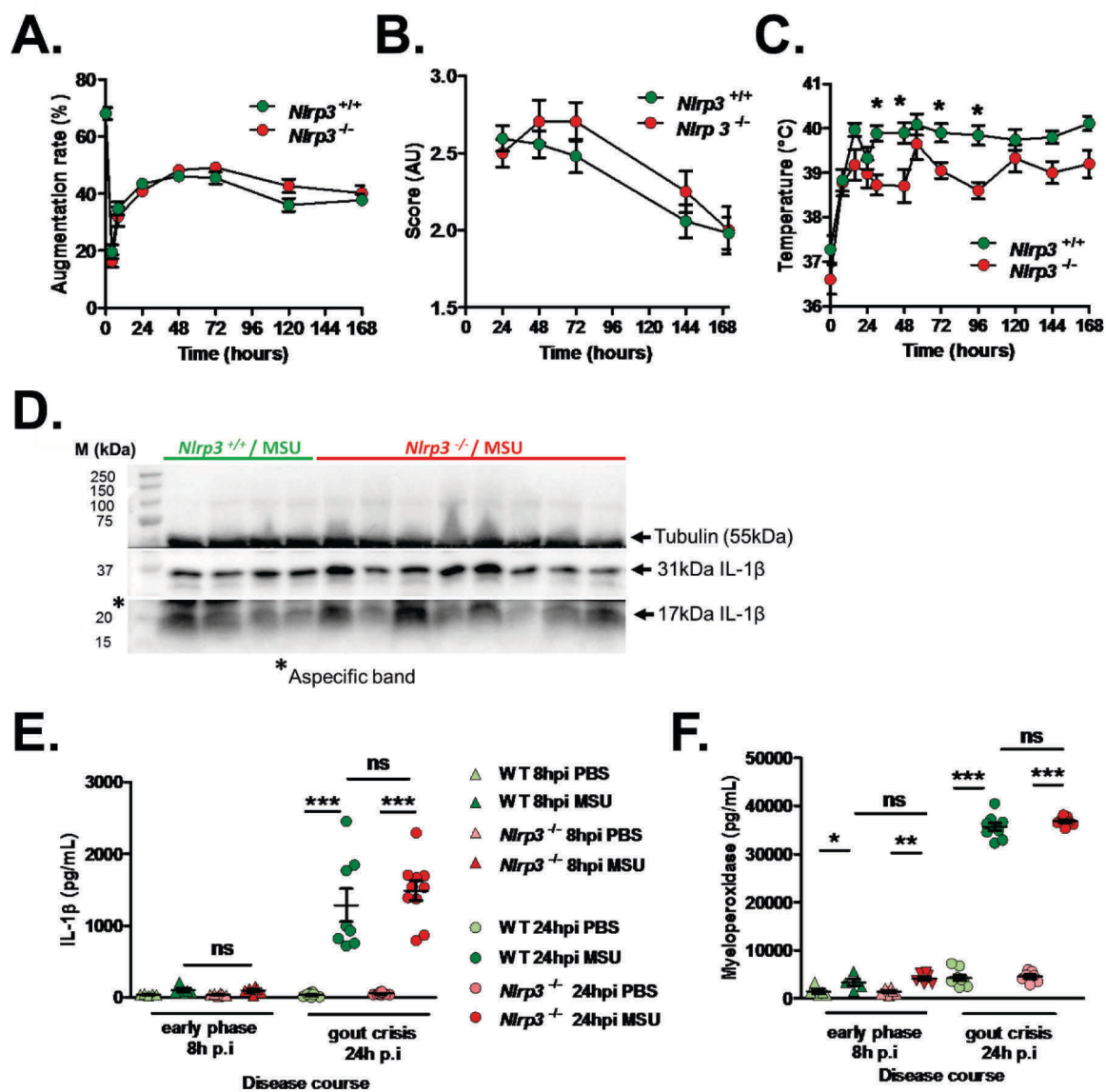


**Figure S1: The murine subcutaneous acute uratic inflammation model is clinically similar to human gout attack.** **A and B.** Representative pictures of C57BL/6J mice paws taken 24h after the injection of 3mg of MSU crystals (acute phase) and 168h after (Resolution phase). Paws are typically inflamed at the early phase (R: redness, Oe: Oedema, AOe: Ankle oedema) (T: Tophus/i), cardinal signs of inflammation tends to disappear at the resolution phase enabling numerous tophus-like structures (T) to be visible. **C.** Axial view of paws imaged by Magnetic Resonance Imaging (MRI) of PBS (left) and MSU-injected (right) C57BL/6J mice at 24h post-injection. MRI was performed with the T2-weighted, fat-suppression mode and reveals oedema and tenosynovitis upon MSU injection. **D.** MSU injection induces mature IL-1 $\beta$  production. Mice paws were collected at different time points after the injection of MSU crystals or PBS. Paw extracts were realized and submitted to western blot for IL-1 $\beta$ ; Vinculin was used as loading control. The picture is representative of three different blots. \* denotes a non-specific band.

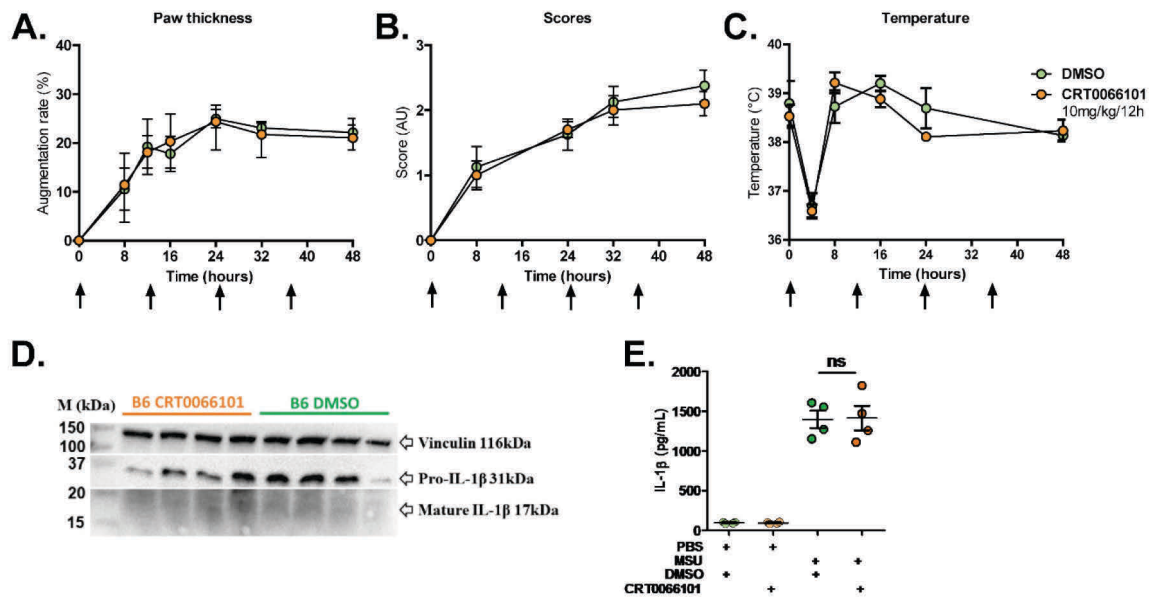




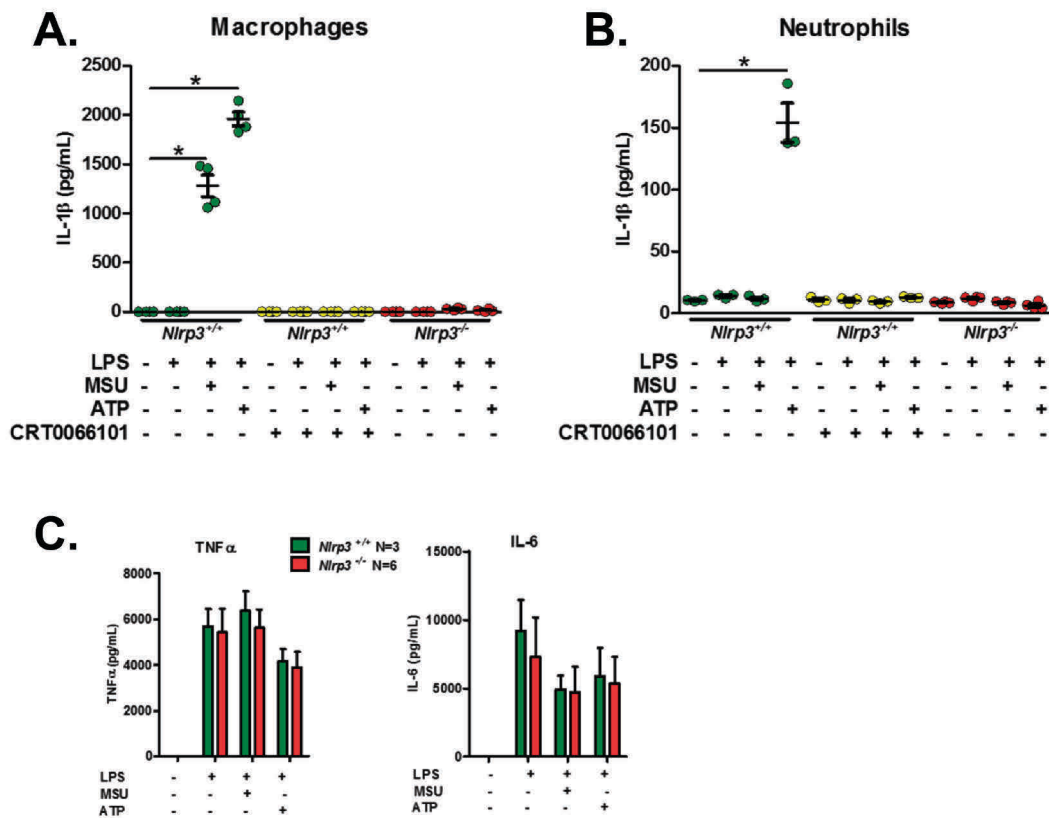
**Figure S2: Subcutaneous acute uratic inflammation responds to the first-line drug regimen used in human gout attack.** A-D. C57BL/6J mice were submitted to an acute uratic inflammation experiment and treated with colchicine at day 0 (1mg/kg/j) and at day 1 (0,5mg/kg/j). A. Paw swelling measurements. B. Clinical scores. C. representative pictures of the colchicine-treated (right) and vehicle-treated (left) mice paws and D. Body temperature. E-H. Acute uratic inflammation (C57BL/6J mice) following Anakinra (100mg/kg/j) at D0 and D1 (E-F) or Etanercept treatment (10mg/kg) at D0 (G-H). E. and G. Paw swelling, F. and H. Clinical scores. All experiments were realized with n = 5 mice in each group. Results represent mean +/- SEM and were analysed with a two-tailed Mann-Whitney test, \* = p<0.05, \*\* = p < 0.01.



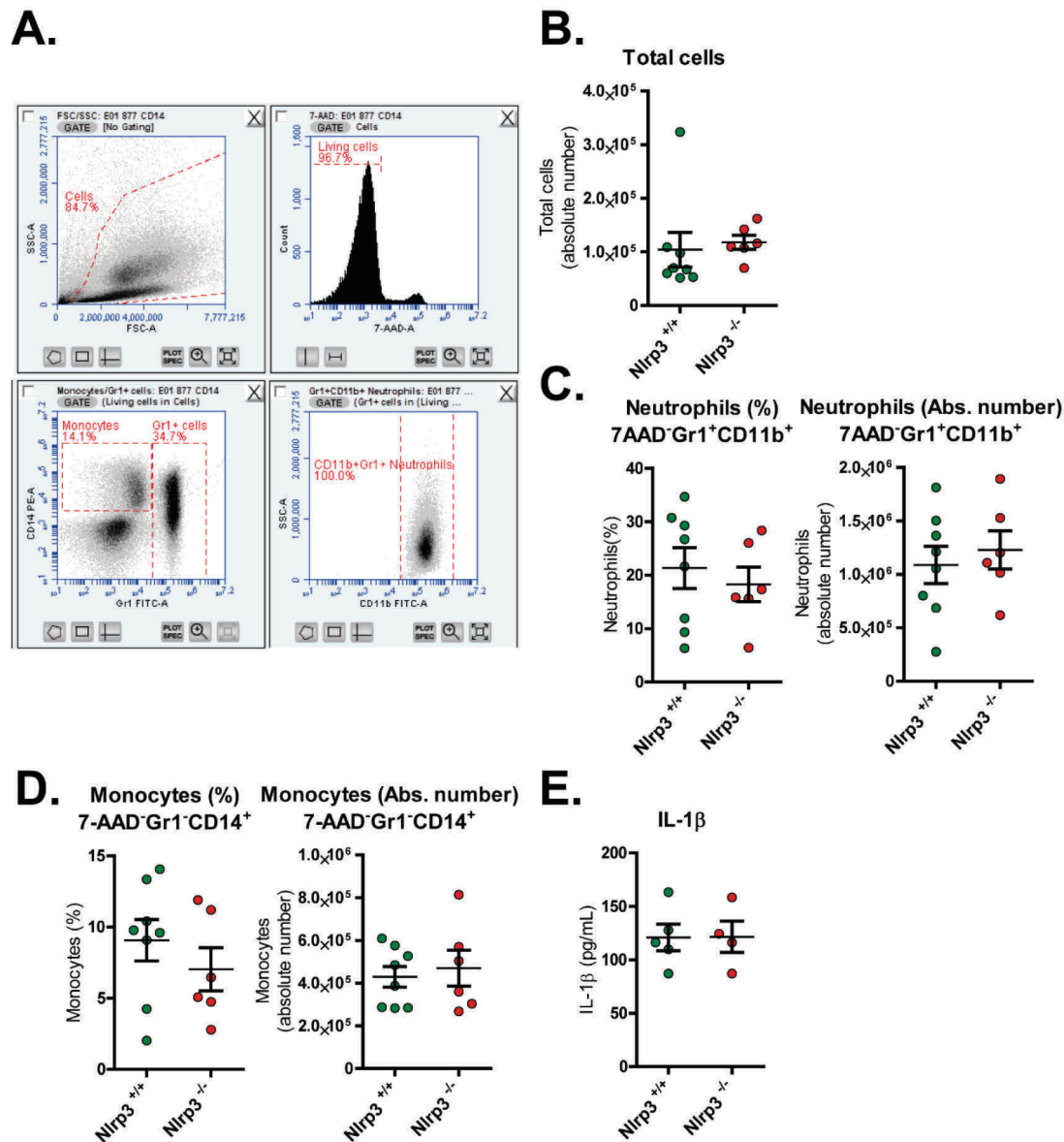
**Figure 1:** The NLRP3 inflammasome is not required for IL-1 $\beta$  maturation and consecutive inflammation in the subcutaneous acute uratic inflammation model. A-F. *Nlrp3<sup>+/+</sup>* and *Nlrp3<sup>-/-</sup>* mice were submitted to an acute uratic inflammation experiment. A. Paw swelling, B. Clinical scores and C. Body temperature were recorded over a 7-days-long period (n = 11 to 13 in each group). D-F. *In situ* (paws) analysis of IL-1 $\beta$  production/maturation and MPO quantification. D. Twenty four hours post-injection, paws were grinded and a western blot analysis was realized on 75 $\mu$ g of paw extracts to visualize pro-IL-1 $\beta$  (31kDa) and its cleaved, mature form (17kDa); Tubulin was used a loading control (n = 4 *Nlrp3<sup>+/+</sup>* and 8 *Nlrp3<sup>-/-</sup>*). E. IL-1 $\beta$  and F. myeloperoxidase (MPO) were quantified by ELISA in paw extracts obtained at the early phase (8h post-injection, n = 5 to 6) and the peak (24hpi, n = 8 to 10). All data are representative of three independent experiments except for clinical observation (five independent experiments). Symbols represent individual mice, horizontal lines and bars correspond to mean  $\pm$  SEM; Results were analysed with a two-tailed Mann-Whitney test, \* = p < 0.05, \*\* = p < 0.01, \*\*\* = p < 0.001, ns = not significant.



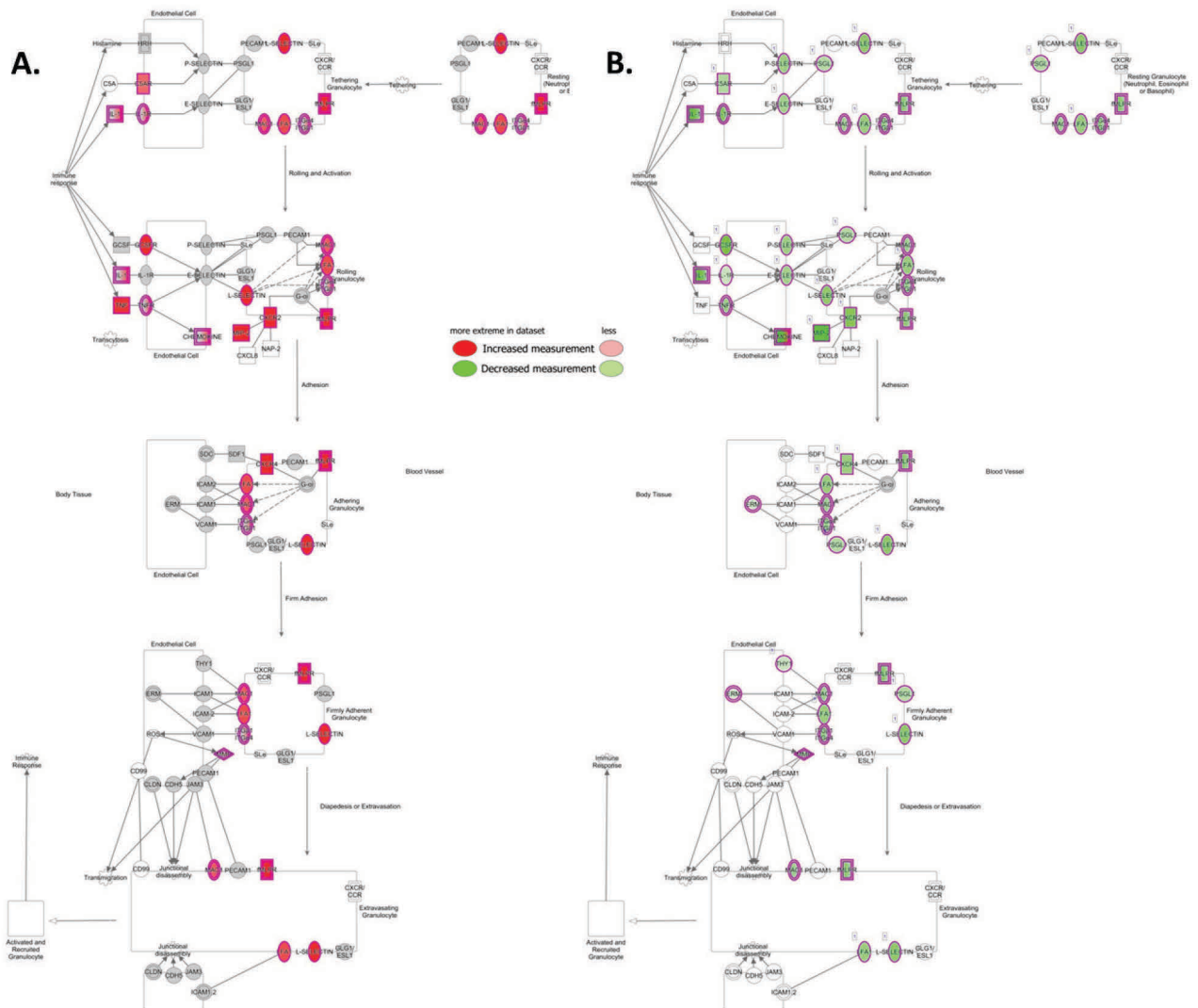
**Figure S3: Pharmacological inhibition of the PKD-NLRP3 axis phenocopies the *Nlrp3* knock out.** C57BL/6J mice were treated with the Pan-PKD inhibitor CRT0066101 (10mg/kg) or the corresponding vehicle (DMSO) prior the induction of acute uratic inflammation. CRT0066101 or vehicle were then injected every 12h (10mg/kg). **A-C.** Clinical data were recorded over 2 days. **A.** Paw swelling, **B.** clinical scores and **C.** Body temperature. **D.-E.** Paw extracts were subjected to a western blot analysis to reveal IL-1 $\beta$  (**D.**) and ELISA quantifications of total IL-1 $\beta$  (**E.**). **A-C.** n = 4 to 5 in each group, data are representative of 3 independent experiments. **D-E.** n = 4 in each group. Symbols represent individual mice, horizontal lines and bars correspond to mean  $\pm$  SEM; Results were analysed with a two-tailed Mann-Whitney test, ns = not significant.



**Figure S4: IL-1 $\beta$  maturation depends on the PKD-NLRP3 axis *in vitro*.** **A.** Peritoneal macrophages isolated from *Nlrp3*<sup>+/+</sup> (n=4) and *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (n=4) mice were seeded at 5x10<sup>5</sup> cells/well and stimulated with lipopolysaccharide only (LPS, 1 $\mu$ g/mL) or LPS plus MSU or ATP. *Nlrp3*<sup>+/+</sup> macrophages were treated with the CRT0066101 inhibitor (green dots) or DMSO (yellow dots) 1h prior and all along the stimulation; DMSO-treated *Nlrp3*<sup>-/-</sup> macrophages were used as controls (red dots). IL-1 $\beta$  was quantified by ELISA. **B.** The same experiment as in A. was realized with 1x10<sup>6</sup> murine neutrophils/well. **C.** Peritoneal macrophages from *Nlrp3*<sup>+/+</sup> (green dots) or *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (red dots) were stimulated with LPS only or LPS plus MSU or ATP. TNF $\alpha$  and IL-6 were quantified by ELISA. The data are representative of 3 experiments. Symbols represent individual mice, horizontal lines and bars correspond to mean  $\pm$  SEM; Results were analysed with a two-tailed Mann-Whitney test, \* = p<0.05, ns = not significant.



**Figure S5: NLRP3 is not required in the MSU-induced peritonitis model.** *Nlrp3*<sup>+/+</sup> (n=8) and *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice (n=6) were subjected to a peritonitis model by injecting 1 mg of MSU crystals into the peritoneal cavity. **A-D.** Flow cytometry analysis of peritoneal exudate. **A.** Gating strategy: peritoneal cells were distinguished from debris according to FSC/SSC profile and live cells were selected. CD14<sup>+</sup>Gr1<sup>-</sup> were assigned to monocytes; neutrophils were defined as Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>. **B.** Total cells according to the FSC/SSC profile, **C.** Percentage and absolute number of neutrophils, **D.** Percentage and absolute number of monocytes. **E.** ELISA measurements of peritoneal IL-1 $\beta$  (4 animals per group). *Nlrp3*<sup>+/+</sup> mice are depicted by green dots, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> by red dots. Symbols represent individual mice, horizontal lines and bars correspond to mean  $\pm$  SEM; Results were analysed with a two-tailed Mann-Whitney test, ns = not significant.



**Figure S6: Neutrophil function-associated genes are upregulated by MSU crystals and subsequently downregulated by topical imiquimod treatment.**

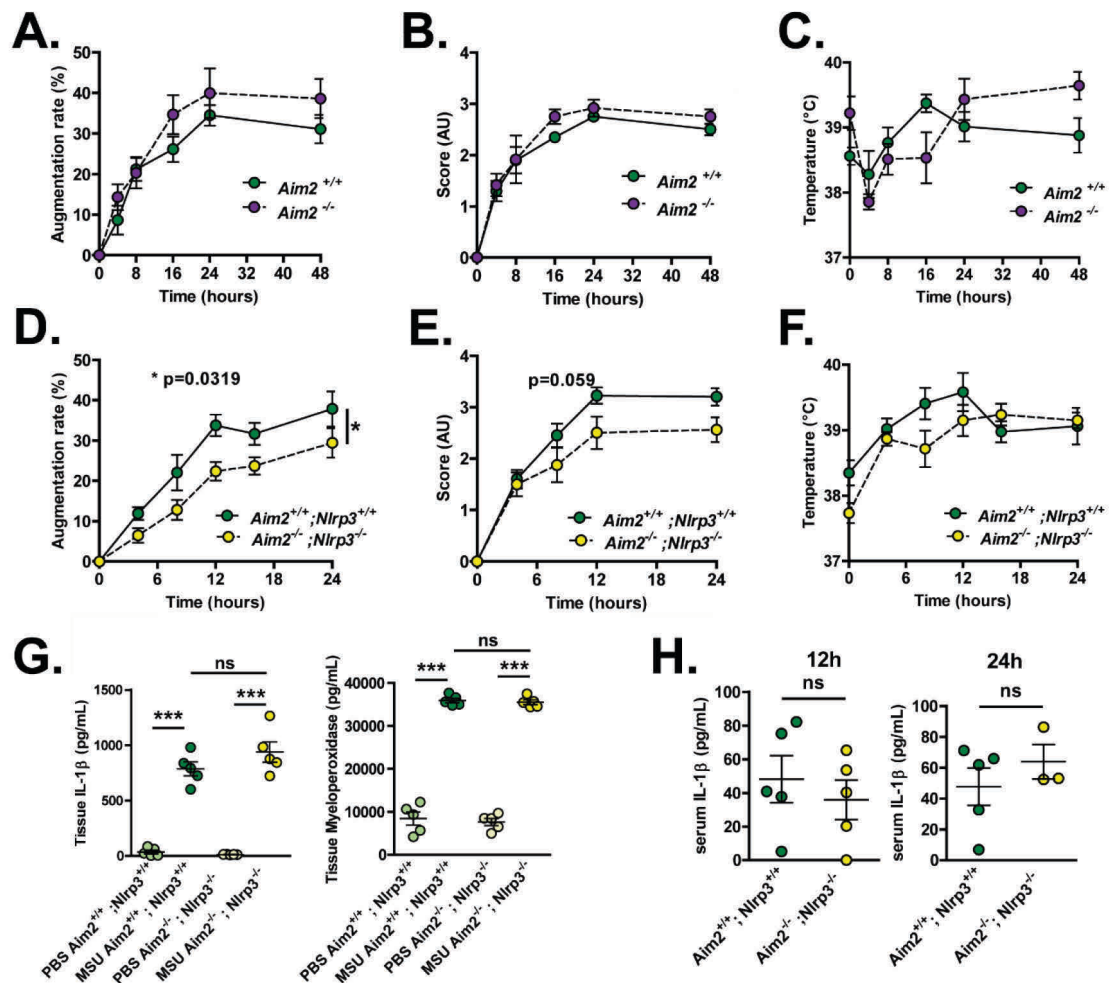
An acute uratic inflammation experiment was conducted on two cohorts of animals (one paw was injected with MSU crystals and the contralateral one with PBS); one cohort was treated with topical imiquimod, the other with control cream. 24h after, paws were collected, grinded and total RNA were extracted and submitted to a genome-wide transcriptomic analysis by RNAseq.

The most differentially expressed genes in the settings of two comparisons (**A.** MSU crystal-injected versus PBS-injected paws, **B.** MSU injected and imiquimod-treated versus MSU-injected and control cream-treated paws) were analysed with the IPA (Ingenuity pathway analysis, Qiagen) software. Genes associated with neutrophil functions were significantly overexpressed following MSU injection and downregulated when topical imiquimod was applied.

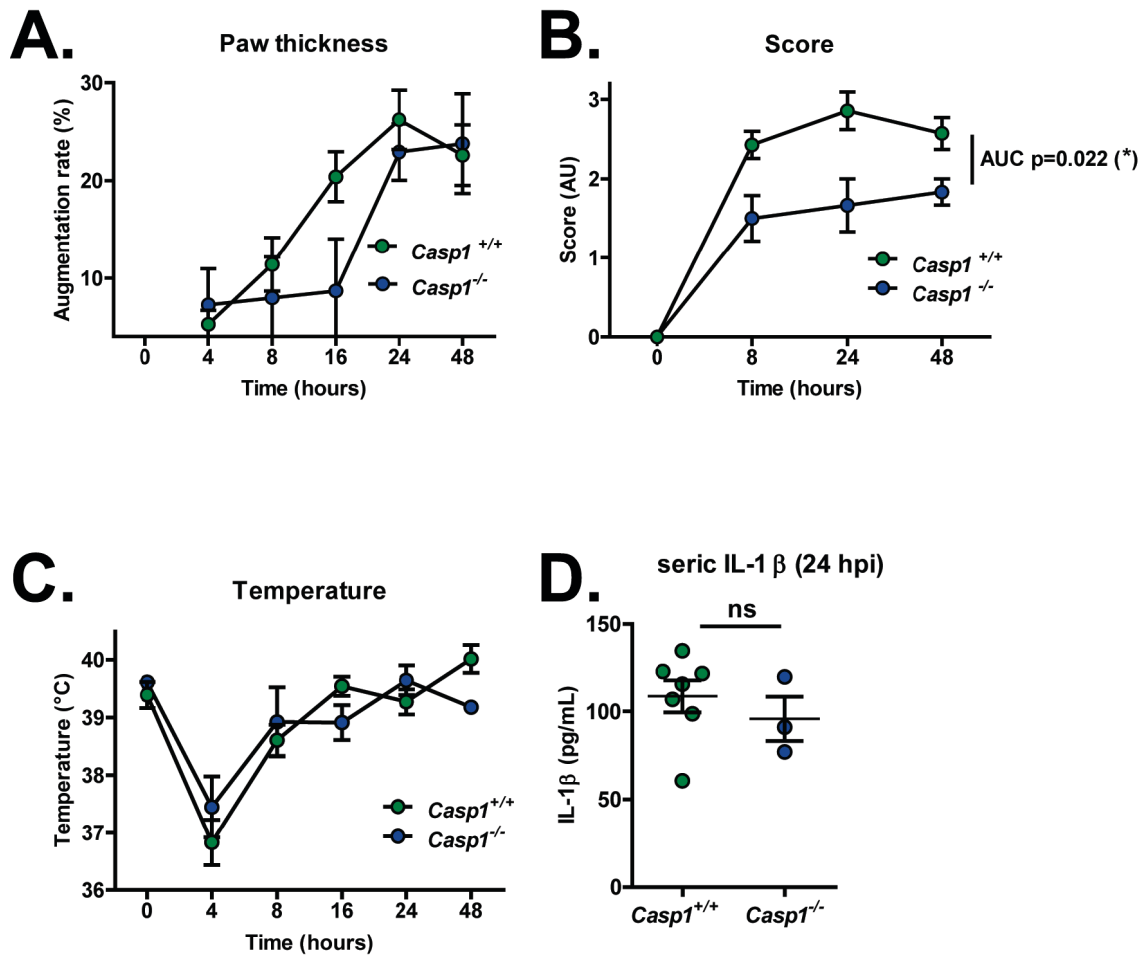
Solid bars/arrows indicate direct interactions, broken bars/arrows the indirect ones; green pictograms represent down-modulated genes, red ones the overexpressed genes in the setting of imiquimod-treated relative to control-cream treated paws.

For more information, see the following link:

[http://qiagen.force.com/KnowledgeBase/articles/Basic\\_Technical\\_Q\\_A/Legend](http://qiagen.force.com/KnowledgeBase/articles/Basic_Technical_Q_A/Legend).

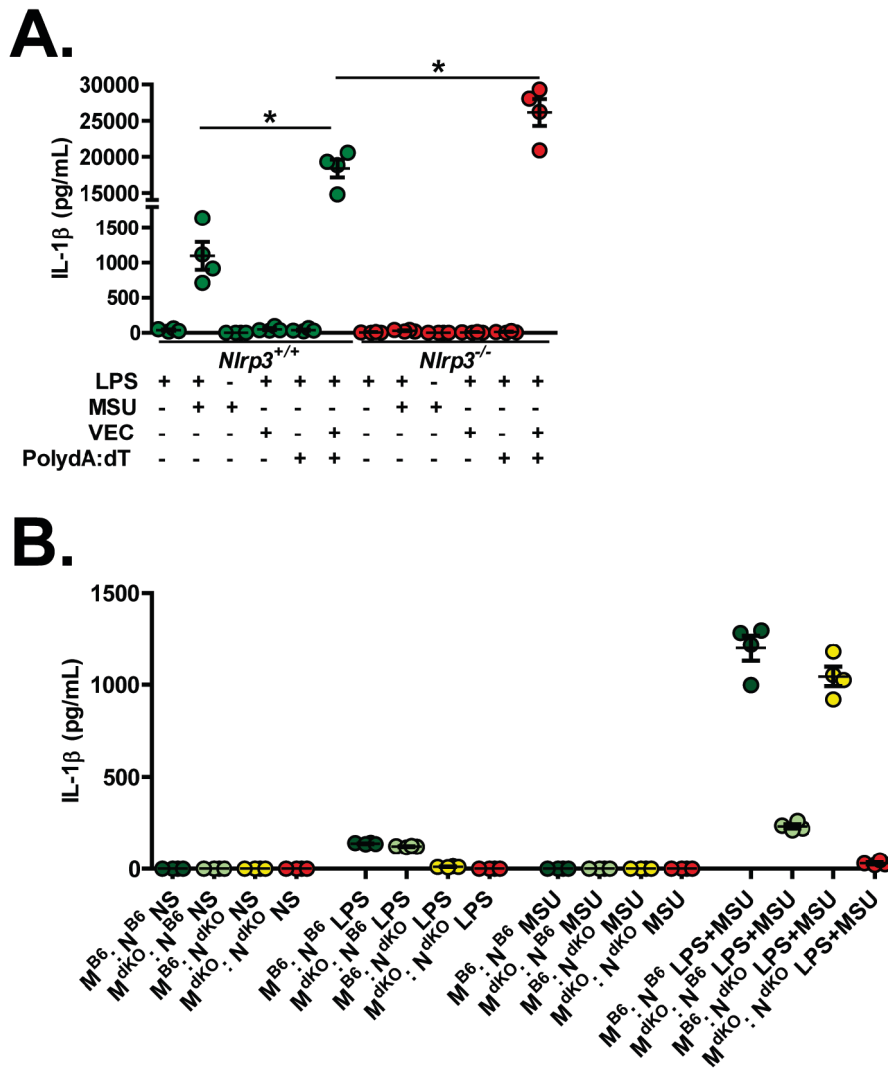


**Figure 2:** *Aim2* or *Aim2/Nlrp3* combined deficiency do not impact on acute uratic inflammation development and severity. A-C. Acute uratic inflammation was induced in *Aim2*<sup>+/+</sup> and *Aim2*<sup>-/-</sup> animals (n = 3 to 6). **A.** Paw swelling, **B.** Clinical scores and **C.** Body temperature. **D-E.** *Aim2*<sup>-/-</sup>; *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (double knock out) mice (n = 8) and *Aim2*<sup>-/-</sup>; *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (n = 10) were subjected to an acute uratic inflammation experiment. **D.** Paw swelling and **E.** Clinical scores and **F.** body temperature measures, all recorded over a 24h period. **G.** IL-1β and MPO quantified by ELISA in paws extracts collected at 24hpi, n = 5 in each group. **H.** IL-1β and MPO quantified by ELISA in serum collected 12hpi (left) and 24hpi (right) (n = 3 to 5). Symbols represent individual mice, green dots correspond to WT mice (littermate controls) purple dots to *Aim2*<sup>-/-</sup> mice and red ones to *Aim2*<sup>-/-</sup>; *Nlrp3*<sup>-/-</sup> mice, light coloured dots represent PBS paws and bright coloured dots the MSU paws. Horizontal lines and bars correspond to mean +/- SEM; Results were analysed with a two-tailed Mann-Whitney test, \* = p<0.05, \*\* = p < 0.01, \*\*\* = p < 0.01, ns = not significant. In graphs **D.** and **E.** the area under curve (AUC) was determined and analysed by a Mann-Whitney test.

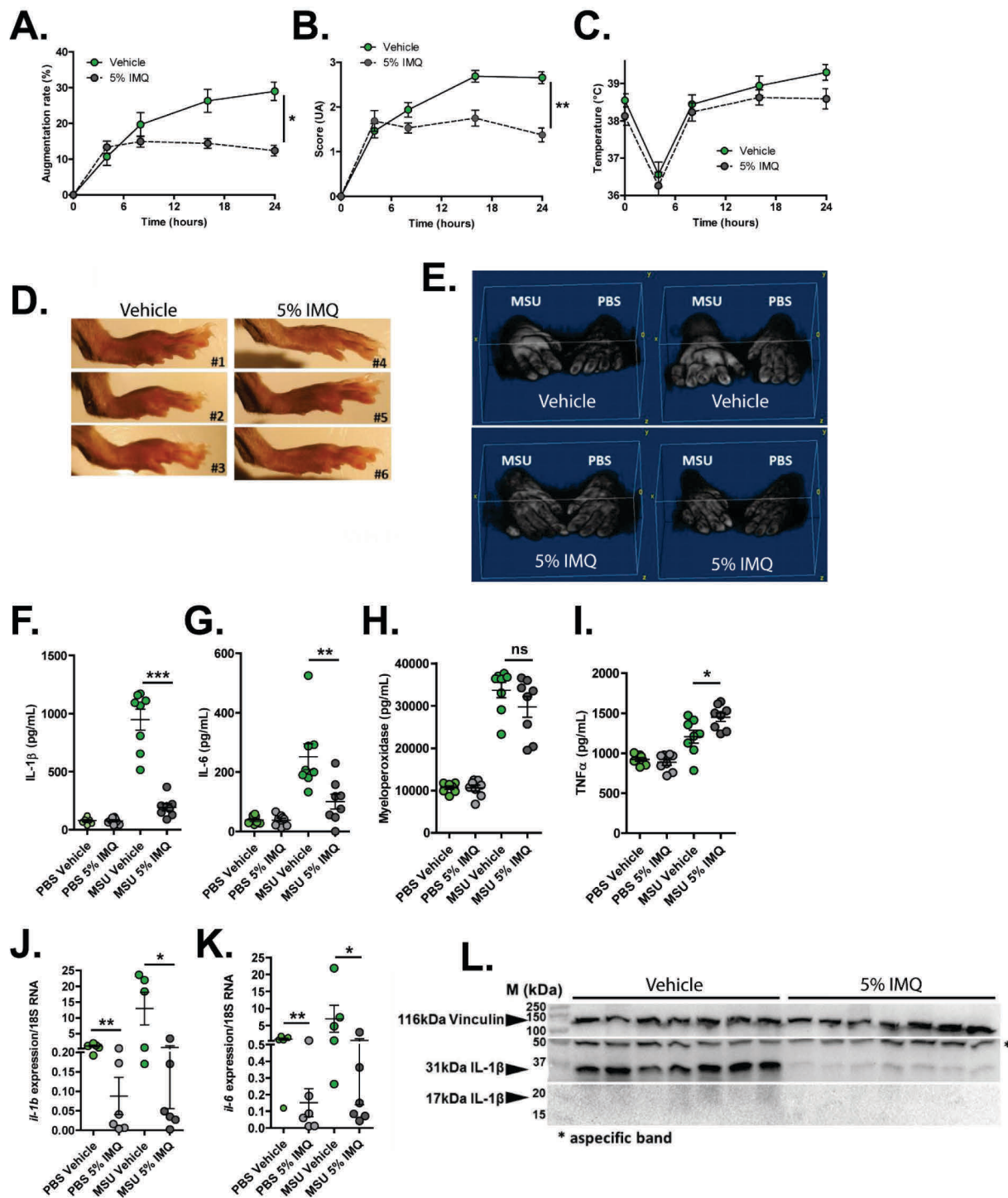


**Figure S7: caspase1/11 have a limited impact in the subcutaneous MSU-induced acute uratic inflammation model.** *Casp1*<sup>-/-</sup> (bearing a passenger mutation compromising *Casp11* function) were submitted to an acute uratic inflammation experiment (n = 3 to 7) and clinical observations were made over a 48h period. **A.** Paw thickness, **B.** Clinical score, **C.** Body temperature and **D.** seric IL-1β measured ELISA. Symbols represent individual mice, green dots represent *Casp1*<sup>+/+</sup> mice and blue dots the *Casp1*<sup>-/-</sup> (*Casp1*<sup>-/-</sup>; *Casp11*<sup>-/-</sup>) mice. Horizontal lines and bars correspond to mean +/- SEM; Results were analysed with a two-tailed Mann-Whitney test, \* = p<0.05, ns = not significant. In graph B, the area under curve (AUC) was determined and analysed with a Mann-Whitney test.



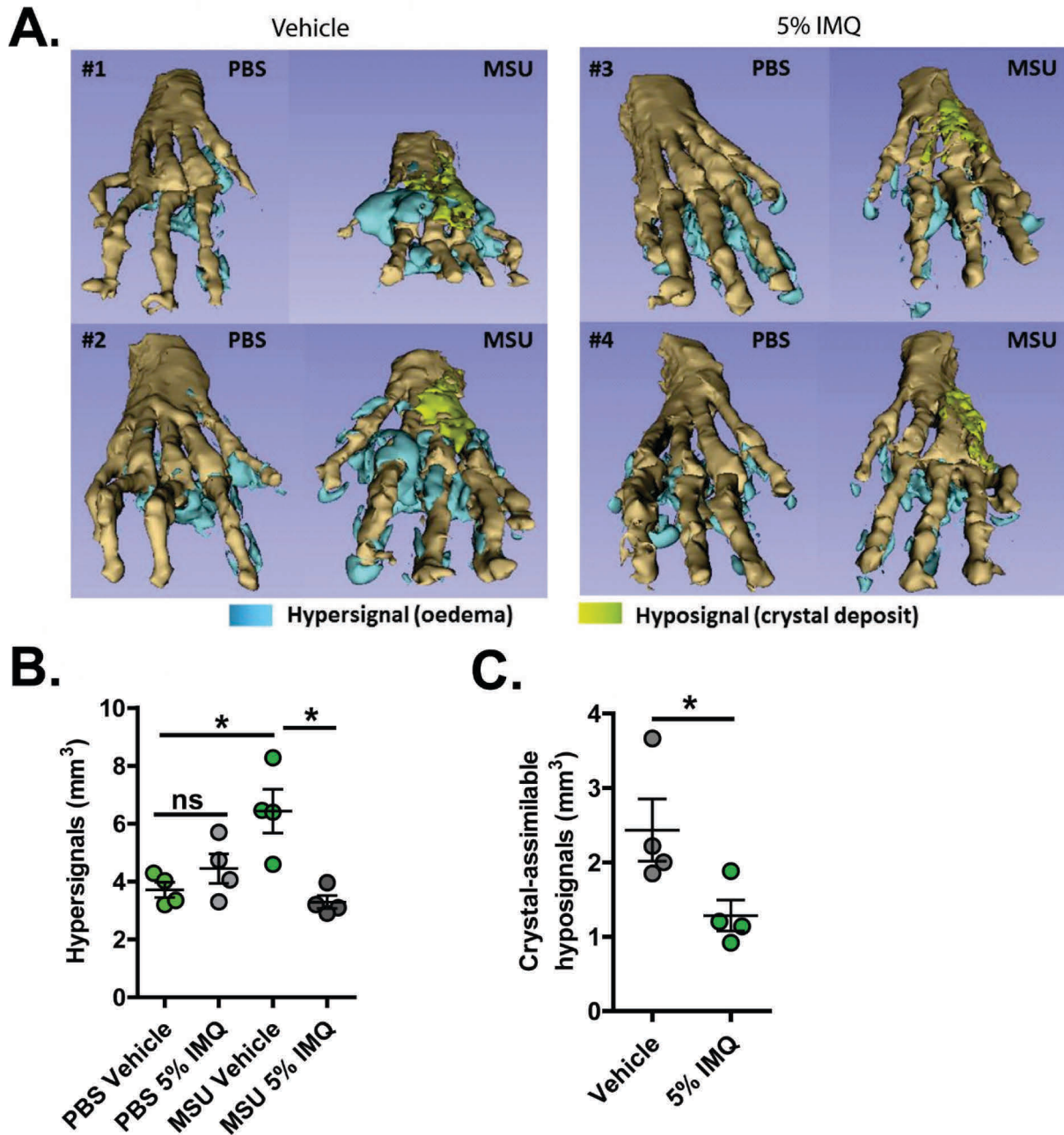


**Figure 3: Activated (netotic) neutrophils fail to promote IL-1 $\beta$  secretion by macrophages.**  
**A.** *Nlrp3*<sup>+/+</sup> and *Nlrp3*<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages were seeded at  $5 \times 10^5$  cells/well and stimulated with LPS only or the conjunction of LPS and MSU, LPS and lipofectamin (VEC.), LPS and poly dA:dT (0,5 $\mu$ g/mL) or LPS and lipofectamin complexed with poly dA:dT (0,5 $\mu$ g/mL). Green dots represent *Nlrp3*<sup>+/+</sup> macrophages, red ones the *Nlrp3*<sup>-/-</sup>. **B.** WT (B6) or *Aim2*<sup>-/-</sup>; *Nlrp3*<sup>-/-</sup> (double knock out: dKO) peritoneal macrophages (M) were plated at  $5 \times 10^5$  cells/well together with  $1 \times 10^6$  neutrophils (N) of both genotype making combinations (M B6 : N B6, dark green; M dKO : N B6, light green; M B6 : N dKO, yellow; M dKO : N dKO, red). Cells were left untreated (NS) or treated with LPS only (1 $\mu$ g/mL for 27h), MSU crystals only (250 $\mu$ g/mL) for 24h or the conjunction of both (LPS alone for 3 hours and then MSU for 24h). Cells were isolated from n=4 mice. Horizontal lines and bars correspond to mean  $\pm$  SEM; Results were analysed with a two-tailed Mann-Whitney test, \* =  $p < 0.05$ , ns = not significant.

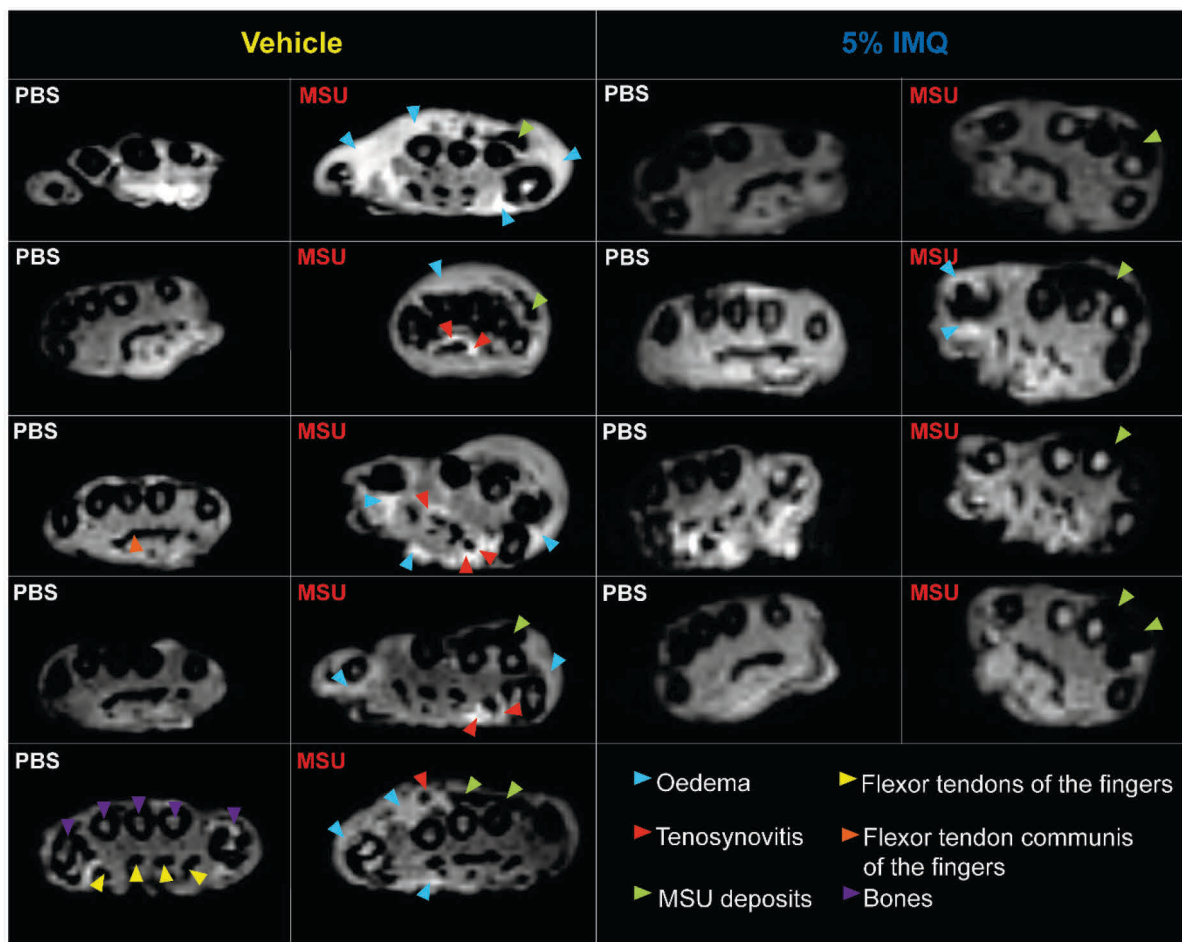


**Figure 4: Topical application of an imiquimod-containing cream (ALDARA) alleviates acute uratic inflammation by down-modulating *Il-1b* and *Il-6* expression.** A-E. C57BL/6J mice were submitted to an acute uratic inflammation experiment and immediately treated with either topical imiquimod (ALDARA® commercial cream) or a control cream. Gouty crisis was followed for 24 hours (n = 8 mice per group, data are representative of 3 independent experiments). **A.** Paw swelling, **B.** Clinical scores, **C.** Body temperature, **D.** representative pictures of the paws (16hpi) and **E.** volumetric representation of 2 pairs of control cream-treated paws (up), imiquimod-treated paws (low) obtained after Magnetic Resonance Imaging (MRI) and image reconstruction with 3D viewer. **F.-I.** Mice paws were collected at 24hpi and paw extracts were analysed by ELISA for IL-1 $\beta$  (**F.**), IL-6 (**G.**), MPO (**H.**) and TNF $\alpha$  (**I.**). **J.-K.** Similar to F.-I., paws were collected at 24hpi and analysed by RT-qPCR analysis for *Il-1b* (**J.**) and *Il-6* (**K.**). **L.** Proform and mature IL-1 $\beta$  production was assessed

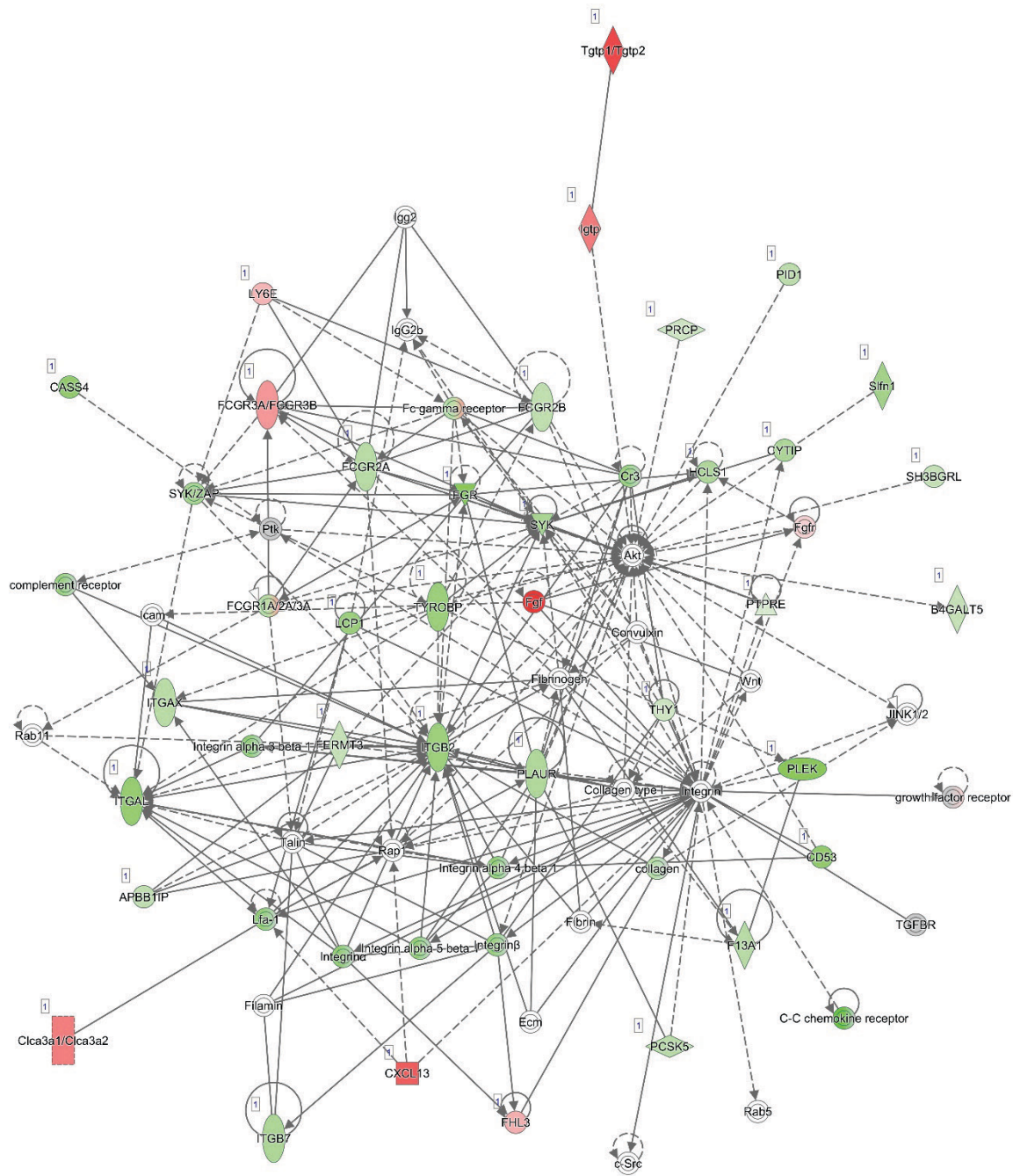
by western blot of paw extracts. Vinculin was used as loading control. Green dots represent control cream-treated mice, grey ones the topical imiquimod-treated animals; light colours correspond to PBS paws, dark colours to MSU paws. Symbols represent individual mice, horizontal lines and bars correspond to mean  $\pm$  SEM; Results were analysed with a two-tailed Mann-Whitney test, \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ , ns = not significant. In graphs A and B, the area under the curve (AUC) was calculated and analysed with a Mann-Whitney test.



**Figure 5: MRI reveals major dampening of MSU crystal-induced oedema formation upon topical imiquimod therapy.** A-C. Acute uratic inflammation was induced and topical imiquimod or control cream were immediately applied on the paws of mice (n=4 per group). 24hpi, animals were euthanized and subjected to Magnetic Resonance Imaging (MRI). After acquisition of MRI sequences (T2, fat suppression), pictures were computed and reconstructions were made by 1) automated segmentation and 2) reconstruction of hyper-signal volumes (oedemas), hypo-signals volumes (MSU crystal-associated volume) and bones with the help of the 3D Slicer software. **A.** 3D reconstructions of 4 pairs of paws (control cream-treated, left; imiquimod-treated, right). **B.** Quantification of the hyper-signal volume. **C.** Quantification of the crystal-assimilable hypo-signal volumes. Green dots represent control cream-treated mice, grey ones the imiquimod-treated animals, light colours correspond to PBS paws, dark colours to MSU paws. Symbols represent individual mice, horizontal lines and bars correspond to mean +/- SEM; Results were analysed with a two-tailed Mann-Whitney test, \* = p<0.05, ns = not significant.



**Figure S8: Topical imiquimod is potent in reducing both subcutaneous oedemas and tenosynovitis.** MRI sequences performed according to the procedure described in Figure 5 (MRI at 24hpi, T2, fat suppression) are presented in this panel (4 mice per group). **Left**, control cream-treated paws (5 pictures for 4 mice), the two upper images are from the same mouse and depict the concomitant presence of large subcutaneous oedemas and a marked tenosynovitis of the *flexor tendon communis of the fingers*; **right**, topical imiquimod-treated paws (4 pictures for 4 mice). Anatomic details are indicated by arrows (see legend, lower-right corner). Contrast has been set manually for each pair of paws (PBS and MSU for each mouse), each MSU paw should then be considered with regard to the PBS paw.



© 2000-2019 QIAGEN. All rights reserved.

**Figure S9: Topical imiquimod affects a constellation of signalling pathway related to neutrophil adhesion and Syk-PI3K axis.**

The 666 most differentially expressed genes between MSU-control cream- and MSU-imiquimod-treated paws found by RNAseq (the same data set that at the Figure S6) were analysed with IPA (*Ingenuity pathway analysis*, Qiagen) software. The main signalling pathways affected by topical imiquimod are depicted and connexions are shown in this gene map. Solid bars/arrows indicate direct interactions, broken bars/arrows the indirect ones; green pictograms represent down-modulated genes, red ones the overexpressed genes in the setting of topical imiquimod-treated relative to control-cream treated paws. For more information, see the following link:

[http://qiagen.force.com/KnowledgeBase/articles/Basic\\_Technical\\_Q\\_A/Legend](http://qiagen.force.com/KnowledgeBase/articles/Basic_Technical_Q_A/Legend).



## Therapeutic Modulation of Plasmacytoid Dendritic Cells in Experimental Arthritis

Ramzi Nehmar,<sup>1</sup> Ghada Alsaleh,<sup>1</sup> Benjamin Voisin,<sup>2</sup> Vincent Flacher,<sup>2</sup> Alexandre Mariotte,<sup>1</sup> Victoria Saferding,<sup>3</sup> Antonia Puchner,<sup>3</sup> Birgit Niederreiter,<sup>3</sup> Thierry Vandamme,<sup>4</sup> Gernot Schabbauer,<sup>5</sup> Philippe Kastner,<sup>6</sup> Susan Chan,<sup>6</sup> Peggy Kirstetter,<sup>6</sup> Martin Holcman,<sup>7</sup> Christopher Mueller,<sup>2</sup> Jean Sibilia,<sup>1</sup> Seiamak Bahram,<sup>1</sup> Stephan Blüml,<sup>3</sup> and Philippe Georgel<sup>1</sup>

**Objective.** The role of plasmacytoid dendritic cells (PDCs) and type I interferons (IFNs) in rheumatoid arthritis (RA) remains a subject of controversy. This study was undertaken to explore the contribution of PDCs and type I IFNs to RA pathogenesis using various animal models of PDC depletion and to monitor the effect of localized PDC recruitment and activation on joint inflammation and bone damage.

**Methods.** Mice with K/BxN serum-induced arthritis, collagen-induced arthritis, and human tumor necrosis factor transgene insertion were studied. Symptoms were evaluated by visual scoring, quantification of paw swelling, determination of cytokine levels by

enzyme-linked immunosorbent assay, and histologic analysis. Imiquimod-dependent therapeutic effects were monitored by transcriptome analysis (using quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction) and flow cytometric analysis of the periarticular tissue.

**Results.** PDC-deficient mice showed exacerbation of inflammatory and arthritis symptoms after arthritogenic serum transfer. In contrast, enhancing PDC recruitment and activation to arthritic joints by topical application of the Toll-like receptor 7 (TLR-7) agonist imiquimod significantly ameliorated arthritis in various mouse models. Imiquimod induced an IFN signature and led to reduced infiltration of inflammatory cells.

**Conclusion.** The therapeutic effects of imiquimod on joint inflammation and bone destruction are dependent on TLR-7 sensing by PDCs and type I IFN signaling. Our findings indicate that local recruitment and activation of PDCs represents an attractive therapeutic opportunity for RA patients.

Supported by institutional funding from INSERM, Strasbourg University, the Laboratoire d'Excellence TRANSPANTEX (ANR-11-LABX-0070 TRANSPANTEX), the PRTS ANR program (SPIRALE), and Campus France (PHC Program Amadeus 33696WM).

<sup>1</sup>Ramzi Nehmar, PhD, Ghada Alsaleh, PharmD, PhD, Alexandre Mariotte, MS, Jean Sibilia, MD, PhD, Seiamak Bahram, MD, PhD, Philippe Georgel, PhD: Université de Strasbourg, INSERM, IRM UMR-S 1109, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Faculté de Médecine, and Fédération Hospitalo-Universitaire, OMICARE, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, Strasbourg, France; <sup>2</sup>Benjamin Voisin, PhD, Vincent Flacher, PhD, Christopher Mueller, PhD: Université de Strasbourg, CNRS UPR 3572, Laboratory of Immunopathology and Therapeutic Chemistry/Laboratory of Excellence MEDALIS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France; <sup>3</sup>Victoria Saferding, MS, Antonia Puchner, MS, Birgit Niederreiter, MS, Stephan Blüml, MD, PhD: Internal Medicine 3, Medical University of Vienna, Vienna, Austria; <sup>4</sup>Thierry Vandamme, PhD: Université de Strasbourg, CNRS UMR 7199, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France; <sup>5</sup>Gernot Schabbauer, PhD: Center for Physiology and Pharmacology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria; <sup>6</sup>Philippe Kastner, PhD, Susan Chan, PhD, Peggy Kirstetter, PhD: Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, INSERM U964, CNRS UMR 7104, Illkirch, France; <sup>7</sup>Martin Holcman, PhD: Comprehensive Cancer Center, Medical University of Vienna, Vienna, Austria.

Address correspondence to Philippe Georgel, PhD, Université de Strasbourg, 1 Place de l'Hôpital, Strasbourg 67085, France. E-mail: pgeorgel@unistra.fr.

Submitted for publication December 20, 2016; accepted in revised form July 25, 2017.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic multifactorial autoimmune disease (1), and secondary autoinflammatory mechanisms are major contributors to its perpetuation (2). The disease etiology involves different cell types, including innate and adaptive immune cells, which, along with resident synovial fibroblasts, interact to initiate and maintain an inflammatory milieu in the affected joint (3). Our current understanding is that interaction between the genetic background and environmental factors triggers the disruption of tolerance to self antigens, which leads to activation of both B and T cells. This B and T cell activation in turn leads to a proinflammatory loop including cytokine production, aberrant adaptive response, neovascularization, and synoviocyte activation. To control or avoid this pathogenic interplay of cells in the synovium of RA patients,



drugs that affect different cellular and/or molecular actors have been developed (4), and major successes have been obtained in the past 15 years (5,6), especially with biologic agents that target various cytokines (7). These treatments, however, have serious side effects in some cases (4).

While currently available therapies aim to control the various actors in RA pathogenesis, dendritic cells (DCs), which are at the crossroads between innate and adaptive immune cells, have not received due attention as potential therapeutic targets. Of interest is a subpopulation of DCs, the plasmacytoid DCs (PDCs), which are defined by their capacity to secrete large amounts of type I interferons (IFNs). IFNs are inflammatory cytokines of paramount importance in the pathophysiology of many autoimmune or autoinflammatory diseases (8). However, while the involvement of type I IFNs in RA pathogenesis is substantiated by several observations, such as an association with single-nucleotide polymorphisms in genes like IFN regulatory factor 5 (IRF-5) or IRF-8 (9) or the presence of the so-called “IFN signature” in the peripheral blood cells of RA patients (10,11), the precise effect of these cytokines remains a subject of controversy. This is particularly well evidenced by the dichotomy between the positive and promising action of type I IFNs administered intraarticularly in animal models (12) and the subsequent absence of biologic effects when these molecules were delivered in the context of unsuccessful clinical trials (13). Hence, the precise role of type I IFNs, either beneficial or detrimental in RA pathogenesis, remains a subject of debate. Therefore, the potential to target these cytokines or the cells that produce them (PDCs) in order to expand the spectrum of molecules that may be prescribed to RA patients is still largely unexplored, despite obvious medical needs (among RA patients, 30–40% do not respond to biologic agents and complete remission is achieved in only 25–30% [4]) and clear evidence demonstrating the presence of PDCs in the synovium of RA patients (14).

The present study aimed to clarify this issue. In various mouse models of PDC depletion in which joint inflammation was triggered by arthritogenic K/BxN serum transfer, we observed worsened symptoms, suggesting that PDCs exert protective functions in RA. We next showed that mobilization and activation of PDCs upon topical application of the Toll-like receptor 7 (TLR-7) ligand imiquimod induces a notable reduction in the inflammation and bone erosion seen in 3 different mouse models of RA. This effect is accompanied by local recruitment of PDCs and reduced neutrophil infiltrates in the joint, as revealed by flow cytometry

and transcriptome analysis. Importantly, the beneficial effects of imiquimod require type I IFN signaling. These observations highlight the potential efficacy of imiquimod, a molecule approved by the Food and Drug Administration, and its possible future use as the first topical treatment for RA.

## MATERIALS AND METHODS

**Mice.** Ikaros-deficient mice (Ik<sup>L/L</sup> mice) have been described previously (15). TLR-7<sup>-/-</sup> mice were provided by Lena Alexopoulou, PhD (Centre d’Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, France), BDCA2-DTR mice were obtained from Maria Sibia, MD (Medical University of Vienna) with the agreement of Marco Colonna, MD (Washington University, St. Louis, MO), and IFNAR-1<sup>-/-</sup> mice were obtained from Rolf Zinkernagel, MD (University Hospital Zurich, Zurich, Switzerland). Mice used in all experiments were age and sex matched. Animals were maintained under pathogen-free conditions in the animal care facility of our laboratory (Institut d’Immunologie et d’Hématologie, Strasbourg, France). Human tumor necrosis factor (TNF)–transgenic mice were provided by George Kollias, MD (Biomedical Sciences Research Center Alexander Fleming, Vari, Greece) and maintained in the animal facility of the Medical University of Vienna.

**Study approval.** Handling of mice and experimental procedures were conducted in accordance with French law for the protection of laboratory animals. The procedures were approved by the Service Vétérinaire de la Préfecture du Bas-Rhin (Strasbourg, France) and by the Regional Ethics Committee for Animal Experimentation of Strasbourg University, under authorization number 01608.01. Experiments performed in Vienna were approved by the animal ethics committee of the Medical University of Vienna and comply with institutional guidelines (BMWF-66.009/0103-C/GT/2007 and BMWF-66.009/0241-II/3b/2011). For additional information on study methods, see Supplementary Methods, available on the Arthritis & Rheumatology web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40225/abstract>.

**Statistical analysis.** To analyze the time-dependent evolution of several parameters (paw thickness, joint arthritis score, and weight), we calculated the area under the curve and used the Mann-Whitney nonparametric unpaired 2-tailed test to compare 2 independent groups using GraphPad 5.04 software. Similarly, interleukin-6 (IL-6) expression, quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction (qRT-PCR) results, quantification of cell population, and OsteoMeasure data were analyzed by Mann-Whitney 2-tailed unpaired test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

## RESULTS

**PDC deficiency exacerbates joint inflammation in a serum-transfer model of arthritis.** To evaluate the contribution of PDCs to RA pathogenesis, we first used a serum-transfer model of arthritis (in which B and T cells are dispensable) (16). In this model, arthritogenic

K/BxN serum was injected into control mice and  $I\kappa^{L/L}$  mice, which have a hypomorphic mutation that causes a deletion of peripheral PDCs, while myeloid cells (like neutrophils) and lymphoid cells (B, T, and natural killer cells) remain unaffected (15,17). (See Supplementary Figures 1A–C, available on the *Arthritis & Rheumatology* web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40225/abstract>.)

The severity of joint inflammation was evaluated by measurement of paw thickness.  $I\kappa^{L/L}$  mice exhibited a significant increase in joint swelling compared to controls from days 6 to 15 (Figure 1A). Visual scoring of the joints (considering redness and swelling) yielded similar results (Supplementary Figure 1D). Increased weight loss in  $I\kappa^{L/L}$  mice compared to controls (Figure 1B) additionally indicated that PDC depletion promoted more severe systemic effects in  $I\kappa^{L/L}$  mice upon serum transfer. These observations were confirmed by cytokine quantification showing increased IL-6 and IL-1 $\beta$  gene expression in the paws of  $I\kappa^{L/L}$  mice at the peak of the response (on day 9) (Figures 1C and D) and augmented secreted IL-6 in the blood of mutant animals on days 5 and 9 (Figures 1E and F). Histologic examination was performed on day 9. (Representative tartrate-resistant acid phosphatase staining is shown in Figures 1K and L.) Histologic analysis indicated increased inflammatory infiltrates, osteoclast numbers, and importantly, bone erosion in the paws of  $I\kappa^{L/L}$  mice (Figures 1G–I).

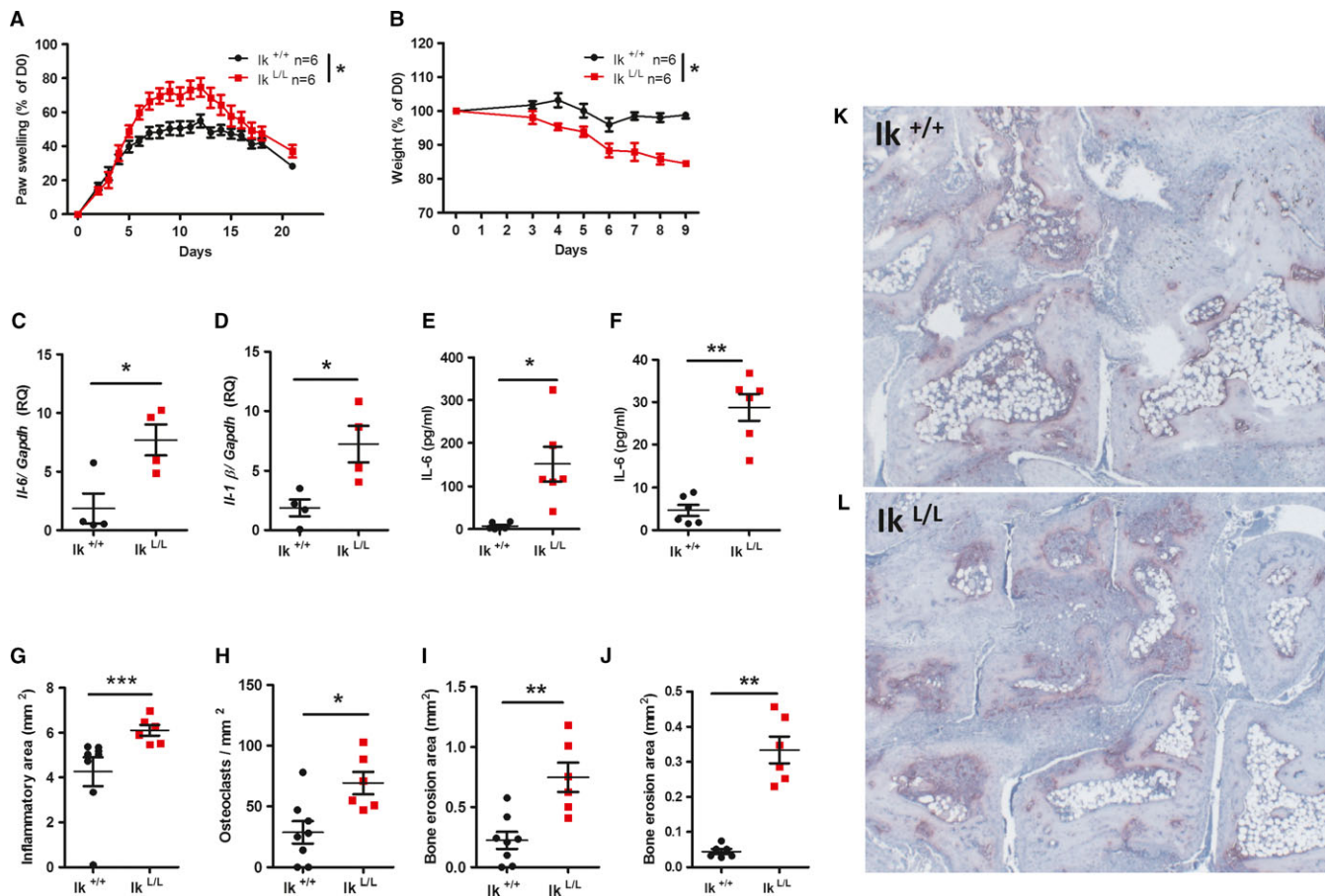
While the serum-transfer model of arthritis is a model of acute disease characterized by quick recovery, we observed lasting bone erosion in  $I\kappa^{L/L}$  mice 22 days after the induction of arthritis (Figure 1J). Of note,  $I\kappa^{L/L}$  mice did not spontaneously develop any obvious bone defects, as evidenced by an exhaustive bone morphometric analysis (Supplementary Table 1, available on the *Arthritis & Rheumatology* web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40225/abstract>). Furthermore, similar numbers of osteoclasts were obtained upon RANKL stimulation of bone marrow cells from wild-type and  $I\kappa^{L/L}$  mice (Supplementary Figure 1E), indicating that osteoclastogenesis is not affected by the Ikaros mutation. Finally, we also detected a population of infiltrating PDCs in the periarticular tissue of control mice, but not  $I\kappa^{L/L}$  mice, with serum-transfer arthritis on day 10 (Supplementary Figures 1F–I). (These were  $CD45+B220^{low}PDCA1+$  cells, which also stain with anti-CCR9 antibody, but not anti-Siglec H antibody [results not shown].) Of note, increased immune cell (CD45+) infiltrate, of which neutrophils are likely the majority (18), was observed in  $I\kappa^{L/L}$  mice compared to wild-type mice

(Supplementary Figure 1H). Taken together, these data indicate that the presence of PDCs is important to limit or resorb the joint inflammation triggered by serum transfer.

To further analyze the role of PDCs, we used 2 different ablation methods. First, mice were injected with 120G8 monoclonal antibody (mAb) (19), which is specific for bone marrow stromal antigen 2 (tetherin/CD317), predominantly expressed by mouse PDCs (20), and then inflammatory arthritis was examined following K/BxN serum transfer. Paw swelling was significantly increased in mice receiving 4 injections of 120G8 mAb compared to those in which a control isotype antibody was injected (Supplementary Figure 2A, available on the *Arthritis & Rheumatology* web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40225/abstract>). Serum IL-6 levels quantified 5 days after arthritis induction were increased in 120G8-treated mice compared to controls (Supplementary Figure 2B). However, histologic analysis did not reveal marked differences between PDC-depleted and control animals (Supplementary Figures 2C–G), which might be related to the resistant population of PDCs ( $B220+PDCA1+CD11c+$ ) remaining after injections of 120G8 mAb (Supplementary Figures 2H and I) or, alternatively, to the consumption of complement caused by the iterative mAb injections.

Indeed, inflammation in the serum-transfer models of arthritis is particularly complement dependent (21). To circumvent this, we induced PDC ablation in BDCA2-DTR-transgenic mice (22). Using this approach, we first noticed that 5 successive injections of diphtheria toxin (on days 0, 2, 4, 6, and 8) partially phenocopied the  $I\kappa^{L/L}$  mutation. Indeed, a significant increase in paw swelling (Supplementary Figure 3A) and systemic IL-6 secretion on day 5 (Supplementary Figure 3B) was observed in DTR-transgenic mice upon diphtheria toxin injection. However, qRT-PCR quantification of IL-6 and IL-1 $\beta$  transcripts on day 9 did not show any difference between control and BDCA2-DTR mice (Supplementary Figure 3C). Accordingly, this protocol, although efficient, did not enable PDC depletion as extensive as that seen in  $I\kappa^{L/L}$  mice (Supplementary Figures 3D and E). Therefore, consistent with our previous analysis of 120G8-depleted mice, BDCA2-DTR-transgenic animals did not exhibit enhanced arthritis characteristics upon histologic analysis (Supplementary Figures 3F–H). Taken together, these data suggest a protective role of PDCs in inflammatory arthritis.

**Dampened inflammation and reduced bone destruction upon PDC recruitment and activation in mouse models of RA.** We next sought to recruit and activate PDCs with the aim of controlling experimental

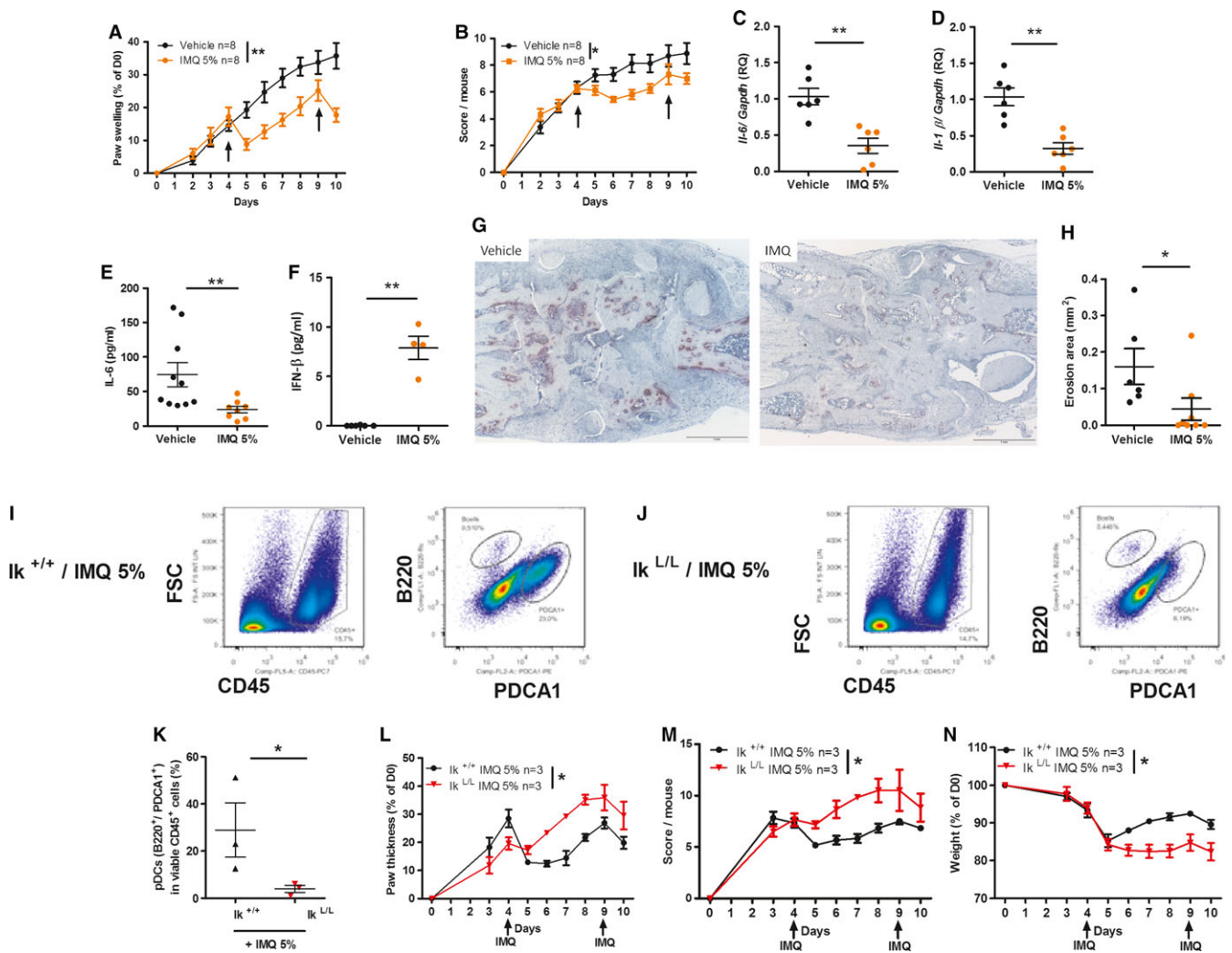


**Figure 1.** Enhanced arthritis symptoms in Ikaros mutant ( $Ik^{L/L}$ ) mice upon K/BxN serum transfer. **A**, Clinical quantification of paw swelling in wild-type and  $Ik^{L/L}$  mice with serum-transfer arthritis. **B**, Effect of serum-transfer arthritis on the weight of wild-type and  $Ik^{L/L}$  mice. In **A** and **B**, values are the mean  $\pm$  SEM. D0 = day 0. **C** and **D**, Relative quantification (RQ) of interleukin-6 (IL-6) (**C**) and IL-1 $\beta$  (**D**) expression in the paws of wild-type mice ( $n = 4$ ) and  $Ik^{L/L}$  mice ( $n = 4$ ) by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction 9 days after serum-transfer arthritis induction. **E** and **F**, Quantification of serum IL-6 in wild-type mice ( $n = 6$ ) and  $Ik^{L/L}$  mice ( $n = 6$ ) by enzyme-linked immunosorbent assay 5 days (**E**) and 9 days (**F**) after serum-transfer arthritis induction. **G–I**, Histomorphometric quantification of the area of inflammation (**G**), number of osteoclasts (**H**), and bone erosion area (**I**) in the hind paws of wild-type mice ( $n = 8$ ) and  $Ik^{L/L}$  mice ( $n = 6$ ) 9 days after serum-transfer arthritis induction. **J**, Histomorphometric quantification of bone erosion in the hind paws of wild-type mice ( $n = 8$ ) and  $Ik^{L/L}$  mice ( $n = 6$ ) 22 days after serum-transfer arthritis induction. In **C–J**, symbols represent individual mice; horizontal lines and error bars show the mean  $\pm$  SEM. **K** and **L**, Representative images of tartrate-resistant acid phosphatase staining of the hind paws of wild-type mice (**K**) and  $Ik^{L/L}$  mice (**L**) 9 days after serum-transfer arthritis induction. Original magnification  $\times 5$ . \* =  $P < 0.05$ ; \*\* =  $P < 0.01$ ; \*\*\* =  $P < 0.001$ . Results are representative of at least 2 experiments.

inflammatory arthritis. Imiquimod, a TLR-7 agonist, has been shown to induce psoriasis-like lesions upon topical application via the recruitment and activation of PDCs (23,24). We first tested the effect of a cream containing 5% imiquimod in the serum-transfer arthritis model (see Supplementary Video, available on the Arthritis & Rheumatology web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40225/abstract>). We observed that 2 topical applications of 0.75  $\mu$ g of imiquimod on the inflamed joints on days 4 and 9 significantly reduced swelling (Figures 2A and B). This was accompanied by a decrease in local IL-6 and IL-1 $\beta$  gene expression

(Figures 2C and D) and systemic IL-6 secretion (Figure 2E). Of note, increased IFN $\beta$  secretion was also observed after application of imiquimod on day 5 (Figure 2F). This reduced inflammation enhanced bone quality, as seen by decreased erosion in the imiquimod-treated group compared to the vehicle-treated group (Figures 2G and H).

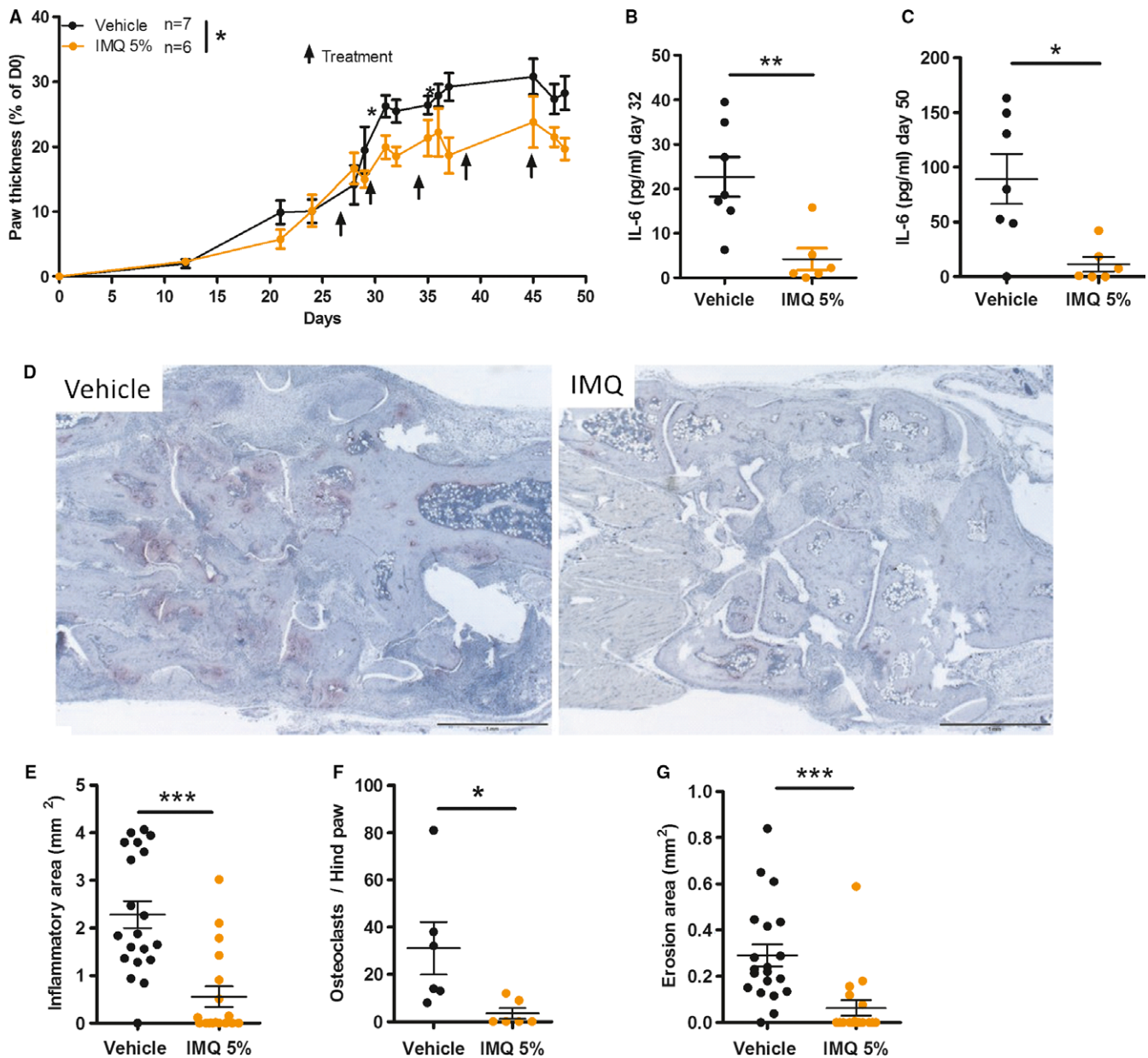
Importantly, imiquimod application increased the population of periarticular PDCs in wild-type animals (compared to vehicle-treated mice, see Supplementary Figure 1F), but not in  $Ik^{L/L}$  mutant mice (Figures 2I–K), in which the treatment did not appear



**Figure 2.** Reduction in joint inflammation and bone damage in serum-transfer arthritis upon topical application of imiquimod (IMQ). **A–H** show results for C57BL/6 wild-type mice ( $n = 6$  per group in **C** and **D**;  $n = 10$  vehicle-treated mice and 8 imiquimod-treated mice in **E**;  $n = 6$  vehicle-treated mice and 4 imiquimod-treated mice in **F**;  $n = 6$  vehicle-treated mice and 8 imiquimod-treated mice in **H**). Animals were treated with topical application of 5% imiquimod or a vehicle cream on the ankle joints of the front and hind paws on days 4 and 9. **A** and **B**, Paw swelling (**A**) and clinical score (**B**) in mice with serum-transfer arthritis. **C** and **D**, Relative quantification (RQ) of interleukin-6 (IL-6) (**C**) and IL-1 $\beta$  (**D**) expression in mouse paws by quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction 9 days after serum-transfer arthritis induction. **E**, Quantification of serum IL-6 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 9 days after serum-transfer arthritis induction. **F**, Quantification of serum interferon- $\beta$  (IFN $\beta$ ) by ELISA 5 days after serum-transfer arthritis induction. **G**, Representative images showing tartrate-resistant acid phosphatase staining of mouse hind paws 9 days after serum-transfer arthritis induction. Bars = 500 $\mu$ . **H**, Histomorphometric quantification of bone erosion in mouse hind paws 9 days after serum-transfer arthritis induction. **I** and **J**, Representative flow cytometric analysis of joint-infiltrating plasmacytoid dendritic cells (PDCs; CD45+PDCA1+B220+) in wild-type ( $Ik^{+/+}$ ) mice (**I**) and Ikaros $^{L/L}$  ( $Ik^{L/L}$ ) mice (**J**) treated with topical application of imiquimod 5%. **K**, Quantification of joint-infiltrating PDCs in wild-type mice ( $n = 3$ ) and  $Ik^{L/L}$  mice ( $n = 3$ ) treated with topical application of imiquimod 5%. **L–N**, Paw thickness (**L**), visual score (**M**), and weight (**N**) in wild-type mice and  $Ik^{L/L}$  mice treated with topical application of imiquimod 5%. In **A**, **B**, and **L–N**, values are the mean  $\pm$  SEM. In **C–F**, **H**, and **K**, symbols represent individual mice; horizontal lines and error bars show the mean  $\pm$  SEM. \* =  $P < 0.05$ ; \*\* =  $P < 0.01$ . Results are representative of at least 2 experiments. D0 = day 0.

to be effective either locally (as measured by paw swelling and visual score) or systemically (as measured by weight) (Figures 2L–N). Furthermore,  $Ik^{L/L}$  mice treated with vehicle and those treated with imiquimod exhibited similar joint inflammation (Supplementary

Figures 4A–E, available on the *Arthritis & Rheumatology* web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40225/abstract>), although a weak and transient IFN response was noticed in  $Ik^{L/L}$  mice following imiquimod application (Supplementary Figure 4F), which can



**Figure 3.** Reduction in joint inflammation and bone damage in DBA/1 mice with collagen-induced arthritis (CIA) by topical application of imiquimod (IMQ). **A**, Paw swelling in mice with CIA. Animals were treated with topical application of 5% imiquimod or a vehicle cream on the ankle joints of the front and hind paws on days 28, 31, 36, 41, and 46. Values are the mean  $\pm$  SEM. D0 = day 0. **B** and **C**, Quantification of serum interleukin-6 (IL-6) by enzyme-linked immunosorbent assay in vehicle-treated mice (n = 7) and imiquimod-treated mice (n = 6) 32 days (**B**) and 50 days (**C**) after induction of CIA. Symbols represent individual mice; horizontal lines and error bars show the mean  $\pm$  SEM. **D**, Representative images of tartrate-resistant acid phosphatase staining of the hind paws of vehicle-treated mice (left) and imiquimod-treated mice (right) 50 days after CIA induction. Bars = 500 $\mu$ m. **E–G**, Histomorphometric quantification of the area of inflammation (**E**), number of osteoclasts (**F**), and bone erosion area (**G**) in the hind paws of vehicle-treated mice and imiquimod-treated mice 50 days after CIA induction. Symbols represent individual mice; horizontal lines and error bars show the mean  $\pm$  SEM. \* =  $P < 0.05$ ; \*\* =  $P < 0.01$ ; \*\*\* =  $P < 0.001$ . Results are representative of at least 2 experiments.

reflect the presence of a small proportion of PDCs, or alternatively, the response of imiquimod-responding cells, such as conventional DCs, expressing low levels of TLR-7.

Next, we induced joint inflammation using serum transfer and treated mice (on days 4 and 9) in the right hind paw only. Paw thickness and visual score did not differ significantly between the contralateral (untreated)

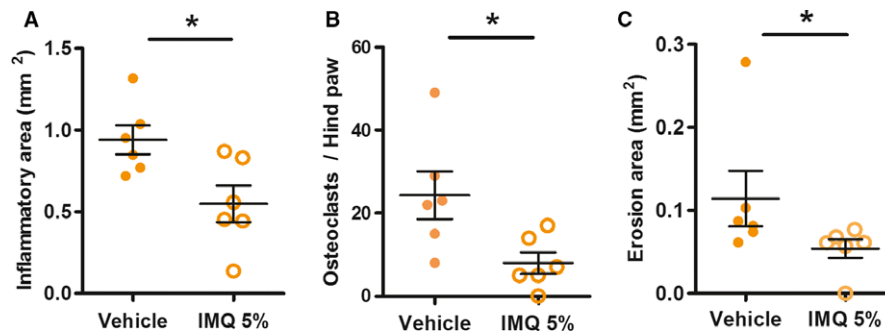
paws of treated mice and the paws of mice that received no imiquimod, thereby indicating that imiquimod exerts its maximal effects at the site of application (Supplementary Figures 5A–C, available on the *Arthritis & Rheumatology* web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40225/abstract>).

To expand these observations to alternative models of RA (18), we also tested the effect of iterative imiquimod applications in DBA/1 mice with collagen-induced arthritis (CIA). We initiated imiquimod applications on day 28, when the first signs of inflammation appeared, and then repeated the treatment 4 times (on days 31, 36, 41, and 46). This led to a significant reduction in paw swelling compared to that in animals given the vehicle cream (Figure 3A and Supplementary Figure 6, available on the *Arthritis & Rheumatology* web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40225/abstract>). This observation was corroborated by decreased IL-6 secretion in the imiquimod-treated group at the peak of symptoms (on day 50) (Figure 3B). Histologic analysis of the paws revealed a marked reduction in the area of inflammation, the numbers of osteoclasts per hind paw, and, importantly, the bone erosion area (Figures 3E–G). In addition, imiquimod application induced a significant decrease in the production of anti-type II collagen antibodies on day 50 (Supplementary Figure 7, available on the *Arthritis & Rheumatology* web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40225/abstract>).

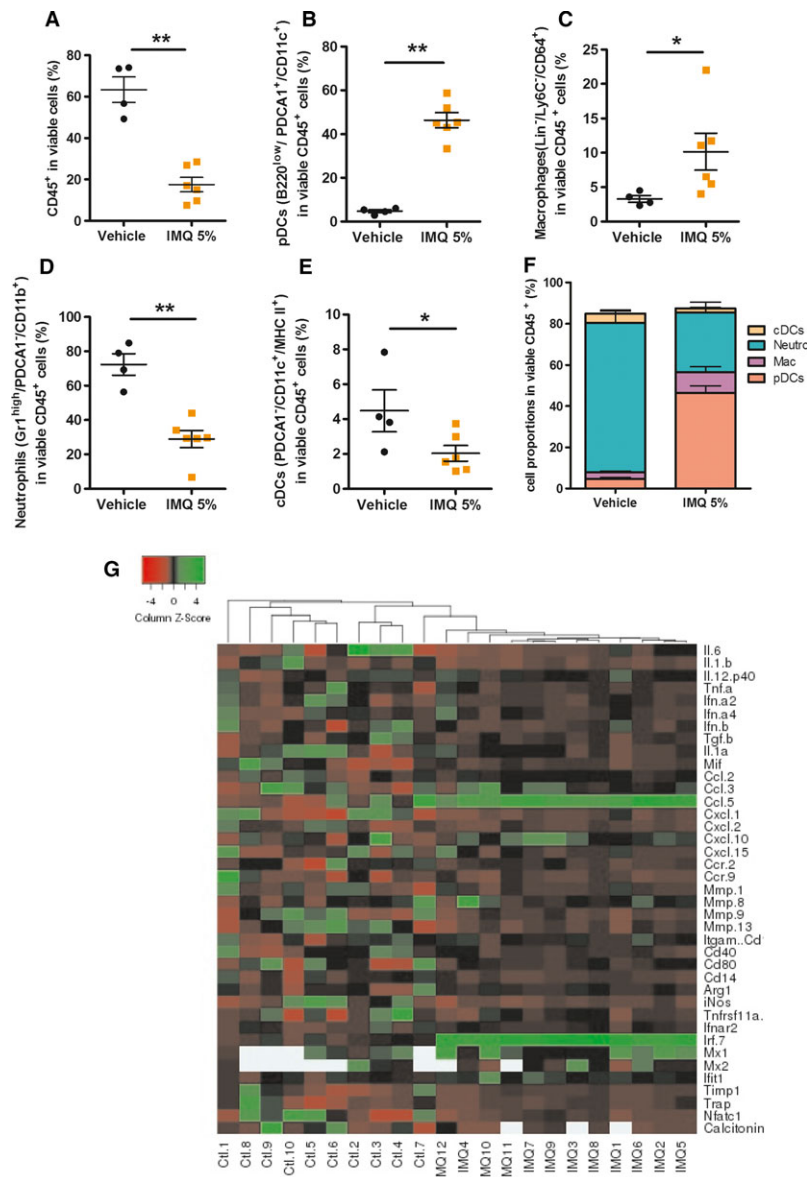
Finally, we administered serial imiquimod (or vehicle) applications to human TNF-transgenic mice, which are considered to be a relevant model of erosive arthritis (25). Each mouse received treatments on 1 hind paw. As seen in Figure 4, mice receiving imiquimod exhibited reduced arthritis symptoms, as monitored by histologic parameters.

**Imiquimod-mediated therapeutic effects require type I IFN signaling.** Having established the beneficial effect of topical imiquimod on joint inflammation, we aimed to describe its mechanism of action. First, we confirmed that topical application of imiquimod requires signaling through TLR-7 to induce its protective effects on joint inflammation. As shown in Supplementary Figure 8 (available on the *Arthritis & Rheumatology* web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40225/abstract>), application of imiquimod on days 4 and 9 had no beneficial effects on local arthritis symptoms (increased joint swelling and score) (Supplementary Figures 8A and B) or systemic arthritis symptoms (weight loss) (Supplementary Figure 8C) caused by K/BxN serum transfer in TLR-7<sup>-/-</sup> animals. These observations correlate with the steady-state levels of circulating IL-6 seen on day 5 (Supplementary Figure 8D) and lack of PDC mobilization in the joints (Supplementary Figures 8E and F).

We gathered additional details by first using flow cytometry to analyze the effects of imiquimod application on the innate immune cell populations present in the periarticular tissue (gating strategy is shown in Supplementary Figure 9, available on the *Arthritis & Rheumatology* web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40225/abstract>). In addition, we performed a transcriptome analysis of this microenvironment. We noticed that application of imiquimod (but not the vehicle cream) to the joints of wild-type mice on days 4 and 9 following K/BxN serum transfer drastically reduced the CD45<sup>+</sup> immune cell infiltrate (Figure 5A). (See also Supplementary Figure 10, available on the *Arthritis & Rheumatology* web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40225/abstract>, for absolute numbers of cells present in the joint.) This is consistent with reduced swelling and a decrease in the



**Figure 4.** Reduced severity of arthritis symptoms in human tumor necrosis factor-transgenic mice treated with topical application of imiquimod (IMQ). Animals were treated with vehicle (n = 6) or imiquimod 5% (n = 6). **A**, Histomorphometric quantification of the area of inflammation in vehicle-treated and imiquimod-treated mice. **B**, Number of osteoclasts per hind paw in vehicle-treated and imiquimod-treated mice. **C**, Bone erosion area in the hind paws of vehicle-treated and imiquimod-treated mice. Symbols represent individual mice; horizontal lines and error bars show the mean  $\pm$  SEM. \* =  $P < 0.05$ . Results are representative of at least 2 experiments.

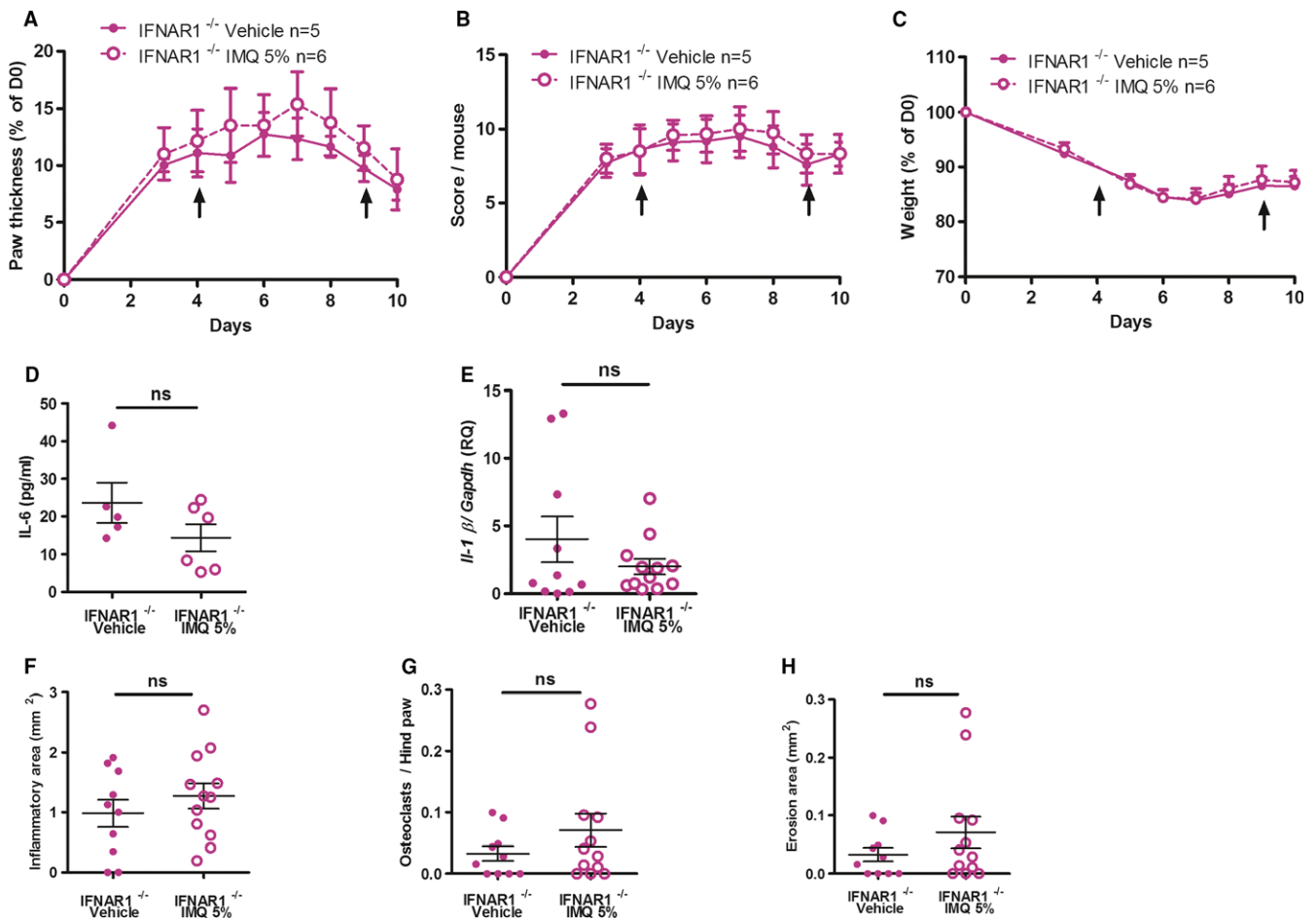


**Figure 5.** Induction of major cellular and transcriptional changes in the inflamed joints of mice with serum-transfer arthritis treated with imiquimod (IMQ). **A**, Quantification of immune (CD45<sup>+</sup>) cells by flow cytometry. **B–E**, Proportion of plasmacytoid dendritic cells (PDCs) (**B**), macrophages (Mac) (**C**), neutrophils (Neuro) (**D**), and conventional DCs (CDCs) (**E**) in the periarticular tissue of vehicle-treated C57BL/6 mice (n = 4) or imiquimod-treated C57BL/6 mice (n = 6) 9 days after serum-transfer arthritis induction. In **A–E**, symbols represent individual mice; horizontal lines and error bars show the mean ± SEM. **F**, Proportions of conventional DCs, neutrophils, macrophages, and PDCs in CD45<sup>+</sup> cells in the periarticular tissue of vehicle-treated C57BL/6 mice (n = 4) and imiquimod-treated C57BL/6 mice (n = 6) 9 days after serum-transfer arthritis induction. Bars show the mean ± SEM. **G**, Heatmap depicting transcriptional profiling in the paws of vehicle-treated C57BL/6 mice (n = 10) and imiquimod-treated C57BL/6 mice (n = 12) 9 days after serum-transfer arthritis induction. \* = *P* < 0.05; \*\* = *P* < 0.01.

expression of markers of inflammation (IL-6 and IL-1) (Figures 2C–E).

Furthermore, imiquimod induced the recruitment or the activation of PDCs, the proportion of which increased in the periarticular tissue of treated animals (Figures 5B and F), while absolute numbers remained steady (Supplementary Figure 10B). These

changes were accompanied by reduced numbers of neutrophils (Figure 5D) and conventional DCs (Figure 5E). Consistent with these observations, we found that imiquimod induced changes in transcriptome profiling, such as decreased expression of the genes encoding the neutrophil chemoattractants CXCL1 and CXCL2 (26), and increased expression of CCL2 and



**Figure 6.** Type I interferon signaling is necessary for imiquimod (IMO)-mediated antiinflammatory and bone-protective effects. **A–C**, Paw thickness (**A**), visual score (**B**), and weight (**C**) in IFNAR1<sup>-/-</sup> mice with serum-transfer arthritis treated with vehicle or imiquimod on days 4 and 9 after arthritis induction. D0 = day 0. **D**, Quantification of serum interleukin-6 (IL-6) by enzyme-linked immunosorbent assay in vehicle-treated IFNAR1<sup>-/-</sup> mice (n = 5) and imiquimod-treated IFNAR1<sup>-/-</sup> mice (n = 6) 5 days after serum-transfer arthritis induction. **E**, Relative quantification (RQ) of IL-1 $\beta$  transcripts in the paws of vehicle-treated IFNAR1<sup>-/-</sup> mice (n = 10) and imiquimod-treated IFNAR1<sup>-/-</sup> mice (n = 12) by quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction 9 days after serum-transfer arthritis induction. **F–H**, Histomorphometric quantification of the area of inflammation (**F**), number of osteoclasts (**G**), and bone erosion area (**H**) in the hind paws of vehicle-treated IFNAR1<sup>-/-</sup> mice (n = 10) and imiquimod-treated IFNAR1<sup>-/-</sup> mice (n = 12) 9 days after serum-transfer arthritis induction. In **A–C**, values are the mean  $\pm$  SEM. In **D–H**, symbols represent individual mice; horizontal lines and error bars show the mean  $\pm$  SEM. Results are representative of at least 2 experiments. NS = not significant.

CCL5, the products of which attract monocytes (27) and PDCs (28) (Figure 5G and Supplementary Figure 11, available on the *Arthritis & Rheumatology* web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40225/abstract>).

Importantly, the ratio of arginase 1 to inducible nitric oxide synthase indicated that infiltrating macrophages of imiquimod-treated mice are likely polarized toward alternative activation (M2) (29), which is consistent with reduced IL-6, IL-1, and CD14 expression and reduced major histocompatibility complex class II staining in macrophages (Supplementary Figure 9D). Of note, a clear IFN signature was evidenced by

increased levels of IRF-7 and several IFN-stimulated genes (ISGs), such as Mx-1, IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 1, and CXCL10 transcription. The lack of changes in the expression of IFN $\beta$ , IFN $\alpha$ 4, and IFN $\alpha$ 2 might reflect the fact that these genes are fast, non-lasting responders. Finally, the quantification of transcripts encoding matrix metalloproteinases (MMPs), which are important effectors participating in the bone damage following serum-transfer arthritis, confirms the protective effect of imiquimod. Indeed, expression of MMP-8 (whose knockout increases bone erosion, thereby classifying this MMP as “protective” [30]) was augmented by imiquimod application, while



transcripts encoding the “pathogenic” MMP-9 (31) and MMP-13 (32) were slightly reduced.

Quantitative RT-PCR of a set of osteoclast-related genes additionally showed reduced expression of the calcitonin receptor gene in the imiquimod-treated samples, consistent with the effects of the treatment on bone erosion, as seen on histologic examination. Transcripts encoding IL-10 remained below detection levels in this assay (results not shown). This analysis showed that topical application of imiquimod induced profound changes in the cellular cocktail that infiltrates the joint after serum-transfer arthritis induction. Most of these changes (such as M2 polarization of macrophages and the reduced proportion of neutrophils) likely account for the beneficial effects of imiquimod on joint inflammation and subsequent bone damage induced in mice with serum-transfer arthritis.

Finally, the transcriptomic “IFN signature” prompted us to evaluate the importance of type I IFN signaling in the antiinflammatory effects mediated by application of imiquimod. We examined the impact of imiquimod application in IFNAR<sup>-/-</sup> mice upon K/BxN serum transfer. The data demonstrated that absence of type I IFN signaling impairs imiquimod-dependent antiinflammatory effects, as determined by paw swelling, weight, IL-6 expression, and histologic features of the arthritic joints (Figure 6). Taken together, our findings indicate a stepwise scenario whereby the sequence imiquimod/TLR-7/PDCs/type I IFN creates an appropriate environment for dampening joint inflammation and reducing subsequent bone damage.

## DISCUSSION

The role of type I IFNs in the pathogenesis of RA remains a matter of controversy (10). Several previous studies pointed to an association between increased type I IFN secretion and subsequent transcription of ISGs (the so-called “IFN signature” [33]) in some RA patients (34). This suggests that this cytokine family exerts proarthritogenic effects, which correlate with cases of disease induction in patients with hepatitis C virus treated with PEGylated IFN (35). However, several mouse studies have challenged this concept. For instance, IRF-7-deficient mice are resistant to serum-transfer arthritis (36), and several authors have reported beneficial effects of IFN $\beta$  injections in mice (12) or rhesus monkeys (37) after arthritis induction. This led to a first clinical trial involving a small number of patients ( $n = 11$ ) (38) whose promising results could not be reproduced when the number of subjects was scaled up ( $n = 209$ ) (13). Furthermore, a pathogenic role of type I IFNs

is also difficult to reconcile with the correlation between a reduction in PDCs and the severity of arthritis shown in mice (39) and in humans (40), since PDCs are the main source of type I IFNs. The most striking demonstration of the controversial role of type I IFNs in RA is perhaps illustrated by 2 publications from the same group reporting that IFNAR-knockout mice can either protect (41) or enhance (42) RA pathology, depending on the model.

In this study, using 3 models of PDC depletion, we provide substantial evidence for a protective role of PDCs in inflammatory arthritis (Figure 1 and Supplementary Figures 1–3). We also managed to mobilize these cells at the inflamed site using topical application of imiquimod, a TLR-7 ligand. Imiquimod is the active component of a Food and Drug Administration–approved topical treatment for superficial basal cell carcinoma and external genital warts, a process which is also PDC dependent (28). This simple procedure exhibited remarkable efficacy for both resolution of inflammation and protection from bone damage. Importantly, we demonstrated that this protocol is efficient in 3 different models of arthritis characterized by different mechanisms of disease initiation and perpetuation (43): the K/BxN serum-transfer model of arthritis, CIA, and human TNF-transgenic mice (Figures 2–4). Finally, our flow cytometry and transcriptome analyses (Figure 5) of periarticular tissues revealed that imiquimod application induces a TLR-7/PDC/type I IFN cascade that ultimately reduces the proportion of infiltrating neutrophils, the cytotoxic functions of which make them major contributors to RA pathology (44). This is accompanied by an increased number of macrophages, whose polarization toward an alternatively activated phenotype likely contributes to the maintenance of an antiinflammatory milieu.

Consistent with a previous report describing CpG-mediated inhibition of serum-transfer arthritis (45), our data suggest that PDCs are major players in the regulation of inflammatory reactions in the joint. While the precise mechanisms of the cellular cross-talk remain to be deciphered, both imiquimod- and CpG-mediated resolution of inflammatory arthritis appear to converge toward a reduction of the neutrophil infiltrate in the joint. A more thorough transcriptome analysis (using RNA sequencing) of the inflamed joint following imiquimod application is needed to identify signatures enabling the identification and activation status of the different innate immune cells present in this compartment (46). However, our work extends these observations beyond the innate immunity-dependent models of arthritis in mice (namely, K/BxN serum transfer and human TNF-transgenic mice)

to the CIA model in which T and B cell activation is required. Furthermore, the present work points to an essential role of type I (and possibly type III [47]) IFN signaling in the protective effect of imiquimod following experimental arthritis. This is illustrated by the up-regulation of the ISG CXCL10 which, through its antiangiogenic properties (48), may also participate in this therapeutic process. In addition, our data are consistent with recent observations that enabled a re-evaluation of the role of IFN $\beta$  and PDCs in the dampening of excessive inflammation occurring in various pathologic settings (49,50).

Up to now, manipulation of DCs for therapeutic purposes has been accomplished by means of adoptive transfer, for instance, of PDCs, which confer recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis (49), or of tolerogenic DCs in RA patients (51). While infusion of autologous tolerogenic DCs appears feasible, and possibly beneficial (although not yet demonstrated) in large joints, this expensive procedure is unlikely to be applicable to the ever-growing number of patients in developed countries. Furthermore, it does not appear suitable for smaller joints in which injections remain a very painful procedure. We believe that mobilization of PDCs upon topical application of imiquimod, although not devoid of risks (52), might represent an attractive, cost-effective, and efficient alternative for improving the management of RA. A future clinical trial should clarify this opportunity.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Marc Dalod and Elena Tomasello (Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, France) for helpful advice.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Georgel had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

**Study conception and design.** Nehmar, Alsaleh, Voisin, Flacher, Mariotte, Saferding, Puchner, Niederreiter, Vandamme, Schabbauer, Kastner, Chan, Kirstetter, Holcman, Mueller, Sibilia, Bahram, Georgel.

**Acquisition of data.** Nehmar, Alsaleh, Voisin, Flacher, Mariotte, Saferding, Puchner, Niederreiter, Vandamme, Schabbauer, Kastner, Chan, Kirstetter, Holcman, Mueller, Sibilia, Bahram, Blüml, Georgel.

**Analysis and interpretation of data.** Nehmar, Alsaleh, Voisin, Flacher, Mariotte, Saferding, Puchner, Niederreiter, Vandamme, Schabbauer, Kastner, Chan, Kirstetter, Holcman, Mueller, Sibilia, Bahram, Blüml, Georgel.

#### REFERENCES

1. Firestein GS. The disease formerly known as rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2014;16:114.
2. McGonagle D, McDermott MF. A proposed classification of the immunological diseases. *PLoS Med* 2006;3:e297.
3. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011;365:2205–19.
4. Zampeli E, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG. Treatment of rheumatoid arthritis: unraveling the conundrum. *J Autoimmun* 2015;65:1–18.
5. Smolen JS, Aletaha D. Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges. *Nat Rev Rheumatol* 2015;11:276–89.
6. Burmester GR, Feist E, Dorner T. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10:77–88.
7. McInnes IB, Buckley CD, Isaacs JD. Cytokines in rheumatoid arthritis: shaping the immunological landscape. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:63–8.
8. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2015;15:471–85.
9. Messemaker TC, Huizinga TW, Kurreevan F. Immunogenetics of rheumatoid arthritis: understanding functional implications. *J Autoimmun* 2015;64:74–81.
10. Conigliaro P, Perricone C, Benson RA, Garside P, Brewer JM, Perricone R, et al. The type I IFN system in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 2010;43:220–5.
11. Lopez de Padilla CM, Niewold TB. The type I interferons: basic concepts and clinical relevance in immune-mediated inflammatory diseases. *Gene* 2016;576:14–21.
12. Van Holten J, Reedquist K, Sattontet-Roche P, Smeets TJ, Plater-Zyberk C, Vervoordeldonk MJ, et al. Treatment with recombinant interferon- $\beta$  reduces inflammation and slows cartilage destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R239–49.
13. Van Holten J, Pavelka K, Vencovsky J, Stahl H, Rozman B, Genovese M, et al. A multicentre, randomised, double blind, placebo controlled phase II study of subcutaneous interferon  $\beta$ -1a in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:64–9.
14. Takakubo Y, Takagi M, Maeda K, Tamaki Y, Sasaki A, Asano T, et al. Distribution of myeloid dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells in the synovial tissues of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2008;35:1919–31.
15. Allman D, Dalod M, Asselin-Paturel C, Delale T, Robbins SH, Trinchieri G, et al. Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. *Blood* 2006;108:4025–34.
16. Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, et al. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* 1999;10:451–61.
17. Dumortier A, Kirstetter P, Kastner P, Chan S. Ikaros regulates neutrophil differentiation. *Blood* 2003;101:2219–26.
18. Christensen AD, Haase C, Cook AD, Hamilton JA. K/BxN serum-transfer arthritis as a model for human inflammatory arthritis. *Front Immunol* 2016;7:213.
19. Asselin-Paturel C, Brizard G, Pin JJ, Briere F, Trinchieri G. Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J Immunol* 2003;171:6466–77.
20. Blasius AL, Giurisato E, Cella M, Schreiber RD, Shaw AS, Colonna M. Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. *J Immunol* 2006;177:3260–5.
21. Monach PA, Verschoor A, Jacobs JP, Carroll MC, Wagers AJ, Benoist C, et al. Circulating C3 is necessary and sufficient for induction of autoantibody-mediated arthritis in a mouse model. *Arthritis Rheum* 2007;56:2968–74.

22. Swiecki M, Gilfillan S, Vermi W, Wang Y, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8<sup>+</sup> T cell accrual. *Immunity* 2010;33:955–66.
23. Urošević M, Dummer R, Conrad C, Beyeler M, Laine E, Burg G, et al. Disease-independent skin recruitment and activation of plasmacytoid dendritic cells following imiquimod treatment. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1143–53.
24. Glitzner E, Korosec A, Brunner PM, Drobits B, Amberg N, Schonhaler HB, et al. Specific roles for dendritic cell subsets during initiation and progression of psoriasis. *EMBO Mol Med* 2014;6:1312–27.
25. Kollias G. TNF pathophysiology in murine models of chronic inflammation and autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum* 2005;34 Suppl 1:3–6.
26. De Filippo K, Dudeck A, Hasenberg M, Nye E, van Rooijen N, Hartmann K, et al. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood* 2013;121:4930–7.
27. Szekanecz Z, Koch AE. Successes and failures of chemokine-pathway targeting in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:5–13.
28. Drobits B, Holcman M, Amberg N, Swiecki M, Grundtner R, Hammer M, et al. Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J Clin Invest* 2012;122:575–85.
29. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 2014; 6:13.
30. Garcia S, Forteza J, Lopez-Otin C, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A, Conde C. Matrix metalloproteinase-8 deficiency increases joint inflammation and bone erosion in the K/BxN serum-transfer arthritis model. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R224.
31. Itoh T, Matsuda H, Tanioka M, Kuwabara K, Itoharu S, Suzuki R. The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J Immunol* 2002;169:2643–7.
32. Singh A, Rajasekaran N, Hartenstein B, Szabowski S, Gajda M, Angel P, et al. Collagenase-3 (MMP-13) deficiency protects C57BL/6 mice from antibody-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2013;15:R222.
33. Higgs BW, Liu Z, White B, Zhu W, White WI, Morehouse C, et al. Patients with systemic lupus erythematosus, myositis, rheumatoid arthritis and scleroderma share activation of a common type I interferon pathway. *Ann Rheum Dis* 2011;70:2029–36.
34. Van der Pouw Kraan TC, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, Voskuyl AE, Rustenburg F, Baggen JM, et al. Rheumatoid arthritis subtypes identified by genomic profiling of peripheral blood cells: assignment of a type I interferon signature in a subpopulation of patients. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1008–14.
35. Cacopardo B, Benanti F, Pinzone MR, Nunnari G. Rheumatoid arthritis following PEG-interferon- $\alpha$ -2a plus ribavirin treatment for chronic hepatitis C: a case report and review of the literature. *BMC Res Notes* 2013;6:437.
36. Sweeney SE, Corr M, Kimbler TB. Role of interferon regulatory factor 7 in serum-transfer arthritis: regulation of interferon- $\beta$  production. *Arthritis Rheum* 2012;64:1046–56.
37. Tak PP, Hart BA, Kraan MC, Jonker M, Smeets TJ, Breedveld FC. The effects of interferon  $\beta$  treatment on arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:362–9.
38. Smeets TJ, Dayer JM, Kraan MC, Versendaal J, Chicheportiche R, Breedveld FC, et al. The effects of interferon- $\beta$  treatment of synovial inflammation and expression of metalloproteinases in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43: 270–4.
39. Jongbloed SL, Benson RA, Nickdel MB, Garside P, McInnes IB, Brewer JM. Plasmacytoid dendritic cells regulate breach of self-tolerance in autoimmune arthritis. *J Immunol* 2009;182:963–8.
40. Jongbloed SL, Lebre MC, Fraser AR, Gracie JA, Sturrock RD, Tak PP, et al. Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R15.
41. Magnusson M, Zare F, Tarkowski A. Requirement of type I interferon signaling for arthritis triggered by double-stranded RNA. *Arthritis Rheum* 2006;54:148–57.
42. Ying F, Chalish JP, Narendra SC, Magnusson M. Type I IFN protects against antigen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 2011; 41:1687–95.
43. Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, Liew FY. Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2009;39:2040–4.
44. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 10:593–601.
45. Wu HJ, Sawaya H, Binstadt B, Brickelmaier M, Blasius A, Gorelik L, et al. Inflammatory arthritis can be reined in by CpG-induced DC-NK cell cross talk. *J Exp Med* 2007;204:1911–22.
46. Spinelli L, Carpentier S, Montanana Sanchis F, Dalod M, Vu Manh TP. BubbleGUM: automatic extraction of phenotype molecular signatures and comprehensive visualization of multiple gene set enrichment analyses. *BMC Genomics* 2015;16:814.
47. Blazek K, Eames HL, Weiss M, Byrne AJ, Perocheau D, Pease JE, et al. IFN- $\lambda$  resolves inflammation via suppression of neutrophil infiltration and IL-1 $\beta$  production. *J Exp Med* 2015; 212:845–53.
48. Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:593–609.
49. Duraes FV, Lippens C, Steinbach K, Dubrot J, Brighthouse D, Bendriss-Vermare N, et al. pDC therapy induces recovery from EAE by recruiting endogenous pDC to sites of CNS inflammation. *J Autoimmun* 2016;67:8–18.
50. Yang JY, Kim MS, Kim E, Cheon JH, Lee YS, Kim Y, et al. Enteric viruses ameliorate gut inflammation via Toll-like receptor 3 and Toll-like receptor 7-mediated interferon- $\beta$  production. *Immunity* 2016;44:889–900.
51. Bell GM, Anderson AE, Diboll J, Reece R, Eltherington O, Harry RA, et al. Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 2017;76:227–34.
52. Yokogawa M, Takaishi M, Nakajima K, Kamijima R, Fujimoto C, Kataoka S, et al. Epicutaneous application of Toll-like receptor 7 agonists leads to systemic autoimmunity in wild-type mice: a new model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66:694–706.

## Opinion

# Therapeutic Perspectives for Interferons and Plasmacytoid Dendritic Cells in Rheumatoid Arthritis

Ramzi Nehmar,<sup>1,2,4</sup> Alexandre Mariotte,<sup>1,2,4</sup> Aurore de Cauwer,<sup>1,2</sup> Jean Sibilia,<sup>1,2,3</sup> Seiamak Bahram,<sup>1,2</sup> and Philippe Georget<sup>1,2,\*</sup>

**Rheumatoid arthritis (RA) is a multifactorial immune disease exhibiting diverse clinical responses to specific therapeutic agents. Such heterogeneity reflects variable activation of signaling pathways. Consequently, RA physiopathology has been linked to many immune cells and factors, with controversial observations for interferons (IFNs). In this opinion article, we review the roles of these cytokines and the cells that produce them in light of recent data: clinical observations showing that expression of IFN-dependent genes does not reflect RA activity and RA mouse models in which the stimulation of IFN-dependent pathways provided disease protection. We suggest that epicutaneous stimulation of the IFN network is an attractive possibility to limit neutrophil infiltration or activation, thus providing therapeutic benefits to RA patients refractory to current therapies.**

## Rheumatoid Arthritis Pathogenesis Is Heterogeneous

Rheumatoid arthritis (RA) is a multifactorial disease resulting from genetic, epigenetic, and environmental specificities leading to immune alterations. RA is characterized by swelling, stiffness, and inflammatory pain, mainly in the small joints of hands and feet [1]. In addition, systemic manifestations (such as pulmonary and cardiovascular complications) also contribute to a significant alteration of the quality of life and reduced life expectancy of RA patients [1]. Several MHC Class II alleles such as HLA-DRB1\*0401 and HLA-DRB1\*0404 have been described as major contributors to the disease [2] and genome-wide association studies have identified numerous additional loci (such as *PTPN22*, *PADI4*, *TNFAIP3*) encoding genes that participate in its initiation and/or development [3]. Furthermore, epigenetic regulation of gene expression provided by miRNAs and histone modifications have been recently identified as an additional layer of complexity in the heritability of RA [4]. Finally, environmental exposures to chemical (such as those generated during smoking [5]) or to specific microorganisms (*Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in the oral cavity [6,7], *Prevotella copri* in the gut [8]) also participate in the pathogenesis of RA. The complexity of this disease is also particularly illustrated by the diversity of the currently available RA therapies. Up to now, available therapies include conventional synthetic **disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs; see Glossary)** (like methotrexate), biological DMARDs, and more recently also targeted synthetic DMARDs (such as Janus kinase inhibitors; see **Box 1**) [9]. Biological DMARDs target several cells types (T cells with cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 mimics, B cells with anti-CD20 antibodies) and signaling molecules – tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) whose modulation with **monoclonal antibody (mAb)** is highly potent, and also IL-1 or IL-17, which may also be usefully targeted in some RA patients

## Highlights

Type I ( $\alpha\beta$ ) and Type II ( $\gamma$ ) interferons involvement in rheumatoid arthritis is highly controversial.

Type III interferons are secreted by epithelial cells and exhibit potent anti-inflammatory properties.

Interferon properties depend on the immune context (infectious or not) and the cellular microenvironment (containing immune and stromal cells).

Epicutaneous application of imiquimod is a potential therapeutic option for the treatment of neutrophil-driven joint inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis.

<sup>1</sup>Université de Strasbourg, INSERM, IRM UMR-S 1109, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Faculté de Médecine, F-67000 Strasbourg, France

<sup>2</sup>Fédération Hospitalo-Universitaire, OMICARE, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, 67085 Strasbourg, France

<sup>4</sup>Equal first authors

\*Correspondence: pgeorget@unistra.fr (P. Georget).

### Box 1. Clinician's Corner

- Despite impressive progresses in the management of RA following the introduction of biological DMARDs, 30–40% of the patients still fail to achieve long-term remission.
- Current conventional synthetic or biological DMARDs are systematically delivered and may induce adverse events such as infections due to global immunosuppression; although highly effective, biological DMARDs represent a huge economic burden to the social security systems in developed countries. In other countries, this high cost might limit the availability of these treatments and thereby creates inequity.
- Like in other rheumatic diseases, RA patients express increased interferon-responsive genes in white blood cells or synovial tissue, a feature dubbed as 'the interferon response'. In RA animal models, the therapeutic potential of Type I and Type II interferons was repeatedly demonstrated. However, clinical trials in humans were unsuccessful in terms of clinical benefit but a subgroup of patients might positively respond to an interferon-based therapy.
- Contrary to Type I and Type II, Type III interferon signaling uses a specific receptor with limited distribution. Therefore, manipulating its expression may restrict the risk of adverse events.
- **Imiquimod**, a TLR7 agonist, triggers Type I and III interferon signaling. A cream containing this compound is approved to treat superficial basal cell carcinoma and genital warts for a limited cost. A clinical trial to evaluate the impact of imiquimod topical application on inflamed small joint refractory to current therapies should be initiated.

[2,10]. The diversity of the patient's responses to these compounds suggests that RA should be perhaps be considered as a syndrome, rather than a single clinical entity [2]. This heterogeneity in RA pathophysiology might also be invoked with regard to the controversial roles of Type I interferons (IFN-I), and the cells that produce them in large amounts, that is, the plasmacytoid dendritic cells (pDCs), in the etiopathology of the disease.

IFN-I is a family of cytokines mainly composed of IFN- $\beta$  and 13 isoforms of IFN- $\alpha$  sharing the same receptor and signal transduction pathway [11]. They are mostly considered as inflammatory cytokines (given their essential roles in antiviral defense mechanisms [12]) and promoters of autoimmunity [13], with the noticeable exception of their action in multiple sclerosis, an inflammatory demyelinating disease for which IFN- $\beta$  is widely used as first-line treatment in relapsing forms [14]. The positive effects of IFN- $\beta$  in multiple sclerosis are attributed to its anti-inflammatory and immunomodulatory properties [15]. Of note, IFN- $\beta$  anti-inflammatory properties are also protective against ischemic stroke [16]. Pathogenic roles of Type I IFNs are also observed, such as in systemic lupus erythematosus (SLE), a prototypical autoimmune/auto-inflammatory disease that is characterized, as in many such diseases, by a marked overexpression of IFN-stimulated genes (ISGs). This overexpression pattern is defined as the so-called **IFN signature** [17]. RA and SLE display several important opposing features: striking differences in their evolution during pregnancy (while a marked relapse and even a remission can be observed in pregnant RA patients, lupus patients experience an increased risk of flares) [18] and the incidence of sex in disease development (both disease preferentially affect women, but while lupus severity is more severe in men compared with women, RA symptoms do not depend on the sex of the patients [19]), likely reflecting major immunological particularities between these two conditions. This suggests that, opposite to SLE for which therapies that aim to reduce IFN signaling might be of interest [20,21], enhancing or increasing IFN signaling might exhibit more potential therapeutic potential in RA. Herein, we will review the possible disadvantages and benefits of IFNs' future therapeutic considerations for RA. To this end, we present a possible model based on recent findings describing the importance of Type I, Type II, and Type III IFNs in light of a possible interplay between keratinocytes, pDCs, and the cellular content in the synovial cavity, with a focus on **natural killer (NK) cells** and neutrophils.

### Evidence for Pathogenic Roles of Type I IFNs and RA

A first glimpse in favor of the potential involvement of IFN-I in RA pathogenesis was suggested by the overexpression of a subset of ISGs in blood cells isolated from preclinical RA patients [in

### Glossary

#### Anticitrullinated peptide

**antibodies:** autoantibodies directed against peptides and proteins that are citrullinated. Citrullination is a post-translational modification of proteins whereby arginine residues are enzymatically converted into citrulline.

**Collagen-induced arthritis (CIA):** a classical procedure to induce autoimmune arthritis in mice through immunization with heterologous (chicken or bovine) collagen II.

#### Complete Freund's adjuvant

**(CFA):** used to produce water-in-oil emulsions of immunogens (collagen II in the case of CIA). Antigens in emulsions stimulate high and long-lasting antibody responses.

#### Dendritic epidermal T cells:

lymphocytes present in the mouse epidermis expressing an invariant V $\gamma$ 3V $\delta$ 1 T cell receptor (TCR). Once activated, dendritic epidermal T cells locally produce cytokines (like IL-17), hence participating in the regulation of skin inflammatory responses.

#### Disease modifying antirheumatic

**drugs (DMARDs):** a set of unrelated molecules used to slow down disease progression in rheumatoid arthritis patients. They are subdivided into two classes: (i) synthetic DMARDs (comprising conventional synthetic DMARDs, such as methotrexate, and target-specific DMARDs, such as Janus kinase inhibitors); and (ii) biological DMARDs (like monoclonal antibodies against TNF- $\alpha$ ) which comprise biological original and biosimilar DMARDs.

#### Fibroblast-like synoviocyte (FLS):

a specialized cell type present in the synovial membrane of the normal joint, responsible for the synthesis of essential components of the synovial fluid (such as hyaluronic acid). In RA patients, FLS proliferation leads to hyperplasia of the synovial membrane. Furthermore, RA FLSs acquire an aggressive phenotype characterized by their capacity to produce pro-inflammatory molecules (e.g., IL-6) and metalloproteases.

#### Human TNF- $\alpha$ transgenic mice:

transgenic mice that over-express human TNF- $\alpha$  and develop an erosive polyarthritis with many characteristics observed in rheumatoid arthritis patients.

which autoantibodies directed against post-translationally modified proteins/peptides including citrullinated (**anticitrullinated peptide antibodies**), carbamylated (anticarbamylated peptide antibodies), and acetylated proteins/peptides (antiacetylated proteins/peptide antibodies) can be detected, in the absence of clinical symptoms], hence supporting this 'Type I IFN signature' as a biomarker predictive of arthritis development [22]. While current belief postulates that increased Type I IFN expression contributes to autoimmunity by promoting dendritic cells maturation [23], their exact role in RA pathogenesis is not clearly established. A correlation between ISGs expression levels [quantified in whole blood by quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR)] and antibodies against citrullinated and carbamylated proteins has been observed [24]; however, increasing evidence to the hypothesis suggests that IFN-I might promote the production of pathogenic autoantibodies. Furthermore, this Type I IFN signature seems now to describe a subgroup of RA patients and does not correlate with disease clinical scores, as evidenced by the absence or correlation of an IFN score (reflecting mean expression of 19 IFN-responsive genes quantified by RT-qPCR in whole blood) and the disease activity score, the occurrence of erosion or autoantibody positivity [25]. Therefore, the position of IFN-I, as a cause or a consequence in RA pathogenesis, is questionable. Additional support for a pathogenic role attributed to IFN-I is provided by clinical observations of RA occurring after pegylated-IFN- $\alpha$  plus ribavirin treatment for cellular hepatocarcinoma in hepatitis C virus (HCV)-infected patients [26]. However, treatment with IFN- $\alpha$  (once the standard of care for HCV infection) may also lead to substantial clinical improvement of HCV-related arthritis [27]. Because these discrepancies may originate from differences in patient's characteristics, using animal models might provide better, more controlled approaches to tackle this issue. Since polymorphisms in the gene encoding IFN regulatory factor 5 (*IRF5*, an important transcription factor regulating *lfn-a* genes expression) were previously associated with increased risk of several autoimmune diseases, including RA [28], experimental arthritis was evaluated in mice deficient in this transcription factor involved in IFN-I production. In this model, arthritis induced by arthritogenic K/BxN serum transfer was less pronounced in *Ir5*<sup>-/-</sup> and *Tlr7*<sup>-/-</sup> (which triggers IRF5 activation and nuclear translocation following single-stranded RNA binding) mouse mutants compared with wild-type animals [29]. In addition, **collagen-induced arthritis (CIA)** severity was also reduced in *Tlr7*-deficient mice [30]. This observation also suggested that IFN-I, which is a well-known (but not exclusive) target of Toll-like receptor 7 (TLR7) signaling, may promote RA pathogenesis. Altogether, both human clinical data and mouse experimental observations that favor an arthritogenic effect of IFN-I appear rather scarce and questionable.

### Protective Effects of Type I IFNs in RA

Many observations point, in fact, to protective effects of IFN-I in RA. First, genome-wide association studies performed on 1348 RA patients and 3000 controls have identified protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (*PTPN22*) 1858T (or R620W) allele as the strongest non-human leukocyte antigen (HLA) genetic predisposition factor for RA [31–33]. *PTPN22* is a phosphatase that binds TNF receptor-associated factor 3 (TRAF3) and promotes TRAF3 Lys63-linked autoubiquitination in bone marrow-derived macrophages after engagement of TLRs [34]. This effect on TRAF3 enables *PTPN22* to mediate production of IFN-I. Transgenic mice with the human *PTPN22*R620W variant (introduced in a murine *Ptpn22* knockout background) fail to promote Type 1 IFN-dependent suppression of arthritis in response to poly I:C injection [34]. **polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C)** injection [34]. Multiple experiments have been subsequently performed in mice to evaluate the potential therapeutic benefits of IFN-I with regard to various models of experimental arthritis. To cite a few examples, intra-articular injections of IFN- $\alpha$  protected wild-type mice against methylated bovine serum albumin-induced arthritis [35] and intraperitoneal injection of IFN- $\beta$  reduced arthritis symptoms

**IFN-III:** Type III interferons comprise IFN- $\lambda$ 1 (also named IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (IL28A), IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B), and IFN- $\lambda$ 4 in humans. In mice, only IFN- $\lambda$ 2 and IFN- $\lambda$ 3 are expressed. IFN-III bind to a receptor complex consisting of the specific IFN- $\lambda$  receptor chain 1 associated to the IL-10 receptor chain 2.

**IFN signature:** a specific increased activation of interferon signaling, leading to overexpression on interferon-responsive genes in circulating blood cells.

**Ikaros:** a transcription factor containing a Zinc finger DNA binding motif required for lymphocytes development and differentiation. In mice, Ikaros hypomorphic mutants are characterized by an absence of pDCs in the periphery.

**Imiquimod:** a synthetic compound mimicking single-stranded RNA capable of activating Toll-like receptor 7 and inducing IFN-I synthesis. Under the brand name 'Aldara', a cream containing imiquimod is prescribed to treat genital warts and basal cell carcinoma.

**K/BxN serum transfer:** a procedure based on intraperitoneal injection of serum harvested from K/BxN mice (obtained upon crossing transgenic KRN mice in a C57BL/6 background with NOD1 animals) that spontaneously develop arthritis.

**Monoclonal antibody (mAb):** when used to treat rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases, they are named biological DMARDs.

**Natural killer (NK) cells:** cytotoxic innate lymphocytes. Once activated by a combination of cytokines (such as IL-12, IFN-I), they secrete IFN- $\gamma$ .

**Plasmacytoid dendritic cell (pDC):** an innate immune cell particularly responsive to ligands activating endosomal Toll-like receptors and capable of secreting massive amounts of interferons.

**Polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C):** a synthetic ligand of Toll-like receptor 3, used to mimic viral infections and inducing IFN-I production.

**NETosis:** neutrophil extracellular trap formation. The process by which neutrophils release their nuclear contents into the extracellular milieu. This results in the formation of fibers formed by decondensed chromatin,

in the **K/BxN serum transfer** mouse model [36] as well as in the CIA mouse model [37]. Furthermore, the beneficial effects of IFN-I on RA evolution were also observed in a non-human primate model, rhesus monkeys: IFN- $\beta$  injected daily subcutaneously reduced soft tissue swelling and redness of the affected joints [38]. While these encouraging results were supported by additional mouse models, such as those carrying a deficiency in the *Irf7* gene in which arthritis induced by K/BxN serum transfer is exacerbated [39], clinical trials aiming at translating this novel therapeutic opportunity to the bedside had disappointing results: at the doses tested, treatment with IFN- $\beta$  in combination with methotrexate three times a week did not have measurable clinical or radiological effects in RA patients [40]. Despite interesting *ex vivo* data explaining the anti-inflammatory effects of IFN-I, whether at the level of the IL-1 receptor [36] or inflammasome repression [41], further explorations of the therapeutic potential of IFN-I have not been pursued, possibly because of its well-known side effects observed in HCV-infected patients [42].

### IFN- $\gamma$ , a Pleiotropic Immunomodulatory Cytokine with Contrasting Effects in RA

The complex immunomodulatory activities of IFN- $\gamma$  on the regulation of RA severity have been known for almost three decades. Indeed, in the adjuvant arthritis rat model, administration of this cytokine could either enhance the severity of the disease when provided 24 h before **complete Freund's adjuvant (CFA)** or reduce the symptoms if injected 48 h after CFA [33], which suggests that IFN- $\gamma$  plays opposite roles at the initiation and during the course of disease in the CIA model. This concept of a biphasic effect of IFN- $\gamma$  was later confirmed in the CIA model in mice [43]. Similar to Type I IFNs, some research has indicated a disease-enhancing role for IFN- $\gamma$  [44], while multiple reports demonstrated its beneficial effects in various RA models (reviewed in [45]). These immunomodulatory effects of IFN- $\gamma$  prompted clinical trials to explore its therapeutic potential; however, IFN- $\gamma$  injections in RA patients provided limited amelioration and intramuscular injections of anti-IFN- $\gamma$  antibodies improved articular symptoms [46], and so this treatment strategy was abandoned. However, research on RA mouse models has continued to elucidate the mechanisms driving the anti-inflammatory effects of IFN- $\gamma$ . CpG-mediated immune-suppressive effects in the K/BxN serum transfer mouse model was shown to involve IL-12-activation of NK cells and their subsequent IFN- $\gamma$  secretion, which inhibited neutrophils recruitment in the joints [47]. More recently, TNF- $\alpha$ -induced necroptosis was reduced and Th17 differentiation was increased in splenocytes obtained from IFN- $\gamma$ -knockout mice compared with wild-type mice [48], highlighting an additional potential mechanism accounting for IFN- $\gamma$ 's anti-inflammatory properties [48]. Altogether, these recent reports provide additional evidence supporting the potential use of IFN- $\gamma$ -based therapies for RA patients.

### Type III IFNs, New Players in RA Pathophysiology

While the clinical interest for IFN-I decreased, a new family of IFNs, Type III IFNs (**IFN-III**), was simultaneously described in mammals. IFN-III members, which comprise IFN- $\lambda$ 1 (IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A), IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B), and IFN- $\lambda$ 4 in humans (mice possess only IFN- $\lambda$ 2 and IFN- $\lambda$ 3), bind to a receptor complex consisting of the specific IFN- $\lambda$  receptor chain 1 associated to the IL-10 receptor chain 2 [43]. While the receptor for IFN-I is ubiquitously expressed, the cellular distribution of the IFNs- $\lambda$  receptor is highly restricted and is expressed at the cell surface of dedicated hematopoietic cells (such as pDCs, see below) and epithelial cells [49]. This specificity might partially explain the limited adverse events observed during clinical trials with recombinant IFN- $\lambda$ 1 in HCV-infected patients [50] because IFN-I and IFN-III induce otherwise many overlapping intracellular signaling events. This unique characteristic of IFNs- $\lambda$  makes it an attractive therapeutic tool, including in RA, as has been suggested by other

which are capable of trapping microorganisms. As such, NETosis represents an important defense mechanism against infections. However, excessive or uncontrolled NET formation is also associated with autoimmune diseases and the production of autoantibodies directed for instance against DNA, nucleosomes, or citrullinated histones.

researchers [51]. Indeed, daily intraperitoneal injection of recombinant IFN- $\lambda$ 2 provides remarkable protection, as judged by reduction of disease score and joint swelling in CIA in mice, and even reversal of some joint damage [52]. In this assay, IFN- $\lambda$ 2 was shown to exert its anti-inflammatory properties through reduced neutrophils recruitment in the joints and subsequent lower expression of transcripts encoding IL-1 $\beta$ . In this paper, neutrophils, which express IFN-III receptor, appeared as plausible targets of IFN- $\lambda$ 2 therapy. These observations indicate that IFN-III-based therapies could be of major interest for several autoinflammatory diseases [49]. However, the mechanisms of action of these cytokines still require extensive work to be fully elucidated.

### Plasmacytoid Dendritic Cells: Damaging or Protective in RA?

Consistent with the conflicting activities of IFN-I in RA, dual roles have been attributed to pDCs, which are the main producers of these cytokines. First, reduced numbers of pDCs were observed in the peripheral blood of RA patients [53]. Second, both myeloid and pDCs harvested from RA donors exhibit an immature (inactive) phenotype as judged by reduced expression of cell surface markers CD80 and CD83; pDCs with an immature phenotype are thought to be less capable of responding to environmental triggers, and are poor producers of IFNs. By contrast, pDCs purified from RA patients express IFN- $\alpha$  at higher levels compared with healthy donors. This, together with a reduction in expression of the pro-Th2 cytokine IL-4 by activated pDCs, might contribute to the Th1 imbalance, which characterizes RA patients. Finally, that C-C chemokine receptor type 7 is overexpressed by RA pDCs suggests an increased migration of immature cells from the bone marrow to lymph nodes upon recognition of the chemokines CCL19 and CCL21. This is in agreement with augmented generation of pDC precursors from CD34<sup>+</sup> cells in the bone marrow of RA patients compared with osteoarthritis donors [54]. The reduction of circulating pDC numbers in the blood of RA patients was confirmed in a study in which pDCs were additionally observed in the synovial fluid of RA patients. While remaining fully responsive to TLR agonists, these pDCs exhibited an immature (low CD62L as quantified by flow cytometry) phenotype [55,56]. Infiltration of pDCs in synovial tissue from RA patients was confirmed by immunohistochemical staining and their numbers correlate with anticitrullinated peptide antibody levels [57]. The reduction of circulating pDC, which is nevertheless difficult to reconcile with the 'IFN signature' seen in blood cells isolated from RA patients, might be caused by their preferential migration to arthritic joints. Altogether, these data have been interpreted by us and other researchers [54–56] in favor of a pathogenic role of pDCs, favoring antigenic stimulation and promoting a proarthritogenic cytokinic environment. By contrast, however, pDC mobilization in joint tissues could also be a response to a dangerous inflammatory milieu. In this respect, these cells could be seen as trying to avoid further damages caused by inflammatory cells. This aspect was explored in a mouse arthritis model induced by injection of Th1 polarized, ovalbumin-specific T-cell receptor (TCR) transgenic T cells. In this model, which is characterized by high T-(proliferation) and B- (IgG secretion) cell responses to the joint-specific self-protein collagen II, antibody-mediated depletion of pDCs increased the severity of the disease, which suggests a regulatory, suppressive role for these cells [58]. This dichotomy in the functions of pDC could explain why researchers might hesitate to undertake therapeutic trials that aim to modulate pDC activity and why they have not been done. By contrast, trials have been undertaken in which myeloid dendritic cells (mDCs) polarized toward a tolerogenic phenotype have been injected into the joints of RA patients [59]. While this invasive procedure performed on 12 RA patients appeared safe (adverse events were judged mild), no clinical effects improving the patients' condition were detectable, although some exhibited a stabilization of their disease. Up to now, increasing the number of synovial pDCs upon local



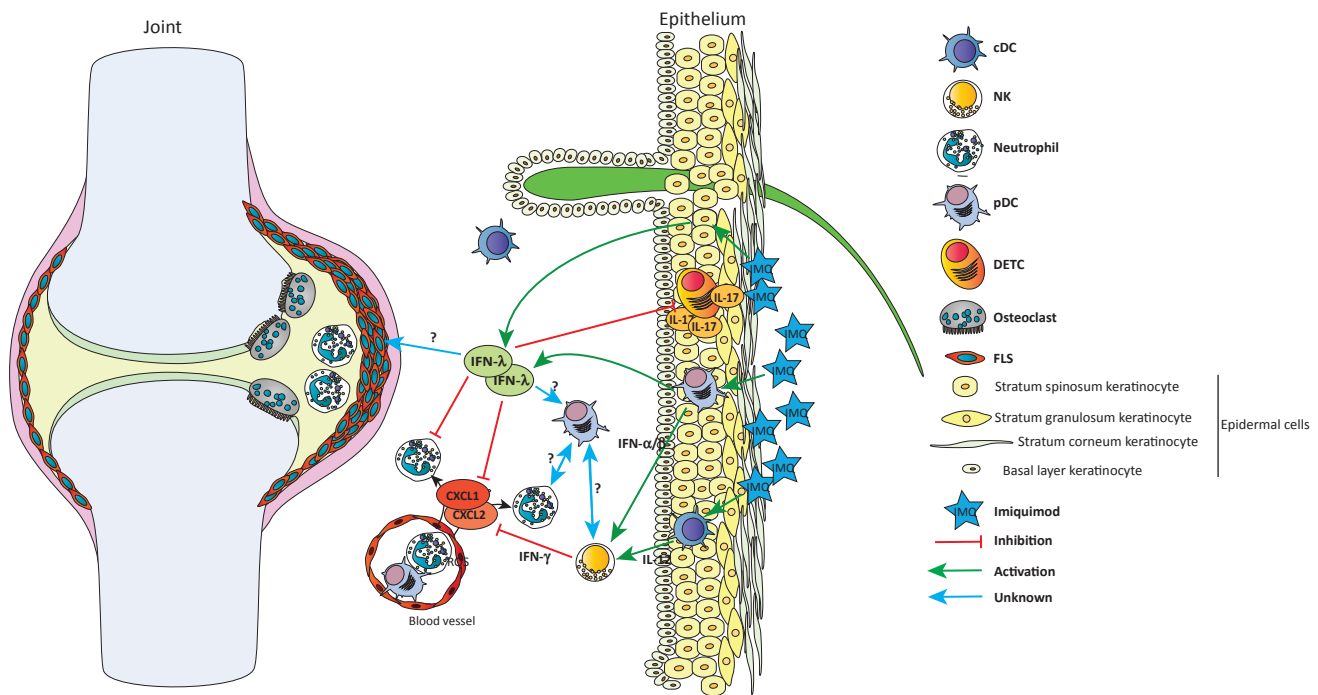
injection of FMS-like tyrosine kinase 3 ligand in a trial setting has only been theoretically considered [60].

### The Skin and Synovium Communication: A Novel Opportunity to Modulate pDC Activity and Dampen Local Joint Inflammation

We reported recently that pDC depletion, whether of genetic origin (in **Ikaros** mutant mice) or in inducible conditions (i.e., upon pDC-specific antibody injection or following diphtheria toxin administration to BDCA2-DTR transgenic animals), augmented joint arthritic symptoms (inflammation, bone erosion, osteoclasts mobilization) in the K/BxN serum transfer model [61]. To provide further evidence supporting their suppressive functions with regard to inflammation, we performed topical application (on inflamed joints) of imiquimod (IMQ), a well-known TLR7 agonist inducing pDC recruitment and activation [62], to mice with three models of joint inflammation (K/BxN serum transfer, CIA, and **human TNF- $\alpha$  transgenic mice**, which are assumed to display normal pDC recruitment). In all of these mouse models of inflammation, topical application of IMQ induced a marked improvement of clinical symptoms (redness, swelling) and histomorphological parameters (bone destruction, inflammatory infiltrate, osteoclasts density). Analyses of the periarticular tissue both at the cellular infiltrate (by flow cytometry) and at the transcriptomic (by RT-qPCR) levels indicated that neutrophil recruitment was impaired in treated animals and that the therapeutic benefits of IMQ, which was lost in mice depleted for the IFN-I receptor, therefore required IFN-I signaling [61]. However, the exact nature of the events connecting skin IMQ application and reduced joint inflammation still requires extensive work (potentially involving high-throughput transcriptomic analysis by RNA-seq and immunohistochemistry of joint section to visualize stromal and immune cell types and their interactions) to be fully understood. Both IFN- $\lambda$ 2 and IFN- $\gamma$  have previously been reported to reduce neutrophils infiltration in the K/BxN serum transfer and CIA mouse models [47,52]. Combined with our data, these papers enable us to propose a comprehensive but hypothetical model (Figure 1, Key Figure) accounting for the therapeutic action of topical IMQ on the inflamed joint and orienting future molecular and cellular investigations. In this model, keratinocytes, as expected from epithelial cells [63], respond to IMQ application by producing IFN-III. It is also possible that skin-resident pDCs, similar to those isolated from blood [64], produce IFN- $\lambda$ 3 in response to IMQ. These cells likely also respond to TLR7 stimulation by producing IFN-I. As a major consequence and in agreement with a previous study that reported expression of the receptor for IL- $\lambda$ 2 on CD11b<sup>+</sup>GR1<sup>+</sup>-sorted neutrophils from mouse bone marrow [52], we observed that reduced neutrophils infiltrate in the joints of IMQ-treated, K/BxN-injected mice. In addition, IFN-III can inhibit functions of neutrophils, such as ROS production, which is potentially responsible for severe tissue damage. Altogether, these data indicate that neutrophils, which are key players in RA pathogenesis [65] and whose mobilization in the inflamed joint is the hallmark of all RA animal models [66], might be the primary targets of IFN-III. IFN-III might also impair IL-17 secretion by  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup> **dendritic epidermal T cells** [52], thereby further limiting the inflammatory burden. The function of IFN-I produced upon TLR7-dependent signaling in keratinocytes and skin-resident pDCs [67] would enable pDCs survival and maintain their production from bone marrow precursors [68]. It is also possible that pDC, once primed by IFN-I, could shift toward an IFN-III-secreting phenotype. This would account for the requirement of IFNAR1 in the therapeutic effect of IMQ [61], as well as for the failures of the IFN-I-based therapies. A crucial role for IFN- $\gamma$  produced by NK cells in CpG-mediated, mDCs-dependent inhibition of K/BxN-dependent arthritis has been reported [47]. We suggest that this mDC–NK crosstalk, which culminates in IFN- $\gamma$  production limiting neutrophils infiltration and resorbing joint inflammation, can also be implemented in our model. Indeed, IL-12 expressed by IMQ-activated conventional DCs might activate (together with IFN-I) NK cells, which, following IFN- $\gamma$  secretion, can directly participate in the reduction of the neutrophilic infiltrate. Furthermore, IFN-

## Key Figure

## Our Proposed Model for Anti-inflammatory Effects of Interferons on Joint Arthritis and Cellular Interactions



Trends in Molecular Medicine

**Figure 1.** We hypothesize that application of imiquimod (IMQ) on the skin of inflamed joints would induce Toll-like receptor 7 (TLR7)-dependent Type III interferon (IFN-III) secretion in keratinocytes and IFN-I release by skin-resident plasmacytoid dendritic cells (pDCs), which might also produce IFNs-λ. IFN-III might then exert its anti-inflammatory properties through the inhibition of chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1)-dependent neutrophils recruitment and ROS production. In addition, IMQ may trigger conventional dendritic cells (cDCs) activation and interleukin-12 (IL-12) production. IL-12 and IFN-I might then contribute to natural killer (NK) cells activation and IFN-γ release, which might further contribute to inhibition of neutrophils chemotaxis. Several putative cellular interactions, such as neutrophils–pDC or NK–pDC, still require substantial investigations. Finally, the roles of IFN-III on aggressive rheumatoid fibrocyte-like synoviocytes (FLSs), or on pDC activation and/or proliferation are not documented yet (see Outstanding Questions).

γ can also help pDC survival and differentiation. Of course, this model leaves many questions unanswered. For instance, **fibrocyte-like synoviocytes (FLSs)**, which also actively participate in RA pathogenesis through their capacity to secrete IL-6 and metalloproteases [69], may be impacted by IFN-I, IFN-II, or IFN-III, reducing their aggressive behavior and resistance to apoptotic stimuli. In this regard, analysis of the crosstalk between pDCs and FLSs represents a challenging issue. In addition, while the impact of IFNs on the migration and function of neutrophils appears robustly demonstrated, their role on the inhibition of neutrophil extracellular trap formation (**NETosis**) or their apoptosis is still not documented. Finally, we suggest in our model the existence of pDCs–neutrophils dialog in which the latter, for instance through their secretion of IL-1β, orient pDCs toward an IFN-III-secreting, anti-inflammatory phenotype. In the

absence of neutrophils, IMQ topical application drives pDC secretion of mainly IFN-I, which, in a specific cytokinic microenvironment, may exhibit massive inflammatory properties leading to the development of a lupuslike disease [70] or psoriasis [62]. Of course, our model presently applies to the specific mouse skin and joint microenvironment which, for instance, harvests dendritic epidermal T cells [71] and will require further analysis in human skin biopsies. Nevertheless, we hypothesize that efficient IFN-based therapies in RA in the future could benefit from a topical, joint-specific mobilization of these cytokines using IMQ or other, less toxic TLR ligands. In addition to being totally painless, this procedure avoids (or limits) the systemic induction of IFN-dependent signaling pathways, which likely trigger undesirable and uncontrolled effects. Of course, a careful stratification of patients that may respond to such therapy (as well as to current biological DMARDs) is key for its future use; establishing such stratification of patients would require extensive genomics and transcriptomics analyses of RA patients.

### Concluding Remarks

IFNs (Type I-II), through their coordinated action, appear to exhibit powerful inhibition of neutrophils recruitment and activation. These cells possess extensive damaging potential through their capacity to release ROS and proteases. In addition, their capacity to perform NETosis represents an important mean to expose autoantigens and therefore, to trigger autoimmunity. Thus, reducing their density as early as possible during the ignition phase of the inflammatory process in RA is an effective approach to avoid the initiation of a vicious circle, characterized by further bone destruction and autoantibody production which, in return, enhance the inflammatory reaction. Clinical trials aimed at modulating pDCs recruitment and activation with local application of IMQ might be effective in RA, as well as in other inflammatory disease in which uncontrolled activities of neutrophils are responsible for severe damages, such as vasculitides or gout. Furthermore, because IMQ mostly drives IFN-I expression by pDCs, future research to target its delivery within a specific population might be considered. This could be achieved, for instance, through coupling IMQ to a monoclonal antibody designed against this – yet to be identified – high IFN-III producing cell. This strategy to promote IFN-III production might be of interest to decrease IMQ inherent toxicity. Finally, developing appropriate vectorization systems to enable joint-specific delivery across the skin of other molecules, such as those targeting neutrophil functions, like protein arginine deiminase inhibitors, might also provide considerable benefits to RA patients.

### Acknowledgments

This work was supported by institutional funding from INSERM, Strasbourg University, the Laboratoire d'Excellence TRANSPLANTEX (ANR-11-LABX-0070\_TRANSPLANTEX) and the PRTS ANR program (SPIRALE).

### References

- McInnes, I.B. and Schett, G. (2011) The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 365, 2205–2219
- Firestein, G.S. and McInnes, I.B. (2017) Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity* 46, 183–196
- Okada, Y. *et al.* (2014) Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 506, 376–381
- Ospelt, C. *et al.* (2017) Epigenetics in the pathogenesis of RA. *Semin. Immunopathol.* 39, 409–419
- Sparks, J.A. and Karlson, E.W. (2016) The roles of cigarette smoking and the lung in the transitions between phases of preclinical rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 18, 15
- König, M.F. *et al.* (2016) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* 8, 369ra176
- Koziel, J. *et al.* (2014) The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review. *Curr. Rheumatol. Rep.* 16, 408
- Maeda, Y. and Takeda, K. (2017) Role of gut microbiota in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Med.* 6, 60
- Ramiro, S. *et al.* (2017) Safety of synthetic and biological DMARDs: a systematic literature review informing the 2016 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 1101–1136
- Burmester, G.R. and Pope, J.E. (2017) Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. *Lancet* 389, 2338–2348
- Schreiber, G. (2017) The molecular basis for differential type I interferon signaling. *J. Biol. Chem.* 292, 7285–7294

### Outstanding Questions

What are the reciprocal transcriptional relationships between Type I, Type II, and Type III interferons?

Which cells produce interferons following epicutaneous application of imiquimod? Keratinocytes? Langerhans cells? Other resident dendritic cells?

What is the impact of Type III interferons on the activation and/or the proliferation of pDCs? On FLSs? On NETosis?

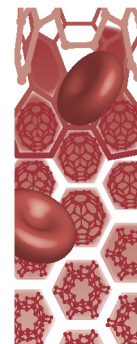
Why does imiquimod application on a normal skin promote neutrophils infiltration and inflammation (resembling psoriasis) while reducing neutrophils recruitment and ROS production when delivered on an inflamed epithelium?

Is there a crosstalk between pDCs and neutrophils? What kind of dialog could mediate this crosstalk – cytokines, cell contacts, or both?

Will it be possible to reconstitute the joint microenvironment to investigate the complex cellular interactions involving immune/stromal cells in rheumatoid arthritis?

12. Zuniga, E.I. *et al.* (2007) Type I interferon during viral infections: multiple triggers for a multifunctional mediator. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 316, 337–357
13. Ronnblom, L. (2016) The importance of the type I interferon system in autoimmunity. *Clin. Exp. Rheumatol.* 34, 21–24
14. Kieseier, B.C. (2011) The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs* 25, 491–502
15. Kasper, L.H. and Reder, A.T. (2014) Immunomodulatory activity of interferon-beta. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 1, 622–631
16. Kuo, P.C. *et al.* (2016) Interferon-beta modulates inflammatory response in cerebral ischemia. *J. Am. Heart Assoc.* 5, e002610
17. Bennett, L. *et al.* (2003) Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J. Exp. Med.* 197, 711–723
18. Tavakolpour, S. and Rahimzadeh, G. (2016) New insights into the management of patients with autoimmune diseases or inflammatory disorders during pregnancy. *Scand. J. Immunol.* 84, 146–149
19. Tedeschi, S.K. *et al.* (2013) Sexual disparities in the incidence and course of SLE and RA. *Clin. Immunol.* 149, 211–218
20. Yao, Y. *et al.* (2009) Neutralization of interferon-alpha/beta-inducible genes and downstream effect in a phase I trial of an anti-interferon-alpha monoclonal antibody in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 60, 1785–1796
21. Greth, W. *et al.* (2017) Targeting the interferon pathway with sifalimumab for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Immunotherapy* 9, 57–70
22. Lubbers, J. *et al.* (2013) The type I IFN signature as a biomarker of preclinical rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 776–780
23. Sozzani, S. *et al.* (2017) Dendritic cell recruitment and activation in autoimmunity. *J. Autoimmun.* 85, 126–140
24. Castaneda-Delgado, J.E. *et al.* (2017) Type I interferon gene response is increased in early and established rheumatoid arthritis and correlates with autoantibody production. *Front. Immunol.* 8, 285
25. de Jong, T.D. *et al.* (2016) Type I interferon response gene expression in established rheumatoid arthritis is not associated with clinical parameters. *Arthritis Res. Ther.* 18, 290
26. Cacopardo, B. *et al.* (2013) Rheumatoid arthritis following PEG-interferon-alfa-2a plus ribavirin treatment for chronic hepatitis C: a case report and review of the literature. *BMC Res. Notes* 6, 437
27. Zuckerman, E. *et al.* (2000) Hepatitis C virus-related arthritis: characteristics and response to therapy with interferon alpha. *Clin. Exp. Rheumatol.* 18, 579–584
28. Vernerova, L. *et al.* (2016) A combination of CD28 (rs1980422) and IRF5 (rs10488631) polymorphisms is associated with seropositivity in rheumatoid arthritis: a case control study. *PLoS One* 11, e0153316
29. Duffau, P. *et al.* (2015) Promotion of inflammatory arthritis by interferon regulatory factor 5 in a mouse model. *Arthritis Rheumatol.* 67, 3146–3157
30. Alzabin, S. *et al.* (2012) Investigation of the role of endosomal Toll-like receptors in murine collagen-induced arthritis reveals a potential role for TLR7 in disease maintenance. *Arthritis Res. Ther.* 14, R142
31. Viatte, S. *et al.* (2013) Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9, 141–153
32. Stanford, S.M. and Bottini, N. (2014) PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10, 602–611
33. Jacob, C.O. *et al.* (1989) Heterogeneous effects of IFN-gamma in adjuvant arthritis. *J. Immunol.* 142, 1500–1505
34. Wang, Y. *et al.* (2013) The autoimmunity-associated gene PTPN22 potentiates Toll-like receptor-driven, type 1 interferon-dependent immunity. *Immunity* 39, 111–122
35. Ying, F. *et al.* (2011) Type I IFN protects against antigen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* 41, 1687–1695
36. Corr, M. *et al.* (2011) Interleukin 1 receptor antagonist mediates the beneficial effects of systemic interferon beta in mice: implications for rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 858–863
37. van Holten, J. *et al.* (2004) Treatment with recombinant interferon-beta reduces inflammation and slows cartilage destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 6, R239–R249
38. Tak, P.P. *et al.* (1999) The effects of interferon beta treatment on arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 38, 362–369
39. Sweeney, S.E. *et al.* (2012) Role of interferon regulatory factor 7 in serum-transfer arthritis: regulation of interferon-beta production. *Arthritis Rheum.* 64, 1046–1056
40. van Holten, J. *et al.* (2005) A multicentre, randomised, double blind, placebo controlled phase II study of subcutaneous interferon beta-1a in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 64, 64–69
41. Guarda, G. *et al.* (2011) Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity* 34, 213–223
42. Calvaruso, V. *et al.* (2011) Pegylated-interferon-alpha(2a) in clinical practice: how to manage patients suffering from side effects. *Expert Opin. Drug Saf.* 10, 429–435
43. Boissier, M.C. *et al.* (1995) Biphasic effect of interferon-gamma in murine collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* 25, 1184–1190
44. Miyata, M. *et al.* (2000) Unmethylated oligo-DNA containing CpG motifs aggravates collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 43, 2578–2582
45. Schurgers, E. *et al.* (2011) Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on interferon-gamma. *J. Interferon Cytokine Res.* 31, 917–926
46. Sigidini, Y.A. *et al.* (2001) Randomized, double-blind trial of anti-interferon-gamma antibodies in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 30, 203–207
47. Wu, H.J. *et al.* (2007) Inflammatory arthritis can be reined in by CpG-induced DC-NK cell cross talk. *J. Exp. Med.* 204, 1911–1922
48. Lee, S.H. *et al.* (2017) Interferon-gamma regulates inflammatory cell death by targeting necroptosis in experimental autoimmune arthritis. *Sci. Rep.* 7, 10133
49. Eslam, M. and George, J. (2016) Targeting IFN-lambda: therapeutic implications. *Expert Opin. Ther. Targets* 20, 1425–1432
50. Muir, A.J. *et al.* (2010) Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology* 52, 822–832
51. Buckland, J. (2015) Experimental arthritis: antiviral IFN-lambda2 has unexpected roles in inflammation. *Nat. Rev. Rheumatol.* 11, 383
52. Blazek, K. *et al.* (2015) IFN-lambda resolves inflammation via suppression of neutrophil infiltration and IL-1beta production. *J. Exp. Med.* 212, 845–853
53. Sennikov, S.V. *et al.* (2016) Maturation and cytokine production potential of dendritic cells isolated from rheumatoid arthritis patients peripheral blood and induced *in vitro*. *Hum. Immunol.* 77, 930–936
54. Hirohata, S. *et al.* (2014) Increased generation of pre-plasmacytoid dendritic cells in bone marrow of rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol.* 24, 443–447
55. Jongbloed, S.L. *et al.* (2006) Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 8, R15
56. Lande, R. *et al.* (2004) Characterization and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in synovial fluid and tissue of patients with chronic inflammatory arthritis. *J. Immunol.* 173, 2815–2824
57. Lebre, M.C. *et al.* (2008) Rheumatoid arthritis synovium contains two subsets of CD83-DC-LAMP-dendritic cells with distinct cytokine profiles. *Am. J. Pathol.* 172, 940–950
58. Jongbloed, S.L. *et al.* (2009) Plasmacytoid dendritic cells regulate breach of self-tolerance in autoimmune arthritis. *J. Immunol.* 182, 963–968
59. Bell, G.M. *et al.* (2017) Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 227–234

60. Lebre, M.C. and Tak, P.P. (2009) Dendritic cells in rheumatoid arthritis: which subset should be used as a tool to induce tolerance? *Hum. Immunol.* 70, 321–324
61. Nehmar, R. *et al.* (2017) Therapeutic modulation of plasmacytoid dendritic cells in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 69, 2124–2135
62. Glitzner, E. *et al.* (2014) Specific roles for dendritic cell subsets during initiation and progression of psoriasis. *EMBO Mol. Med.* 6, 1312–1327
63. Lazear, H.M. *et al.* (2015) Interferon-lambda: immune functions at barrier surfaces and beyond. *Immunity* 43, 15–28
64. Murata, K. *et al.* (2014) *Ex vivo* induction of IFN-lambda3 by a TLR7 agonist determines response to Peg-IFN/ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. *J. Gastroenterol.* 49, 126–137
65. Wright, H.L. *et al.* (2014) The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10, 593–601
66. Christensen, A.D. *et al.* (2016) K/BxN serum-transfer arthritis as a model for human inflammatory arthritis. *Front. Immunol.* 7, 213
67. Palamara, F. *et al.* (2004) Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J. Immunol.* 173, 3051–3061
68. Chen, Y.L. *et al.* (2013) A type I IFN-Fit3 ligand axis augments plasmacytoid dendritic cell development from common lymphoid progenitors. *J. Exp. Med.* 210, 2515–2522
69. Bustamante, M.F. *et al.* (2017) Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 19, 110
70. Yokogawa, M. *et al.* (2014) Epicutaneous application of Toll-like receptor 7 agonists leads to systemic autoimmunity in wild-type mice: a new model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 66, 694–706
71. Pasparakis, M. *et al.* (2014) Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 289–301



# Anti-inflammatory effect of active nanofibrous polymeric membrane bearing nanocontainers of atorvastatin complexes

Pascale Schwinté<sup>\*.1</sup>, Alexandre Mariotte<sup>2</sup>, Priya Anand<sup>3</sup>, Laetitia Keller<sup>1</sup>, Ysia Idoux-Gillet<sup>1</sup>, Olivier Huck<sup>1,4</sup>, Florence Fioretti<sup>1,4</sup>, Henri Tenenbaum<sup>4</sup>, Philippe Georgel<sup>2</sup>, Wolfgang Wenzel<sup>3</sup>, Silvia Irusta<sup>5</sup> & Nadia Benkirane-Jessel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM (French National Institute of Health & Medical Research), UMR 1109, "Osteoarticular & Dental Regenerative Nanomedicine", Faculté de Médecine, 11 rue Humann, FMTS, Strasbourg, F-67085, France

<sup>2</sup>INSERM UMR 1109, Molecular ImmunoRheumatology, LabEx TRANSPLANTE, Faculté de Médecine, Center de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, 4 rue Kirschleger, FMTS, Université de Strasbourg, Strasbourg, F-67085, France

<sup>3</sup>Institute of Nanotechnology, Karlsruhe Institute of Technology, KIT Campus North, Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, Building 640, Eggenstein-Leopoldshafen, D-76344, Germany

<sup>4</sup>Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, 1 place de l'Hôpital, Strasbourg F-67085, France

<sup>5</sup>Department of Chemical Engineering & Aragon Nanoscience Institute, University of Zaragoza, C/Mariano Esquillor, s/n, Zaragoza, 50018, Spain

\* Author for correspondence: Tel.: +33 368853376; [pschwinte@unistra.fr](mailto:pschwinte@unistra.fr)

**Aim:** We developed polymeric membranes for local administration of nonsoluble anti-inflammatory statin, as potential wound patch in rheumatic joint or periodontal lesions. **Methods:** Electrospun polycaprolactone membranes were fitted with polysaccharide-atorvastatin nanoreservoirs by using complexes with poly-aminocyclodextrin. Characterization methods are UV-Visible and X-ray photoelectron spectroscopy, molecular dynamics, scanning and transmission electron microscopy. *In vitro*, membranes were seeded with macrophages, and inflammatory cytokine expression were monitored. **Results & conclusion:** Stable inclusion complexes were formed in solution (1:1 stability constant  $368 \text{ M}^{-1}$ ,  $-117.40 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), with supramolecular globular organization (100 nm, substructure 30 nm). Nanoreservoir technology leads to homogeneous distribution of atorvastatin calcium trihydrate complexes in the membrane. Quantity embedded was estimated (70–90  $\mu\text{g}$  in  $30 \mu\text{m} \times 6 \text{ mm}$  membrane). Anti-inflammatory effect by cell contact-dependent release reached 60% inhibition for TNF- $\alpha$  and 80% for IL-6. The novelty resides in the double protection offered by the cyclodextrins as drug molecular chaperones, with further embedding into biodegradable nanoreservoirs. The strategy is versatile and can target other diseases.

First draft submitted: 28 May 2017; Accepted for publication: 5 September 2017; Published online: 2 November 2017

**Keywords:** anti-inflammatory wound dressing • atorvastatin • electrospun polycaprolactone • inclusion complexes • inflammation • nanocontainers • polymeric amino cyclodextrin

## Background

### Modulation of inflammatory host response

Inflammation represents the normal response to infection. However, when getting out of control or upon chronicity, inflammation may lead to major disorders such as encephalitis or rheumatoid arthritis. Many effective anti-inflammatory drugs are available [1], including aspirin and other NSAIDs. World famous aspirin (acetylated salicylic acid) developed by Felix Hoffman inhibits the cyclooxygenase (COX) enzymes COX-1 and COX-2, which synthesize inflammatory mediators, prostaglandins and thromboxanes. NSAIDs target COX-2 and the synthesis of prostaglandins, in particular PGE2. Glucocorticoids, derived from natural cortisol, are also widely used as anti-inflammatory agents, despite their side effects. Inflammation is a biological process involving pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and VEGF. Thus, new varieties of anti-inflammatory agents include biological anticytokine molecules (anticytokine therapies) that reduce the activity of specific cytokines or their

receptors. Anticytokine therapies have shown their benefits in the treatment of autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, inflammatory bowel disease, etc. However their major drawback is a decreased host-immune defense against infection. Compared with the long-term side effects of glucocorticoid treatment, anticytokine therapies constitute a remarkable improvement, as they do not induce organ toxicities while their action is located in extracellular compartments. Kinases acting downstream of cytokine receptors have become new targets in the control of inflammation, and molecules blocking the activity of kinases are being developed. Among other new drugs with anti-inflammatory properties, active inhibitors of histone deacetylases were also discovered, which block cell proliferation, as well as naturally occurring resolvins [1]. Statins, a family of drugs used for lowering serum cholesterol, also exhibit anti-inflammatory properties. Statins (or 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors) are primarily used for the treatment of hypercholesterolemia, as they are the most efficient drugs to reduce serum cholesterol levels [2]. Statins possess diverse pleiotropic effects such as anti-inflammatory, antioxidative, antibacterial and immune-modulatory effects [2,3]. Up to now, several studies highlighted the potential therapeutic effects of statins in wound healing and bone regeneration [4,5]. Other studies suggest that statins may be helpful for reducing bacterial burden, improving epithelialization and wound healing [5]. Antithrombotic and anti-inflammatory functions have also been recently reported for this class of molecules [6]. Indeed, simvastatin has been shown to modulate LPS-dependent cytokine production (lipopolysaccharide [LPS]) *in vitro* and *in vivo* [7], although the precise mechanism underlying such immuno-modulatory functions is not yet precisely known [8].

Following randomized, placebo-controlled studies, anti-inflammatory properties of statins vary according to the statin and the dose, whereas cholesterol-lowering properties are similar. For example, six clinically used statins were compared *in vitro*, and cerivastatin, atorvastatin (AT) and simvastatin were more effective than fluvastatin, lovastatin or pravastatin in reducing the studied inflammation parameters [9].

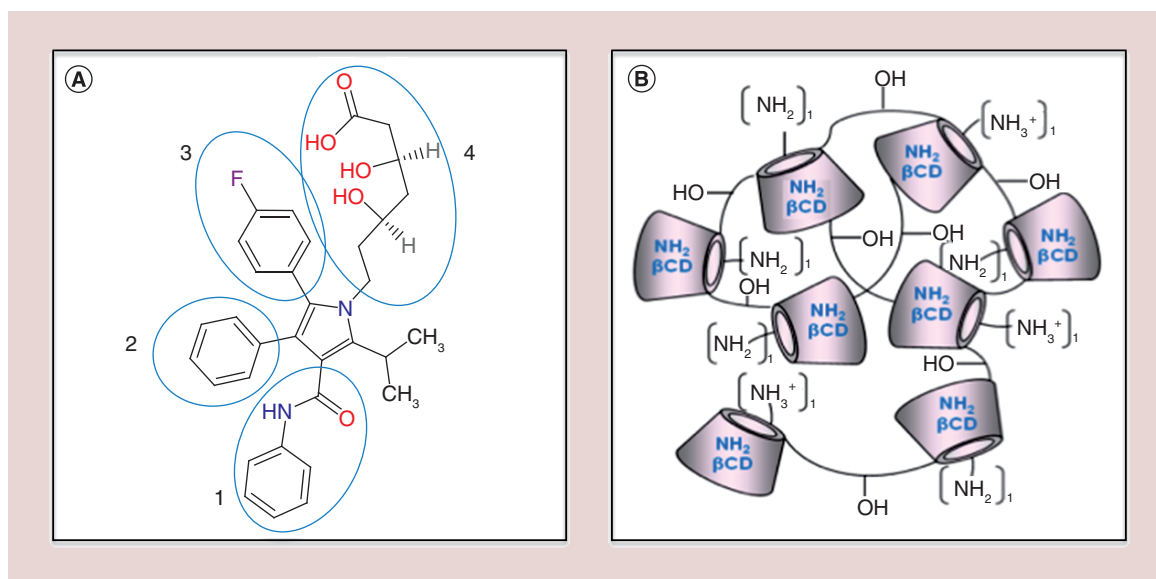
In relation to rheumatoid arthritis, several trials with statins demonstrated a moderate reduction in joint inflammation. Thus, as many patients suffering from this disease are also at risk for cardiovascular diseases, adding statin therapy to the standard drug, methotrexate, could be beneficial. Similarly, the addition of statins to cyclosporine administered to kidney transplant patients was shown to reduce the percentage of organ rejection. In patients suffering from multiple sclerosis, 6 months statin therapy significantly reduced the number of detected brain lesions, and examination of peripheral blood cells revealed an increased production of IL-10, an anti-inflammatory cytokine [10].

Several host modulation therapies have been developed to regulate immune and inflammatory responses, through a systemic administration or a local administration (with the use of membranes), in order to enhance wound healing. The aim is to restore a balance between pro-inflammatory mediators (destructive enzymes) and anti-inflammatory mediators (enzyme inhibitors). These molecules can be antibiotic drugs (azithromycin, minocycline, doxycycline and tetracycline) [11,12], anti-inflammatory drugs (statin, ibuprofen) [13–15] and resolvins [16].

### Properties of scaffold matrices

The design of a scaffold for tissue engineering purposes has to take into account some requirements like chemical properties, morphology and kinetics of degradation in order to obtain a 3D architecture, with designed characteristics. Moreover, the scaffold should have a high porous network to facilitate cell attachment, proliferation, migration and differentiation, and to allow transport of nutrients and metabolic waste. It should also be biocompatible and biodegradable. However, its degradation has to be precisely controlled during time to follow regenerated neotissues along their stage of growth, remodeling and maturation [17].

The scaffold will be used as a delivery system for encapsulation of active biomolecules and their release in a sustained and controlled manner. Studies have shown that different types of delivery methods can be adapted to specific characteristics of wound sites. The challenge is to optimize the timing of therapeutic molecules expression on the wound site, while minimizing the risks for patients [18]. In order to incorporate active biomolecules, the layer-by-layer (LBL) technology has been developed. This method is based on the alternate deposition of polyanions and polycations [19–21], and allows creating a functionalized film with specific molecules, proteins or particles. A specific application of this principle has been developed by Mendoza-Palomares *et al.* [22], in the form of local nanoreservoirs of adsorbed therapeutics distributed along the fibers of nanofibrous scaffolds, and acting as cell contact-dependent source of local therapeutics with sustained availability.



**Figure 1. Structure of compounds.** Schematic representation of **(A)** Atorvastatin and its main chemical groups, 1: phenylcarbamoyl, 2: phenyl, 3: fluorophenyl, 4: 3,5-dihydroxy heptanoic acid; **(B)** The amino- $\beta$ -CD polymer produced from a cross-linking reaction with epichlorohydrin between 6-monodeoxy-6-monoamino- $\beta$ -CD units, which can occur on primary or secondary side. CD: Cyclodextrin.

### Properties of cyclodextrins

However, some drugs may not be electrically charged or water soluble, and consequently will not attach to the opposite polyelectrolyte. To counteract this issue, the use of cyclodextrins (CDs) can be very helpful. CDs are cyclic oligosaccharides made of several  $\alpha$ -(1,4)-linked D-glucose units. Typically,  $\beta$ -CD is composed of seven glucose units and presents a hollow cone shape, with a lipophilic cavity and a hydrophilic outer surface. CDs have the ability to form inclusion complexes with various guest molecules, by taking up some nonpolar parts of the guest molecule into their hydrophobic cavity [23]. Thereby, CDs have been reported to improve physicochemical properties of hydrophobic drugs, in particular their water solubility, dissolution rate and stability [24–26]. CDs can be substituted on both their primary and secondary side hydroxyls. For instance, many studies have reported the increased solubility of hydroxypropyl- $\beta$ -CD, its greater complexing properties and biocompatibility [27].

The specific strategy of using substituted CDs to incorporate sparingly soluble drugs into layer-by-layer bioactive coatings, has been successfully applied to anti-inflammatory polypeptide multilayer coatings embedding piroxicam NSAID as a complex with a 6<sup>A</sup>-carboxymethylthio- $\beta$ -CD [28].

The first objective of the present study was to find a way to incorporate an anti-inflammatory statin drug (atorvastatin calcium trihydrate, or AT) into a poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) nanofibrous membrane, with an objective to produce an effective biocompatible anti-inflammatory wound patch that could be used in various applications such as periodontal and rheumatic diseases. We describe here a functionalization of the nanofibrous scaffold with the nanoreservoir technology to achieve effective embedding of AT (Figure 1A) into nanoreservoirs, through encapsulation by an amino- $\beta$ -CD polymer (Figure 1B). Along with this study, we realized physico-chemical studies on AT and its complex. The second objective was to investigate the impact of PCL membranes loaded with the anti-inflammatory statin molecule on cytokine expression. As a model system, AT-loaded PCL membranes were seeded with control and LPS-stimulated THP-1 cells and we monitored TNF- $\alpha$  and IL-6 expression.

## Materials & methods

### Reagents

AT, 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES), dichloromethane (DCM), dimethylformamid (DMF), poly(L-lysine) (PLL), dextran sulfate (DEX) and lipopolysaccharide LPS from *Salmonella abortus equi* were purchased from Sigma-Aldrich (France). Sodium chloride (NaCl) was purchased from Euromedex (France). Methanol (MeOH) was purchased from Prolabo (France). Poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) clinical grade, MW 124 kDa, was obtained



from Purac (Gorinchem, Netherlands). Amino- $\beta$ -CD polymer, namely 6-Monodeoxy-6-monoamino- $\beta$ -CD soluble polymer cross-linked with epichlorohydrin (Av. MW 25 kDa) was purchased from Cyclolab (Budapest, Hungary). Cell culture media (RPMI 1640), FCS, L-glutamine, penicillin, streptomycin and amphotericin B were from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). The enzyme immunoassay kits for human TNF- $\alpha$  and IL-6 detection were from Bio-Techne (Lille, France).

MES and NaCl were used to prepare MES buffer at pH 5.5 (40-mM MES, 150-mM NaCl); MeOH was used as miscible organic solvent in solubilization experiments. PCL, DCM and DMF were used for electrospinning PCL nanofibrous membranes. Other polyelectrolytes used for the functionalization of PCL electrospun membranes were poly(L-lysine) and DEX. LPS was used to induce inflammation in *in vitro* experiments.

### Spectrophotometric complexation & solubilization studies

#### *UV-Vis spectroscopy to follow solubilization of AT by amino- $\beta$ -CD polymer*

A range of increasing concentrations of amino- $\beta$ -CD polymer, from 0.08 to 10 mg ml<sup>-1</sup>, was prepared in MES buffer in 2-ml Eppendorf tubes. In each tube was added 1 mg of AT excess powder and the mixtures were shaken overnight. AT is sparingly soluble in aqueous medium, and reported solubility values depend on authors and conditions, ranging from 4.8  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> [29] or 27.04  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> [30] in distilled water at 25°C, to 57.06  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> in phosphate-buffered saline (PBS) pH 6.8 [30], or to even higher values such as 120  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> in water [31] or 149.3  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> as saturation solubility [32]. Soluble amino- $\beta$ -CD polymer will increase the drug solubility by forming inclusion complexes. The concentration of drug solubilized is determined by UV-vis spectroscopy, from a calibration curve established for AT in MeOH:MES (1:1). As the drug is sparingly soluble in aqueous medium, but soluble in organic solvent like MeOH, we chose this mixed solvent for the calibration curve. For the measurement of absorbance, the excess AT powder in the mixtures was filtered off, and each mixture supernatant was mixed at equal volume with MeOH in order to be in the same conditions as used for the calibration curve of AT in MeOH:MES (1:1). From the concentration of AT determined in MeOH:MES, the concentration of drug initially dissolved by amino- $\beta$ -CD polymer in MES was obtained as the twofold. The measure of absorbance was done between 200 and 350 nm, on UV-Vis Spectrophotometer Uvikon XL (BioTek Instrument, USA) with Lab Power Junior software. A total of 1-cm path quartz cuvettes (Hellma-France, Paris, France) were used. The calibration curve was established in MeOH:MES (1:1) prior to these experiments, with AT concentrations ranging from 0.01 to 2.5 mg ml<sup>-1</sup>.

#### *Fluorescence spectroscopy to study drug & complexes microenvironment*

Fluorescence properties of AT in the absence and presence of increasing quantities of amino- $\beta$ -CD polymer (in MES pH 5.5) were examined as a means of evaluation of the drug microenvironment. Indeed, an increase in the fluorescence intensity of similar hydrophobic drugs upon addition of CD was often used as a demonstration of the inclusion of the drug in the CD cavity, as the hydrophobic microenvironment provided by this inclusion boosts the fluorescence yield of the drug. Spectra were measured on a Spectracq Fluorolog<sup>®</sup> (HORIBA Jobin Yvon S.A.S., Longjumeau, France) fluorescence spectrometer. Excitation was set at 276 nm, and emission was measured between 300 and 500 nm (emission peak of AT is at about 381 nm), with a 5 nm slit and integration time of 1 s. Mixtures of AT/amino- $\beta$ -CD polymer in MES were prepared in 2-ml Eppendorf tubes, at constant concentration of drug (1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) and increasing concentration of polymer (from 93  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> to 3.75 mg ml<sup>-1</sup>) and fluorescence spectra measured between 300 and 500 nm.

#### *UV-Vis spectroscopy to quantify AT contained in functionalized membranes*

Two approaches were used to try and quantify AT in the membranes. In the first approach, the functionalized membrane was soaked into MeOH overnight, in order to solubilize the adsorbed AT. The next day, the solution of MeOH containing the dissolved AT was mixed with an equal volume of MES buffer and the absorbance was read with a UV spectrophotometer, between 200 and 350 nm. Afterward, in the Eppendorf tube containing the membrane, fresh MeOH was added and the tube was vortexed to be sure that a maximum of the drug had been removed from the membrane, then the MeOH was taken and again mixed with an equal volume of MES buffer and the absorbance read (vortex 1). This process was repeated a few times (vortex 2, 3, 4), as long as an AT spectrum was recognizable. Quantification of the drug recovered from the membrane was performed by use of the calibration curve and by summing up the amounts obtained from the successive MeOH washing steps. In the second approach, the drug-CD complex solution, used at each adsorption step during the functionalization of the membrane, was kept and put in an Eppendorf tube, and mixed with an equal volume of MeOH. The measure of the absorbance

was done between 200 and 350 nm. The idea was to estimate how much drug had been adsorbed at each step by measuring what was left in the dipping solution. Again, the quantification was performed by use of the calibration curve and by summing up the amounts obtained from each adsorption step.

#### *UV-vis spectroscopy to quantify AT release from PCL membranes*

After functionalization of the membrane, we have checked the potential release of AT from the membrane, comparing two different buffers: MES (pH 5.5) used during functionalization and PBS buffer at pH 7.4, for the *in vitro* conditions of use of the membrane in the presence of cells and cell culture medium. After functionalization, membranes were left to rest in a well, either in MES or in PBS buffer. Buffer was removed and replaced with fresh one, at various times (2, 18, 20, 24 and 48 h after the end of the functionalization). The recovered buffer solutions were then mixed with an equal volume of MeOH, and the absorbance measured with a UV spectrophotometer, between 200 and 350 nm. Quantification of potentially released AT was performed by the means of calibration curves, in MES:MeOH and in PBS:MeOH (1:1).

### Preparation, characterization & functionalization of PCL membranes

#### *Electrospinning*

The fabrication of the membranes was realized with the standard Electrospinning Apparatus EC-DIG provided by IME Technologies (Amsterdam, The Netherlands). This apparatus is composed of a hermetic enclosure connected to aeration for chemical extraction, a syringe-pump and its command, a vertical support in order to maintain a 21 G needle (0.8 mm of diameter) at a certain distance from a conductive collector of 10 cm of diameter. The range of voltage furnished by the generator embedded in the apparatus is +25 kV/-25 kV (needle/collector). The generator is controlled with a touch screen. This apparatus allow us to elaborate nanofibrous and microporous thin and thick membranes. The manufacture of electrospun thin membranes was done from a solution of PCL polymer (PCL 124 000) at a concentration of 27% (27-mg PCL for 100 ml of solution) in a mixed solvent composed of DCM and DMF, at a ratio 40/60 (v/v). This solution is injected through the needle from a 5 ml syringe placed in the syringe pump of the apparatus, via a polydimethylsiloxane tube. The solution of PCL is electrospun during 15 min, under a +22/-3 kV differential voltage, 1 ml/h flow rate, 24°C and 45 ± 5% relative humidity. The fibers are collected on the round collector placed at 16 cm from the injection needle. At the end of the process, the membrane is put in a heat chamber at 50°C to eliminate the remaining solvent from the electrospinning process.

#### *Functionalization of the electrospun PCL membranes*

The technique used for the functionalization of the membrane is the nanoreservoir technology developed in the laboratory [22], initially based on the layer-by-layer technique described by Decher [19] to form multilayer coatings from electrostatic interactions between polyelectrolytes of opposite charges, through alternate dippings. The electrospun membrane formed on aluminium foil was cut into small pieces using a round punch (6 mm diameter, JLB340P BOEHRM<sup>®</sup>, France). To separate the membranes from their aluminium counterpart, they were immersed in a 70% alcohol bath, and left there for at least 1 h. This enabled at the same time some hydrophilization of the PCL membranes. Afterward, these were placed at the bottom of wells in a 96-well plate.

For this membrane functionalization, pH 5.5 MES buffer (40 mM, with NaCl 150 mM) was used to make the polyelectrolyte solutions and wash out the nonadsorbed polyelectrolytes after each membrane dipping step. We used DEX (500 µg ml<sup>-1</sup>) as polyanion. The polycation was amino-β-CD polymer/AT complex solution. To prepare this solution, we first dissolved amino-β-CD polymer in MES buffer and stirred overnight. We then added an excess of AT powder to the CD solution (0.5 mg for 2 ml of solution). The mixture was vortexed and then shaken for 24 h. The excess remaining solid was filtered off and the supernatant solution containing amino-β-CD polymer/AT complex was used as polycation dipping solution for the nanoreservoirs formation.

The wells containing PCL membranes were filled with 300 µl of MES buffer and left to equilibrate overnight at 4°C before beginning the experiment. The functionalization of the membranes was then realized through successive baths (300 µl) of alternate polycation/polyanion dipping solutions. After each polyelectrolyte adsorption step, the dipping solution was removed with a pipette and replaced by buffer, as a rinsing step to remove all nonadsorbed compound (two washings). Each bath lasted 15 min, except for the complex solution (half an hour, necessary to reach a plateau, as determined by preliminary Quartz Crystal Microbalance experiments). The build-up was initiated with a standard PLL (500 µg ml<sup>-1</sup>)/DEX (500 µg ml<sup>-1</sup>) adsorption cycle, as a 'primer layer'. The construction can be described as – PLL-DEX-(CPLX-DEX)<sub>n</sub> where CPLX is the solution of amino-β-CD polymer/AT complex

and  $n$  is the number of adsorption cycles, which governs the 'size' of the nanoreservoirs. When the functionalization is finished, the membranes are left into MES buffer, the plates are stored in the fridge at 4°C.

## Scanning & transmission electron microscopy observations

### *Scanning electron microscopy*

Samples of compounds and complexes in solution were prepared for scanning electron microscopy (SEM) observation by depositing a drop of solution on a thin microscope glass slide cover, let it dry, repeat the operation a few times and finally wash out the buffer salt by rinsing the slide with water. These glass covers were then fixed on SEM sample holders and coated for SEM observation.

Functionalized membranes need to be treated and dehydrated before the observation at the SEM. After the functionalization, the membranes were rinsed three-times (10 min each) with phosphate buffer (PB), fixed with 2.5% glutaraldehyde diluted into PB (10 min) at room temperature, and washed three-times (10 min) with PB. Dehydration was done by successive dippings (10 min each) into ethanol at increasing concentration: 25, 50, 75, 90 and 100%. After a quick dipping into hexamethyldisilazane (HMDS), the membranes were fixed on a SEM sample holder using conductive double-sided adhesive tape, and the holders were metal-coated (Au/Pd) or carbon-coated. SEM observations were made on a Hitachi S800 scanning electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan), at 5 kV for Au/Pd-coated samples, and 15 kV for carbon-coated samples. For higher magnification, some samples were further observed on a Hitachi TM 1000 (IGBMC, Strasbourg, France).

### *Transmission electron microscopy*

Transmission electron microscopy (TEM) observations were made with a Hitachi H7500 transmission electron microscope (Hitachi) equipped with an AMT Hamamatsu digital camera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan). Solution samples of AT, polymer-CD and complexes were prepared for TEM by depositing a microdrop of solution on a TEM grid covered with a carbon film, let it dry, repeat the operation a few times and finally wash out the buffer salt by rinsing the grid with water.

## X-ray photoelectron spectroscopy analysis

The x-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis was performed with an Axis Supra (Kratos Analytical, Manchester, UK). The spectra were excited by the monochromatized AlK $\alpha$  source (1486.6 eV) run at 15 kV and 15 mA. For the individual peak regions, pass energy of 40 eV was used. Analyses of the peaks were performed with the CasaXPS software, after background subtraction.

## Molecular dynamic simulations on inclusion complexes

### *Force-field parameterization*

To prepare the starting structure for simulations, the amino- $\beta$ -CD and AT coordinates are extracted from the PDB structure file (Protein Data Bank). Partial atomic charges are assigned based on the AM1-BCC method [33,34], using the antechamber program of AmberTools [35]. AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) is a family of force fields for molecular dynamics of biomolecules, and the name of the software package that simulates these force fields. The van der Waals and bonded parameters are taken from the general amber force field [36]. The AMBER format files of these molecules are then converted to the GROMACS format using the acpype python script [37]. The coordinate and topology files of both molecules are then merged to obtain the final starting structure and topology file for each complex.

### *Molecular dynamic simulations*

Molecular dynamic (MD) simulations are performed using GROMACS-4.6.2 [38]. The complex was placed in the center of a cubic periodic box and solvated by the addition of simple point charge (SPC) water molecules. The net charge on the system was then neutralized by adding counter ions as required. The energy was minimized using the steepest descent algorithm. The system was then heated to 300 K during constant volume simulation with 1 fs time step. The pressure was then equilibrated to 1 atm during an NPT simulation with 1 fs time step (NPT are the system variables that are regulated: N constant particle number, P pressure, T temperature). Production simulations were performed for 40 ns with a 2 fs time step. The temperature and pressure were maintained at 300 K and 1 atm using the v-rescale temperature [39] and Parrinello–Rahman pressure coupling method [40]. All bonds were constrained using the parallel Linear Constraint Solver (LINCS) algorithm method [41,42].

### Binding free energy

In order to calculate the interaction-free energies of the AT/amino- $\beta$ -CD complexes, we use the molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area (MM-PBSA) protocol. The calculations were performed using the *g\_mmpbsa* tool [43,44], which implements the MM-PBSA approach using the GROMACS and APBS software packages.

MD simulations were used to generate an ensemble of conformations for each of the four binding complexes in the presence of explicit water. Subsequently, the MM-PBSA approach is used to estimate the average binding energy over the MD ensemble of the default parameters provided with the *g\_mmpbsa*. The MM-PBSA energies were obtained from samples of 100 snapshots (for each complex) that were extracted from the MD trajectories.

The solvation energy consists of two terms: electrostatic (polar solvation energy) and nonelectrostatic (nonpolar solvation energy) contributions. For the nonpolar contribution, we apply solvent-accessible surface areas (SASA)-only nonpolar model (most widely used nonpolar model) [45,46]. According to literature, the binding energies in MM-PBSA are generally overestimated in comparison to experiment, depending on the combination of parameters used, however the model is well suited to predict the relative binding energies of the complexes.

## Anti-inflammatory activity

### Cell culture

THP-1 cells (American Type Culture Collection) were cultured in RPMI-1640 medium containing 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  streptomycin, 100 IU  $\text{ml}^{-1}$  penicillin, 10% fetal calf serum and 2 mM L-Gln.

### Stimulation of cells

A total of  $5 \times 10^5$  THP-1 cells were seeded in 24-well plates, containing (or not) bare PCL membranes or PCL membranes functionalized with nanoreservoirs made of DEX and amino- $\beta$ -CD polymer/AT complex (CPLX) (from 1 or 10  $\text{mg ml}^{-1}$  amino- $\beta$ -CD polymer). These cells were then stimulated with LPS at 100  $\text{ng ml}^{-1}$ , or left in medium alone for 6, 24 and 48 h. TNF- $\alpha$  and IL-6 release were measured in culture supernatants by a heterologous two-site sandwich ELISA according to the manufacturer's instructions.

For the statistical analysis of the AT embedded-mediated inhibition of TNF- $\alpha$  and IL-6 secretion, we used nonparametric Mann–Whitney (two-tailed unpaired) test to compare two independent groups using GraphPad 5.04 software. A probability (*p*) value of  $<0.05$  was considered to be significant. \**p*  $< 0.05$ ; \*\**p*  $< 0.01$ .

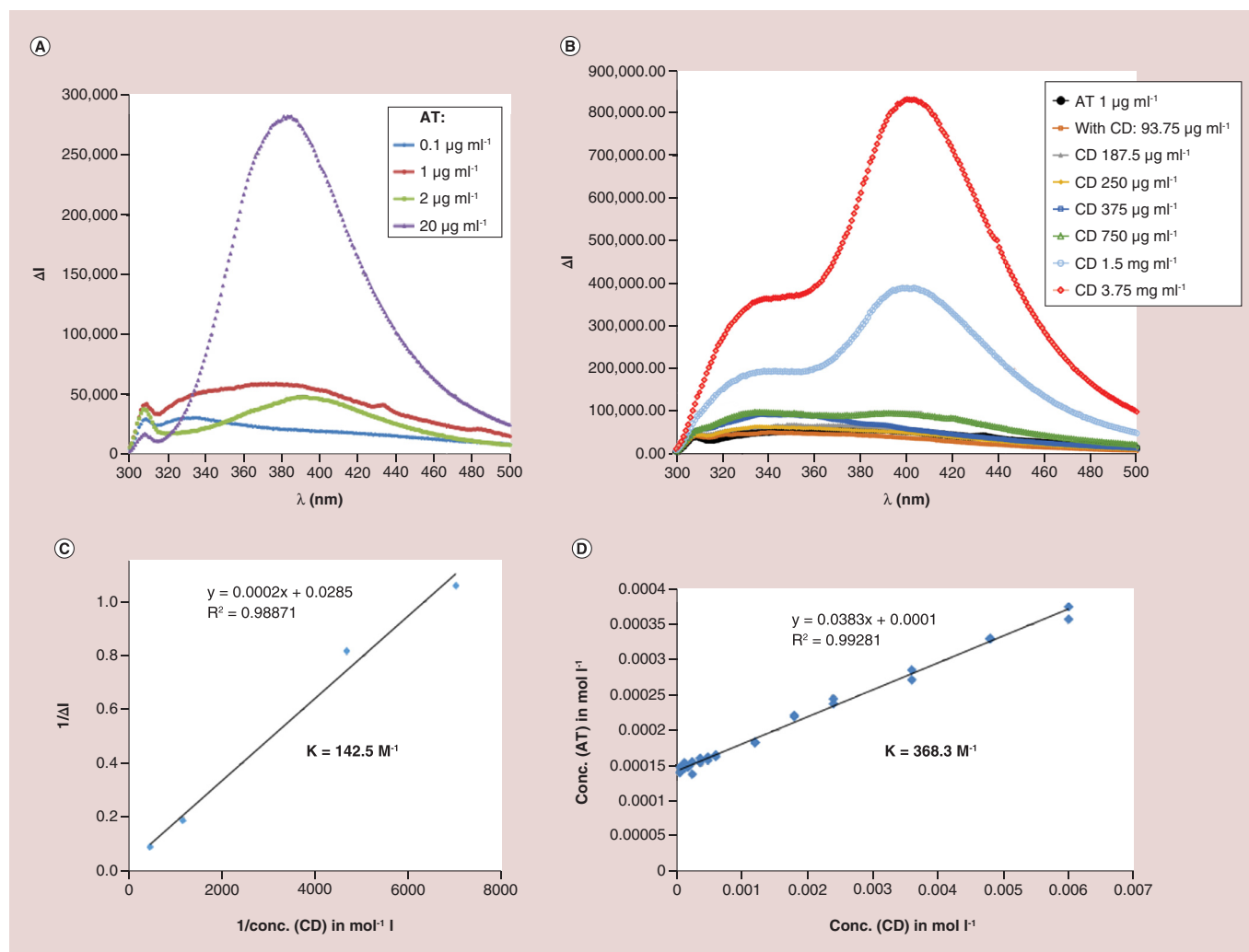
## Results & discussion

### Suggestion of inclusion complexation by fluorescence behavior

Fluorescence properties of AT (constant concentration of 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) in the absence and presence of increasing quantities of amino- $\beta$ -CD polymer in MES (2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid) pH 5.5 (concentration ranging from 93  $\mu\text{g ml}^{-1}$  to 3.75  $\text{mg ml}^{-1}$ ) were examined as a means of evaluation of the drug microenvironment.

AT presents amphiphilic characteristics, which can lead to micellar aggregation properties. It has a hydrophilic tail (dihydroxyheptanoic acid) associated to a large hydrophobic moiety composed of mainly three aromatic substituents (phenyl, fluorophenyl, phenylcarbamoyl) as well as a propanyl-pyrrole (Figure 1A). The phenylcarbamoyl substituent is actually the combination of a phenyl group linked to an amide bond. The aromatic substituents can be involved in hydrophobic interactions such as  $\pi$ -stacking and intercalation. First, AT reveals by its emission spectrum a differing environment when increasing its concentration (Figure 2A): at 0.1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , there is a peak at about 330 nm; at 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , this peak is supplemented by another shoulder at 380 nm; at 2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  only the red shifted peak at 380 nm is present, also at 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  along with a markedly increase in fluorescence intensity (fivefold). This red shift in emission wavelength together with the significant increase in fluorescence intensity suggests enhanced aromatic interactions, such as face-to-face  $\pi$ - $\pi$  stacking of the aromatic groups [47].

At higher concentration in MES (saturated 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , filtered), the spectral characteristics of the drug could actually be explained by the formation of micellar aggregates that could arise from  $\pi$  stacking for instance, leading to a hydrophobic core from the three aromatic substituents and an outer hydrophilic surface made of the drug carboxyl chain [47]. We have observed such micellar assemblies (see SEM observations). Furthermore, aggregation properties of AT were also suggested by the deviation from the Beer–Lambert law, in the UV-visible absorbance calibration curves realized both in MES-MeOH (Methanol) and PBS-MeOH, where the response of the solute is linear in dilute concentration range, up to respectively 0.25 and 0.4  $\text{mg ml}^{-1}$ , but displays a parabolic plateau tendency at higher concentration, which can be explained by diffusion phenomena (not shown).



**Figure 2.** Inclusion complexation of atorvastatin by amino- $\beta$ -cyclodextrin polymer confirmed by fluorescence and UV-vis spectroscopies. (A) Hydrophobic aggregation properties of AT at increasing concentration, leading to an increase in fluorescence intensity together with a red shift in emission wavelength (excitation 276 nm, emission around 381 nm); (B) Strong increase in AT fluorescence intensity, induced by the presence of amino- $\beta$ -CD polymer, explained by inclusion of AT substituents into the apolar cavities of  $\beta$ -cyclodextrins; (C) Double reciprocal plot (Benesi–Hildebrand) of  $1/\Delta I$  versus  $1/C(\text{CD})$ , giving a graphical estimate of 1:1 inclusion complex stability constant (linear plot); (D) Solubilization measurements, giving a graphical estimate of 1:1 inclusion complex stability constant (linear plot). AT: Atorvastatin; CD: Cyclodextrin.

As seen in Figure 2B, the presence of amino- $\beta$ -CD polymer at a concentration above  $750 \mu\text{g ml}^{-1}$  considerably increases the fluorescence intensity of the drug (16-fold, for the highest CD concentration studied). The increase in fluorescence intensity means that the drug encounters a more apolar environment. This could be either due to encapsulation of the drug in the CD cavities on the polymer and/or formation of nanoplexes (drug-polyelectrolyte nanoparticle complex) based on electrostatic and hydrogen bond interactions between drug micellar aggregates (with outer hydrophilic carboxylic substituents) and polymer chains (with CD amino groups) [48,49]. The increase in the fluorescence intensity of similar hydrophobic drugs upon addition of CD was often used as a demonstration of the inclusion of the drug in the CD cavity, as the hydrophobic micro-environment provided by this inclusion boosts the fluorescence yield of the drug [28,50]. Interestingly, the fluorescence peak of AT at 381 nm is red shifted to 400 nm in the presence of CD polymer. This is quite unusual, as CD strong binding of aromatic drugs generally produces a blue shift in wavelength. A similar red shift had been encountered in the case of piroxicam complexation by a carboxyl-CD [28], and was explained by Yoon *et al.* by the existence of different prototropic forms of the

drug, leading to an excited state intramolecular proton transfer (hydroxyl to carbonyl), favored by the existence of intramolecular hydrogen bonds in apolar environment [50].

Finally, an extrapolation of the apparent binding constant of the '1:1' complex can be obtained from the double reciprocal plot (Benesi–Hildebrand plot)  $1/\Delta I$  as a function of  $1/\text{concentration}(\text{ligand})$  where  $\Delta I$  is the relative fluorescence intensity (Figure 2C). A 1:1 complexation is suggested by the linear portion of this plot. As described in details by Connors [51] with appropriate approximations, such as the fact that the ligand (here CD polymer) does not fluoresce, the resulting fluorescence equation of the system is given by  $1/\Delta I = i + (i/K_{11})(1/C_L)$ , where  $i$  is the intercept,  $K_{11}$  the binding constant of the complex and  $C_L$  the concentration of ligand (CD polymer), and an estimation of the binding constant is given by the intercept to slope ratio. The Benesi–Hildebrand plot leads to an apparent  $K_{11}$  value of  $2850 \text{ M}^{-1}$  when using CD polymer concentration, and  $142 \text{ M}^{-1}$  when using the concentration of CD units corresponding to this polymer concentration (linear regression,  $R^2 = 0.98871$ ). This CD unit concentration has been estimated knowing the polymer average molecular weight ( $25,000 \text{ g mol}^{-1}$ ), the average CD content of the polymer (70%, given by the product information sheet of the supplier) and the amino-CD unit molecular weight ( $1170.5 \text{ g mol}^{-1}$ ). This gives an average of 15 CD units on the polymer chain. The stability of the AT/amino- $\beta$ -CD polymer complex as estimated this way is comparable to values obtained by phase solubility studies of the AT complex with  $\beta$ -CD ( $248 \text{ M}^{-1}$ , by Shivanand and Jagadevappa) [52] or HP- $\beta$ -CD ( $312 \text{ M}^{-1}$  by Shivanand and Jagadevappa;  $164 \text{ M}^{-1}$  by Lv) [52,53].

### Solubilization of AT by amino- $\beta$ -CD polymer

The results of AT solubilization experiments realized with increasing concentrations of amino- $\beta$ -CD polymer in MES are displayed in Figure 2D, expressed as the concentration (in  $\text{mol l}^{-1}$ ) of AT solubilized in MES, as a function of the amino- $\beta$ -CD polymer concentration (in  $\text{mol l}^{-1}$ ). The absorbance results were all sitting in the linear portion of the calibration curve. In the range of polymer concentrations studied (limited by its own solubility), the solubility diagram is linear. As explained by Connors [51], the basic principle is that the increased solubility of the substrate (the drug) is due to the formation of one or several complexes  $S_{\text{min}}$  by interaction of the substrate with the ligand (the CD polymer). A linear diagram generally means that all the complexes are first-order with respect to the ligand ( $n = 1$ ). When the slope of a linear solubility diagram is greater than unity, at least one complex is present for which  $m > 1$ . However if the slope is less than unity, it does not necessarily mean that only a 1:1 complex is formed. The apparent binding constant can be derived from the linear solubility diagram. Thus, if  $s$  is the slope and  $i$  is the intercept, the stability constant for the 1:1 complex is given by  $K_{11} = s/i(1-s)$  [51]. From the plot linear regression parameters (slope, intercept), we get an apparent binding constant of  $2444 \text{ M}^{-1}$ , with respect to polymer molar concentration, and  $368 \text{ M}^{-1}$  with respect to CD unit molar concentration, which is reasonably strong for a hydrophobic drug/ $\beta$ -CD inclusion complex. It is very similar in magnitude, though higher, as  $K_{11}$  values obtained from similar solubility diagrams, reported by Shivanand and Jagadevappa for the  $\beta$ -CD complex in water at pH 6.8 and  $25^\circ\text{C}$  ( $248 \text{ M}^{-1}$ ) and for the hydroxypropyl- $\beta$ -CD ( $312 \text{ M}^{-1}$ ) [52], and also by Hussein *et al.* for the  $\beta$ -CD complex in water ( $252 \text{ M}^{-1}$ ) and for the hydroxypropyl- $\beta$ -CD ( $219 \text{ M}^{-1}$ ) [31]. Lv *et al.* reported a quite lower value at  $25^\circ\text{C}$  in water for hydroxypropyl- $\beta$ -CD ( $164 \text{ M}^{-1}$ ) [53], as did Taksande *et al.* for  $\beta$ -CD ( $53 \text{ M}^{-1}$ ) and hydroxypropyl- $\beta$ -CD ( $120 \text{ M}^{-1}$ ) [54]. The stability we observed is though surprisingly lower than what we reported earlier for the complexation of the hydrophobic aromatic anti-inflammatory NSAID molecule piroxicam, with a charged 6<sup>A</sup>-carboxy-methylthio- $\beta$ -cyclodextrin, used for the build-up of anti-inflammatory multilayered coatings [28]. In this case, the high stability could be explained by a cooperative effect between hydrophobic inclusion in the CD cavities and supplementary electrostatic and/or hydrogen bonding interactions between the CD amino groups and the carboxy chains of the drug, as reported earlier [55]. We could have expected some similar cooperative effects in the present case, through strong interaction between the carboxylic chain of AT and the CD amino group, at the CD lower rim, supplementing the aromatic inclusion of the pyridyl engulfed in the cavity. However this is probably hindered by the shorter size (lack of linker) of the amino substituent that does not enable a deep engulfing of both the long carboxylic chain and the aromatic core of the drug. To have an insight into the molecular complexation features of our system, we have performed molecular dynamic simulations.

### AT/amino- $\beta$ -CD complex MD simulations

We investigated potential complexes of AT with amino- $\beta$ -CD (CD). AT is an aromatic heterocyclic compound with a structure based on a core pyrrole ring linked on one side to a 3,5-dihydroxy heptanoic acid chain and a propan-2-yl group, and on the other side to a fluorophenyl group, a phenyl group and a phenylcarbamoyl group

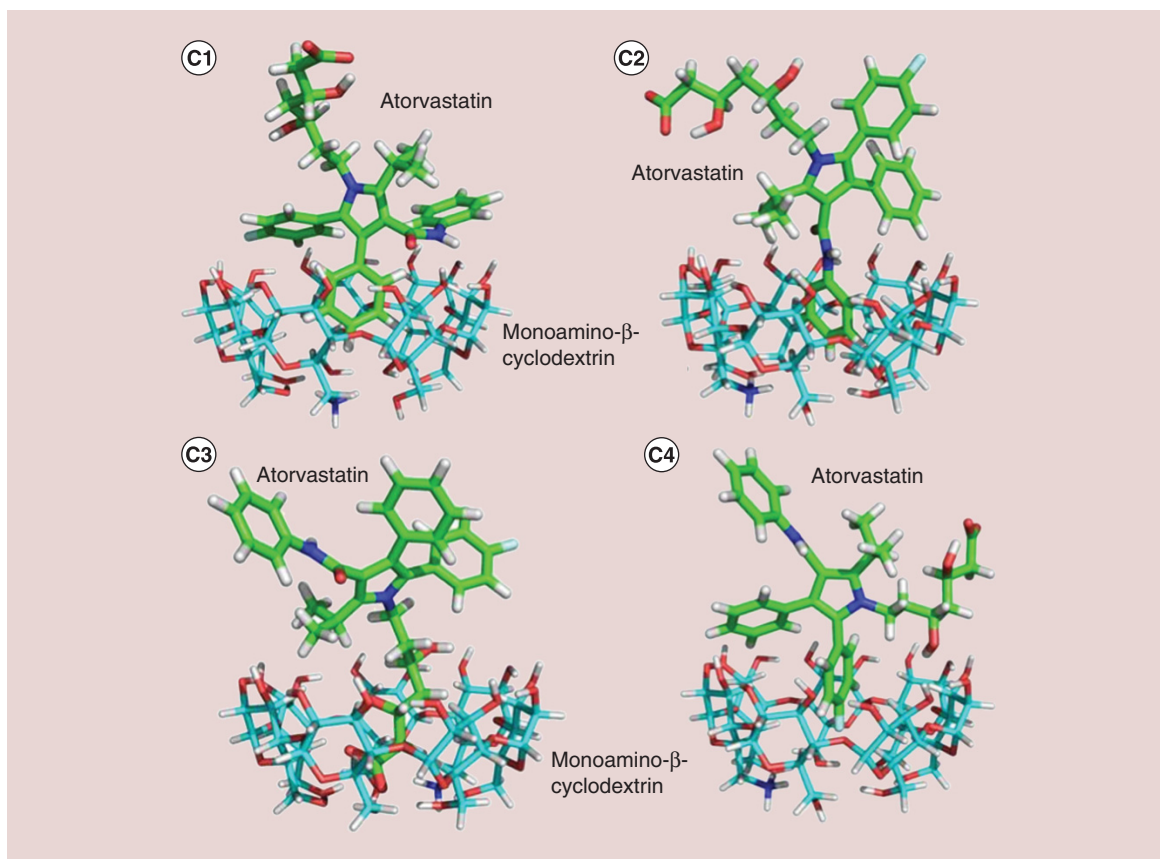


Figure 3. Four potential complexes (C1–C4) of AT and amino- $\beta$ -cyclodextrin by molecular dynamic simulations.

Table 1. Molecular dynamic simulations: calculated binding enthalpy using the molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area protocol.

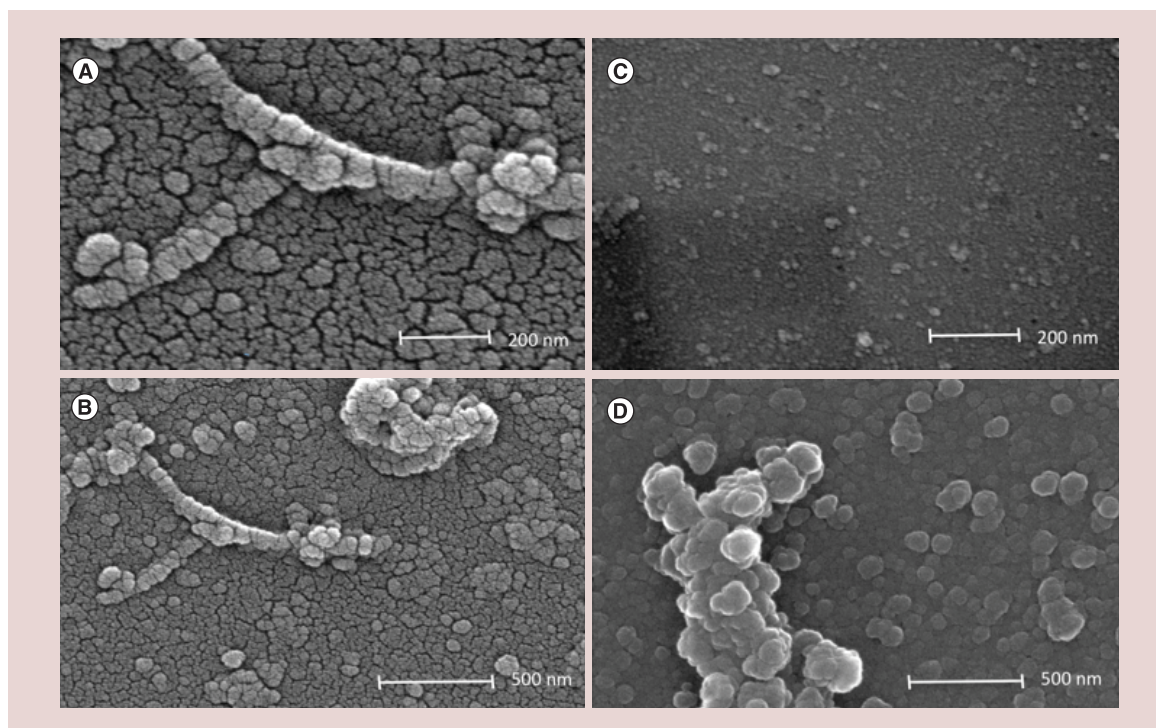
AT-amino- $\beta$ -CD complex	Binding energy, $\text{kJ mol}^{-1}$	$\pm$ Error bar, $\text{kJ mol}^{-1}$
C1	-114.545	57.355
C2	-117.398	19.535
C3	-106.336	20.827
C4	-112.719	20.962
C5 unbound	11.522	20.576

AT: Atorvastatin; CD: Cyclodextrin.

(Figure 1A). The interaction with amino- $\beta$ -CD would increase the solubility of AT by binding hydrophobic groups of the molecule and removing them from the solvent. With docking simulations, we have generated four potential complexes (C1–C4) of AT-amino- $\beta$ -CD, in which different groups of AT bind inside the cavity of amino- $\beta$ -CD (Figure 3). It is clear from the proportions of amino- $\beta$ -CD cavity that it is impossible to completely bind AT into the amino- $\beta$ -CD cavity. This cavity with an internal diameter and height around 0.7 nm is able to bind one of the side groups of AT emanating from the central pyrrole ring.

In order to quantitatively assess the binding propensity, we calculated the binding enthalpy using the MM-PBSA protocol [43,56]. We find that all complexes are thermodynamically stable (Table 1), but complex C2 has by far the lowest binding energy ( $-117.40 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), because of a favorable solvation contribution. In C2, the hydrophobic phenylcarbamoyl ring is completely hidden in the hydrophobic amino- $\beta$ -CD pocket while the two other hydrophobic groups are partially covered by the outer amino- $\beta$ -CD ring.

Hydroxypropyl- $\beta$ -CD is commonly used to deliver drugs. In the AT-hydroxypropyl- $\beta$ -CD complex studied by Lv *et al.* [53], molecular modeling studies have shown that the spontaneous inclusion process is realized by the



**Figure 4.** SEM observation of AT complexes. Scanning electron micrographs of compounds deposited on glass from aqueous solutions: (A & B) Atorvastatin, (C) amino- $\beta$ -cyclodextrin polymer, (D) atorvastatin/amino- $\beta$ -cyclodextrin polymer complexes.

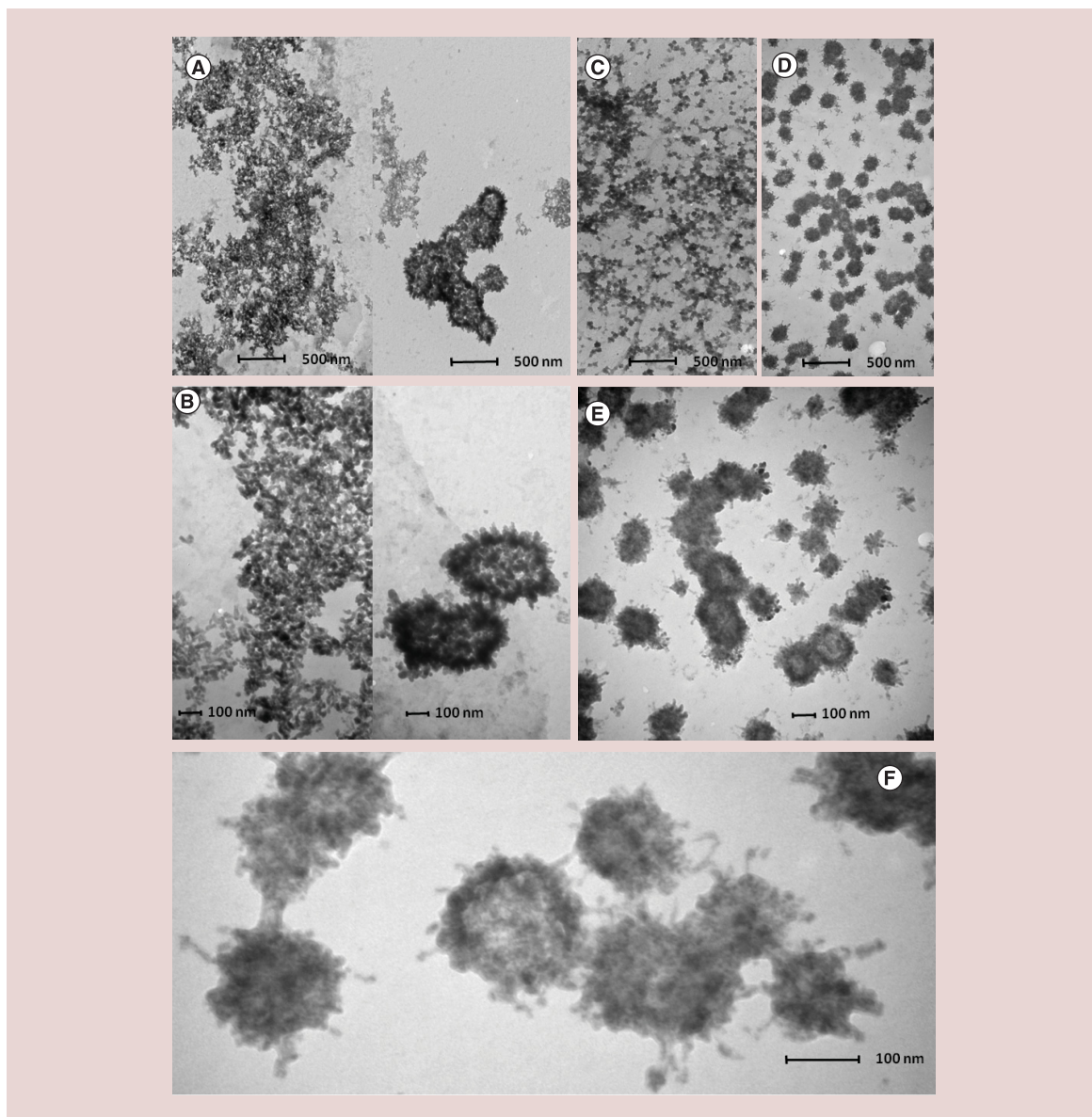
heptanoic acid chain through interaction with the CD primary side hydroxyl groups, and stabilized by the formation of hydrogen bonds and electrostatic interactions. This configuration leaves the three phenyl-based substituents still accessible for further complexation, which could explain why the solubility diagram pattern obtained by the authors suggested two different mechanisms of complexation. At low CD concentration, the first part of the plot was linear, attributed to a 1:1 complex, whereas the decreased parabolic plateau tendency observed at high CD concentration suggested a higher stoichiometry relative to CD describing a 'supermolecule'. Hussein *et al.* reported for AT/ $\beta$ -CD, a deviation from linearity, and suggested both 1:1 and 1:2 (AT:CD) stoichiometry [31]. Similar deviation from linearity was reported by Dey *et al.* [29] for the AT/ $\beta$ -CD complex in water, suggesting formation of higher order inclusion complexes ascribed to the formation of complex aggregates (nanoplexes) involving noninclusion complexation, or micellar aggregates. Loftsson *et al.* have evidenced this phenomenon in a study involving several drugs and several CDs [26].

For the 1:1 AT-hydroxypropyl- $\beta$ -CD complex, Lv *et al.* [53] found a binding energy of  $-101.63 \text{ kJ mol}^{-1}$  ( $-24.29 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). This low value indicates a quite spontaneous binding process and implies a high stability of the complex. For AT-amino- $\beta$ -CD, the binding energy found for the C3 complex (inclusion of the acid chain) is very similar ( $-106.33 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), but the other complexes C1, C2, C4 are slightly more favored, and for the C2 complex we found a binding energy value even lower,  $-117.40 \text{ kJ mol}^{-1}$ , indicating an even more spontaneous binding process, in accordance with the corresponding higher stability constant ( $368 \text{ M}^{-1}$ ), compared with the AT-hydroxypropyl- $\beta$ -CD complex ( $164 \text{ M}^{-1}$  reported by Lv or  $312 \text{ M}^{-1}$  reported by Shivanand and Jagadevappa, at  $25^\circ\text{C}$ ) [52,53].

### SEM/TEM observations of the complexes

As a first step, we observed AT alone by SEM (Figure 4A). AT forms numerous micellar self-assembled aggregates from a few nanometers (visible on the background) to about 50 nm wide in general, aggregating themselves subsequently at a bigger scale, following two different tendencies, stacking of discoid aggregates with unidirectional tendency and more spherical-like sprouting (Figure 4B). This has been confirmed by TEM observations (Figure 5A & B). The amino- $\beta$ -CD polymer itself is deposited as spherical polymeric globules about 10–20 nm that tend





**Figure 5.** TEM observation of AT complexes. Transmission electron micrographs of compounds deposited on carbon-coated grids from aqueous solutions: (A & B) Atorvastatin, (C) amino- $\beta$ -cyclodextrin polymer, (D–F) atorvastatin/amino- $\beta$ -cyclodextrin polymer complexes.

to aggregate as a network (Figures 4C & 5C). The observation of drops of AT/amino- $\beta$ -CD polymer complex displays again a background of globular aggregates, bigger than before, of an average size 100 nm, much more evenly distributed in size, which tend to assemble themselves into bigger structures (more than 500 nm), again sprouting in a rod-like shape, or a more spherical assembly (Figures 4D & 5D–F). The TEM pictures confirm the basic homogeneous size distribution of the polymeric AT-CD complexes around 100 nm previously observed by SEM. Figure 5F nicely displays the bridging interactions between basic complex particles, which appear like pincushions. One can also distinguish substructural details in these complex particles, especially from the outside periphery, showing the contour of 30 nm sized globules.

AT presents amphiphilic characteristics, which explain micellar aggregation properties. It has a hydrophilic tail (dihydroxyheptanoic acid) associated to a large hydrophobic moiety composed of mainly three aromatic substituents (phenyl, fluorophenyl and phenylcarbamoyl) as well as a propanyl-pyrrole. The phenylcarbamoyl substituent is actually the combination of a phenyl group linked to an amide bond. AT calcium as a solid is a dimer, with

strong electrostatic bonds between the acid chains and the calcium ions, as well as other weaker bonds such as hydrogen bonds. Wang *et al.* have evidenced this local structure through solid-state nuclear magnetic resonance studies [57], despite the absence of x-ray structure for this solid. The aromatic substituents can be involved in hydrophobic interactions such as  $\pi$ -stacking: the phenyl and fluorophenyl would preferably face each other to minimize steric hindrance, and thereby could enable further phenyl intercalation from a neighboring AT molecule, whereas the phenyl linked to the amide bond is further away and can itself be involved in other hydrophobic or  $\pi$ - $\pi$  interactions, also depending on the change in conformation of the amide bond. The aromatic moieties can undergo edge-face, offset stacked or face-to-face stacked interactions. In aqueous media, the hydrophilic and hydrophobic parts of the molecules will tend to self-assemble in order to constitute a hydrophobic core, with the hydrophilic parts pointing out. The levels of freedom from amide bond and acid chain could explain the sprouting effect observed under SEM/TEM. Such self-assembly properties have been described, for example, by Zhang *et al.* for a series of amide compounds with various aromatic substituent headgroups [58]. Depending on their features they form various 'organogels' (supramolecular gels) in various organic solvents, and their self-assembly capacity depends greatly on the size of the aromatic head-group. These molecules could self-assemble and stack into different shape-like structures such as belt-, rod-, lamellae- or wrinkle-shaped structures, depending on solvent environment. These self-assemblies are based on a range of weak interactions, including  $\pi$ - $\pi$  stacking, other hydrophobic interactions from aromatic moieties and hydrogen bonds. These assemblies are often reversible and depend also on pH and ionic force. A spectacular example is given by Xie *et al.* who designed, in the same family of compounds, an Fmoc tripeptide, N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-phenylalanine-tryptophan-lysine (Fmoc-Phe-Trp-Lys-OH) [47], which formed nanofibers at pH 5, flat ribbons at pH 6–11 and helical nanoribbons above pH 11, the latter assemblies being based on a more rigid conformation of the peptide, with strong intramolecular  $\pi$ - $\pi$  interactions between the tryptophan and the Fmoc moieties.

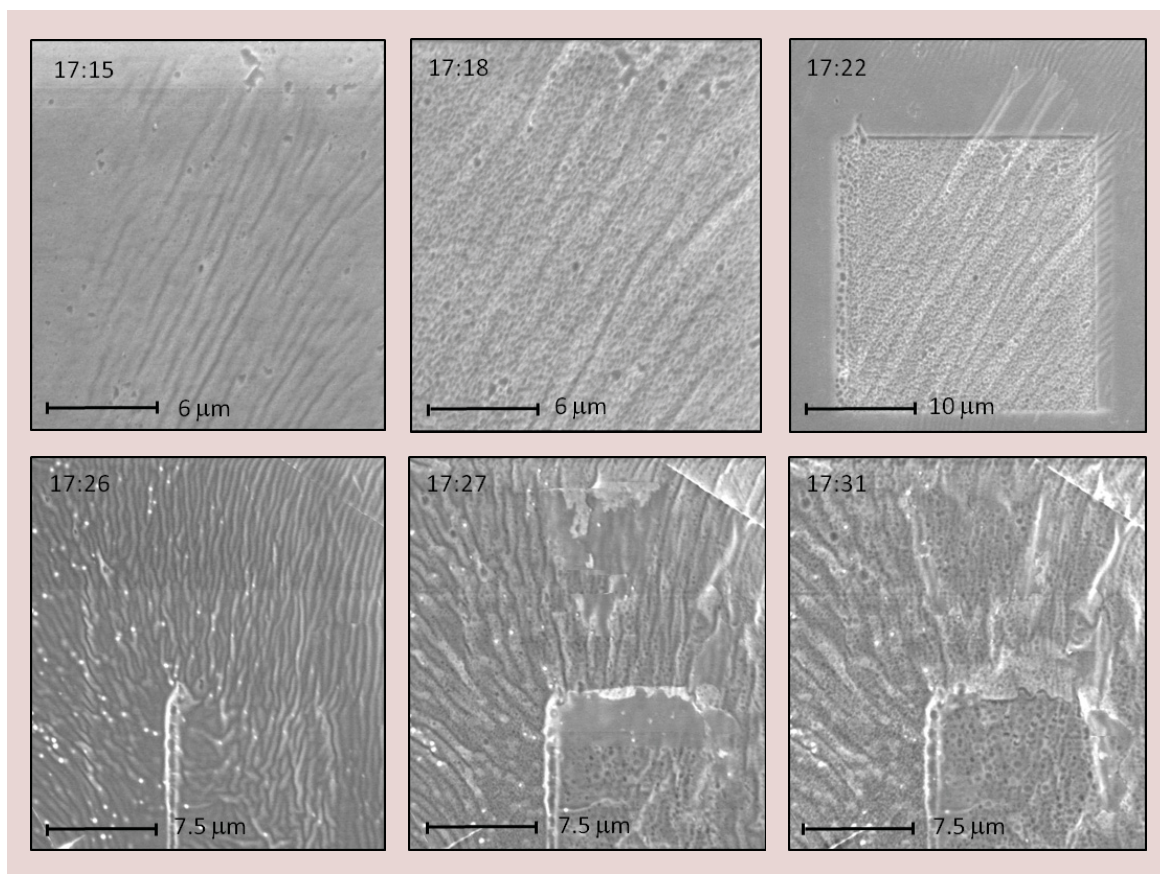
The amino- $\beta$ -CD polymer is produced from a cross-linking reaction with epichlorohydrin between 6-mono-deoxy-6-mono-amino- $\beta$ -CD units, which can occur on primary or secondary side. All amino substituents can make hydrogen bonding with hydroxyl protons either from water or from neighboring CD units, which tends to condensate the network. This could explain why we can observe by SEM the formation of polymeric spherical nanoparticles of about 10 nm diameters. These spherical particles can aggregate into bigger assemblies and tend to form a reticulate network.

The bigger particulate size observed for AT/amino- $\beta$ -CD polymer complexes (about 100 nm supramolecular structures, formed by 30 nm globules) is also in accordance with the Tyndall effect (scattering of light by particles in suspension) we observed for the aqueous solution of amino- $\beta$ -CD polymer. This effect was increased upon complexation, suggesting the formation of larger aggregates.

Comparable supramolecular assemblies have been reported by Yang *et al.* based on the synthesized polymer per-methyl- $\beta$ -CD-modified hyaluronic acid (HA), complexing the pro-drug adamplatin (adamantyl groups) [59], or more recently, complexing the porphyrin-modified paclitaxel pro-drug through strong host-guest interaction between the porphyrin and the CD units [60]. This led to supramolecular amphiphilic complexes self-assembling into structured nanoparticles with a hydrophilic HA outer shell (able to target HA-receptor on cells) and a hydrophobic pro-drug core. These nanoparticles were biocompatible, biodegradable and lowered the side effects of the paclitaxel anticancer drug. This HA-p-me-CD polymer displays a molecular weight (28,000) similar to our amino- $\beta$ -CD polymer and an average hydrodynamic radius around 20 nm, also comparable. The complexes formed spherical nanoparticles of 30–50 nm, tending to self-aggregate in bigger assemblies through hydrogen bond interactions between particles (carboxyls and hydroxyls of the HA), resulting in a measured hydrodynamic radius of 171 nm, with a  $\zeta$ -potential of -29 mV (negative, from HA acids). This is all quite comparable to our results, as AT/amino- $\beta$ -CD polymer complex forms globular aggregates of an average size 100 nm that tend to aggregate into bigger structures (more than 500 nm), probably due to interparticle amino/hydroxyl hydrogen bonds from the CD units. Moreover, we measured a  $\zeta$ -potential of +14 to +27 mV of the particulate complexes, which confirms the amino nature (+) of the outer shell.

### SEM observation of gel properties

Finally, we would like to point out that in certain conditions of SEM/TEM preparations, with highly concentrated amino- $\beta$ -CD polymer (with and without AT), the polymer network changed into a hydrogel upon rinsing the glass- or carbon-adsorbed sample with water. This hydrogel structure was photographed by SEM and displayed in Figure 6. Under the electron beam, it quickly made unidirectional wrinkles followed by apparition of pores

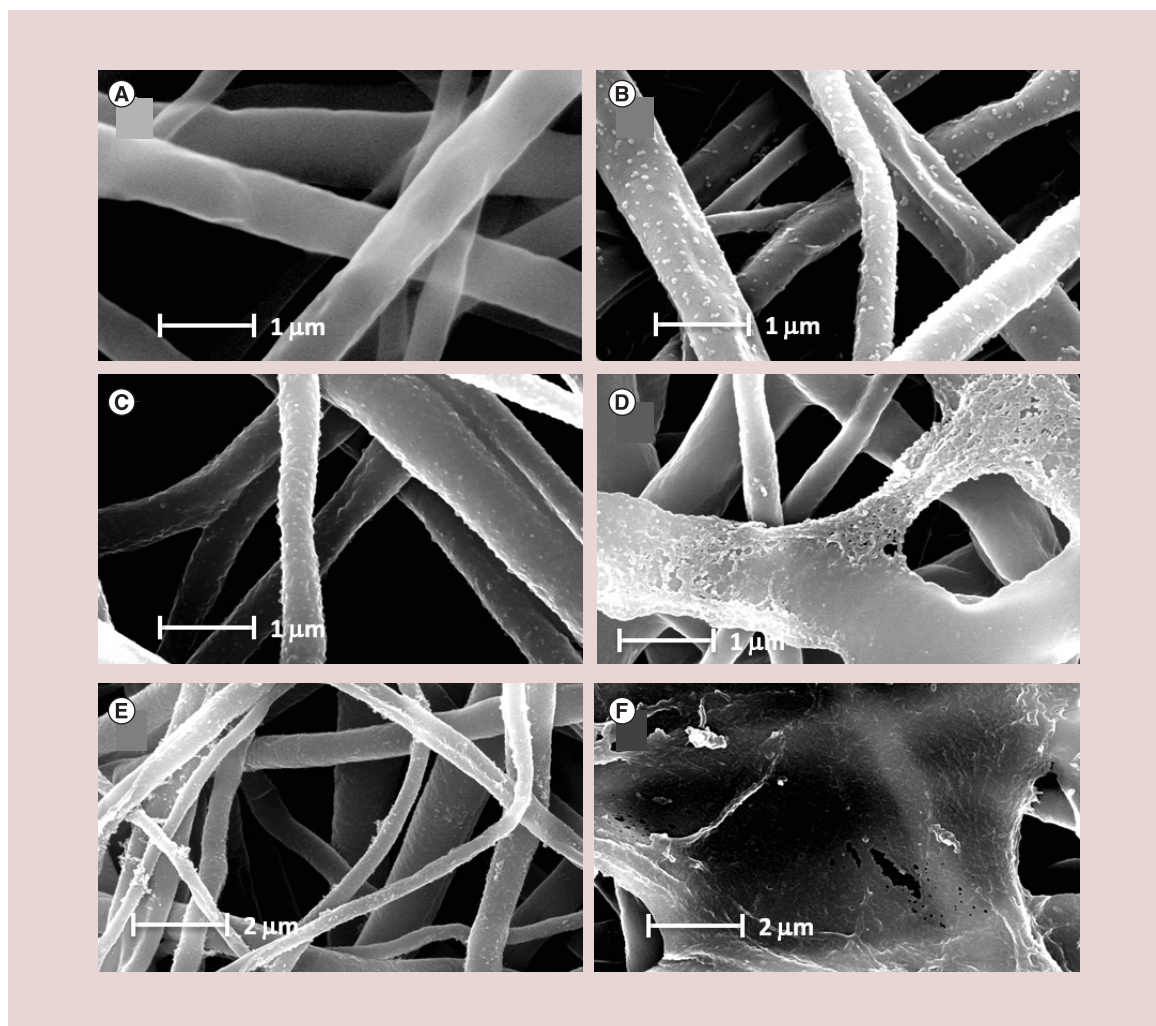


**Figure 6.** Scanning electron micrographs of amino- $\beta$ -cyclodextrin polymer hydrogel: apparition of the porous structure under the electron beam (5 kV) within a few minutes.

(250–750 nm), as the water was replaced by gas. It is quite comparable to pictures obtained by Aouada *et al.* with poly-acrylamide and El Fray *et al.* with a cryo-structured poly(vinyl alcohol) hydrogel [61,62]. The tuned cross-linking and process-cycles-related hydrogel morphology resulted in highly porous (pore size: 1–2  $\mu\text{m}$ ) and ribbon-like, oriented structure, presenting adequate mechanical properties compared with cartilage. Aikawa *et al.* described a behavior similar to ours for polyvinylacetal diethylaminoacetate from solution at pH 4 to porous hydrogel at pH 7.4 and its drug release properties [63]. Pourjavadi and Kurdtabar described similar properties for a superabsorbent hydrogel resulting from copolymerization of acrylamide/sodium acrylate and hydrolyzed collagen [64], showing high sensitivity to pH-inducing reversible swelling, and making this hydrogel a good candidate for drug delivery. This observation widens the scope of our study, as an alternative means of introducing the active anti-inflammatory component in a wound dressing.

#### SEM observation of polycaprolactone functionalized membranes

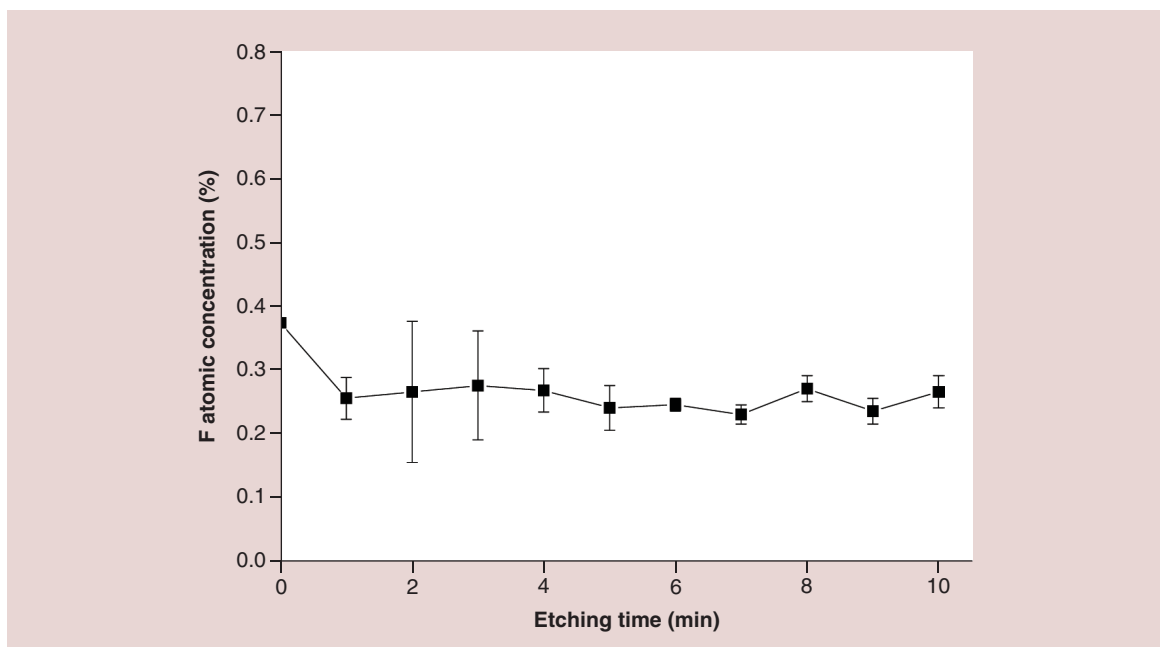
Figure 7 displays functionalized PCL–PLL–DEX–(CPLX–DEX–) $_n$  membranes ( $n = 5$  or  $10$ ), together with a bare control membrane (Figure 7A), and PCL–PLL–DEX–(CD–DEX–) $_n$  for comparison. In the layer-by-layer adsorption process involved in the nanoreservoir technology, the deposition (adsorption) of the polymeric complexes on the fibers is driven mainly by the formation of electrostatic interactions with the oppositely charged polymer previously adsorbed on the fibers, thus enabling a dissemination of the polymeric complexes all over the fibers, through formation of the so-called nanoreservoirs [22]. Many nanoreservoirs are visible, about 50 nm, evenly spread over the surface of the membrane's fibers, as can be seen already with low concentration of CD polymer (190  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ,  $n = 5$ ) (Figure 7B). When increasing the CD polymer concentration (to 1  $\text{mg ml}^{-1}$ ,  $n = 5$ ), the reference coating with CD polymer (Figure 7C) displays the classical nanoreservoirs, covering the whole surface of the fibers. Interestingly, in the same architecture with AT/CD polymer complexes (Figure 7D) we observe the beginning of supplementary lateral interactions, leading to the onset of coating 'extensions'. This effect of lace-like extensions, in particular at crossings,



**Figure 7. Scanning electron micrographs of atorvastatin-functionalized poly( $\epsilon$ -caprolactone) membranes. (A)** Nonfunctionalized control PCL membrane; **(B)** –PLL-DEX-(CPLX-DEX)<sub>5</sub> ‘five cycles’ nanoreservoirs of AT-CD complexes (CPLX) and dextran sulfate (DEX), with amino- $\beta$ -CD polymer 190  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; **(C)** –PLL-DEX-(CD-DEX)<sub>5</sub> ‘five cycles’ nanoreservoirs of amino- $\beta$ -CD polymer/dextran sulfate, with CD polymer 1 mg  $\text{ml}^{-1}$ ; **(D)** –PLL-DEX-(CPLX-DEX)<sub>5</sub> ‘five cycles’ nanoreservoirs of AT-CD complexes/dextran sulfate, with CD polymer 1 mg  $\text{ml}^{-1}$ ; **(E)** –PLL-DEX-(CD-DEX)<sub>10</sub> ‘ten cycles’ nanoreservoirs of CD polymer/dextran sulfate, with CD polymer 1 mg  $\text{ml}^{-1}$ ; **(F)** –PLL-DEX-(CPLX-DEX)<sub>10</sub> ‘ten cycles’ nanoreservoirs of AT-CD complexes/dextran sulfate, with CD polymer 1 mg  $\text{ml}^{-1}$ . AT: Atorvastatin; CD: Cyclodextrin; PCL: Poly( $\epsilon$ -caprolactone); PLL: Poly(L-lysine).

is further enhanced when increasing the number of cycles (1 mg  $\text{ml}^{-1}$  CDpolymer,  $n = 10$ ) (Figure 7F compared with 7E). The condition displayed on Figure 7D represents some kind of border state between nanoreservoirs technology and membrane film formation. This supramolecular propensity to lateral extensions (related to the pincushion structure of the complexes described earlier) ultimately leads to the formation of interfiber films. Thus, the studied system not only allows the formation of homogeneously dispersed active nanoreservoirs, but also the formation of self-assembled thin active films that would allow other particular applications. To modulate the ‘dose’ of AT, one can modulate the number of adsorption cycles, and/or the concentration of CD polymer used to solubilize the drug. This point is discussed in the ‘cytokine expression’ section.

In the nanoreservoirs, composed of different compounds sequentially adsorbed during the functionalization process, the molecule of interest, AT, should be present as complexes. To prove that point and try to quantify the AT present in the membrane, we performed XPS measurements on the functionalized membranes and spectrophotometric quantification of AT embedded in the membranes.



**Figure 8.** Variation of Fluor atomic concentration with etching time obtained from x-ray photoelectron spectroscopy measurements on atorvastatin-functionalized poly( $\epsilon$ -caprolactone) membranes.

#### XPS measurements on functionalized membranes

The chemical composition of the membrane surface was obtained by XPS. Spectra of all membranes reveal the presence of atoms C, O, N, S, Na and F on the surface. The relative atomic concentrations were calculated from the area of the main signal of the observed elements with appropriate atomic sensitive factors and after Shirley background subtraction.

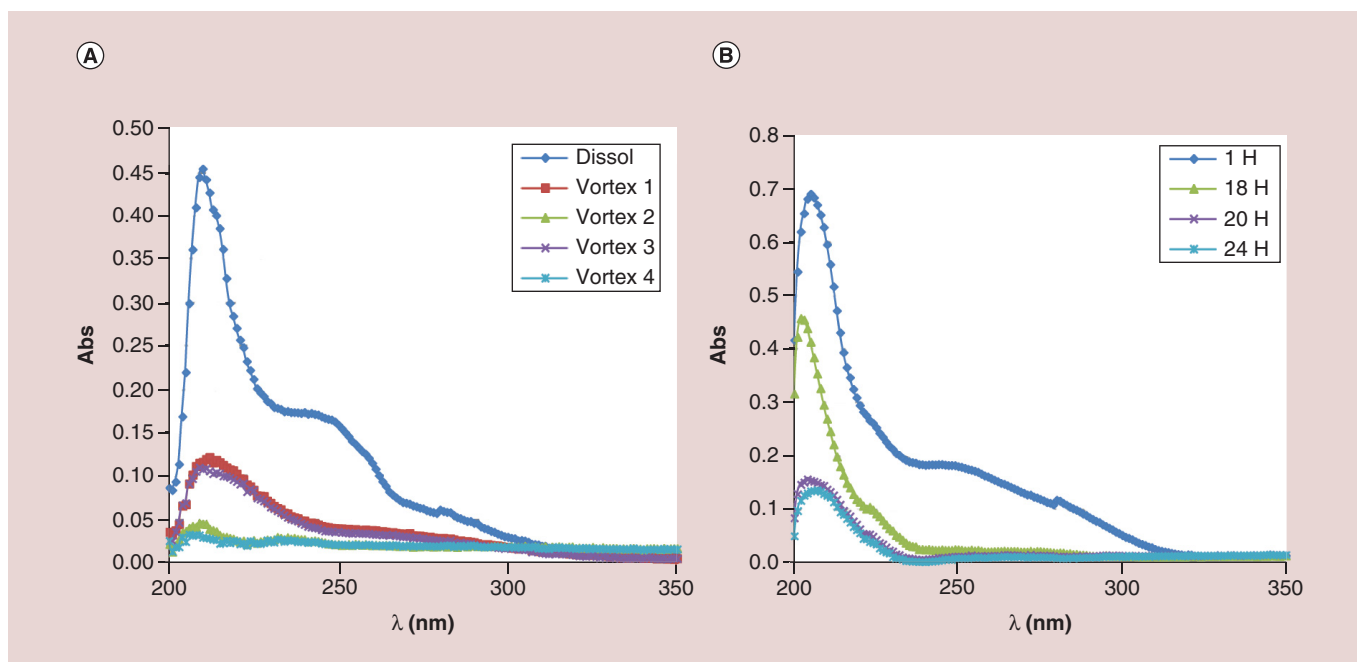
Polyatomic ion beam sputtering with XPS analysis provided quantitative chemical state information as a function of depth with minimal ion beam induced chemical damage. A 10 kV  $\text{Ar}^+$  cluster source was rastered over  $2 \times 2$  mm area to create the depth profile (with an approximate sputter rate of 95 nm/min). A  $110 \times 110$   $\mu\text{m}$  spot located in the center of the rastered square was analyzed.

The presence of AT was first confirmed in a preliminary step-by-step experiment (without etching), where the deposition of AT complexes ‘cycle after cycle’ was demonstrated for membranes corresponding to successive dippings (data not shown). We chose five-cycle membranes as a good standard functionalization. The variation of Fluor (F) atomic concentration with etching time was measured in five different PCL–PLL–DEX–(CPLX–DEX–)<sub>5</sub> membranes and the results are shown in Figure 8. This element is related to the presence of AT in the samples, and according to the results it would be slightly more concentrated on the surface but its signal remains unchanged in the membrane bulk. This is in accordance with SEM pictures that show the presence of the nanoreservoir coating deep inside the nanofibrous membrane. The homogeneous distribution of homogeneous sized nanoreservoirs on the fibers is clearly shown on the SEM pictures; in parallel the XPS experiments demonstrate that the AT quantity (determined by Fluor atomic concentration) is quite constant throughout the thickness of the membrane; yet, AT itself is provided through the polymeric CD complexes. This supports the conclusion that there is a homogeneous active AT nanoreservoirs’ distribution throughout the membrane.

#### Spectrophotometric quantification of AT embedded in the membranes

##### *Dissolution with MeOH*

To quantify the AT present in the membrane we tried to dissolve the embedded molecule with successive washings of the membrane into MeOH (Figure 9A). The UV-vis spectrum of the first recovered MeOH solution, diluted with equivalent volume of MES buffer, displayed the features of AT. Then, in subsequent MeOH washings spectra, there is less and less AT recovered, until only a few traces. The quantity of AT was determined for each washing (overnight, vortex 1, 2, 3 and 4) using the calibration curve and then summed up to have the total quantity of AT



**Figure 9.** Atorvastatin UV-vis spectra in MES:methanol (1:1). (A) Recovery of atorvastatin embedded in PCL membrane five-cycle coating, by successive methanol washings. (B) Follow-up of atorvastatin release with time when changing from MES buffer (pH 5.5) to PBS (pH 7.4).

MES: 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid; PBS: Phosphate-buffered saline; PCL: Poly( $\epsilon$ -caprolactone).

dissolved out of the membrane. The resulting average (of 3 experiments) was  $26 (\pm 22) \mu\text{g}$  for five-cycle membranes and  $30 (\pm 21) \mu\text{g}$  for ten-cycle membranes.

#### *Analysis of the dipping solutions of complex*

For a concentration of amino- $\beta$ -CD polymer of  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ , the concentration of AT solubilized in MES is  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$  according to the previous results. The volume of dipping complex solution poured in the well (96-well plate) was  $300 \mu\text{l}$ , therefore the quantity of AT in solution in the well containing the membrane was initially  $60 \mu\text{g}$ .

From the UV spectra of the complex dipping solutions used for membrane functionalization, we determined the quantity of AT remaining in the dipping solutions after adsorption and, by subtraction with the initial quantity present in the dipping solution, calculated the quantity adsorbed in the membrane.

The total quantity of AT adsorbed on the membrane was obtained by the addition of the quantities adsorbed at each cycle. As an average of four experiments, the quantity of AT adsorbed on the membrane was  $84 \pm 11 \mu\text{g}$  for five-cycle membranes and  $200 \pm 13 \mu\text{g}$  for ten-cycle membranes.

#### *Comparison of the two approaches*

We have been able to estimate the quantity of AT present on the membrane by two different simple approaches. The limits of the first method are the uncertainty concerning the dissolution of all the AT present on the membrane, as well as the possible variation in membrane thicknesses. The first point is suggested by the leveling of quantity dissolved with MeOH despite the increase from five to ten cycles of adsorption. Regarding the membrane itself, its thickness may slightly differ from one to another. Thus, the quantity absorbed on one membrane may be higher if the membrane is thicker and lower if the membrane is thinner.

The dispersion of the results with the second approach is much smaller than with the MeOH dissolution method. Another big difference is the expected increase in membrane-embedded AT (complex) when going from five cycles to ten cycles of adsorption. The fact that the quantity is more than doubled is actually in accordance with the increasing occurrence of extended lace networks in the coating, observed by SEM, when going from five to ten cycles of adsorption. Finally, we know how much AT we have at the end of the functionalization but we need to know if the molecule of interest remains on the membrane when left in the buffer after functionalization.

*Follow-up of potential AT release*

The recording of UV-vis spectra of MES buffer at each rinsing cycle during functionalization showed that a tiny amount of adsorbed AT (about 1 µg) is washed out of the membrane at each first of the two washings. As demonstrated by the absence of AT characteristics in the UV-vis spectra of the MES buffer above the membrane, taken after the functionalization, no release of AT out of the membrane is observed even after 2 days. The functionalized membranes can be stored probably a few months without noticeable change, as was confirmed by XPS measurements.

The 1 µg/cycle loss during functionalization has to be subtracted from the quantity of embedded drug determined from dipping complex solutions, which leads to doses of  $79 \pm 11$  µg for five-cycle membranes and  $190 \pm 13$  µg for ten-cycle membranes.

When soaking the functionalized membrane from MES into PBS pH 7.4 buffer, the UV-vis spectra of that rinsing buffer taken at various times in the first 48 h show that there is a little bit of release of AT in the first hour (Figure 9B, see above 250 nm) although in small amount, estimated to 3–4 µg, in other words, about 6% loss, which has to be subtracted also when expressing final dose at pH 7.4 for *in vitro/in vivo* studies.

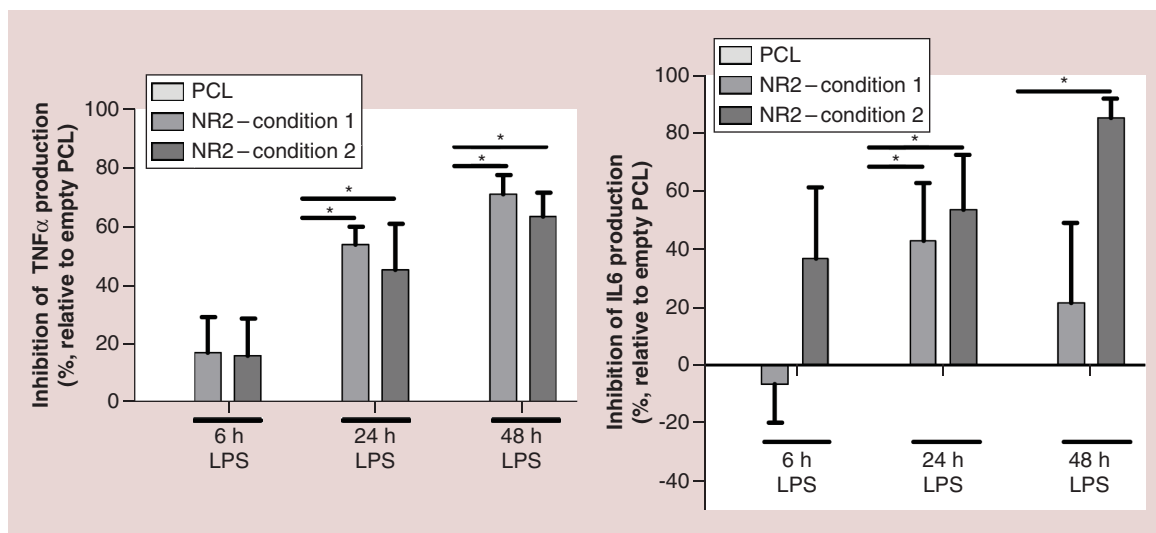
### Polycaprolactone membranes functionalized with AT repress TNF-α & IL-6 production in LPS-activated THP-1 cells

We evaluated the anti-inflammatory properties of AT, which for potential future use in rheumatic diseases has been embedded into a biodegradable matrix of polycaprolactone (PCL) that might be inserted into the synovial space of affected joints. The embedding into the nanoreservoirs should enable delayed and long-term consumption of the active molecule, as it is a cell contact-dependent delivery mode through degradation of the excipient polymer by the contacting cells [22]. The aim of the present study was to investigate the impact of PCL membranes loaded with the anti-inflammatory molecule on cytokine expression. For this, empty and statin-functionalized PCLs were seeded in culture wells with control and LPS-stimulated THP-1 cells, and TNF-α and IL-6 expressions were monitored over time. The model was studied from 6 to 48 h. We first noticed that empty PCL membranes do not induce cytokine expression in control cells, nor do they repress IL-6 or TNF-α secretion by LPS-activated cells. Next, as seen in Figure 10, we observed that both TNF-α (panel A) and IL-6 (panel B) secretion in the medium was reduced when cells were cultured on AT-containing PCL membranes, at late time points (24 and 48 h post-LPS stimulation), while AT-containing PCL membranes appeared inefficient on early (6 h) time points, when TNF-α secretion was at its maximal levels.

This effect is also visible on IL-6 expression, which is characterized by a slower secretion with nearly nothing at 6 h and peak values at 48 h. Rather than suggesting a limited efficacy of AT-coated PCL membranes, this observation indicated that the statin delivery from the biomaterial was delayed. Alternatively, it is also conceivable that AT-dependent post-translational modifications of signaling proteins such as Ras/GTPases acting downstream of TLR4 might initially exhibit only minor effects on cytokine expression, but whose consequences would result in the amplification of an inhibitory signal.

Regarding TNF-α secretion, increasing the ‘dose’ when using complexes from 10 mg ml<sup>-1</sup> CD polymer (condition 1), instead of 1 mg ml<sup>-1</sup> (condition 2), has no supplemental effect on inflammation inhibition, at any time point, reaching about 60% inhibition at 48 h. Interestingly, effects of PCL-embedded AT appeared dose dependent with regard to IL-6 secretion, with a higher effect for the condition 2 functionalization, with a maximum of 80% inhibition of IL-6 at 48 h.

As said earlier, to modulate the ‘dose’ of AT, one can modulate the number of adsorption cycles, and/or the concentration of CD polymer used to solubilize the drug. Preliminary experiments varying the number of drug complex adsorption cycles (NR<sub>n</sub>) for the membrane functionalization, with n = 2 or 5, showed no noticeable difference. Consequently, n = 2 was considered sufficient and chosen for all following experiments, to stay in the ‘nanoreservoirs’ strategy and avoid the formation of interfiber films. In the time of the *in vitro* tests (48 h), the anti-inflammatory effect observed is the same for five and two adsorption cycles, at the same concentration of CD (1 mg ml<sup>-1</sup>), whereas during the same time two adsorption cycles with increased CD concentration (10 mg ml<sup>-1</sup>) show a ‘dose’ effect. It should be reminded that the solubilization experiments demonstrated that the increased amino-β-CD polymer concentration solubilizes more AT. In condition 2, the dose of AT available at one stage ‘in one shot’ for the cells through the CD polyplexes is bigger. To access deeper-embedded AT (through many adsorption cycles, involving DEX as excipient) would just require more time, to consume the polymers.



**Figure 10. Atorvastatin-coated PCL repress IL-6 and TNF- $\alpha$  production in LPS-activated THP-1 cells.** (A) TNF- $\alpha$  release was determined by ELISA in THP-1 culture supernatants after LPS ( $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) stimulation for 6, 24 and 48 h, in the presence of empty (PCL) or atorvastatin-coated PCL membranes; results are expressed as % inhibition relative to PCL alone (NR<sub>2</sub> = 2-cycle nanoreservoirs; Condition 1 = AT complexes formed with CD polymer  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ; Condition 2 = AT complexes formed with CD polymer  $10 \text{ mg ml}^{-1}$ ); (B) IL-6 release was determined by ELISA in culture supernatants after stimulation of THP-1 cells in the same conditions as in (A). Quantification was made in four independent experiments realized in duplicates. Histograms represent mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis: nonparametric Mann-Whitney (two-tailed unpaired). A probability (p) value of less than 0.05 was considered to be significant; \*p < 0.05; \*\*p < 0.01. AT: Atorvastatin; CD: Cyclodextrin; LPS: Lipopolysaccharide; PCL: Poly( $\epsilon$ -caprolactone).

Future experiments will be necessary to decipher more precisely the pathways that are disrupted by AT. Furthermore, *in vivo* experiments will be performed to evaluate the impact of implanted AT-functionalized PCL membranes. The mouse air pouch model appears as the most advantageous system for this purpose [65].

## Conclusion

In this study, we have developed a therapeutic membrane with anti-inflammatory properties, as potential wound dressing, consisting in a synthetic nanofibrous electrospun polycaprolactone membrane functionalized with nanoreservoirs containing AT in the form of inclusion complexes with a polymeric amino- $\beta$ -CD. We first examined the behavior of this complex system in solution and demonstrated the complex formation through fluorescence and UV-vis spectroscopy, corroborated by MD simulations. Further characterization of the supramolecular organization of this complex system was obtained from SEM/TEM observations and was discussed in terms of the chemical structure and properties of the compounds. Polyamino- $\beta$ -CD was chosen to achieve a double objective: to solubilize the poorly soluble hydrophobic AT through formation of inclusion complexes in the CD cavities and/or nanoplexes and to be suitable for the build-up of the nanoreservoirs, as it is a positively charged polyelectrolyte. Nanoreservoirs were formed through alternate adsorption of polyamino- $\beta$ -CD-AT and DEX. The functionalized membranes were analyzed by SEM to confirm formation of the nanoreservoirs on the membrane fibers. Different approaches were used to confirm the presence of the drug in the nanoreservoirs, and estimate its quantity and release behavior. XPS measurements on the membranes with etching showed that AT (specific F atom) was uniformly present in the membrane bulk. UV-vis measurements after MeOH washings (extraction of the drug from the membrane) and analysis of solutions used for the nanoreservoirs build-up (remaining drug, nonadsorbed), led to an estimation of the drug present on the membranes. Pros and cons of the two approaches were discussed. UV-vis follow-up of the buffer after the build-up showed no release in MES, and a slight release when going into PBS (6% loss), and this stability of the functionalized membranes was confirmed by XPS measurements after a few months, still showing the AT signal. This behavior could enable to get a small release of the drug at the time of the membrane insertion at the lesion site (physiological pH), and thereafter the delivery of the drug is cell contact-dependent, as in other applications of the patented nanoreservoirs: upon contact, cellular enzymes degrade the polymer coating



and the drug becomes available. As cells grow, they infiltrate deeper in the porous scaffold inducing the sustained release of the drug. In a model system, the designed AT-functionalized membranes were seeded with control and LPS-stimulated THP-1 macrophages and inflammatory cytokine expression (TNF- $\alpha$  and IL-6) was monitored.

TNF- $\alpha$  inhibition reached about 60% at 48 h (no dose effect), and up to 80% for IL-6, depending on the dose. Future experiments will be performed to investigate more precisely the pathways disrupted by AT. Furthermore, *in vivo* experiments will be performed to evaluate the impact of the functionalized membranes, such as the mouse air pouch model, for rheumatic applications, and the mouse periodontal wound pocket, for periodontal applications. Wound healing properties are under study for periodontal application. The *in vitro* short-term effects of AT embedded into nanoreservoirs through amino-CD polymer complexes on nanofibrous PCL membranes are under investigation in human periodontal fibroblasts, keratinocytes and osteoblasts, representative of periodontal tissue, through measurement of cell metabolic activity (Alamar Blue Test), cell migration (scratch wound healing assay) and bone proteins expression (immunofluorescence). Preliminary data are encouraging. The novelty of our system resides in the double protection offered by the CDs as drug molecular chaperones, combined with further embedding into cell contact-dependent biodegradable nanoreservoirs. As the designed active membrane is a highly

### Summary points

#### Background

- Modulation of inflammation is a key point in healing processes. Statins have potential therapeutic effects in wound healing and bone regeneration through anti-inflammatory properties. As sparingly soluble molecules, they can be solubilized through encapsulation inside cyclodextrin (CD) cavities.
- We report here the production of an anti-inflammatory membrane based on a nanofibrous electrospun polycaprolactone biodegradable scaffold fitted with nanoreservoirs of atorvastatin (AT), embedded in the form of complexes with some amino- $\beta$ -CD polymer.
- Polyamino- $\beta$ -CD was chosen to achieve a double objective: to solubilize the poorly soluble hydrophobic AT through formation of inclusion complexes in the CD cavities and/or nanoplexes and to be suitable for the build-up of the nanoreservoirs, as it is a positively charged polyelectrolyte. Nanoreservoirs were formed through alternate adsorption of polyamino- $\beta$ -CD-AT and dextran sulfate.

#### Characterization of the complexes of AT with amino- $\beta$ -CD polymer

- Inclusion complexation of atorvastatin by amino- $\beta$ -CD polymer was confirmed by fluorescence and UV-vis spectroscopies.
- Molecular dynamic simulations of AT/amino- $\beta$ -CD (monomer) complex showed that the four substituents of AT lead to four thermodynamically stable complexes but inclusion of phenylcarbamoyl has by far the lowest binding energy (-117.40 kJ mol<sup>-1</sup>), because of a favorable solvation contribution.
- Scanning and transmission electron microscopy observations of the AT/amino- $\beta$ -CD polymer complexes show globular elements (around 100 nm), which tend to assemble themselves into bigger structures; transmission electron microscopy also shows the bridging interactions between basic complex particles, which appear like pincushions (substructural details in these complex particles, 30 nm sized globules).

#### Characterization of the AT-functionalized poly( $\epsilon$ -caprolactone) membranes

- Scanning electron microscopy observation of the functionalized membranes show the nanoreservoirs (50 nm), evenly spread on the surface of the membrane's fibers.
- The variation of Fluor (F) atomic concentration with etching time was measured by x-ray photoelectron spectroscopy. This element is related to the presence of AT in the samples; it seems slightly more concentrated on the surface but its signal remains unchanged in the membrane bulk.
- A spectrophotometric approach, by two different methods, leads to an estimation of quantities embedded in the membranes (70–90  $\mu$ g in 30  $\mu$ m  $\times$  6 mm membrane, NR5). Spectra confirm the absence of passive statin release (at pH 5.5). Membranes are stable after small loss upon pH change from 5.5 to 7.4 (3–4  $\mu$ g, 6%).

#### Anti-inflammatory properties of the AT-functionalized poly( $\epsilon$ -caprolactone) membranes

- Polycaprolactone membranes functionalized with AT repress TNF- $\alpha$  and IL-6 production in LPS-activated THP-1 cells.
- Both TNF- $\alpha$  and IL-6 secretion was reduced when cells were cultured on AT-containing membranes, at late time points (24 and 48 h post-LPS stimulation), while same membranes appeared inefficient on early (6 h) time points, mainly explained by the levels of cytokine produced at this time point (very little for IL-6, very high for TNF- $\alpha$ ). Rather than suggesting a limited efficacy, this observation indicated that the statin delivery from the biomaterial was delayed.
- TNF- $\alpha$  secretion reached about 60% inhibition and IL-6 about 80% at 48 h.
- Effects appeared dose dependent with regard to IL-6 secretion.

versatile therapeutic platform, it is likely to be applied for instance as a dual AT/BMP-2 delivery system for bone regeneration and inflammation modulation in periodontal repair.

### Acknowledgements

The authors wish to thank the Laboratory of Supramolecular Chemistry and Biomaterials, at ISIS center in Strasbourg, for the use of fluorescence spectrometer and Zetasizer. We also wish to thank V Demais (Electron Microscopy Platform, Neurochemistry Department, Strasbourg) and JL Weickert (Electron Microscopy Platform, IGBMC, Strasbourg) for their help in the electron microscopy studies.

### Financial & competing interests disclosure

This work was supported by the ANR project Imperio from the “Agence Nationale de la Recherche, ANR”. P Schwinté is indebted to “Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg” for financial support. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

### References

Papers of special note have been highlighted as: ● of interest; ●● of considerable interest

- Dinarelo CA. Anti-inflammatory agents: present and future. *Cell* 140(6), 935–950 (2010).
- Arnaud C, Braunersreuther V, Mach F. Toward immunomodulatory and anti-inflammatory properties of statins. *Trends Cardiovasc. Med.* 15(6), 202–206 (2005).
- Blanco-Colio LM, Tuñón J, Martín-Ventura JL, Egido J. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of statins. *Kidney Int.* 63(1), 12–23 (2003).
- Kinra P, Khan S. Simvastatin: its potential new role in periodontal regeneration. *Biol. Med.* 3(2), 215–221 (2011).
- Farsaei S, Khalili H, Farboud ES. Potential role of statins on wound healing: review of the literature. *Int. Wound J.* 9(3), 238–247 (2012).
- **This interesting review discusses the complicated process of wound healing implicating coordinated events including hemostasis, inflammation, proliferation, revascularization and remodeling, and discusses the effect of statins in these events.**
- Ciurleo R, Bramanti P, Marino S. Role of statins in the treatment of multiple sclerosis. *Pharmacol. Res.* 87, 133–143 (2014).
- Niessner A, Steiner S, Speidl WS *et al.* Simvastatin suppresses endotoxin-induced upregulation of toll-like receptors 4 and 2 *in vivo*. *Atherosclerosis* 189(2), 408–413 (2006).
- Wittebole X, Castanares-Zapatero D, Laterre PF. Toll-like receptor 4 modulation as a strategy to treat sepsis. *Mediators Inflamm.* 2010, 568396 (2010).
- Hilgendorff A, Muth H, Parviz B *et al.* Statins differ in their ability to block NF-kappaB activation in human blood monocytes. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 41(9), 397–401 (2003).
- Paul F, Waiczies S, Wuerfel J *et al.* Oral high-dose atorvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *PLoS ONE* 3(4), e1928 (2008).
- Hirsch R. Periodontal healing and bone regeneration in response to azithromycin. *Aust. Dent. J.* 55(2), 193–199 (2010).
- Minabe M, Kodama T, Kogou T *et al.* Clinical significance of antibiotic therapy in guided tissue regeneration with a resorbable membrane. *Periodontal Clin. Investig.* 23(1), 20–30 (2001).
- Chen P-Y, Sun J-S, Tsuang Y-H, Chen M-H, Weng P-W, Lin F-H. Simvastatin promotes osteoblast viability and differentiation via Ras/Smad/Erk/BMP-2 signaling pathway. *Nutr. Res.* 30(3), 191–199 (2010).
- Sakoda K, Yamamoto M, Negishi Y, Liao JK, Node K, Izumi Y. Simvastatin decreases IL-6 and IL-8 production in epithelial cells. *J. Dent. Res.* 85(6), 520–523 (2006).
- Usui M, Suda R, Miyazawa Y *et al.* Statin decreases IL-1 and LPS-induced inflammatory cytokines production in oral epithelial cells [Internet]. In: *New Frontiers in Lifestyle-Related Diseases*. Miyazaki A, Imawari M (Eds). Springer Japan, Tokyo, 125–131 (2008). [www.springerlink.com/index/10.1007/978-4-431-76428-1\\_14](http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-4-431-76428-1_14)
- Thomas MV, Puleo DA. Infection, inflammation, and bone regeneration: a paradoxical relationship. *J. Dent. Res.* 90(9), 1052–1061 (2011).
- Alsberg E, Kong HJ, Hirano Y, Smith MK, Albeiruti A, Mooney DJ. Regulating bone formation via controlled scaffold degradation. *J. Dent. Res.* 82(11), 903–908 (2003).
- Chen F-M, Shelton RM, Jin Y, Chapple ILC. Localized delivery of growth factors for periodontal tissue regeneration: role, strategies, and perspectives. *Med. Res. Rev.* 29(3), 472–513 (2009).
- Decher G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science* 277(5330), 1232–1237 (1997).

●● **The founding article about layer-by-layer strategy.**

- 20 Richert L, Lavalle P, Payan E *et al.* Layer by layer buildup of polysaccharide films: physical chemistry and cellular adhesion aspects. *Langmuir* 20(2), 448–458 (2004).
- 21 Ladam G, Schaaf P, Voegel JC, Schaaf P, Decher G, Cuisinier F. *In situ* determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 16(3), 1249–1255 (2000).
- 22 Mendoza-Palomares C, Ferrand A, Facca S *et al.* Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano* 6(1), 483–490 (2012).

●● **This article is the founding article about nanoreservoir technology: the cell contact dependent bioerodable nanoreservoirs described here permit sustained release of drugs, genes and growth factors, opening general route to the design of sophisticated cell-therapy implants for the regeneration of a broad variety of tissues.**

- 23 Salústio PJ, Feio G, Figueirinhas JL, Pinto JF, Cabral Marques HM. The influence of the preparation methods on the inclusion of model drugs in a beta-cyclodextrin cavity. *Eur. J. Pharm Biopharm.* 71(2), 377–386 (2009).
- 24 Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilisation and stabilisation. *J. Pharm. Sci.* 85(10), 1017–1025 (1996).
- 25 Frömring KH, Szejtli J. *Cyclodextrin in Pharmacy*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (1994).

●● **This is a specialized review about cyclodextrin, by a reknown cyclodextrin chemist.**

- 26 Loftsson T, Magnúsdóttir A, Másson M, Sigurjónsdóttir JF. Self-association and cyclodextrin solubilisation of drugs. *J. Pharm. Sci.* 91(11), 2307–2316 (2002).
- 27 Gould S, Scott RC. 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD): a toxicology review. *Food Chem. Toxicol.* 43(10), 1451–1459 (2005).
- 28 Benkirane-Jessel N, Schwinté P, Falvey P *et al.* Build-up of polypeptide multilayer coatings with anti-inflammatory properties based on the embedding of piroxicam–cyclodextrin complexes. *Adv. Funct. Mater.* 14(2), 174–182 (2004).
- **Describes an initiating former work of ours using cyclodextrin complexes of anti-inflammatory drug in layer-by-layer technology.**
- 29 Dey S, Chattopadhyay S, Mazumder B. Formulation and evaluation of fixed-dose combination of bilayer gastroretentive matrix tablet containing atorvastatin as fast-release and atenolol as sustained-release. *Bio. Med. Res. Int.* 2014, 1–12 (2014).
- 30 Lakshmi Narasaiah V, Kalyan Reddy B, Kishore K *et al.* Enhanced dissolution rate of atorvastatin calcium using solid dispersion with PEG 6000 by dropping method. *J. Pharm. Sci. Res.* 2(8), 484 (2010).
- 31 Hussein AK, Ibrahim MA, Amin MA, Ahmed OA, Afouna MI. Improved *in vitro* dissolution parameters and *in vivo* hypolipidemic efficiency of atorvastatin calcium through the formation of hydrophilic inclusion complex with cyclodextrins. *Drug Dev. Res.* 72(5), 379–390 (2011).
- 32 Kulthe VV, Chaudhari PD. Drug resinsates an attractive approach of solubility enhancement of atorvastatin calcium. *Indian J. Pharm. Sci.* 75(5), 523–532 (2013).
- 33 Jakalian A, Jack DB, Bayly CI. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *J. Comput. Chem.* 23(16), 1623–1641 (2002).
- 34 Wang J, Wang W, Kollman PA, Case DA. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J. Mol. Graph. Model.* 25(2), 247–260 (2006).
- 35 Case D, Darden T, Cheatham T III *et al.* AMBER 12. University of California, CA, USA (2012).
- 36 Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA. Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* 25(9), 1157–1174 (2004).
- 37 Sousa da Silva AW, Vranken WF. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface. *BMC Res. Notes* 5(1), 367 (2012).
- 38 Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E. GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.* 4(3), 435–447 (2008).
- 39 Nosé S, Klein ML. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. *Molecular Physics* 50(5), 1055–1076 (1983).
- 40 Bussi G, Donadio D, Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 126(1), 014101 (2007).
- 41 Hess B, Bekker H, Berendsen H, Fraaije J. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* 18, 1463 (1997).
- 42 Hess B. P-LINCS: a parallel linear constraint solver for molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.* 4(1), 116–122 (2008).
- 43 Kumari R, Kumar R. Open Source Drug Discovery Consortium, Lynn A. *g.mmpbsa* — a GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *J. Chem. Inf. Model.* 54(7), 1951–1962 (2014).
- 44 Paoisoni C, Spiliotopoulos D, Musco G, Spitaleri A. GMXPBSA 2.1: a GROMACS tool to perform MM/PBSA and computational alanine scanning. *Comput. Phys. Commun.* 186, 105–107 (2015).
- 45 Sitkoff D, Sharp KA, Honig B. Accurate calculation of hydration free energies using macroscopic solvent models. *J. Phys. Chem.* 98(7), 1978–1988 (1994).

- 46 Still WC, Tempczyk A, Hawley RC, Hendrickson T. Semi-analytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 6127 (1990).
- 47 Xie Y, Wang X, Huang R *et al.* Electrostatic and aromatic interaction-directed supramolecular self-assembly of a designed Fmoc-tripeptide into helical nanoribbons. *Langmuir* 31(9), 2885–2894 (2015).
- **Interesting article describing a system governed by supramolecular self-assembly based on electrostatic and aromatic interactions, and the various techniques used to study this.**
- 48 Cheow WS, Hadinoto K. Self-assembled amorphous drug-polyelectrolyte nanoparticle complex with enhanced dissolution rate and saturation solubility. *J. Colloid Interface Sci.* 367(1), 518–526 (2012).
- 49 Cheow WS, Hadinoto K. Green amorphous nanoplex as a new supersaturating drug delivery system. *Langmuir* 28(15), 6265–6275 (2012).
- 50 Yoon M-J, Choi H-N, Kwon H-W, Park K-H. Solvent dependence of absorption and fluorescence spectra of piroxicam. A possible intramolecular proton transfer in the excited state. *Bull. Korean Chem. Soc.* 9(3), 171–175 (1988).
- 51 Connors KA. *Binding Constants: The Measurement Of Molecular Complex Stability.* Wiley, NY, USA (1987).
- **The bible reference for researchers involved in physicochemical study of complexes.**
- 52 Shiralashetti Shivanand S, Patil Jagadevappa S. Design, characterization and evaluation of inclusion complexes of poorly soluble atorvastatin calcium. *Unique J. Pharm. Biol. Sci.* 2(2), 88–96 (2014).
- 53 Lv H-X, Zhang Z-H, Hui-Jiang null, Waddad AY, Zhou J-P. Preparation, physicochemical characteristics and bioavailability studies of an atorvastatin hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex. *Pharmazie* 67(1), 46–53 (2012).
- 54 Taksande Jayshree B, Lade Swati N, Trivedi Rashmi V, Mahore Jayashri G, Umekar Milind J. Effect of hydrophilic polymer on solubility and dissolution of Atorvastatin inclusion complex. *Int. J. Pharm. Chem. Sci.* 1(1), 374–385 (2012).
- 55 Schwinté P, Darcy R, O’Keeffe F. Ditopic binding of nucleotides by heptakis(6-hydroxyethylamino-6-deoxy)- $\beta$ -cyclodextrin. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*(4), 805–808 (1998).
- 56 Kollman PA, Massova I, Reyes C *et al.* Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Acc. Chem. Res.* 33(12), 889–897 (2000).
- 57 Wang WD, Gao X, Strohmeier M, Wang W, Bai S, Dybowski C. Solid-state NMR studies of form I of atorvastatin calcium. *J. Phys. Chem. B* 116(11), 3641–3649 (2012).
- 58 Zhang L, Jiao T, Ma K *et al.* Self-assembly and drug release capacities of organogels via some amide compounds with aromatic substituent headgroups. *Materials* 9(7), 541 (2016).
- 59 Yang Y, Zhang Y-M, Chen Y, Chen J-T, Liu Y. Targeted polysaccharide nanoparticle for adamplatin prodrug delivery. *J. Med. Chem.* 56(23), 9725–9736 (2013).
- 60 Yang Y, Zhang Y-M, Chen Y, Chen J-T, Liu Y. Polysaccharide-based noncovalent assembly for targeted delivery of taxol. *Sci. Rep.* 6, 19212 (2016).
- 61 Aouada FA, de Moura MR, Fernandes PRG, Rubira AF, Muniz EC. Optical and morphological characterization of polyacrylamide hydrogel and liquid crystal systems. *Eur. Polymer J.* 41(9), 2134–2141 (2005).
- 62 El Fray M, Pilaszkievich A, Swieszkowski W, Kurzydowski KJ. Morphology assessment of chemically modified cryostructured poly(vinyl alcohol) hydrogel. *Eur. Polymer J.* 43(5), 2035–2040 (2007).
- 63 Aikawa K, Matsumoto K, Uda H *et al.* Hydrogel formation of the pH response polymer polyvinylacetal diethylaminoacetate (AEA). *Int. J. Pharm.* 167(1–2), 97–104 (1998).
- 64 Pourjavadi A, Kurdtabar M. Collagen-based highly porous hydrogel without any porogen: synthesis and characteristics. *Eur. Polymer J.* 43(3), 877–889 (2007).
- 65 Dalmarco EM, Astolfi G, de Liz R, de Córdova CMM, Fröde TS. Modulatory effect of mycophenolate mofetil on carrageenan-induced inflammation in the mouse air pouch model. *Int. Immunopharmacol.* 13(4), 476–482 (2012).





# DICER1: A Key Player in Rheumatoid Arthritis, at the Crossroads of Cellular Stress, Innate Immunity, and Chronic Inflammation in Aging

Aurore De Cauwer<sup>1,2†</sup>, Alexandre Mariotte<sup>1,2†</sup>, Jean Sibilia<sup>1,2,3</sup>, Seiamak Bahram<sup>1,2</sup> and Philippe Georgel<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Strasbourg, INSERM, ImmunoRhumatologie Moléculaire UMR\_S 1109, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Faculté de Médecine, Strasbourg, France, <sup>2</sup> Fédération Hospitalo-Universitaire, OMICARE, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, Strasbourg, France, <sup>3</sup> Centre de Référence des Maladies Autoimmunes Rares, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Moncef Zouali,  
Institut National de la Santé et  
de la Recherche Médicale  
(INSERM), France

### Reviewed by:

Laura Mandik-Nayak,  
Lankenau Institute for Medical  
Research, United States  
Erika H. Noss,  
University of Washington,  
United States

### \*Correspondence:

Philippe Georgel  
pgeorgel@unistra.fr

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work.

### Specialty section:

This article was submitted  
to Autoimmune and  
Autoinflammatory Disorders,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 09 May 2018

Accepted: 04 July 2018

Published: 24 July 2018

### Citation:

De Cauwer A, Mariotte A, Sibilia J,  
Bahram S and Georgel P (2018)  
DICER1: A Key Player in Rheumatoid  
Arthritis, at the Crossroads of  
Cellular Stress, Innate Immunity, and  
Chronic Inflammation in Aging.  
Front. Immunol. 9:1647.  
doi: 10.3389/fimmu.2018.01647

Loss-of-function or knockout mouse models have established a fundamental role for the RNase III enzyme DICER1 in development and tissue morphogenesis and/or homeostasis. These functions are currently assumed to result mainly from the DICER1-dependent biogenesis of microRNAs which exhibit important gene expression regulatory properties. However, non-canonical DICER1 functions have recently emerged. These include interaction with the DNA damage response (DDR) pathway and the processing of cytotoxic non-coding RNAs, suggesting that DICER1 might also participate in the regulation of major cellular processes through miRNA-independent mechanisms. Recent findings indicated that reduced *Dicer1* expression, which correlates with worsened symptoms in mouse models of joint inflammation, is also noted in fibroblast-like synoviocytes (FLS) harvested from rheumatoid arthritis (RA) patients, as opposed to FLS cultured from biopsies of osteoarthritic patients. In addition, low DICER1 levels are associated with the establishment of cellular stress and its associated responses, such as cellular senescence. Senescent and/or stressed cells are associated with an inflammatory secretome (cytokines and chemokines), as well as with “find-me” and “eat-me” signals which will attract and activate the innate immune compartment (NK cells, macrophages, and neutrophils) to be eliminated. Failure of this immunosurveillance mechanism and improper restoration of homeostasis could lead to the establishment of a systemic and chronic inflammatory state. In this review, we suggest that reduced DICER1 expression contributes to a vicious cycle during which accumulating inflammation and premature senescence, combined to inadequate innate immunity responses, creates the appropriate conditions for the initiation and/or progression of autoimmune-autoinflammatory diseases, such as RA.

**Keywords:** Dicer1, inflammation, rheumatoid arthritis, senescence, ageing

## BIOLOGICAL ROLES OF DICER1

### The Canonical Role of DICER1: MicroRNA (miRNA) Biogenesis

Since its discovery by Bernstein et al. (1), the RNase III enzyme DICER (encoded by the *DICER1* gene in *H. sapiens* and *Dicer1* in *Mus musculus*, the nomenclature that will be used throughout this review) has been extensively studied and its role in the miRNA biogenesis is today well described [reviewed in Ref. (2)]. miRNA synthesis usually begins with the RNA polymerase II-dependent

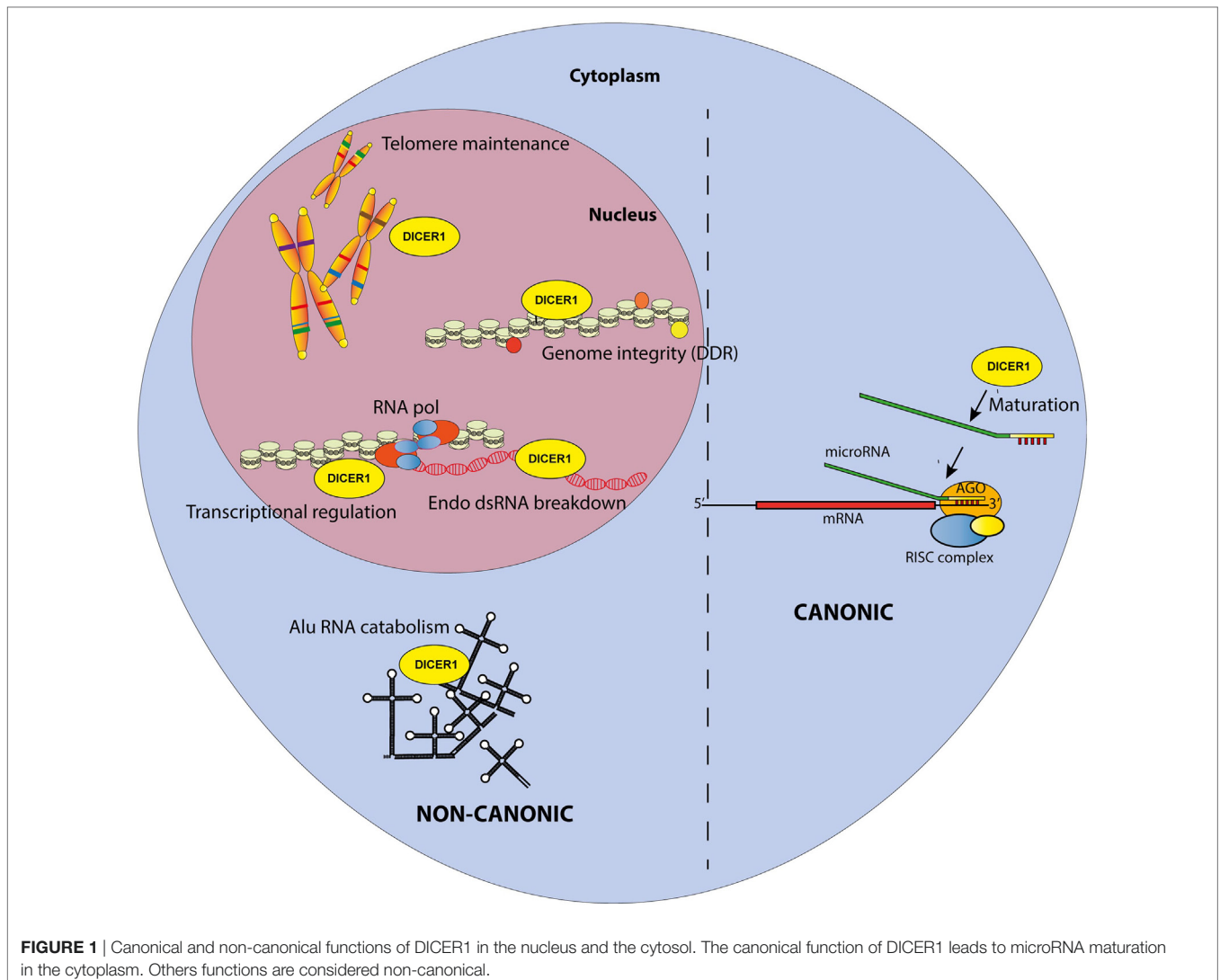
transcription of genes encoding primary-miRNAs (pri-miRNAs), which are several kilobase-long stem-loop transcripts. Alternatively, pri-miRNAs can also originate from introns of protein coding genes. Whatever their origin, pri-miRNAs are then processed by the nuclear microprocessor complex DROSHA/DiGeorge syndrome Critical Region 8 (DGCR8) into precursor microRNAs (pre-miRNAs). Those 60–80 nucleotide-long precursors are then exported to the cytoplasm where they are recognized and cleaved by DICER1 into a 20–22 nucleotide-long RNA duplex (**Figure 1**). One miRNA strand is conserved and loaded into the RNA-induced silencing complex (RISC) composed of argonaute proteins. Guided by the miRNA, the RISC complex hybridizes with complementary mRNAs leading to either their degradation or translational inhibition. Therefore, DROSHA, DICER1, and miRNA are core factors of the Post-Transcriptional Gene Silencing process, a key regulatory mechanism of gene expression. In addition, several miRNAs are produced upon non-canonical pathway because their synthesis bypasses some of the aforementioned steps; those are Mirtons (whose synthesis is DROSHA-independent) (3) and

miR-451, the only DICER1-independent miRNA described up to now (4, 5).

Interestingly, a study aiming at re-evaluating the contribution of the different key factors in miRNA biogenesis showed that while DROSHA is actually irreplaceable in the canonical miRNA synthesis, some miRNAs are still produced, albeit at reduced levels, without DICER1 (6). These observations, along with ours showing that reduced expression of DICER1 in fibroblast-like synoviocytes (FLS) from rheumatoid arthritis (RA) patients is associated with no more than a modest reduction of miRNA production (7), strongly suggest that other roles, besides miRNAs maturation, might be attributed to DICER1. Indeed, marked phenotypes have been observed in targeted (tissue-specific) *Dicer1* knockout mouse mutants, despite a noticeable preserved (and even sometimes increased) expression of many mature miRNAs.

### DICER1 Non-Canonical Roles

Accordingly, multiple reports have now described the existence of non-canonical, miRNA-independent, roles of DICER1



**FIGURE 1** | Canonical and non-canonical functions of DICER1 in the nucleus and the cytosol. The canonical function of DICER1 leads to microRNA maturation in the cytoplasm. Others functions are considered non-canonical.

(**Figure 1**). Those functions are essentially implicated in nuclear RNAi and have been thoroughly reviewed elsewhere (8). In brief, DICER1, associated with TAR RNA Binding Protein and Protein activator of protein kinase R (PKR) (TRBP/PACT), was shown to regulate the transcription of a subset of hormone-inducible genes by interacting with their promoters in a dsRNA-dependent manner. Nuclear DICER1 is also implicated in the processing of endogenous dsRNA originating from overlapping transcription units, thereby protecting the cells from interferon (IFN)-mediated apoptosis. In addition, DICER1 plays an essential role in the maintenance of genome integrity (9), especially through interactions with the DNA damage response (DDR) pathway. It has been shown that in response to double-strand breaks in DNA, DICER1-dependent accumulation of break-specific dsRNAs facilitates the recruitment of repair factors. Interestingly, this mechanism is also needed for the maintenance of telomeres (10).

Furthermore, the cytoplasm is also a major site of DICER1 non-canonical functions, which have been extensively studied over the last decade. A first hint for such roles was discovered in patients with age-related macular degeneration, which exhibit reduced DICER1 expression in retinal pigmented epithelium cells. In these cells, low *Dicer1* (but, importantly, not any of the other genes involved in miRNA production) expression triggered by shRNA knockdown in mice leads to cytotoxic accumulation of non-coding dsRNA formed upon the transcription Alu sequences (repetitive elements abundantly present in the human genome and classified as short interspersed nuclear elements (SINE)—retrotransposon family) (11). Accumulating Alu RNAs lead to a toll-like receptor (TLR)-independent, P2X7- and ROS-dependent activation of the NLRP3 inflammasome. The resulting maturation and secretion of IL-18 induces an MYD88-dependent pathway and caspase-8-mediated cell death, leading to macular degeneration (12–14).

Altogether, these data point to potentially devastating effects of *DICER1* mis-expression which can theoretically affect all steps of gene expression in both nuclear (replication/transcription/splicing) and cytoplasmic (translation) compartments.

## DICER1 IN INFLAMMATION

### miRNAs in Inflammation: Prominent Roles for miR-155 and -146a

There are 1,917 human miRNA sequences in the most recent miR database. This relatively large number, together with the capacity of every miRNA to target hundreds of mRNAs (15), indicates that they are able to virtually impact every biological function. It is therefore very much expected for miRNAs to be involved in most pathophysiological settings, among which inflammation and associated diseases were particularly scrutinized. In this context, miR-155 and -146a have been extensively described because they clearly exhibit crucial regulatory functions in innate and adaptive immunity. Indeed, miR-146a has been described as a mandatory regulator of the NF- $\kappa$ B pathway in T cells, targeting TRAF6 and IRAK1 (16). miR-146a was also correlated and functionally associated with the control of TNF- $\alpha$

production downstream of several TLRs and to the LPS tolerance phenomenon (17). In this report, it was notably observed that miR-146a is increased in human monocytic cells following LPS re-exposure. Until now, many groups found a pronounced inflammation-limiting role for miR-146a in various inflammatory settings, from atopic dermatitis (18) to sepsis (19). Strong evidence also attests that miR-146a participates in inflammatory disorders such as gout (20, 21) and RA [Ref. (22, 23) and see below].

miR-155, encoded by the *bic* locus, has been described as a major actor in inflammatory responses (24–26). miR-155 is considered a main driver of inflammatory responses through a large array of networks and its down-modulation is associated with termination of acute inflammation, as exemplified in the case of glucocorticoid treatments (27). Interestingly, the inflammatory effects of miR-155 are counteracted by miR-146a, as evidenced by a murine model where the deletion of the former is able to abrogate the inflammation induced by the loss of the latter (28). In essence, miR-155 and -146a, which roles were comprehensively analyzed in mouse knockout models, are considered as major players in the regulation of inflammatory responses.

Interestingly, miRNA biogenesis and the cellular stress response are tightly interconnected (29). This can be illustrated by the reciprocal interactions between type I IFNs-I, cytokines of paramount importance in the resolution of a virus-induced stress, which can modulate *DICER1* gene expression (30). In return, mice carrying a mutation in the *DICER1* gene exhibit an altered transcriptional profile of miRNA-regulated, IFN-stimulated genes (31). It is also noteworthy to observe that miR-124, a major player in the regulation of stress-induced genes in the brain (32), has recently been shown to modulate inflammation in a rat model of arthritis (33).

### Non-Canonical Roles of DICER1 in Inflammation

Evidence directly implicating non-canonical roles of DICER1 in inflammatory responses is scarce. To date, only two examples can be mentioned: (1) the DICER1-dependent processing of Alu RNAs which precludes the harmful activation of NLRP3 Inflammasome and the maturation/secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 (11) (see above) and (2) the involvement of nuclear DICER1 in the processing of dsRNA transcripts from overlapping loci, thus preventing an uncontrolled IFN response (34).

Regulation of IFN secretion and IFN-mediated responses are of high interest because excessive production of these cytokines is associated with several autoimmune diseases. Of note, dysregulation of *DICER1* expression has been linked to the modulation IFN responses, a feature which is considered to result from global miRNA deregulation. *DICER1* ablation in endometrial cancer cells was also linked to an increased IFN- $\beta$  secretion and subsequent upregulation of IFN-stimulated genes (35). However, this response was interpreted as the consequence of cytoplasmic accumulation of pre-miRNAs which are able to trigger the activation of dsRNA sensors, hence leading to an IFN



response. More recently, DICER1's ablation in tumor-associated macrophages was shown to polarize the cells toward an M1-like phenotype associated with hyperactive IFN $\gamma$ /STAT1 signaling. This observation, described as the result of decreased expression of the let-7 miRNA, can only be partially rescued by transduction with a lentivirus expressing let-7 (36). It is then conceivable that non-canonical roles of DICER1 might also play a role in the M1/M2 macrophage polarization. Nevertheless, this model, whereby unprocessed dsRNAs accumulate in the cytosol upon DICER1 deficiency and drive inflammatory responses, has been poorly explored so far.

Of note, an increase in cytoplasmic Alu RNA following stress promotes disassembly of stress granules (SGs) (37). Since SGs decrease the interactions between DICER1 and its co-factors, thereby reducing its activity (38), a cross-talk between stress-induced pathways and miRNA-independent functions of DICER1 appears also plausible. Furthermore, SGs negatively regulate the production of inflammatory cytokine such as IL-1 $\beta$  by controlling mRNAs stability and decay (39). Hence, impairment of this activity upon Alu RNA accumulation would also contribute to promote inflammation.

### DICER1 in Aging

Aging is an important risk factor for the development of inflammatory disorders/diseases (40). In rodents, aging has been associated with a decreased expression of *DICER1* in the adipose tissue (41). In human, octogenarians, compared with centenarians, exhibit global decrease in miRNA expression as well as reduced expression of miRNA biogenesis factors including DICER1 in blood cells (42, 43). However, these observations do not provide mechanistic insights for the contribution of DICER1 in the aging process. Of course, many miRNAs (such as miR-34) targeting emblematic pathways involved in senescence (e.g., P53/P21) have been described (44) and are likely to play a role in aging. Nevertheless, aging is a complex process characterized by nine hallmarks: genomic instability, telomere attrition, epigenetic alterations, loss of proteostasis, deregulated nutrient-sensing, mitochondrial dysfunction, cellular senescence, stem cell exhaustion, and altered intercellular communication (45), all of which are possibly impacted by *DICER1* misexpression, not only through impaired miRNAs maturation but also because non-canonical DICER1 functions may be affected as well.

With regards to genomic instability, the role of DICER1 in the processing of RNAs transcribed from retrotransposons belonging to long- or short-interspersed nuclear elements (line or SINE) families participates in the prevention of retrotransposition deleterious events (46). In addition, accumulation of Alu RNAs was found to restrain "stemcellness" and is associated with persistent DNA damage preventing tissue renewal (47). Their DICER1-dependent elimination is therefore required to maintain tissue homeostasis. Next, DICER1 is implicated in the DDR pathway by processing dsRNA essential for the DNA double-strand break repair. This process seems also to be necessary to prevent a second hallmark of aging, telomere shortening (10). Moreover, *DICER1* deletion has been associated with epigenetic alterations, such as chromatin remodeling, DNA methylation, and histone modification in mammalian cells (48, 49).

Evidence in favor of a role of DICER1 in altered nutrient sensing and mitochondrial dysfunction is less documented. However, it was demonstrated that DICER1-depletion in adipocytes (i) overactivates the sensing signaling molecule mTORC1 and (ii) reduces mitochondria numbers, which are also irregularly shaped and associated with reduced oxidative metabolism in response to caloric restriction (50). As mentioned above, senescence has been amply described in relation to modified miRNA expression [e.g., Ref. (51)] but was also linked to Alu RNAs accumulation (47). Finally, downregulation of *Il-8* expression in endothelial cells upon *DICER1* knockdown (52) illustrates the potential impact of this multifunctional enzyme in the last hallmark of aging: cellular communication.

With regards to RA, normal aging of the immune system (immunosenescence) is associated with a higher risk to develop autoimmune disorders, including RA (53, 54). Alternatively, systemic joint inflammation may enhance the progression of immunosenescence and favor the development of comorbidities in RA patients (55).

### DICER1 AND MIRNAS ARE MAJOR PLAYERS IN RA

Rheumatoid arthritis is a systemic autoimmune disease affecting around 1% of the global population. This rheumatic disease is characterized by multiple joint swelling, stiffness, and inflammatory pain, mainly in the small joints of hands and feet (56). Although the auto-immune feature of RA is clearly demonstrated, several decades of research have established a major role for the innate immune system and stromal cells in this disease (57). It is now commonly admitted that RA is a multifactorial disease, where its initiation and development requires concomitant participation of genetic, epigenetic, and environmental factors. Among epigenetic players involved in RA, miRNAs have been the focus of intense attention over the past decade (58).

There are presently more than 20 miRNAs, expression of which is deregulated in various cells (T cells, monocytes, and FLS)/compartments (blood and synovial fluid) harvested from RA patients (59, 60), and our lab has contributed to the identification of several of them within the miR-17~92 cluster (61–63). However, likely because RA etiology relies on innate and adaptive immune systems, miR-146a and -155, both of which have been involved in the regulation of adaptive (such as T cells-mediated) and inflammatory (e.g., in monocytes) responses, have been extensively studied in this disease. miR-146a is increased in RA patients (64–66) and is supposed to be integrated in a feedback loop, triggered by the unrestrained inflammation (67). Furthermore, murine models of RA have clearly shown that miR-146a restrains osteoclastogenesis (23). miR-155 is also upregulated in FLS and peripheral blood CD14-positive cells of RA patients (68, 69). In addition, its expression was correlated to the Disease Activity Score on 28 joints (DAS28) (70). Interestingly, miR-155 is also required for the development of the disease in the collagen-induced arthritis model, a commonly used mouse model of autoimmune arthritis (71). In FLS, upregulation of both miR-146a and miR-155 was

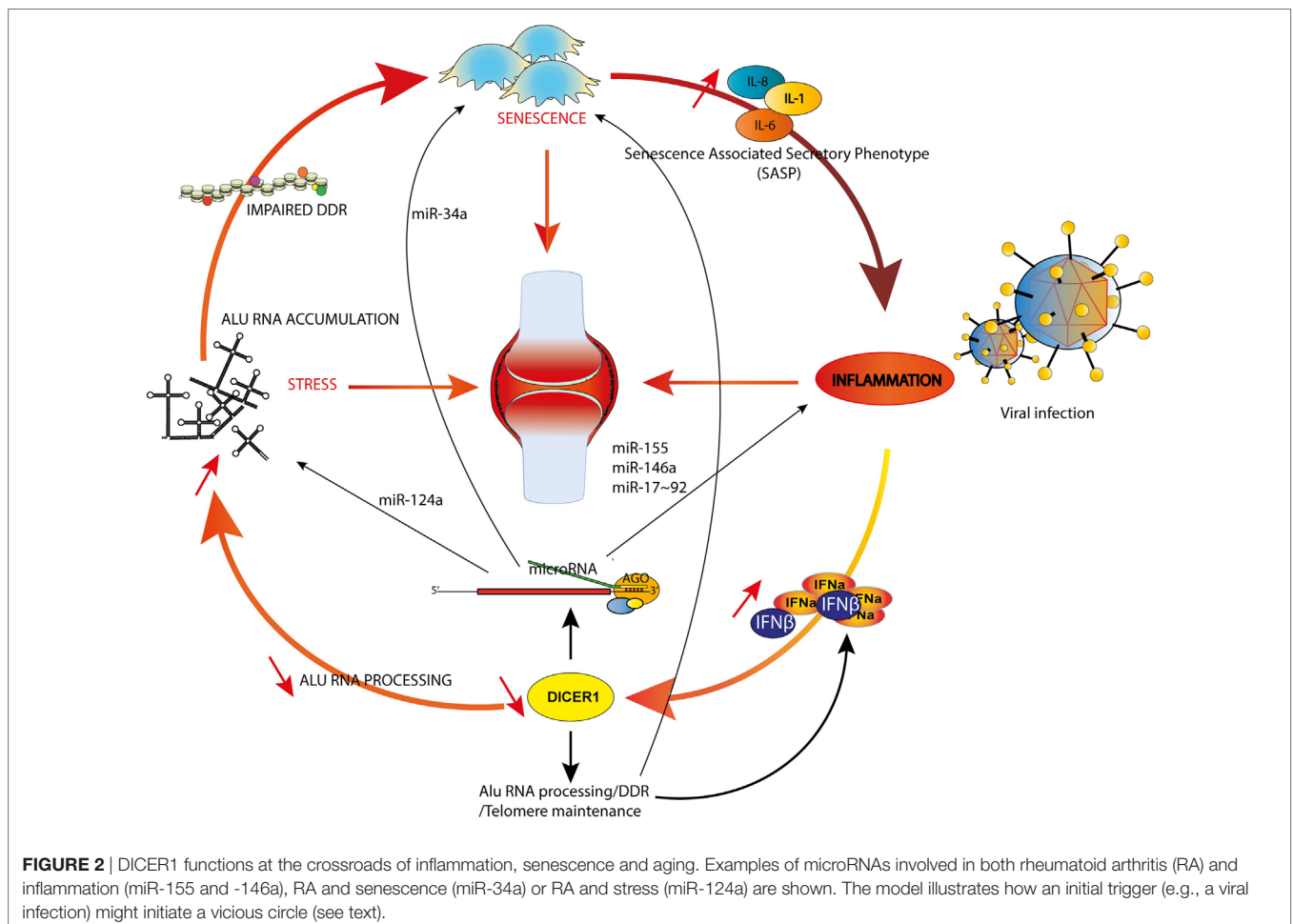
correlated to negative regulation of osteoclastogenesis/MMP production. Therefore, this increased expression was interpreted as a way to limit the RA-associated osteoarticular destruction processes (64).

On the other hand, reduced miR-146a and -155 expression in regulatory T cells (Treg) has also been incriminated in RA (22), which illustrates that a global perturbation (driving either an overexpression or a down-modulation) of miRNA production is unlikely to represent a major trigger of RA pathogenesis. Indeed, increased (or decreased) miRNAs in activated T cells might be compensated by similar alterations in Tregs, and *vice versa*. In this regard, our observations indicating that (i) *Dicer1*-deficient mice exhibit worsened symptoms following experimental (upon K/BxN serum transfer) arthritis induction and (ii) that FLS cultivated from biopsies harvested in RA patients exhibit reduced *DICER1* expression (7) pinpoint to a potential involvement of non-canonical, miRNA-independent activities of DICER1 in joint inflammation. Several possibilities might be considered in line with the abovementioned roles of DICER1 in the processing of Alu sequences. For instance, abolishing DICER1 activity may lead to reduced production of Alu repeat-induced small RNAs (riRNAs) in the nucleus, thereby limiting the proliferative capacities of stem cells (72) and

impairing tissue renewal in the joint. Combined with increased DNA damage (73) which is accompanied with the initiation of senescence, reduced DICER1 non-canonical activities might drive the accumulation of aged FLS resistant to apoptotic stimuli (7) and exhibiting pro-inflammatory capabilities [through IL-6, an essential component of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) (74)], a dangerous cocktail likely driving their aggressive phenotype observed in RA patients. As mentioned above, *Dicer1* expression is negatively regulated by inflammatory cytokines such as type I IFNs, further aggravating the inflammatory response.

## DICER1 AT THE CROSSROADS BETWEEN SENESCENCE AND INFLAMMATION IN RA

These multiple interactions are integrated in the model illustrated in **Figure 2**. We considered three main triggers (or hallmarks) of RA, aging (75), inflammation [through specific cytokines (76)], and stress (77) and their reciprocal interconnections mediated by canonical and non-canonical functions of DICER1. For sake of simplicity, we emphasized only specific miRNAs and other



DICER1 ligands (such as Alu RNAs), but nevertheless, our model supports the notion that DICER1 alterations might perturb every trigger of RA and initiate a chain reaction actually driving pathogenesis. Indeed, their interactions create the appropriate conditions to build a vicious circle which can for instance, start with IFN-dependent *DICER1* down-modulation (for example, as a result of a chronic viral infection). This initial event might contribute to accumulation of Alu RNAs and other dsRNAs in the cytoplasm, which favor the survival of senescent cells in which DNA damages are poorly fixed (hence increasing the inflammatory settings through the SASP) and reduced formation of SGs, leading to an impaired degradation of viral RNAs. Viral RNAs and cytoplasmic endogenous dsRNAs will ultimately enhance type I IFN production and amplify the vicious circle. Of course, this model is incomplete and could also, for instance, integrate metabolism (or other environmental factors contributive to RA). Interestingly, interactions between PKR, TRBP, and DICER1 were described, suggesting an additional (miRNA-independent) role for DICER1 in immunometabolism (78).

## CONCLUDING REMARKS

Precisely evaluating the various roles of DICER1 appears a challenging task due to its complex and pleiotropic roles. Furthermore, factors that influence *DICER1* gene expression in specific cells and at defined developmental stages are still poorly described. In addition, *DICER1* transcripts and protein levels are not always correlated (79), adding another layer of complexity. Moreover, DICER1 activity appears regulated by post-translational modification such as phosphorylation and SUMOylation (80), and the protein can shuttle between the

cytosol and the nucleus and exert different activities in these two compartments, depending on associations with various co-factors. For instance, DICER1-efficient processing activity of Alu RNAs depends on poly(C)-binding protein 2 binding, which is inhibited by iron overload (81).

Here, we provided several examples of reciprocal interactions between DICER1 and mechanisms (stress, inflammation, and aging) that can be either considered as triggers (or inducers of *DICER1* expression) or effectors (i.e., that are able to respond to DICER1-dependent products such as miRNAs or metabolites of Alu or other long non-coding RNAs). We suggest that within this complex network of interactions, DICER1 occupies a central position. In this model, perturbations of these interactions modify homeostasis and drive pathogenesis. The focus of this review has been RA, but this network can be extended to other age-dependent pathological conditions, beyond autoimmune or inflammatory diseases, such as cancer or neurodegeneration.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

PG, AC, AM, JS, and SB participated in discussions; drafted and approved the manuscript.

## FUNDING

The work in our laboratory is supported by funding from INSERM, Strasbourg University, the Laboratoire d'Excellence TRANSPLANTE (ANR-11-LABX-0070\_TRANSPLANTE) and the PRTS ANR program (SPIRALE), Institut Universitaire de France and MSD Avenir program AUTOGEN.

## REFERENCES

- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* (2001) 409(6818):363–6. doi:10.1038/35053110
- Bartel DP. Metazoan microRNAs. *Cell* (2018) 173(1):20–51. doi:10.1016/j.cell.2018.03.006
- Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* (2007) 448(7149):83–6. doi:10.1038/nature05983
- Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* (2010) 465(7298):584–9. doi:10.1038/nature09092
- Cifuentes D, Xue H, Taylor DW, Patnode H, Mishima Y, Cheloufi S, et al. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science* (2010) 328(5986):1694–8. doi:10.1126/science.1190809
- Kim YK, Kim B, Kim VN. Re-evaluation of the roles of DROSHA, xport in 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2016) 113(13):E1881–9. doi:10.1073/pnas.1602532113
- Alsaleh G, Nehmar R, Bluml S, Schleiss C, Ostermann E, Dillenseger JP, et al. Reduced DICER1 expression bestows rheumatoid arthritis synoviocytes proinflammatory properties and resistance to apoptotic stimuli. *Arthritis Rheumatol* (2016) 68(8):1839–48. doi:10.1002/art.39641
- Burger K, Gullerova M. Swiss army knives: non-canonical functions of nuclear Drosha and Dicer. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2015) 16(7):417–30. doi:10.1038/nrm3994
- Hawley BR, Lu WT, Wilczynska A, Bushell M. The emerging role of RNAs in DNA damage repair. *Cell Death Differ* (2017) 24(4):580–7. doi:10.1038/cdd.2017.16
- Rossiello F, Aguado J, Sepe S, Iannelli F, Nguyen Q, Pitchiaya S, et al. DNA damage response inhibition at dysfunctional telomeres by modulation of telomeric DNA damage response RNAs. *Nat Commun* (2017) 8:13980. doi:10.1038/ncomms13980
- Kaneko H, Dridi S, Tarallo V, Gelfand BD, Fowler BJ, Cho WG, et al. DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature* (2011) 471(7338):325–30. doi:10.1038/nature09830
- Tarallo V, Hirano Y, Gelfand BD, Dridi S, Kerur N, Kim Y, et al. DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88. *Cell* (2012) 149(4):847–59. doi:10.1016/j.cell.2012.03.036
- Kim Y, Tarallo V, Kerur N, Yasuma T, Gelfand BD, Bastos-Carvalho A, et al. DICER1/Alu RNA dysmetabolism induces Caspase-8-mediated cell death in age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111(45):16082–7. doi:10.1073/pnas.1403814111
- Kerur N, Hirano Y, Tarallo V, Fowler BJ, Bastos-Carvalho A, Yasuma T, et al. TLR-independent and P2X7-dependent signaling mediate Alu RNA-induced NLRP3 inflammasome activation in geographic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2013) 54(12):7395–401. doi:10.1167/iovs.13-12500
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* (2009) 136(2):215–33. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
- Yang L, Boldin MP, Yu Y, Liu CS, Ea CK, Ramakrishnan P, et al. miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice. *J Exp Med* (2012) 209(9):1655–70. doi:10.1084/jem.20112218
- Nahid MA, Pauley KM, Satoh M, Chan EK. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: implication in innate immunity. *J Biol Chem* (2009) 284(50):34590–9. doi:10.1074/jbc.M109.056317
- Rebane A, Runnel T, Aab A, Maslovskaja J, Ruckert B, Zimmermann M, et al. MicroRNA-146a alleviates chronic skin inflammation in atopic dermatitis

- through suppression of innate immune responses in keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol* (2014) 134(4):836–47.e11. doi:10.1016/j.jaci.2014.05.022
19. Gao M, Wang X, Zhang X, Ha T, Ma H, Liu L, et al. Attenuation of cardiac dysfunction in polymicrobial sepsis by MicroRNA-146a is mediated via targeting of IRAK1 and TRAF6 expression. *J Immunol* (2015) 195(2):672–82. doi:10.4049/jimmunol.1403155
  20. Zhang QB, Qing YF, Yin CC, Zhou L, Liu XS, Mi QS, et al. Mice with miR-146a deficiency develop severe gouty arthritis via dysregulation of TRAF 6, IRAK 1 and NALP3 inflammasome. *Arthritis Res Ther* (2018) 20(1):45. doi:10.1186/s13075-018-1546-7
  21. Dalbeth N, Pool B, Shaw OM, Harper JL, Tan P, Franklin C, et al. Role of miR-146a in regulation of the acute inflammatory response to monosodium urate crystals. *Ann Rheum Dis* (2015) 74(4):786–90. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205409
  22. Zhou Q, Haupt S, Kreuzer JT, Hammitzsch A, Proft F, Neumann C, et al. Decreased expression of miR-146a and miR-155 contributes to an abnormal Treg phenotype in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (2015) 74(6):1265–74. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204377
  23. Saferding V, Puchner A, Goncalves-Alves E, Hofmann M, Bonelli M, Brunner JS, et al. MicroRNA-146a governs fibroblast activation and joint pathology in arthritis. *J Autoimmun* (2017) 82:74–84. doi:10.1016/j.jaut.2017.05.006
  24. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104(5):1604–9. doi:10.1073/pnas.0610731104
  25. O'Connell RM, Kahn D, Gibson WS, Round JL, Scholz RL, Chaudhuri AA, et al. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity* (2010) 33(4):607–19. doi:10.1016/j.immuni.2010.09.009
  26. Alivernini S, Gremese E, McSharry C, Tulusso B, Ferraccioli G, McInnes IB, et al. MicroRNA-155 at the critical interface of innate and adaptive immunity in arthritis. *Front Immunol* (2017) 8:1932. doi:10.3389/fimmu.2017.01932
  27. Zheng Y, Xiong S, Jiang P, Liu R, Liu X, Qian J, et al. Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-mediated inflammatory response by downregulating microRNA-155: a novel anti-inflammation mechanism. *Free Radic Biol Med* (2012) 52(8):1307–17. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.031
  28. Mann M, Mehta A, Zhao JL, Lee K, Marinov GK, Garcia-Flores Y, et al. An NF-kappaB-microRNA regulatory network tunes macrophage inflammatory responses. *Nat Commun* (2017) 8(1):851. doi:10.1038/s41467-017-00972-z
  29. Emde A, Hornstein E. miRNAs at the interface of cellular stress and disease. *EMBO J* (2014) 33(13):1428–37. doi:10.15252/embj.201488142
  30. Wiesen JL, Tomasi TB. Dicer is regulated by cellular stresses and interferons. *Mol Immunol* (2009) 46(6):1222–8. doi:10.1016/j.molimm.2008.11.012
  31. Ostermann E, Tuddenham L, Macquin C, Alsaleh G, Schreiber-Becker J, Tanguy M, et al. Dereglulation of type I IFN-dependent genes correlates with increased susceptibility to cytomegalovirus acute infection of dicer mutant mice. *PLoS One* (2012) 7(8):e43744. doi:10.1371/journal.pone.0043744
  32. Sun Y, Luo ZM, Guo XM, Su DF, Liu X. An updated role of microRNA-124 in central nervous system disorders: a review. *Front Cell Neurosci* (2015) 9:193. doi:10.3389/fncel.2015.00193
  33. Nakamachi Y, Ohnuma K, Uto K, Noguchi Y, Saegusa J, Kawano S. MicroRNA-124 inhibits the progression of adjuvant-induced arthritis in rats. *Ann Rheum Dis* (2016) 75(3):601–8. doi:10.1136/annrheumdis-2014-206417
  34. White E, Schlackow M, Kamieniarz-Gdula K, Proudfoot NJ, Gullerova M. Human nuclear Dicer restricts the deleterious accumulation of endogenous double-stranded RNA. *Nat Struct Mol Biol* (2014) 21(6):552–9. doi:10.1038/nsmb.2827
  35. Chiappinelli KB, Haynes BC, Brent MR, Goodfellow PJ. Reduced DICER1 elicits an interferon response in endometrial cancer cells. *Mol Cancer Res* (2012) 10(3):316–25. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0520
  36. Baer C, Squadrato ML, Laoui D, Thompson D, Hansen SK, Kiiialainen A, et al. Suppression of microRNA activity amplifies IFN-gamma-induced macrophage activation and promotes anti-tumour immunity. *Nat Cell Biol* (2016) 18(7):790–802. doi:10.1038/ncb3371
  37. Berger A, Ivanova E, Gareau C, Scherrer A, Mazroui R, Strub K. Direct binding of the Alu binding protein dimer SRP9/14 to 40S ribosomal subunits promotes stress granule formation and is regulated by Alu RNA. *Nucleic Acids Res* (2014) 42(17):11203–17. doi:10.1093/nar/gku822
  38. Emde A, Eitan C, Liou LL, Libby RT, Rivkin N, Magen I, et al. Dysregulated miRNA biogenesis downstream of cellular stress and ALS-causing mutations: a new mechanism for ALS. *EMBO J* (2015) 34(21):2633–51. doi:10.15252/embj.201490493
  39. Battu S, Afroz S, Giddaluru J, Naz S, Huang W, Khumukcham SS, et al. Amino acid starvation sensing dampens IL-1beta production by activating ribocustering and autophagy. *PLoS Biol* (2018) 16(4):e2005317. doi:10.1371/journal.pbio.2005317
  40. Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat Rev Immunol* (2013) 13(12):875–87. doi:10.1038/nri3547
  41. Mori MA, Raghavan P, Thomou T, Boucher J, Robida-Stubbs S, Macotela Y, et al. Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity. *Cell Metab* (2012) 16(3):336–47. doi:10.1016/j.cmet.2012.07.017
  42. Serna E, Gambini J, Borrás C, Abdelaziz KM, Belenguer A, Sanchis P, et al. Centenarians, but not octogenarians, up-regulate the expression of microRNAs. *Sci Rep* (2012) 2:961. doi:10.1038/srep00961
  43. Borrás C, Serna E, Gambini J, Ingles M, Vina J. Centenarians maintain miRNA biogenesis pathway while it is impaired in octogenarians. *Mech Ageing Dev* (2017) 168:54–7. doi:10.1016/j.mad.2017.07.003
  44. Munk R, Panda AC, Grammatikakis I, Gorospe M, Abdelmohsen K. Senescence-associated microRNAs. *Int Rev Cell Mol Biol* (2017) 334:177–205. doi:10.1016/bs.icmb.2017.03.008
  45. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* (2013) 153(6):1194–217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
  46. Heras SR, Macias S, Caceres JF, Garcia-Perez JL. Control of mammalian retrotransposons by cellular RNA processing activities. *Mob Gen Elements* (2014) 4:e28439. doi:10.4161/mge.28439
  47. Wang J, Geesman GJ, Hostikka SL, Atallah M, Blackwell B, Lee E, et al. Inhibition of activated pericentromeric SINE/Alu repeat transcription in senescent human adult stem cells reinstates self-renewal. *Cell Cycle* (2011) 10(17):3016–30. doi:10.4161/cc.10.17.17543
  48. Haussecker D, Proudfoot NJ. Dicer-dependent turnover of intergenic transcripts from the human beta-globin gene cluster. *Mol Cell Biol* (2005) 25(21):9724–33. doi:10.1128/MCB.25.21.9724-9733.2005
  49. Chitale S, Richly H. DICER and ZRF1 contribute to chromatin decondensation during nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res* (2017) 45(10):5901–12. doi:10.1093/nar/gkx261
  50. Reis FC, Branquinho JL, Brandao BB, Guerra BA, Silva ID, Frontini A, et al. Fat-specific Dicer deficiency accelerates aging and mitigates several effects of dietary restriction in mice. *Aging* (2016) 8(6):1201–22. doi:10.18632/aging.100970
  51. Noren Hooten N, Martin-Montalvo A, Dluzen DF, Zhang Y, Bernier M, Zonderman AB, et al. Metformin-mediated increase in DICER1 regulates microRNA expression and cellular senescence. *Aging Cell* (2016) 15(3):572–81. doi:10.1111/acel.12469
  52. Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Pober JS, Sessa WC. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res* (2007) 100(8):1164–73. doi:10.1161/01.RES.0000265065.26744.17
  53. van Onna M, Boonen A. The challenging interplay between rheumatoid arthritis, ageing and comorbidities. *BMC Musculoskelet Disord* (2016) 17:184. doi:10.1186/s12891-016-1038-3
  54. Straub RH, Scholmerich J, Cutolo M. The multiple facets of premature aging in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (2003) 48(10):2713–21. doi:10.1002/art.11290
  55. Rea IM, Gibson DS, McGilligan V, McNerlan SE, Alexander HD, Ross OA. Age and age-related diseases: role of inflammation triggers and cytokines. *Front Immunol* (2018) 9:586. doi:10.3389/fimmu.2018.00586
  56. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* (2011) 365(23):2205–19. doi:10.1056/NEJMra1004965
  57. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity* (2017) 46(2):183–96. doi:10.1016/j.immuni.2017.02.006

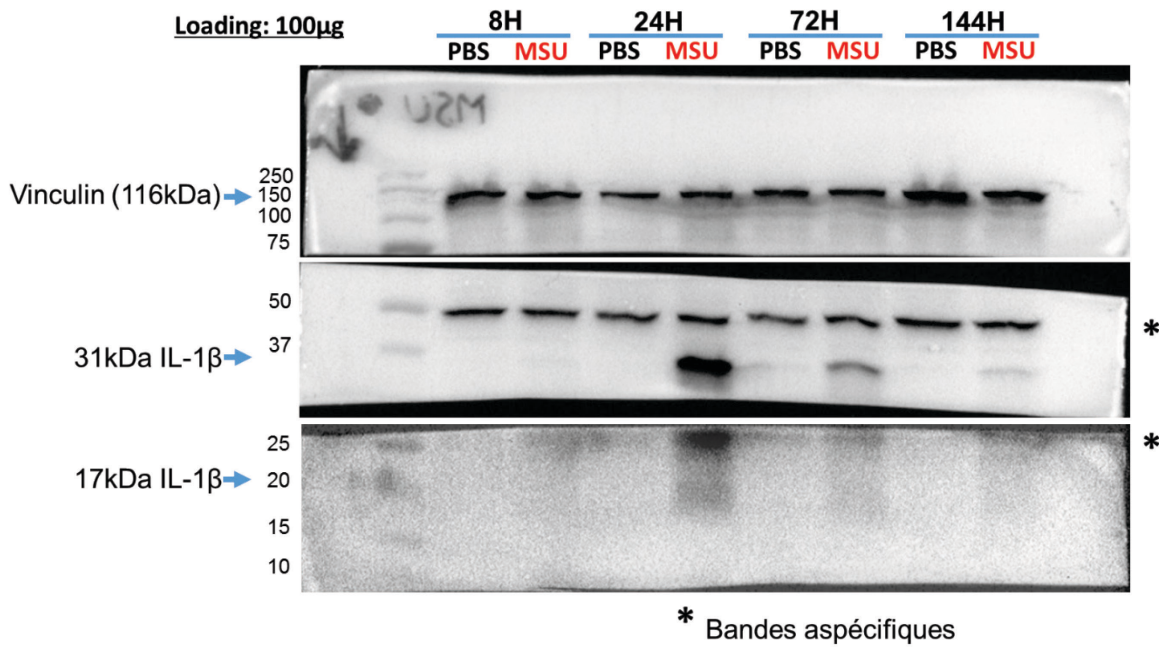
58. Ospelt C, Gay S, Klein K. Epigenetics in the pathogenesis of RA. *Semin Immunopathol* (2017) 39(4):409–19. doi:10.1007/s00281-017-0621-5
59. Vicente R, Noel D, Pers YM, Apparailly F, Jorgensen C. Deregulation and therapeutic potential of microRNAs in arthritic diseases. *Nat Rev Rheumatol* (2016) 12(4):211–20. doi:10.1038/nrrheum.2015.162
60. Chen XM, Huang QC, Yang SL, Chu YL, Yan YH, Han L, et al. Role of micro RNAs in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: novel perspectives based on review of the literature. *Medicine* (2015) 94(31):e1326. doi:10.1097/MD.0000000000001326
61. Philippe L, Alsaleh G, Suffert G, Meyer A, Georgel P, Sibilia J, et al. TLR2 expression is regulated by microRNA miR-19 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* (2012) 188(1):454–61. doi:10.4049/jimmunol.1102348
62. Philippe L, Alsaleh G, Pichot A, Ostermann E, Zuber G, Frisch B, et al. MiR-20a regulates ASK1 expression and TLR4-dependent cytokine release in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Ann Rheum Dis* (2013) 72(6):1071–9. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201654
63. Alsaleh G, Francois A, Philippe L, Gong YZ, Bahram S, Cetin S, et al. MiR-30a-3p negatively regulates BAFF synthesis in systemic sclerosis and rheumatoid arthritis fibroblasts. *PLoS One* (2014) 9(10):e111266. doi:10.1371/journal.pone.0111266
64. Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, et al. Altered expression of microRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (2008) 58(4):1001–9. doi:10.1002/art.23386
65. Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* (2008) 58(5):1284–92. doi:10.1002/art.23429
66. Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubbs MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* (2008) 10(4):R101. doi:10.1186/ar2493
67. Chan EK, Ceribelli A, Satoh M. MicroRNA-146a in autoimmunity and innate immune responses. *Ann Rheum Dis* (2013) 72(Suppl 2):ii90–5. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202203
68. Kurowska-Stolarska M, Alivernini S, Ballantine LE, Asquith DL, Millar NL, Gilchrist DS, et al. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) 108(27):11193–8. doi:10.1073/pnas.1019536108
69. Long L, Yu P, Liu Y, Wang S, Li R, Shi J, et al. Upregulated microRNA-155 expression in peripheral blood mononuclear cells and fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol* (2013) 2013:296139. doi:10.1155/2013/296139
70. Elmesmari A, Fraser AR, Wood C, Gilchrist D, Vaughan D, Stewart L, et al. MicroRNA-155 regulates monocyte chemokine and chemokine receptor expression in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* (2016) 55(11):2056–65. doi:10.1093/rheumatology/kew272
71. Bluml S, Bonelli M, Niederreiter B, Puchner A, Mayr G, Hayer S, et al. Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis Rheum* (2011) 63(5):1281–8. doi:10.1002/art.30281
72. Hu Q, Tanasa B, Trabucchi M, Li W, Zhang J, Ohgi KA, et al. DICER- and AGO3-dependent generation of retinoic acid-induced DR2 Alu RNAs regulates human stem cell proliferation. *Nat Struct Mol Biol* (2012) 19(11):1168–75. doi:10.1038/nsmb.2400
73. Patchesung M, Settayanon S, Pongpanich M, Mutirangura D, Jintarith P, Mutirangura A. Alu siRNA to increase Alu element methylation and prevent DNA damage. *Epigenomics* (2018) 10(2):175–85. doi:10.2217/epi-2017-0096
74. Munoz-Espin D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2014) 15(7):482–96. doi:10.1038/nrm3823
75. Chalan P, van den Berg A, Kroesen BJ, Brouwer L, Boots A. Rheumatoid arthritis, immunosenescence and the hallmarks of aging. *Curr Aging Sci* (2015) 8(2):131–46. doi:10.2174/1874609808666150727110744
76. McInnes IB, Buckley CD, Isaacs JD. Cytokines in rheumatoid arthritis – shaping the immunological landscape. *Nat Rev Rheumatol* (2016) 12(1):63–8. doi:10.1038/nrrheum.2015.171
77. Rahmati M, Moosavi MA, McDermott MF. ER stress: a therapeutic target in rheumatoid arthritis? *Trends Pharmacol Sci* (2018) 39(7):610–23. doi:10.1016/j.tips.2018.03.010
78. Nakamura T, Kunz RC, Zhang C, Kimura T, Yuan CL, Baccaro B, et al. A critical role for PKR complexes with TRBP in immunometabolic regulation and eIF2alpha phosphorylation in obesity. *Cell Rep* (2015) 11(2):295–307. doi:10.1016/j.celrep.2015.03.021
79. Kurzynska-Kokorniak A, Koralewska N, Pokornowska M, Urbanowicz A, Tworak A, Mickiewicz A, et al. The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities. *Nucleic Acids Res* (2015) 43(9):4365–80. doi:10.1093/nar/gkv328
80. Gross TJ, Powers LS, Boudreau RL, Brink B, Reisseter A, Goel K, et al. A microRNA processing defect in smokers' macrophages is linked to SUMOylation of the endonuclease DICER. *J Biol Chem* (2014) 289(18):12823–34. doi:10.1074/jbc.M114.565473
81. Gelfand BD, Wright CB, Kim Y, Yasuma T, Yasuma R, Li S, et al. Iron toxicity in the retina requires Alu RNA and the NLRP3 inflammasome. *Cell Rep* (2015) 11(11):1686–93. doi:10.1016/j.celrep.2015.05.023

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

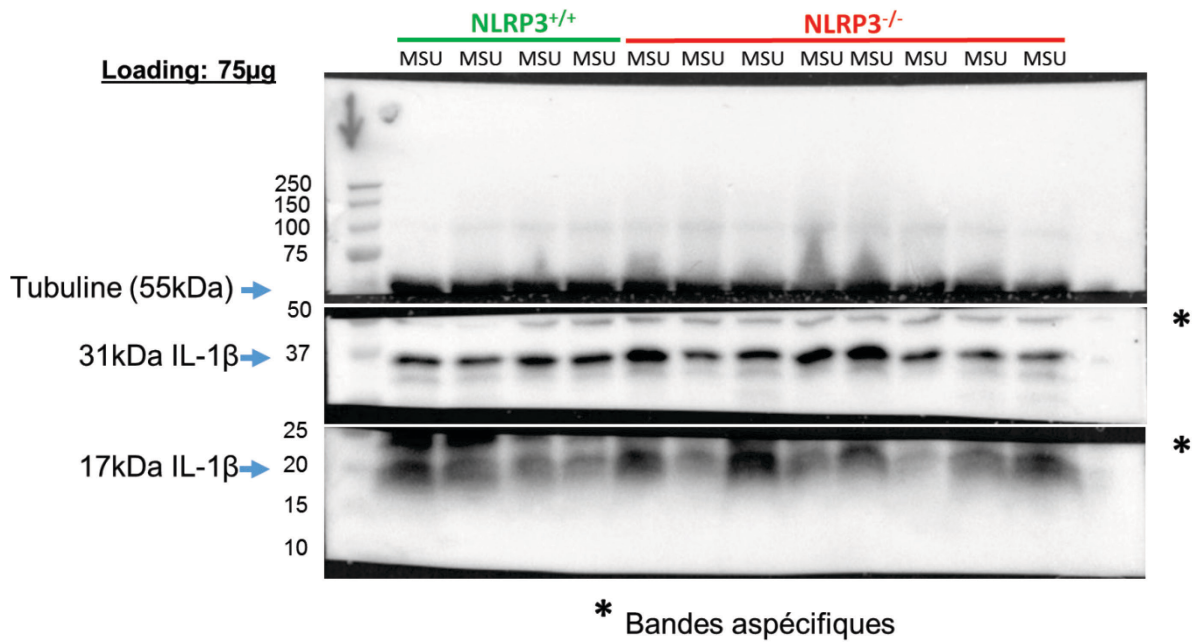
Copyright © 2018 De Cauwer, Mariotte, Sibilia, Bahram and Georgel. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Annexe 3 – Western blot entiers

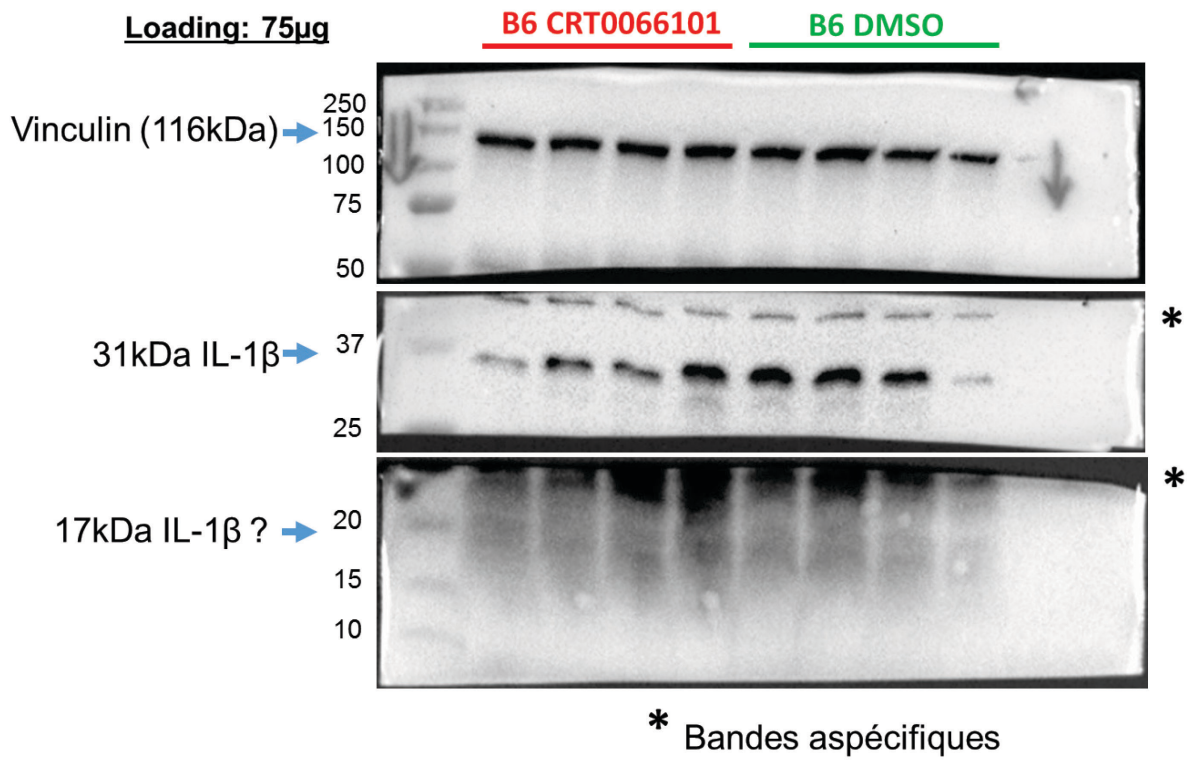
### 1. Blot Figure RS1



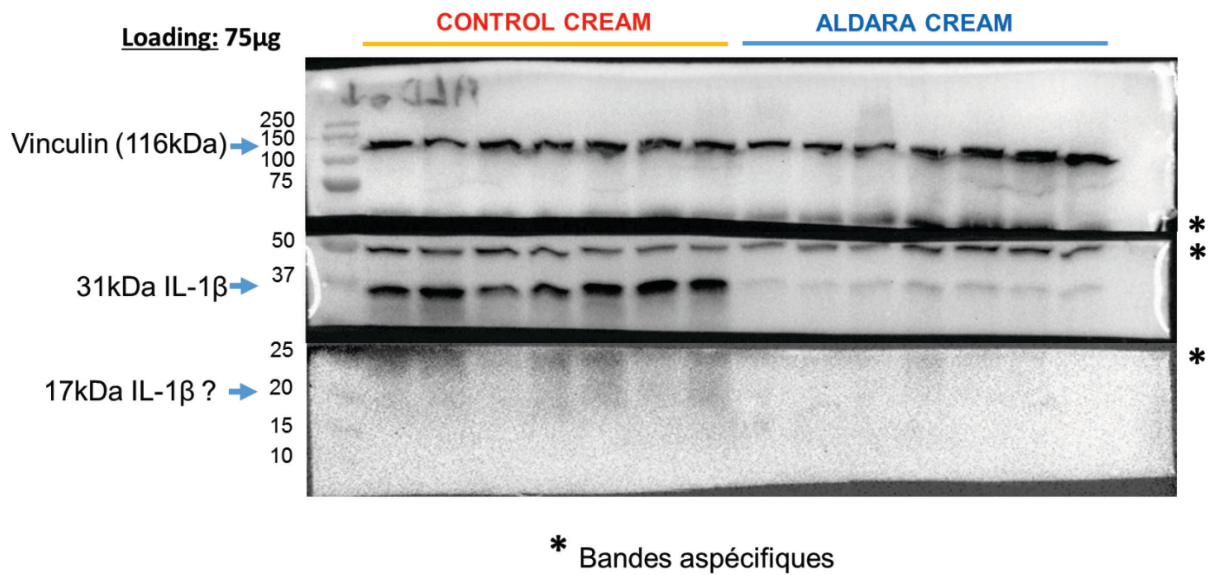
### 2. Blot Figure R1



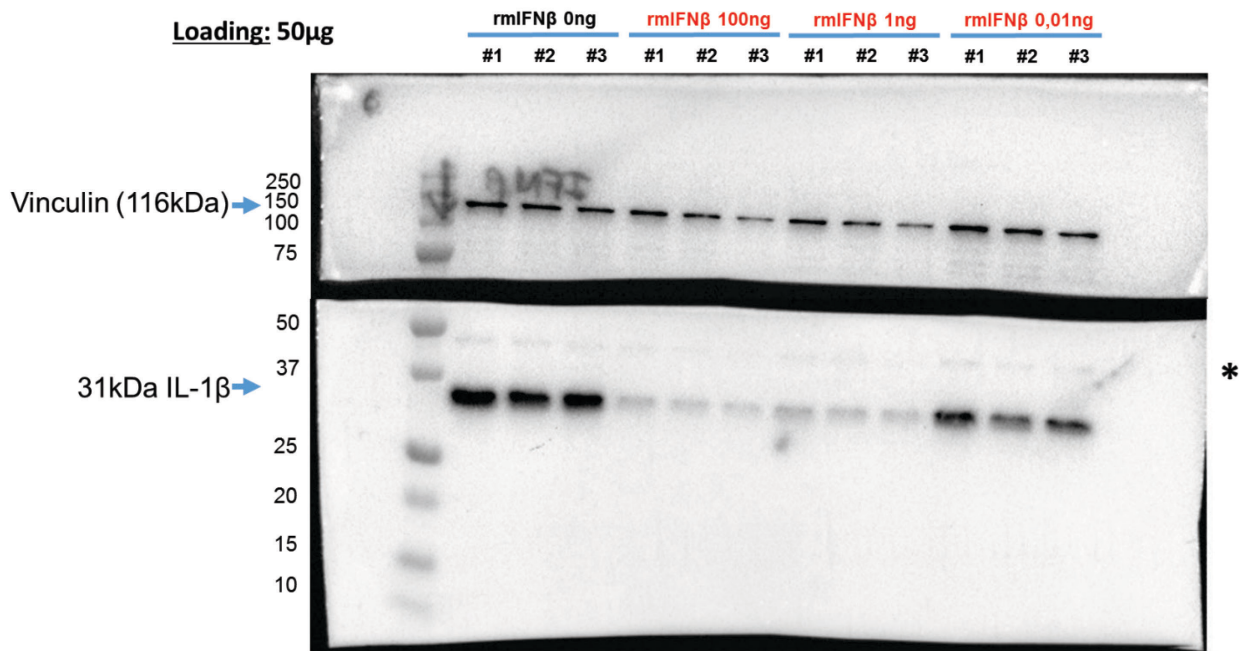
### 3. Blot Figure RS5



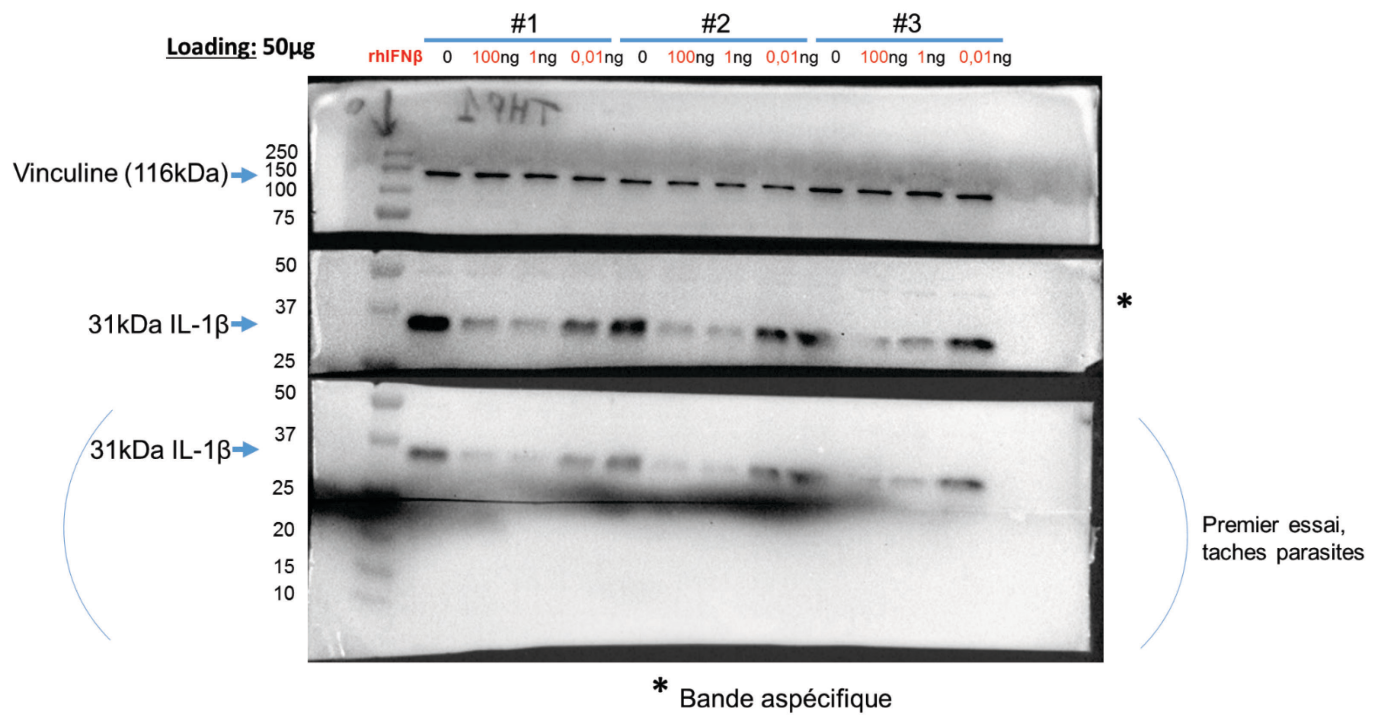
### 4. Blot Figure R4



## 5. Blot Figure R7C



## 6. Blot Figure R7E





Alexandre MARIOTTE

## Analyse de la contribution des inflammasomes et de l'interleukine-1 $\beta$ dans un modèle murin d'inflammation microcristalline

### Résumé

La goutte est une maladie inflammatoire particulièrement prévalente causée par la formation de dépôts articulaires et péri-articulaires de cristaux d'urate monosodique (UMS ou MSU) et dépendante de la cytokine interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). En 2006, l'inflammasome NLRP3 a été montré comme nécessaire pour la maturation de l'IL-1 $\beta$ , *in vitro*, en réponse aux cristaux de MSU. Néanmoins, sa nécessité *in vivo* est un sujet de controverse. Mon travail de thèse a porté sur la caractérisation d'un modèle murin d'inflammation aiguë uratique et l'analyse de la contribution des inflammasomes dans cette pathologie. J'ai d'abord montré que notre modèle par injection sous-cutanée de cristaux de MSU donne lieu une forte inflammation des tissus mous comme cela est souvent observé lors des crises de goutte chez l'Homme. L'emploi de souris invalidées génétiquement et d'inhibitions pharmacologiques m'a permis de décrire son indépendance vis-à-vis de plusieurs composants des inflammasomes et confirme le rôle majeur de l'IL-1 $\beta$ . De manière intéressante, j'ai ensuite montré qu'il est possible de réduire fortement l'inflammation dans ce modèle par un traitement topique à base d'imiquimod (crème ALDARA®), un ligand synthétique de TLR7. Des expériences réalisées *in vivo* et *in vitro* m'ont permis de relier l'effet de l'imiquimod à une baisse importante de l'*Il1b* au niveau transcriptionnel, via une signalisation faisant probablement intervenir les interférons de type I et possiblement le facteur RUNX3. Mes données montrent donc que la production d'IL-1 $\beta$ , dans ce modèle, est visiblement indépendante de NLRP3 mais peut être fortement abaissée par l'application topique d'imiquimod. L'imiquimod pourrait ainsi représenter une piste thérapeutique attractive.

**Mots clés :** Goutte, inflammasomes, interleukine-1 $\beta$ , interférons, Imiquimod

### Résumé en anglais

Gout is a prevalent inflammatory disease caused by the deposition of monosodium urate crystals (MSU) in articular/periarthritic areas, which strongly depends on interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). In 2006, the NLRP3 inflammasome has been shown to perform IL-1 $\beta$  maturation *in vitro* after MSU crystal exposure. However, its *in vivo* dependence is still matter of controversy. In my thesis project, I focused on the characterization of a murine acute uratic inflammation and analysed the contribution of inflammasome components. I first showed that the subcutaneous injection of MSU crystals in mice generate a strong soft tissue inflammation as observed in human gouty crises. Then, by using genetically-modified mouse lines and pharmacological inhibitions, I demonstrated that this model is inflammasome-independent, while still requiring IL-1 $\beta$  secretion. Interestingly, I observed that the topical application of imiquimod (ALDARA® cream), which is a synthetic TLR7 ligand, strongly dampens inflammation. *In vivo* and *in vitro* experiments further demonstrated that this effect is linked to reduced *Il1b* gene expression, which linkly involves type I interferon signaling and eventually the transcription factor RUNX3. Altogether, my results show that IL-1 $\beta$  production is NLRP3-independent in this mouse model but can be strongly decreased by topical application of imiquimod. Therefore, imiquimod might be an attractive therapeutic option for gouty patients.

**Key words:** Gout, inflammasomes, interleukin-1 $\beta$ , interferons, Imiquimod