



HAL
open science

Etude de l'impact fonctionnel des modifications post-traductionnelles dans l'activation de l'inflammasome NLRP3

Marine Gros Lambert

► **To cite this version:**

Marine Gros Lambert. Etude de l'impact fonctionnel des modifications post-traductionnelles dans l'activation de l'inflammasome NLRP3. Immunologie. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSEN022 . tel-04060090

HAL Id: tel-04060090

<https://theses.hal.science/tel-04060090>

Submitted on 6 Apr 2023

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.



Numéro National de Thèse : 2019LYSEN022

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée par
l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Spécialité de doctorat : Immunologie
Discipline : Sciences de la Vie

Soutenue publiquement le 12/07/2019, par :
Marine GROSLAMBERT

**Etude de l'impact fonctionnel des
modifications post-traductionnelles dans
l'activation de l'inflammasome NRLP3**

Devant le jury composé de :

ALEXOPOULOU, Lena	Directrice de Recherche, CNRS, CIML, Marseille	Rapporteuse
BOYER, Laurent	Chargé de Recherche, INSERM, C3M, Nice	Rapporteur
MAHIEUX, Renaud	Professeur des Universités, INSERM, CIRI, Lyon	Examinateur
PETRILLI, Virginie	Chargée de Recherche, CNRS, CRCL, Lyon	Examinatrice
TOUITOU, Isabelle	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, INSERM, CHU de Montpellier, Montpellier	Examinatrice
PY, Bénédicte	Chargée de Recherche, INSERM, CIRI, Lyon	Directrice de thèse

Remerciements

Je souhaite en premier lieu remercier le Dr. Bénédicte Py, ma directrice de thèse, pour m'avoir accepté dans son laboratoire, ainsi que pour avoir suivi le déroulement des travaux effectués très régulièrement et pour m'avoir donné de précieux conseils. J'aimerais aussi la remercier pour son aide lors de la rédaction du manuscrit. D'autre part, je finirai par lui exprimer ma reconnaissance pour m'avoir donné l'opportunité de participer à des congrès. Je remercie également toute l'équipe pour leur aide. Enfin, merci à Simon, Pablo et Amaury pour leur aide lors de l'écriture du manuscrit.

Ma gratitude va également au Dr. Thomas Henry pour son aide et ses conseils toujours bienveillants, ainsi qu'à toute son équipe.

Je souhaite remercier mes rapporteurs, le Pr. Lena Alexopoulou et le Dr. Laurent Boyer, pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je suis également reconnaissante envers les membres de mon comité de thèse, le Dr. Virginie Pétrilli, le Dr. Chloé Journo et le Dr. Damien Arnoult, pour leurs retours pertinents concernant mes travaux.

Je remercie toutes les équipes techniques : le plateau de biologie expérimental de la souris, le plateau d'imagerie ainsi que le plateau de cytométrie pour m'avoir aidé dans la réalisation de mes expériences.

Pour finir, mes remerciements vont également à l'Ecole normale supérieure de Lyon pour m'avoir accordé une bourse de thèse et permis de réaliser des enseignements au département de biologie.

Résumé de la thèse

L'inflammation est un processus déclenché suite à la détection de pathogènes via les PAMP ou de dommages tissulaires via les DAMP. Cette détection est médiée par les PRR portés par les cellules immunitaires. La mise en place de l'inflammation permet la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, qui participent à l'élimination de l'infection et à la réparation des tissus endommagés. Au niveau cellulaire, le déclenchement de la réponse inflammatoire passe notamment par la formation d'un complexe multi-protéique, appelé inflammasome, dans les cellules immunitaires. L'inflammasome NLRP3 est formé suite à la détection de divers stimuli, comme des bactéries, champignons, parasites, cristaux de cholestérol... Ce complexe contient le récepteur NLRP3, l'adaptateur ASC et l'effecteur pro-caspase-1. L'assemblage de ce complexe permet le clivage et l'activation de la pro-caspase-1. Ceci aboutit au clivage des pro-cytokines inflammatoires (pro-IL-1 β , pro-IL-18) et à leur sécrétion, ainsi qu'au déclenchement d'un type de mort cellulaire pro-inflammatoire appelée pyroptose. Au niveau moléculaire, les mécanismes conduisant à l'activation de l'inflammasome NLRP3 ne sont que partiellement compris. Cette activation requiert deux signaux : un signal de *priming* et un signal d'activation. Il a été récemment montré que les modifications post-traductionnelles sont impliquées dans le contrôle de l'activation de NLRP3. La perte de contrôle de l'activation de l'inflammasome conduit au développement de maladies auto-inflammatoires appelées CAPS. De plus, des dérégulations de cette activation sont impliquées dans le développement de nombreuses maladies multifactorielles (maladies neurodégénératives, diabète de type II, athérocclérose...). Nous avons donc cherché à comprendre le rôle des modifications post-traductionnelles dans l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Les travaux présentés ont permis d'identifier plusieurs sites de modifications post-traductionnelles sur la protéine NLRP3 : les résidus lysines K285, K377, K430, K506, K543 sont des sites d'ubiquitination et les résidus sérines S157 et S685 sont des sites de phosphorylation. Afin d'étudier l'impact de ces modifications post-traductionnelles sur l'activation de l'inflammasome, ces sites ont été mutés pour remplacer le résidu modifié par un résidu aux propriétés chimiques proches ce qui permet de ne pas modifier la structure de la protéine. Ainsi, les lysines ont été remplacées par des arginines qui ne peuvent pas être porteuses d'ubiquitines. Les sérines ont quant à elles été remplacées par des alanines ou des acides aspartiques afin de mimer des déphosphorylations ou des phosphorylations constitutives. Ces mutants de NLRP3 ont été utilisés pour reconstituer des lignées

cellulaires murines ou humaines déficientes pour NLRP3. La stimulation des cellules par de multiples stimuli n'a pas permis de détecter des différences significatives de sécrétion d'IL-1 β entre les lignées reconstituées avec les mutants et les lignées reconstituées avec le gène WT. L'utilisation de lignées cellulaires pour étudier des régulations fines de processus d'activation de l'inflammasome n'a ainsi pas semblé être une approche adaptée.

Des souris *Nlrp3 knock-in* ont donc ensuite été générées avec la technique du CRISPR/Cas9 afin de poursuivre l'étude de ces modifications *in vitro* sur des cellules primaires et *in vivo*. Etant limités par le nombre de lignées de souris pouvant être générées, nous avons choisi les sites pour lesquels un variant CAPS a été décrit, ce qui nous a mené à poursuivre notre travail avec les souris *Nlrp3*^{K373R/K373R} et *Nlrp3*^{K568R/K568R}. Ces souris ne présentent pas de phénotype inflammatoire spontané. En revanche, les études *in vitro* réalisées à partir des macrophages primaires ont permis de révéler une sécrétion d'IL-1 β suite au seul signal de *priming*, sécrétion environ cent fois plus faible que celle étant déclenchée suite aux signaux de *priming* et d'activation mais robuste et reproductible. D'autre part, le *priming* de ces cellules ne semble pas entraîner la perméabilisation de leur membrane plasmique, ni le déclenchement de la pyroptose associée.

Les travaux portant sur le mutant NLRP3 K568R sont plus avancés. Ils ont permis de confirmer le clivage de la pro-IL-1 β et de la pro-caspase-1 suite au signal de *priming* par western blot. L'activation du mutant par le signal de *priming* est dépendante de la présence des protéines ASC, caspase-1 et NEK7. Néanmoins aucun *specks* d'ASC n'est observable dans ces conditions. En outre, l'efflux de potassium ainsi que l'activité ATPase de NLRP3 sont toujours des événements indispensables pour l'activation du mutant NLRP3 K568R. De plus, l'activation de ce mutant de NLRP3 nécessite une signalisation via IRAK4. Enfin, nos données ont confirmé que le site NLRP3 K568 était ubiquitiné suite au signal de *priming* dans les cellules. Ainsi, l'ubiquitination du résidu K568 de NLRP3 permet d'empêcher l'activation de l'inflammasome en l'absence du signal d'activation.

Ces travaux ont donc permis d'identifier deux sites d'ubiquitination de NLRP3 nécessaires au contrôle de l'activation de la protéine et de préciser les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Table des matières

Table des matières	vi
Table des figures	viii
Liste des tableaux	x
1 Introduction	1
1.1 La détection de la présence des pathogènes et des dommages tissulaires par l'immunité innée	2
1.2 Les cytokines pro-inflammatoires	7
1.3 La mort cellulaire déclenchée lors des réponses inflammatoires	11
1.4 Les inflammasomes	14
1.5 Mécanismes d'activation et de régulation de l'inflammasome NLRP3	24
1.6 Les maladies liées à l'inflammasome NLRP3	42
1.7 Objectifs des travaux	48
2 Matériel et Méthodes	49
2.1 Clonages et plasmides	51
2.2 Bactéries	51
2.3 Cellules	52
2.4 Génération des souris knock-in <i>Nlrp3</i> ^{K568R/K568R}	53
2.5 Activation de l'inflammasome canonique	56
2.6 Infections bactériennes	57
2.7 Inhibition de l'efflux de potassium lors de l'activation de l'inflammasome	58
2.8 Utilisation des inhibiteurs de l'inflammasome	58
2.9 Transfection des siARN	59
2.10 Transfection au CaCl ₂	60
2.11 Précipitation des protéines présentes dans le surnageant	60
2.12 « Pull-down » de protéines	60
2.13 Western Blot	61
2.14 Test ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	61
2.15 Détection du LDH	62
2.16 Incorporation d'iodure de propidium et de YO-PRO TM -1	62

2.17 Immunofluorescence	62
3 Résultats : Etude de l'impact de plusieurs modifications post-traductionnelles de NLRP3 dans l'activation de l'inflammasome	64
3.1 NLRP3 est phosphorylé et ubiquitiné sur différents sites	65
3.2 Etude des conséquences fonctionnelles des modifications post-traductionnelles de NLRP3 en lignées cellulaires	75
4 Etude de l'activation du mutant <i>Nlrp3</i>^{K568R/K568R}	85
4.1 Article en préparation	85
4.2 Bilan des résultats	122
5 Résultats : Etude de l'activation du mutant <i>Nlrp3</i>^{K373R/K373R}	123
5.1 Le mutant NLRP3 K377R ne montre pas de phénotype d'activation significativement différent de NLRP3 WT en lignées cellulaires	125
5.2 Construction et génotypage des souris <i>Nlrp3</i> ^{K373R/K373R}	127
5.3 Etude du phénotype inflammatoire des BMDM <i>Nlrp3</i> ^{K373R/K373R}	129
5.4 Etude de la liaison à l'ATP	133
6 Discussion	136
6.1 Identification et étude des modifications post-traductionnelles de NLRP3 en lignées cellulaires	137
6.2 Etude de l'activation du mutants NLRP3 K568R dans les macrophages primaires de souris	141
6.3 Etude de l'activation du mutant NLRP3 K373R exprimé dans les macrophages primaires de souris	142
6.4 Discussion générale et conclusion	144
7 Références	147
A Annexes	I
A.1 Publications	I
A.2 Tableaux annexes	XXV
A.3 Abréviations	XXXIII

Table des figures

1.1	Signalisation TLR4 simplifiée	6
1.2	Signalisation déclenchée par les cytokines IL-1 β et IL-1 α	9
1.3	Principaux types de mort cellulaire	12
1.4	Signalisation simplifiée déclenchée par le TNF	13
1.5	Assemblage des protéines constitutives des inflammasomes	16
1.6	Organisation structurale de NLRP3	17
1.7	Modèles de formation des oligomères actifs de récepteurs de l'inflammasome	19
1.8	Mécanisme d'activation de la caspase-1	21
1.9	Voies de relargage de l'IL-1 β proposées	23
1.10	Activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages	25
1.11	Voies de signalisation activées au cours du <i>priming</i>	27
1.12	Mécanismes de la désensibilisation par les IFN de type I	28
1.13	Mécanisme d'activation de l'inflammasome non canonique	31
1.14	Trafic cellulaire des éléments constituant l'inflammasome	33
1.15	Ubiquitination et déubiquitination	34
3.1	Purification des formes modifiées et non modifiées de la protéine NLRP3	66
3.2	Principe de la préparation des protéines pour l'analyse des modifications post-traductionnelles par spectrométrie de masse	67
3.3	Infection des macrophages par la bactérie <i>Francisella tularensis novicida</i>	68
3.4	Ubiquitination des résidus lysines K285, K426, K506 et K543 de NLRP3 murins	69
3.5	Liaison isopeptidique	70
3.6	NLRP3 n'est pas SUMOylé	70
3.7	Bilan des modifications post-traductionnelles identifiées sur NLRP3	71
3.8	Alignements des séquences de NLRP3 correspondant aux résidus entourant les sites identifiés comme étant porteur de phosphorylation	72
3.9	Formules chimiques développées des acides aminés sérine, thréonine et méthionine	72
3.10	Alignement des séquences de NLRP3 entourant les sites identifiés comme étant porteur d'ubiquitination	74

3.11 Formules chimiques développées des acides aminés lysine, arginine, valine et asparagine	75
3.12 Formules développées de la sérine, la phosphosérine, l'alanine, l'acide aspartique et l'acide glutamique	76
3.13 Contrôle du niveau d'expression de <i>NLRP3</i> dans les lignées cellulaires <i>NLRP3</i> KO reconstituées	77
3.14 La doxycycline n'inhibe pas le <i>priming</i> des iBMDM	78
3.15 Les cellules qui expriment les mutants lysines de <i>NLRP3</i> sécrètent de l'IL-1 β en quantité similaire aux cellules sauvages	79
3.16 Les cellules qui expriment les mutants des sérines de <i>NLRP3</i> sécrètent de l'IL-1 β en quantités similaires aux cellules sauvages	80
3.17 Les cellules U937 exprimant des mutants de <i>NLRP3</i> au niveau des lysines ubiquitinées sécrètent des quantités similaires d'IL-1 β après infection par J53	81
3.18 La sécrétion d'IL-1 β par les U937 exprimant <i>NLRP3</i> K289R, <i>NLRP3</i> K430R ou <i>NLRP3</i> K510R est similaire à celle des cellules exprimant <i>NLRP3</i> WT suite à l'infection par <i>Francisella tularensis novicida</i>	82
4.1 Mécanismes d'activation de <i>NLRP3</i> K568R dans les macrophages murins suite au signal de <i>priming</i>	122
5.1 Les mutants <i>NLRP3</i> K377R et K377E ne sécrètent pas d'IL-1 β suite au traitement au LPS, contrairement au mutant CAPS D305N	126
5.2 Génération des souris <i>Nlrp3</i> ^{K373R/K373R} <i>knock-in</i>	128
5.3 Les BMDM <i>Nlrp3</i> ^{K373R/K373R} sécrètent de l'IL-1 β suite au <i>priming</i> par le LPS	130
5.4 Suivi de la perméabilisation cellulaire après le traitement des BMDM au LPS	131
5.5 Suivi de la perméabilisation cellulaire après activation de l'inflammasome dans les BMDM <i>Nlrp3</i> ^{K373R/K373R}	132
5.6 Modélisation de la structure du domaine NACHT	133
5.7 L'ubiquitination du résidu K377 de <i>NLRP3</i> ne modifie pas la liaison de l'ATP au domaine NACHT	134
6.1 Bilan du rôle de l'ubiquitination de <i>NLRP3</i> dans l'activation de l'inflammasome	146

Liste des tableaux

1.1	La famille des TLR	4
1.2	Exemples de signaux activateurs des différents inflammasomes	14
1.3	Exemples de différents signaux de <i>priming</i> et de leurs récepteurs	26
1.4	Récapitulatif des principales modifications post-traductionnelles décrites	36
1.5	Modifications post-traductionnelles de NLRP3 se produisant lors de la phase de <i>priming</i>	37
1.6	Modifications post-traductionnelles de NLRP3 se produisant lors de la phase d'activation	38
1.7	Modifications post-traductionnelles de NLRP3 se produisant lors de la phase de désensibilisation	39
1.8	Modifications post-traductionnelles des principales protéines impliquées dans l'inflammasome NLRP3	40
1.9	Comparaison des voies d'activation canonique et alternative de l'inflammasome NLRP3	41
1.10	Symptômes associés aux trois phénotypes cliniques des CAPS	42
2.1	Caractéristiques des différents ARN guides pouvant être utilisés pour générer une cassure double brins autour du site A1703 de NLRP3	54
2.2	Signaux de <i>priming</i>	57
2.3	Signaux d'activation	57
2.4	Inhibiteurs	59
3.1	Résumé des résultats obtenus lors des expériences menées sur les cellules reconstituées avec NLRP3 muté sur les résidus sérines phosphorylés	83
3.2	Résumé des résultats obtenus lors des expériences menées sur les cellules reconstituées avec NLRP3 muté sur les résidus lysines ubiquitinés	84
A.1	Amorces pour mutagenèse dirigée	XXV
A.1	Amorces pour mutagenèse dirigée	XXVI
A.2	Amorces PCR	XXVI
A.3	siARN	XXVII
A.3	siARN	XXVIII

A.3 siARN	XXIX
A.3 siARN	XXX
A.4 Anticorps primaires	XXXI
A.4 Anticorps primaires	XXXII
A.5 Anticorps secondaires	XXXII

Chapitre 1

Introduction

Sommaire

1.1 La détection de la présence des pathogènes et des dommages tissulaires par l'immunité innée	2
1.1.1 Les motifs moléculaires spécifiques des pathogènes et des tissus endommagés	2
1.1.2 Les récepteurs de ces motifs	3
1.2 Les cytokines pro-inflammatoires	7
1.2.1 L'interleukine-1 et l'interleukine-18	7
1.2.2 Le <i>Tumor necrosis factor</i>	10
1.3 La mort cellulaire déclenchée lors des réponses inflammatoires	11
1.4 Les inflammasomes	14
1.4.1 Composition des inflammasomes	14
1.4.2 L'assemblage des inflammasomes et ses conséquences	15
1.5 Mécanismes d'activation et de régulation de l'inflammasome NLRP3	24
1.5.1 L'activation canonique de l'inflammasome NLRP3 nécessite deux signaux	24
1.5.2 L'activation de NLRP3 par la voie non canonique	31
1.5.3 Localisation subcellulaire des constituants de l'inflammasome NLRP3 au cours de l'activation	32
1.5.4 Rôle des modifications post-traductionnelles dans l'activation de l'inflammasome NLRP3	34
1.5.5 L'inflammasome NLRP3 dans les autres types cellulaires	40
1.6 Les maladies liées à l'inflammasome NLRP3	42
1.6.1 Les <i>Cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS)</i>	42
1.6.2 Les maladies multifactorielles	44
1.7 Objectifs des travaux	48

Les organismes Vertébrés sont en permanence soumis à des attaques de micro-organismes (virus, bactéries, champignons,...) et possèdent des systèmes de défenses immunitaires qui permettent d'éliminer les pathogènes. Le système immunitaire des Vertébrés est divisé en deux branches principales : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. Le système immunitaire inné est le premier à être mobilisé lors d'attaques de l'organisme et permet dans de nombreux cas de résoudre les infections. Le système immunitaire adaptatif est plus lent à se mettre en place et sera sollicité si l'immunité innée ne permet pas d'éliminer les pathogènes. Il est caractérisé par sa haute spécificité vis-à-vis des pathogènes, due à une infinité de récepteurs aux pathogènes, et par la mise en place d'une mémoire immunitaire.

Lorsque les micro-organismes passent les barrières naturelles protectrices constituées par les épithéliums, et atteignent les tissus de l'hôte, ils déclenchent un processus appelé inflammation, localisé au niveau de la zone d'entrée des pathogènes. La zone concernée devient alors plus chaude (*calor*), plus rouge (*rubor*), plus gonflée (*tumor*) et plus douloureuse (*dolor*), constituant les quatre signes caractéristiques de l'inflammation [1]. Ces signes cliniques reflètent l'action de cytokines, petites protéines sécrétées suite à un stress et qui permettent d'orienter la réponse immunitaire, et d'autres médiateurs chimiques sur les vaisseaux sanguins locaux. Ceux-ci sont dilatés et deviennent plus perméables, ce qui permet d'augmenter l'afflux de sang et entraîne le passage de protéines et de globules blancs dans le tissu concerné, utiles pour combattre l'infection. Les cellules immunitaires responsables du déclenchement de la réponse inflammatoire sont principalement les macrophages et les neutrophiles, ces derniers étant recrutés en grand nombre dans les tissus infectés [2]. Peu de temps après l'influx de neutrophiles, des monocytes colonisent également ces tissus. Ils se différencient ensuite rapidement en macrophages, permettant de renforcer la défense du tissu.

1.1 La détection de la présence des pathogènes et des dommages tissulaires par l'immunité innée

1.1.1 Les motifs moléculaires spécifiques des pathogènes et des tissus endommagés

Afin de déclencher la sécrétion des médiateurs chimiques de l'inflammation, les cellules immunitaires résidentes des tissus doivent détecter la présence du danger, c'est-à-dire qu'elles doivent être capables de discriminer le soi d'une variété de pathogènes. Ceci est permis par la présence d'un nombre limité de récepteurs, appelés *pattern recognition receptors* (PRR), exprimés par ces cellules [3]. Ces récepteurs reconnaissent des motifs moléculaires particuliers exprimés seulement par les pathogènes ou les tissus endommagés, suite à une infection par exemple. Ces motifs sont appelés DAMP (*danger-*

associated molecular pattern) et PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) [3, 4]. Les DAMP sont des motifs dérivés de molécules de l'hôte qui ne sont normalement pas accessibles aux cellules immunitaires et sont trouvés aux sites où apparaissent des dommages tissulaires [4, 5]. Ce sont des signaux d'alarme et de dangers émis par les tissus soumis à du stress, comme des molécules libérées suite à la lyse et la mort des cellules. Les PAMP sont des motifs invariants au sein d'une même classe de micro-organismes. Ils sont impliqués dans des voies trouvées spécifiquement chez les micro-organismes et sont nécessaires durant le cycle de vie du pathogène. Ceci limite la possibilité d'évolution de ces molécules qui pourrait être mise en place afin d'échapper à la reconnaissance immunitaire [6]. Les PAMP, contrairement à ce qu'indique leur nom, ne sont pas des signaux spécifiques des pathogènes. En effet, les micro-organismes symbiotiques (de la peau, des intestins...) portent aussi certains de ces motifs, dont beaucoup sont des constituants de la paroi bactérienne. Cependant, un équilibre est maintenu entre l'hôte et les micro-organismes symbiotiques et les réponses inflammatoires ne sont pas déclenchées par la présence de ces micro-organisme [7].

1.1.2 Les récepteurs de ces motifs

La détection des PAMP et des DAMP par les cellules de l'immunité innée se fait par les PRR. Contrairement aux récepteurs de l'immunité adaptative, la diversité et la spécificité de ces récepteurs est limitée. Ils peuvent se lier à différentes molécules ayant des motifs structuraux en commun [6]. Ces récepteurs sont exprimés par les cellules de l'immunité innée, dont les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques [8]. Suite à l'activation des PRR, des voies de signalisation complexes sont activées dans ces cellules immunitaires, ce qui conduit à la sécrétion des médiateurs chimiques de l'inflammation. Nous présenterons ici de manière non exhaustive la détection de certains PAMP/DAMP par les PRR qui ont été étudiés ou utilisés lors des travaux présentés dans cette thèse : les *Toll-like receptors* (TLR) et les *NOD-like receptors* (NLR) principalement. Cependant, ce ne sont pas les seules classes de PRR existantes.

Les récepteurs membranaires TLR

La protéine Toll, membre fondateur de la famille des TLR, a d'abord été identifiée dans le développement de la polarité dorso-ventrale chez la Drosophile (*Drosophila melanogaster*). Son rôle dans la mise en place de la réponse contre les champignons et les bactéries Gram positives a ensuite été découvert, mettant ainsi en évidence pour la première fois une protéine appartenant aux PRR [9]. Depuis, 10 membres fonctionnels de la famille des TLR ont été décrits chez les humains, 12 chez la souris [8]. Les TLR1 à 9 sont conservés entre les 2 espèces [10], le TLR10 est fonctionnel chez l'homme, et les TLR11, TLR12 et TLR13 sont trouvés uniquement chez les souris.

Tous les TLR sont des récepteurs transmembranaires. Les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5,

TLR6 et TLR11 sont localisés sur la membrane plasmique et reconnaissent des PAMP portés par des bactéries, des champignons et des protozoaires. Les TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 et TLR13 sont localisés sur les membranes des vésicules intracellulaires (les endosomes principalement, mais aussi les lysosomes...) et reconnaissent des acides nucléiques dérivés de virus ou de bactéries (tableau 1.1). Le TLR12 colocalise avec le TLR11 sur la membrane plasmique du reticulum [8, 11].

TLR	Ligands	Localisation	Adaptateurs
TLR1/2	Triacyl lipopeptides	Membrane plasmique	MyD88
TLR3	ARN double brins	Endosomes	TRIF
TLR4	LPS	Membrane plasmique	MyD88; TRIF
TLR5	Flagelline	Membrane plasmique	MyD88
TLR2/6	Diacyl lipopeptides	Membrane plasmique	MyD88
TLR7	ARN simple brin	Endosomes	MyD88
TLR8	ARN simple brin	Endosomes	MyD88
TLR9	ADN CpG	Endosomes	MyD88

Tableau 1.1 – **La famille des TLR.** La table décrit les différents TLR qui s’assemblent sous forme d’homo- ou d’hétérodimères (colonne de gauche), des exemples de ligands (LPS : lipopolysaccharide), leur localisation subcellulaire, ainsi que l’adaptateur utilisé lors de la signalisation en aval (MyD88 : *myeloid differentiation primary response 88*; TRIF : *TIR domain-containing adapter inducing interferon- β*).

Ces récepteurs sont composés d’un domaine extracellulaire formé de *leucine-rich repeats* (LRR) nécessaire à la reconnaissance des PAMP/DAMP, d’un domaine intracytoplasmique et d’un domaine intracellulaire *Toll-interleukin-1 receptor* (TIR) nécessaire à la transduction du signal [10]. Ces récepteurs forment des homo- ou des hétérodimères suite à leur interaction avec le ligand. Ils activent des voies de signalisation permettant la production de cytokines inflammatoires, de facteurs chimiotactiques, de peptides antimicrobiens, ou des cytokines antivirales, les interférons (IFN) de type I. La nature des molécules sécrétées dépend du TLR activé et du type cellulaire dans lequel se déroule l’activation [10, 12].

Signalisation TLR4 Dans la suite de notre étude, nous avons fréquemment utilisé le LPS (lipopolysaccharide) comme signal extracellulaire pour activer les macrophages. Le LPS est un composant majeur du feuillet externe de la membrane externe des bactéries Gram négatives. Il participe à la protection des bactéries en leur conférant une imperméabilité à l’entrée de petites molécules hydrophobes toxiques comme les antibiotiques, les détergents et les sels biliaires [13]. Le LPS est composé d’une chaîne de polysaccharide d’un côté et d’une partie lipidique de l’autre côté, le lipide A, responsable de l’activité endotoxique [14]. Le LPS est reconnu par différents récepteurs, dont le TLR4 (figure 1.1) [15]. Cette reconnaissance nécessite également d’autres protéines. La protéine LBP (*LPS-binding protein*) est sécrétée et se lie au LPS bactérien. Ensuite, via une action coordonnée entre la LPB et le récepteur membranaire CD14 (*cluster of differentiation 14*), le LPS est

extrait de la membrane des bactéries et est délivré aux récepteurs membranaires MD-2 (*myeloid differentiation factor 2*) et TLR4. MD-2 et TLR4 sont tous les deux nécessaires pour l'interaction avec le LPS. Ceci entraîne la dimérisation de TLR4 et la transduction du signal [16, 17]. Celle-ci commence par le recrutement des adaptateurs MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*) et TRIF (*TIR domain-containing adapter inducing interferon- β*) via des interactions homotypiques entre les domaines TIR du récepteur et des adaptateurs. Deux principales voies de signalisation sont ensuite mises en place : une voie dépendante de MyD88 et une voie dépendante de TRIF [18].

MyD88 est une protéine possédant un *death domain* (DD) en plus de son domaine TIR, ce qui lui permet de recruter d'autres protéines à DD. C'est ainsi que la kinase IRAK-4 (*IL-1 receptor-associated kinase-4*), contenant un DD et un domaine kinase, est recrutée et permettrait à son tour de recruter, activer puis de dégrader la kinase IRAK-1. Cependant, celle-ci serait moins essentielle à la transduction du signal, comme en attestent les macrophages déficients en IRAK1 qui ne montrent qu'une réduction partielle de la production de cytokines pro-inflammatoires suite au traitement au LPS [18]. La protéine TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*) est ensuite recrutée et permet l'activation de TAK1 (*transforming growth factor- β -activated kinase 1*). TAK1 active ensuite d'une part IKK (*I κ B kinase*) qui phosphoryle I κ B ce qui conduit à sa dégradation et à la libération du facteur de transcription NF- κ B (*nuclear factor κ B*). D'autre part, TAK1 permet également l'activation de la voie des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) qui conduit à l'activation d'un autre facteur de transcription, le facteur AP-1 (*activator protein 1*). Ces deux facteurs de transcription contrôlent l'expression de cytokines pro-inflammatoires.

L'adaptateur TRIF permet l'activation du facteur de transcription IRF3 (*interferon regulatory factor 3*), ainsi que l'activation tardive des voies NF- κ B et MAPK. TRIF recrute la protéine RIPK1 (*receptor interacting protein kinase 1*), importante uniquement pour l'activation de la voie NF- κ B. D'autres protéines sont ensuite nécessaires pour l'activation d'IRF3.

Les récepteurs cytosoliques NLR

Ces récepteurs permettent la détection d'une grande variété de ligands dans le cytoplasme des cellules. Cette famille comprend 23 membres chez l'homme et 34 chez la souris. Les membres de la famille des NLR sont composés d'un domaine LRR en C-terminal probablement impliqué dans la reconnaissance du ligand, d'un domaine N terminal variable permettant de la transduction du signal et d'un domaine central NACHT (*nucleotide binding and oligomerisation*). Le domaine NACHT est nécessaire pour l'oligomérisation du récepteur qui est dépendante de l'ATP et induite par la liaison du ligand [10, 19]. La famille des NLRs est divisée en deux sous-familles.

La première sous-famille est appelée NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) et comprend les protéines NOD1 et NOD2. La partie N terminale de ces pro-

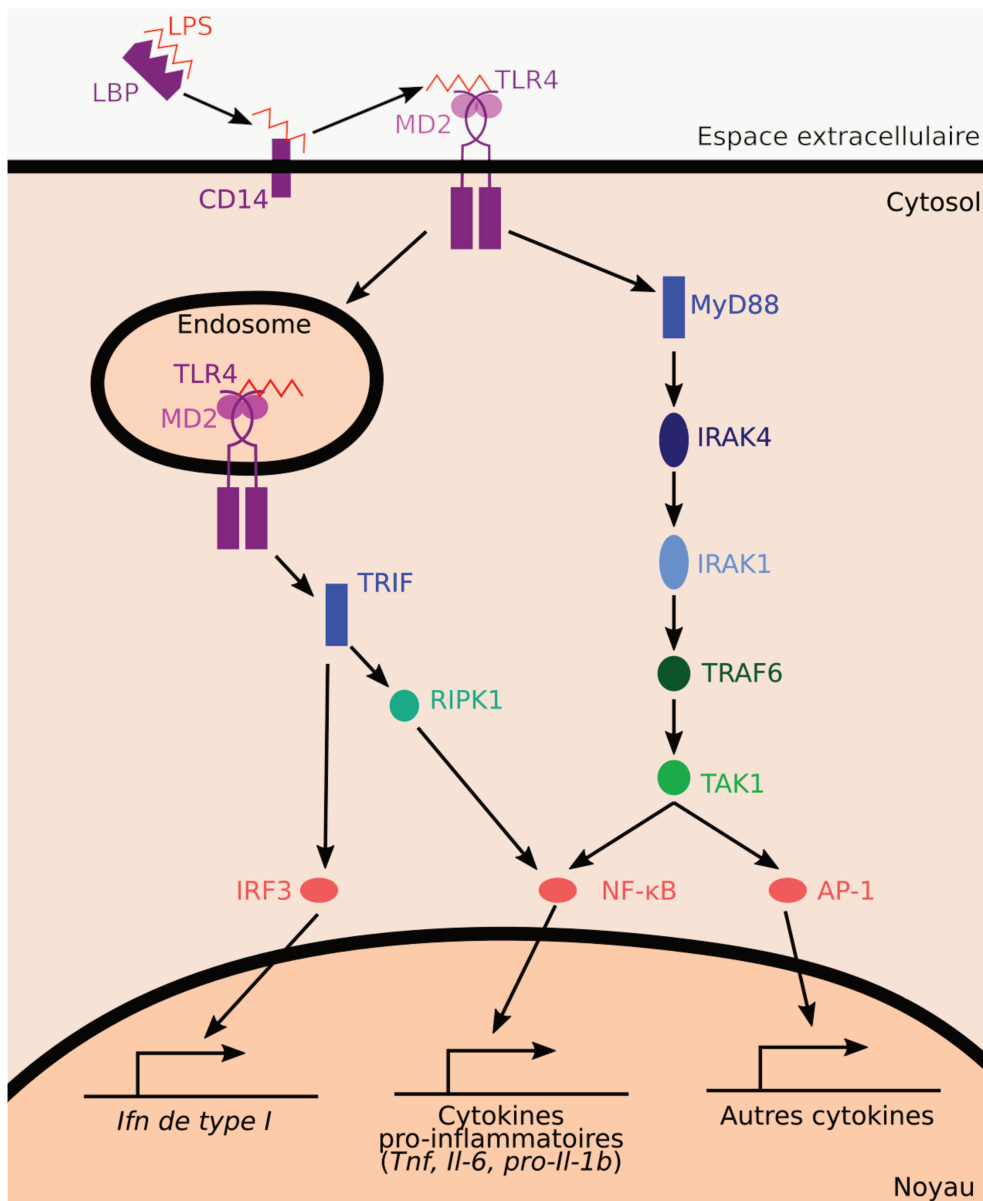


Figure 1.1 – **Signalisation TLR4 simplifiée.** Le schéma présente de manière simplifiée les voies de signalisations activées suite à l'engagement du récepteur TLR4. Le LPS est extrait de la membrane des bactéries par la protéine soluble LBP et la protéine membranaire CD14. Le LPS est ensuite transmis aux protéines TLR4 et MD-2. Ceci permet d'une part l'activation des voies de signalisation NF-κB et MAPK, ce qui entraîne l'activation des facteurs de transcription NF-κB et AP-1 respectivement et déclenche l'expression des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires. De plus, l'activation de TLR4 entraîne également son internalisation dans des endosomes, ce qui permet l'activation de TRIF, puis d'IRF3 et la transcription des gènes codant pour les IFN de type I et de la voie NF-κB de manière tardive.

téines est composée d'un ou de deux domaines CARD (*caspase recruitment domain*) respectivement. Leur domaine LRR C terminal permet la détection de différentes parties du peptidoglycane bactérien, un composant essentiel de la paroi des bactéries [20–22]. Ceci entraîne l'oligomérisation de ces protéines, aboutissant au recrutement de la sérine/thréonine kinase RIPK2 (*receptor interacting protein kinase 2*), ce qui permet l'activation de la voie NF- κ B et la production de cytokines inflammatoires.

La deuxième sous-famille comprend les protéines capables de former un complexe multiprotéique suite à leur activation, appelé « inflammasome », qui permet la maturation de cytokines pro-inflammatoires (comme les interleukines IL-1 β ou IL-18) ou le déclenchement d'un type de mort cellulaire dépendant de l'inflammation, appelé pyroptose [23].

Un autre PRR, le *receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE)

Le récepteur RAGE, localisé à la surface des cellules, a pour ligand les glycoprotéines et les glucides qui ont été modifiés par la réaction de Maillard, appelés *advanced glycation endproducts*. De plus, il reconnaît aussi le DAMP HMGB1 (*high-mobility group box protein B1*) [24, 25], protéine se liant à l'ADN et permettant le remodelage de la chromatine. Ce récepteur RAGE lie également le LPS [26]. La liaison des ligands au récepteur RAGE conduit à l'activation de la voie de signalisation NF- κ B [27].

1.2 Les cytokines pro-inflammatoires

Suite à l'activation des PRR, détaillée dans la section 1.1.2, et à l'activation de la voie de signalisation NF- κ B, des cytokines pro-inflammatoires sont sécrétées par les cellules immunitaires. Les cytokines sont dites pro-inflammatoires lorsqu'elles participent à amplifier la réponse inflammatoire. Dans le cas inverse, elles seront dites anti-inflammatoires. Ainsi, les cytokines pro-inflammatoires de la famille de l'IL-1 et le TNF (*tumor necrosis factor*) permettent d'initier la cascade de médiateurs de l'inflammation en ciblant l'endothélium vasculaire [28].

1.2.1 L'interleukine-1 et l'interleukine-18

La famille de l'IL-1 compte sept ligands agonistes (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ), trois récepteurs antagonistes (IL-1Ra acronyme pour *IL-1 receptor a*, IL-36Ra, IL-38) et une cytokine anti-inflammatoire (IL-37) [29]. Seules seront présentées ici les cytokines IL-1 α , IL-1 β et IL-18 puisque ce sont elles qui ont été utilisées dans les travaux exposés par la suite.

L'interleukine-1

L'IL-1 α est synthétisée sous forme d'un précurseur de 31 kDa, la pro-IL-1 α , de façon constitutive dans les cellules. Son expression peut être augmentée suite à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 en aval de l'activation de certains PRR (voir la section 1.1.2) [30]. La pro-IL-1 α a la même activité biologique que sa forme clivée (18 kDa) [31]. La libération de cette cytokine par les cellules en nécrose, un type de mort cellulaire non contrôlé aboutissant à la libération du contenu de la cellule dans le milieu extracellulaire, agit comme une « alarmine », c'est-à-dire qu'elle permet d'alerter l'organisme sur l'apparition de dommages tissulaires et d'initier rapidement la cascade des cytokines inflammatoires [32, 33].

Contrairement à l'IL-1 α , le précurseur de l'IL-1 β n'est pas synthétisé dans les cellules au repos. Cette synthèse est déclenchée dans les cellules hématopoïétiques comme les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, suite à l'activation des TLR, les facteurs du complément activés, d'autres cytokines (dont le TNF et l'IL-6), et l'IL-1 elle-même, qui activent la voie de signalisation NF- κ B [34, 35]. Ce précurseur de 33 kDa est cependant inactif dans les cellules et seule la forme mature, c'est-à-dire la forme clivée de 17 kDa, est biologiquement active [29]. La pro-IL-1 β est maturée suite à un clivage protéolytique réalisé par la caspase-1, qui doit elle-même être au préalable activée par les inflammasomes. L'IL-1 α n'est pas clivée par la caspase-1 [36], mais il existe un relargage d'IL-1 α dépendant de l'activation de l'inflammasome [37]. La caspase-8, activée par les PRR et différents complexes intracellulaires, peut aussi permettre la maturation de la pro-IL-1 β lors des réponses immunitaires [38–40].

L'IL-1 α et IL-1 β ne sont donc pas relarguées suite aux mêmes signaux, mais elles signalisent ensuite via les mêmes récepteurs (figure 1.2). Le récepteur IL-1R1 est la chaîne possédant le site de liaison aux ligands (IL-1 α , IL-1 β ou IL-1Ra). Seules les IL-1 α et IL-1 β sont des ligands agonistes. Afin de transduire le signal, l'IL-1R1 doit être associé à son co-récepteur, l'IL-1R3. Il existe beaucoup de mécanismes inhibiteurs de cette signalisation. Le ligand antagoniste IL-1Ra peut se lier à l'IL-1R1 mais ne permet pas le recrutement de l'IL-1R3 et empêche donc la transduction du signal. L'IL-1R2 peut lier les ligands et recruter le co-récepteur IL-1R3, mais ne peut pas activer la signalisation en aval puisqu'il ne possède pas de domaine TIR. L'IL-1R8 peut interférer avec le complexe IL-1/IL-1R1/IL-1R3 et empêcher la signalisation en aval. Enfin, les formes solubles des récepteurs IL-1R1, IL-1R2 et IL-1R3 existent et servent de leurres [41]. L'engagement du récepteur IL-1R permet l'activation de la voie NF- κ B et de la voie des MAPK, amplifiant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

Au niveau de l'organisme, la sécrétion de l'IL-1 β agit (i) sur le système nerveux central où elle induit de la fièvre et stimule l'axe corticotrope, (ii) sur le foie où, via l'IL-6, des protéines de l'inflammation sont synthétisées (protéines de la phase aigüe), (iii) sur les chondrocytes qui synthétisent des métalloprotéases et des collagénases, (iv) sur les cel-

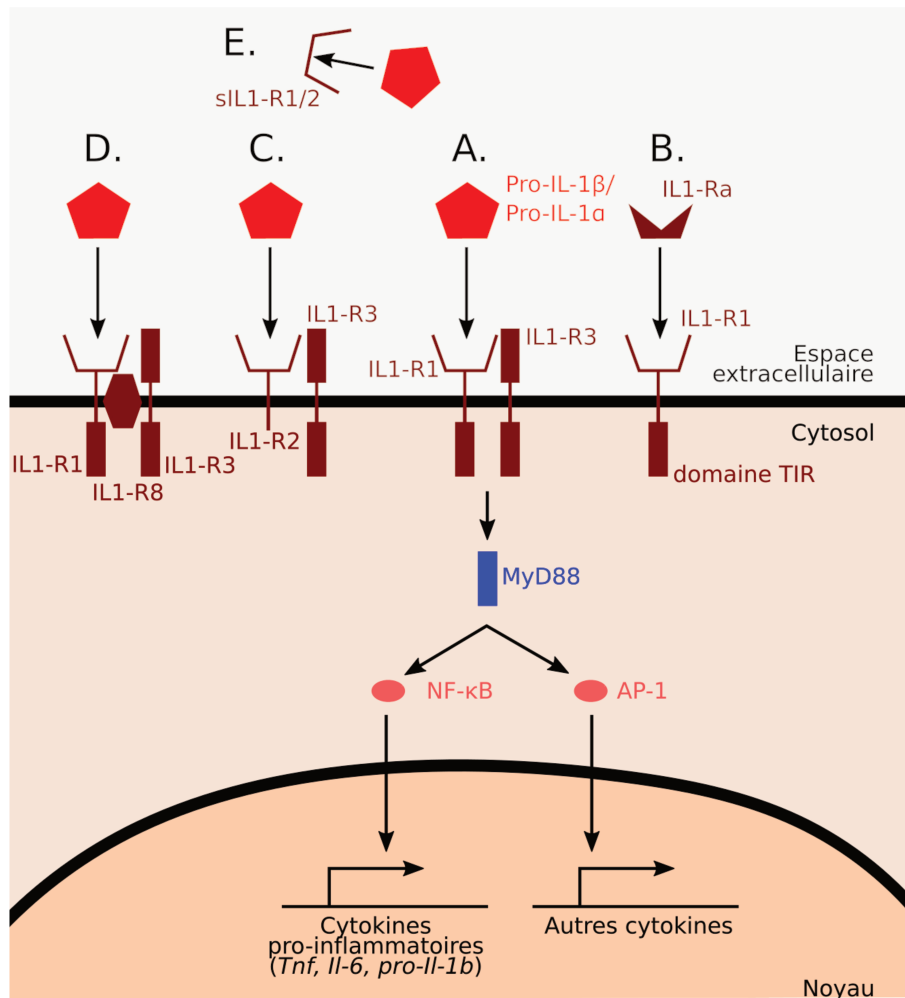


Figure 1.2 – **Signalisation déclenchée par les cytokines IL-1 β et IL-1 α .** A. Afin de transduire le signal donné par ces deux cytokines, IL-1R1 doit être associé à son co-récepteur, l'IL-1R3. Ces deux protéines possédant un domaine TIR, elles permettent ensuite le recrutement de l'adaptateur MyD88 et l'activation de la voie NF- κ B et de la voie des MAPK, amplifiant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. B, C, D, E. Il existe beaucoup de mécanismes inhibiteurs de cette signalisation. B. Le ligand antagoniste IL-1Ra peut se lier à l'IL-1R1 mais ne permet pas le recrutement de l'IL-1R3 et empêche donc la transduction du signal. C. L'IL-1R2 peut lier les ligands et recruter le co-récepteur IL-1R3, mais ne peut pas activer la signalisation en aval puisqu'il ne possède pas de domaine TIR. D. L'IL-1R8 peut interférer avec le complexe IL-1/IL-1R1/IL-1R3 (notés sIL-1R1/2) et empêcher la signalisation en aval. E. Enfin, les formes solubles des récepteurs IL-1R1, IL-1R2 et IL-1R3 existent et servent de leurres.

lules endothéliales qui produisent des chimiokines et des protéines d'adhésion [42]. De plus, elle stimule les cellules NK (*natural killer*), la maturation des cellules dendritiques, active les lymphocytes B et les lymphocytes T CD4 et permet la polarisation des lymphocytes T en TH17 (lymphocytes T *helper*), cellules permettant de combattre les bactéries extracellulaires et les champignons via l'activation des neutrophiles [29].

L'interleukine-18

De la même manière que l'IL-1 β , l'IL-18 est synthétisée sous forme de précurseur inactif de 24 kDa dans les cellules au repos. Sa maturation est effectuée par la protéase pro-caspase-1, elle-même maturée par un inflammasome. L'IL-18 mature signale par l'intermédiaire de son récepteur IL-18R, un hétérodimère formé des chaînes IL-18R α et IL-18R β , qui possèdent des domaines TIR et déclenchent les voies de signalisation NF- κ B et MAPK. Il existe également des leurres qui empêchent la signalisation IL-18, comme l'*IL-18 binding protein* [43].

Cette cytokine est importante notamment pour la polarisation des lymphocytes T en TH1, l'activation de l'endothélium vasculaire via la synthèse des molécules d'adhésion et la synthèse d'IFN- γ par les cellules NK [29, 43].

1.2.2 Le *Tumor necrosis factor*

Le TNF est synthétisé en réponse à l'activation de la voie NF- κ B. Sa sécrétion par les cellules ne nécessite pas l'activation d'un inflammasome. Cette cytokine forme un trimère inséré dans la membrane plasmique, trimère qui peut être clivé donnant une forme soluble. La forme soluble et la forme membranaire du trimère signalisent via le récepteur TNFR1, porté par toutes les cellules. Ceci permet de déclencher la mort cellulaire (par nécroptose ou apoptose), ou les voies de signalisation NF- κ B et MAPK (cette signalisation est développée plus bas dans la section 1.3 et la figure 1.4). A l'inverse, le trimère membranaire peut aussi activer le récepteur TNFR2, présent sur quelques types cellulaires mais pas les macrophages et conduit à l'activation des voies de signalisation NF- κ B et MAPK [44].

Le TNF stimule les cellules de endothélium vasculaire ce qui provoque l'expression de molécules d'adhésion et facilite l'extravasation (traversée de l'endothélium) par les monocytes et les neutrophiles permettant ainsi à ces cellules d'être recrutées au site d'inflammation. Le TNF entraîne aussi la coagulation sanguine et donc l'obstruction des vaisseaux sanguins, empêchant ainsi la dissémination du pathogène dans le corps. En plus de ces effets au niveau local, le TNF permet de déclencher de la fièvre, et, tout comme l'IL-1 β , permet la synthèse des protéines de la phase aigüe [44].

Ainsi, dans les expériences présentées par la suite, l'IL-1 β et l'IL-18 seront utilisées pour détecter l'activation de l'inflammasome et le TNF pour détecter l'activation de la

voie de signalisation NF- κ B.

1.3 La mort cellulaire déclenchée lors des réponses inflammatoires

Alors que le processus de mort cellulaire peut se produire de manière accidentelle au cours de l'infection, il peut également être contrôlé [45]. La mort cellulaire peut entraîner des dysfonctionnements dans un organe ce qui est à l'origine de symptômes d'une maladie. En causant la mort des cellules impliquées dans les défenses immunitaires, les pathogènes peuvent rester plus longtemps dans l'hôte [45]. Au contraire, certains pathogènes intracellulaires peuvent empêcher le déclenchement de la mort cellulaire, ce qui leur permet de se répliquer. Cependant, la dissémination de ces pathogènes et leur transmission à d'autres cellules peuvent nécessiter la mort de la cellule hôte [46]. D'autre part, la mort cellulaire peut être un mécanisme important dans la défense de l'organisme contre les pathogènes. En effet, elle peut permettre l'élimination de la cellule infectée ainsi que le relargage de DAMP et donc l'activation de la réponse inflammatoire, nécessaire à la réparation des tissus endommagés [47].

Il existe plusieurs types de mort cellulaire, différant par leur morphologie et le contrôle de leur déclenchement (figure 1.3).

La pyroptose La pyroptose est un type de mort cellulaire dont le déclenchement est contrôlé par l'activation des caspases inflammatoires. Il permet le relargage de nombreux DAMP et donc l'entretien de la réponse inflammatoire. Il sera expliqué plus en détail par la suite (section 1.4.2).

L'apoptose L'apoptose est un type de mort cellulaire dont le déclenchement est également contrôlé. Il se produit de manière physiologique notamment lors du développement embryonnaire, il permet aussi le recyclage normal des cellules dans les tissus sains [48]. La cellule se condense, et des bourgeonnements apparaissent au niveau de la membrane, permettant la formation de corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques sont phagocytés et dégradés par les phagocytes. Ainsi, ce type de mort cellulaire ne permet pas le relargage de DAMP et ne participe donc pas au déclenchement et à l'entretien de la réponse inflammatoire [46]. Cependant, l'apoptose est un mécanisme essentiel pour le fonctionnement du système immunitaire adaptatif. Premièrement, durant le développement du système immunitaire, la grande majorité des lymphocytes sont éliminés par apoptose via les sélections positives et négatives qui permettent d'éliminer les cellules T ne reconnaissant pas le complexe majeur d'histocompatibilité et les cellules autoréactives respectivement. Lors de la réponse immunitaire adaptative, les cellules infectées sont éli-

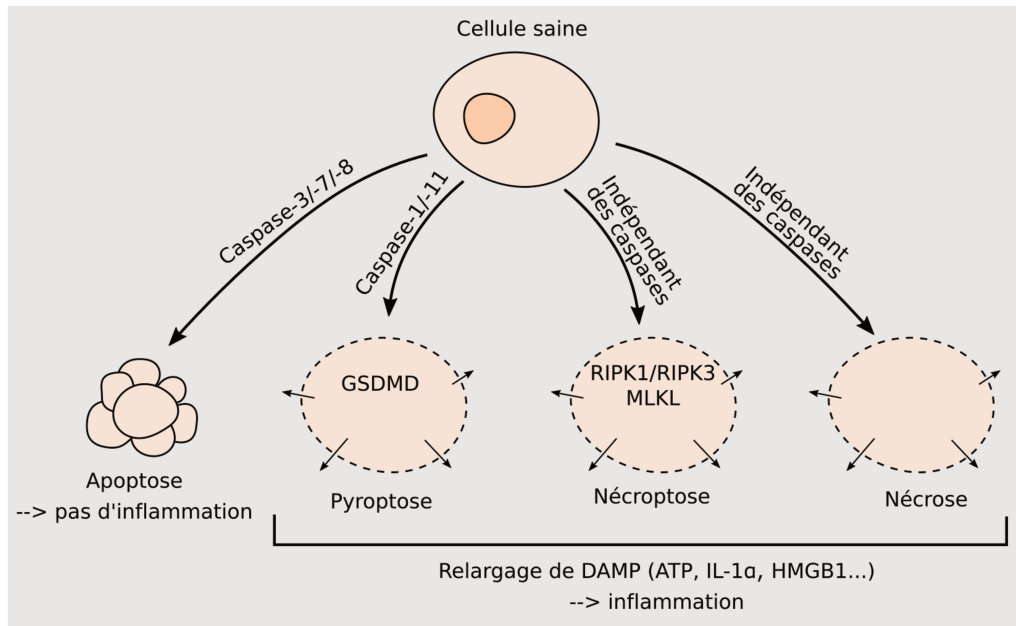


Figure 1.3 – **Principaux types de mort cellulaire.** L'apoptose est un type de mort cellulaire qui ne déclenche pas l'inflammation. Les vésicules apoptotiques produites sont phagocytées par les cellules et aucun DAMP n'est relargué. La pyroptose est déclenchée suite à l'activation des caspases inflammatoires (caspase-1 et caspase-11) et est dépendante de la protéine gasdermine-D (GSDMD). La nécrose et la nécroptose sont indépendantes des caspases. La nécroptose dépend des kinases RIPK1, RIPK3 et de la protéine MLKL (*mixed lineage kinase domain-like*). Ces types de mort cellulaires permettent le relargage de DAMP, et donc l'amplification de la réponse inflammatoire. Figure construite avec l'aide de P. Palazon.

minées par induction de l'apoptose par les lymphocytes cytotoxiques. Les cellules NK déclenchent également l'apoptose des cellules tumorales ou infectées [49]. A la fin de la réponse immunitaire, les lymphocytes qui ont proliféré sont éliminés par apoptose, ainsi que les lymphocytes autoréactifs qui auraient pu être générés lors de l'activation du système immunitaire (lors de l'hypermutation somatique des lymphocytes B par exemple) [50].

La nécrose et la nécroptose La nécrose survient très tôt au cours de l'inflammation et apparaît accidentellement. Elle peut survenir suite à l'infection d'une cellule par un pathogène, au changement de pH, de température ou de pression osmotique [51]. Elle se reconnaît morphologiquement par le gonflement de la cellule, la perte de l'intégrité de la membrane plasmique et le déversement du contenu cytoplasmique de la cellule dans les tissus, ce qui entraîne la génération de DAMP. Ces DAMP permettent de déclencher ou d'entretenir la réponse inflammatoire. Une forme contrôlée de la nécrose existe et est désignée sous le terme de nécroptose. Elle est mise en place suite à la phosphorylation de la protéine MLKL (*mixed lineage kinase domain-like*) par la kinase RIPK3, ce qui entraîne la formation de pores dans la membrane plasmique [52]. La nécroptose est déclenchée par la signalisation en aval de plusieurs stimuli, dont le TNF, mais aussi certains PAMP dont le LPS [53, 54] dans des conditions où les caspases sont inhibées. La voie de signalisation

conduisant à la nécroptose est exposée de manière simplifiée dans la figure 1.4. Le TNF, sous forme de trimère, se lie au récepteur TNFR1. Ceci permet le recrutement et l'ubiquitination de RIPK1, ce qui active la voie de signalisation NF- κ B et entraîne la survie de la cellule. Lorsque RIPK1 est déubiquitiné par A20, il forme un complexe pro-nécrotique en s'associant avec RIPK3 et en phosphorylant ces deux kinases, ce qui permet la phosphorylation de la protéine MLKL qui peut alors former des pores dans la membrane plasmique, ce qui entraîne la lyse des cellules. Si la caspase-8 est inactivée, RIPK1 et RIPK3 sont clivées par cette enzyme, ce qui entraîne la formation d'un complexe composé notamment de FADD (*Fas-associated protein with death domain*), caspase-8 et RIPK1, responsable de l'apoptose [51].

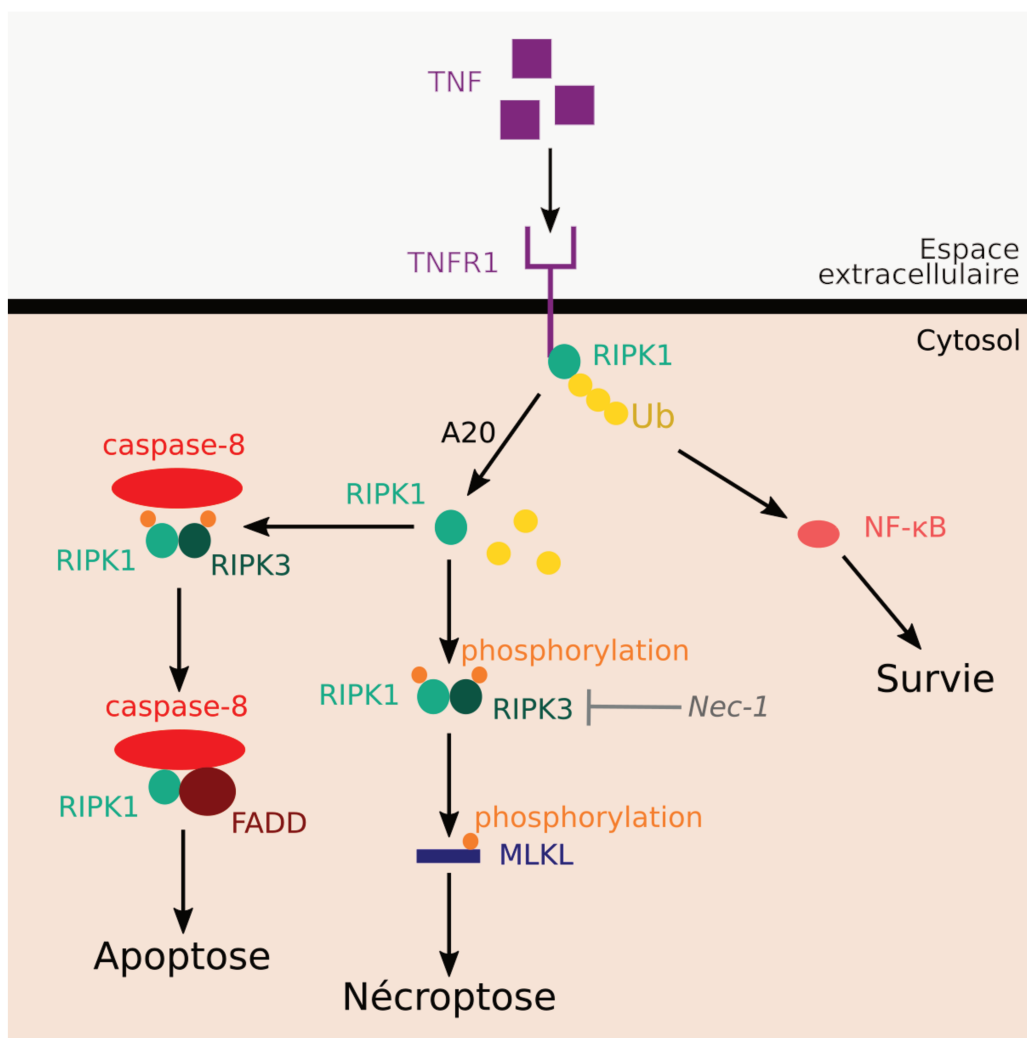


Figure 1.4 – **Signalisation simplifiée déclenchée par le TNF.** Suite à la stimulation de TNFR1, RIPK1 est recrutée et ubiquitinée, ce qui entraîne l'activation de NF- κ B et la survie de la cellule. Si RIPK1 est déubiquitiné par A20, il forme un complexe pro-nécrotique avec RIPK3 par phosphorylation de ces deux protéines, ce qui permet la phosphorylation de MLKL et la formation de pores dans la membrane plasmique, entraînant la lyse cellulaire. Si la caspase-8 est active, elle permet alors le clivage de RIPK1 et RIPK3, ce qui entraîne l'activation d'un complexe composé de FADD, caspase-8 et RIPK1 qui déclenche l'apoptose.

1.4 Les inflammasomes

Les récepteurs NLR ne sont pas les seuls PRR à former des inflammasomes. Nous détaillerons ici quels sont les récepteurs capables de former des inflammasomes, de quoi sont constituées ces plateformes multi-protéiques et comment elles fonctionnent. Sauf indications contraires, ces mécanismes moléculaires seront détaillés dans les macrophages.

1.4.1 Composition des inflammasomes

Les inflammasomes sont des plateformes multi-protéiques sont composées de trois protéines différentes : un récepteur, un effecteur et un adaptateur.

Les récepteurs des inflammasomes

Il existe divers inflammasomes formés en réponse à des signaux de danger et qui diffèrent par le récepteur impliqué dans leur formation, récepteur qui donne son nom à la structure formée. En 2002, l'inflammasome NLRP1 (*nucleotide binding and oligomerization leucine rich repeat pyrin domain containing 1*) a été le premier inflammasome découvert [23]. Depuis, plusieurs autres récepteurs formant des inflammasomes ont été identifiés : NLRP3, NLRC4 (*nucleotide-binding and oligomerization leucine rich repeat and CARD domain containing 4*), AIM2 (*absent in melanoma 2*) et Pyrin [55–57]. D'autres protéines, incluant NLRP6, NLRP7, NLRP12, IFI16 (*IFN- γ inducible protein 16*), RIG-I (*retinoic acid inducible gene 1*), sont capables de conduire à l'activation de la caspase-1 et sont donc soupçonnées de former des inflammasomes [55].

Les signaux de danger auxquels répondent ces différents récepteurs sont détaillés dans le tableau 1.2.

Récepteurs	Signaux activateurs
NLRP1	Toxine léthale de <i>Bacillus anthracis</i> Infection avec <i>Toxoplasma gondii</i>
NLRP3	PAMP et DAMP Toxines qui forment des pores Cristaux Radiations UV
NLRC4	Flagelline Protéines formant les T3SS et T4SS (ex : <i>Salmonella</i>)
AIM2	ADN double brin dans le cytosol
Pyrin	Toxines bactériennes

Tableau 1.2 – Exemples de signaux activateurs des différents inflammasomes. T3SS et T4SS : systèmes de sécrétion de types 3 et 4 respectivement.

Les autres composants des inflammasomes

L'effecteur caspase-1 L'effecteur des inflammasomes est la protéine caspase-1. Cette protéine appartient à la famille des protéases à cystéines, protéases qui clivent leurs substrats à proximité d'un résidu acide aspartique [58]. Elle est constituée d'un domaine CARD en N terminal, puis de deux sous-unités catalytiques p20 et p10, autrement appelées « grande » et « petite » sous-unité catalytique respectivement. Elle est synthétisée dans le cytosol sous la forme d'un précurseur inactif, la pro-caspase-1. Le domaine CARD permet à cette protéine d'être recrutée par les inflammasomes grâce à des interactions homotypiques. Ceci nécessite donc la présence dans les inflammasomes d'autres protéines portant ce même domaine. Certains récepteurs des inflammasomes possèdent un domaine CARD et peuvent donc recruter directement la pro-caspase-1, alors que d'autres doivent d'abord recruter un adaptateur, protéine à domaine CARD, permettant de faire le lien entre le récepteur et l'effecteur.

L'adaptateur ASC L'adaptateur des inflammasomes est une protéine de 22 kDa appelée ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing CARD*), aussi connue sous le nom de PYCARD (*pyrin and CARD domain containing*). Elle est constituée d'un domaine PYD (*pyrin domain*) en N terminal et d'un domaine CARD en C terminal. ASC interagit avec le récepteur via des interactions homotypiques entre les domaines PYD [59–61]. L'expression de cette protéine ne varie pas suite à la détection de PAMP ou de DAMP, cependant, il a été montré que cette protéine, localisée dans le noyau des macrophages et des monocytes au repos, est rapidement relocalisée dans le cytoplasme suite à la détection de ces signaux [62]. La nucléation de nombreuses protéines ASC permet la formation de points d'environ 1 μm de diamètre, appelés *specks* ou pyroptosomes. Chaque cellule activée forme un *speck* unique [63]. Les récepteurs à domaine CARD ne nécessitent pas la présence d'ASC pour déclencher la pyroptose, mais la formation des *specks* nécessite cet adaptateur [64–67]. La figure 1.5 résume les compositions possibles des inflammasomes.

1.4.2 L'assemblage des inflammasomes et ses conséquences

Assemblage des inflammasomes

Structure de NLRP3 La connaissance de la structure des récepteurs des inflammasomes est nécessaire afin d'essayer de comprendre comment ces protéines sont activées et assemblées. Nos travaux ont porté sur l'inflammasome NLRP3, c'est pourquoi ce qui est connu de la structure de cette protéine sera détaillé (figure 1.6).

NLRP3 est un récepteur d'environ 110 kDa constitué de trois domaines structuraux.

En partie N terminale se trouve un domaine PYD. Ce domaine est constitué de six hélices dont les résidus de surface, hydrophobes et chargés, permettent une interaction directe avec la protéine adaptatrice ASC [68]. L'importance de ce domaine dans le maintien

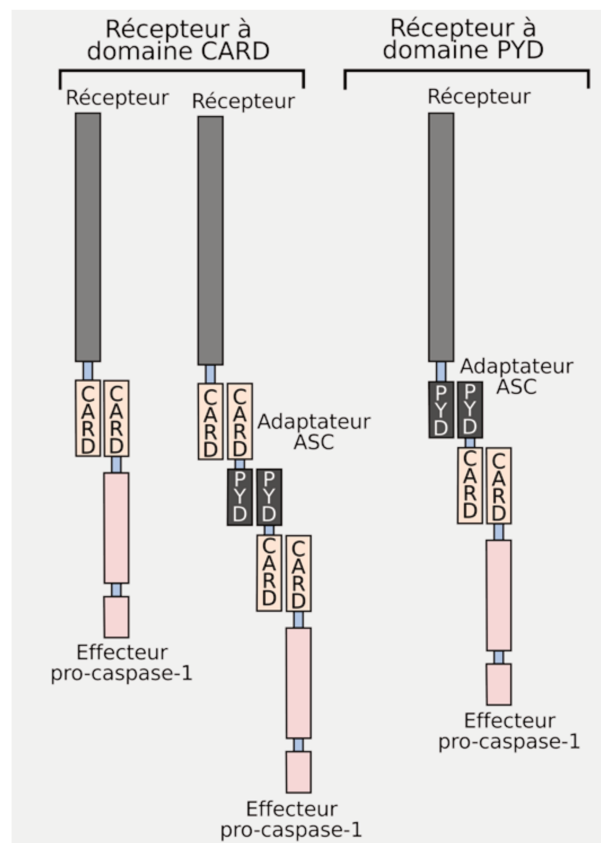


Figure 1.5 – **Assemblage des protéines constitutives des inflammasomes.** Les récepteurs à domaine CARD (NLRP1, NLRC4) peuvent activer la pro-caspase-1 indépendamment de la protéine ASC. Cependant, la protéine ASC peut quand même entrer dans la composition des inflammasomes contenant des récepteurs à domaines CARD. Les récepteurs à domaine PYD recrutent la pro-caspase-1 par l'intermédiaire de l'adaptateur ASC.

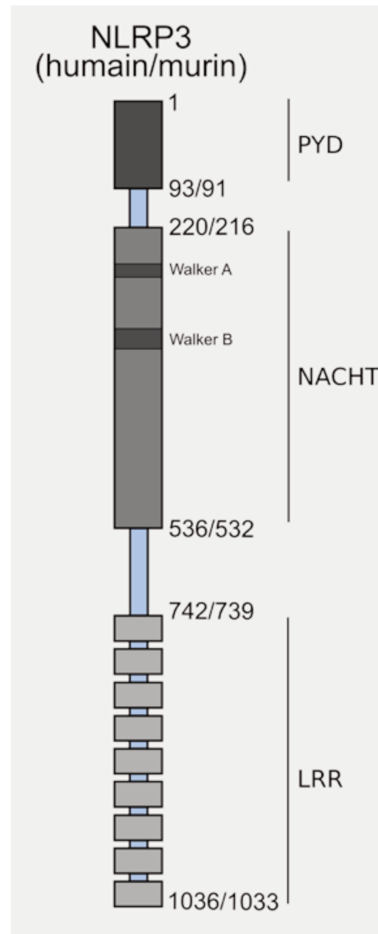


Figure 1.6 – **Organisation structurale de NLRP3.** NLRP3 est une protéine divisée en trois domaines : un domaine PYD en N terminal, un domaine central NACHT contenant des motifs de liaison et d'hydrolyse de l'ATP (Walker A et Walker B), et un domaine LRR en C terminal constitué de 9 motifs LRR. Les numérotations indiquent la position des acides aminés encadrant ces domaines (chez l'homme / chez la souris).

de NLRP3 à l'état inactif a été récemment démontré [69].

La partie C terminale de cette protéine est constituée de neuf répétitions LRR. Les structures inactives des récepteurs homologues NLRC4 et NOD2 ont été décrites [70, 71]. Le domaine LRR de NLRC4 est replié et interagit avec le domaine central ce qui empêche donc l'oligomérisation de la protéine, nécessaire pour son activation [70]. Le ligand bactérien se lie au récepteur NAIP (NAIP2 ou NAIP5, *NLR family apoptosis inhibitory protein*), entraînant le changement de conformation de celui-ci, ce qui lui permet de se lier à NLRC4. Cette fixation entraîne un changement de conformation de NLRC4 et une libération de l'action inhibitrice du LRR, entraînant le recrutement et l'activation d'autres protéines NLRC4. Ce modèle est un modèle d'activation auto-catalytique dans lequel les protéines NLRC4 actives recrutent les protéines NLRC4 inactives, conduisant ainsi à leur activation (figure 1.7 A). L'oligomérisation de NLRC4 entraîne ensuite l'oligomérisation des domaines CARD et le recrutement de la pro-caspase-1 [72]. D'autre part, la protéine NOD2 ne forme pas d'inflammasome mais est capable de s'oligomériser et possède également un domaine LRR. Ce LRR a aussi une action inhibitrice, étant donné que la délétion de ce morceau de la protéine conduit à une augmentation de l'activation de la voie NF- κ B [73]. Cependant, le mécanisme est différent de celui mis en évidence pour la protéine NLRC4. La structure des conformations actives ou inactives de NLRP3 ne sont pas connues, excepté pour le domaine PYD. Par analogie avec NLRC4, un mécanisme inhibiteur du LRR via son repliement sur le domaine NACHT a été proposé. Cependant, une étude récente a montré que le domaine LRR de NLRP3 ne permet pas une auto-inhibition. Dans cette étude, les auteurs proposent que le domaine PYD serait le domaine inhibiteur. Suite à l'activation de plusieurs protéines NLRP3, celles-ci s'assemblent pour former un oligomère actif [69]. Ce modèle d'activation dite stoechiométrique est différent de celui proposé pour NLRC4 (figure 1.7 B).

Le domaine NACHT est essentiel pour l'oligomérisation de NLRP3, qui se fait via des interactions homotypiques entre ces domaines NACHT [74]. Ce domaine contient des motifs de liaison et d'hydrolyse de l'ATP, respectivement les motifs Walker A et Walker B [68]. La liaison de l'ATP est nécessaire à l'activation de l'inflammasome [75]. L'utilisation de divers inhibiteurs de l'activité ATPase de NLRP3 a montré que cette activité était également nécessaire à l'activation de l'inflammasome [76–79].

Une étude utilisant la technique de BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*) a montré que dans les cellules au repos, les protéines NLRP3 sont spatialement proches, le domaine PYD d'une protéine interagissant avec le domaine LRR d'une autre protéine. Suite à la détection des signaux d'activation, l'oligomère change de conformation et devient plus compact, mécanismes dépendants de la protéine ASC [80]. Ceci étant, l'organisation spatiale de l'inflammasome NLRP3 reste largement inconnue.

La kinase NEK7 Une protéine désignée sous le nom de NEK7 (*NIMA-related kinase*) est un constituant essentiel de l'inflammasome et fait partie du complexe multi-

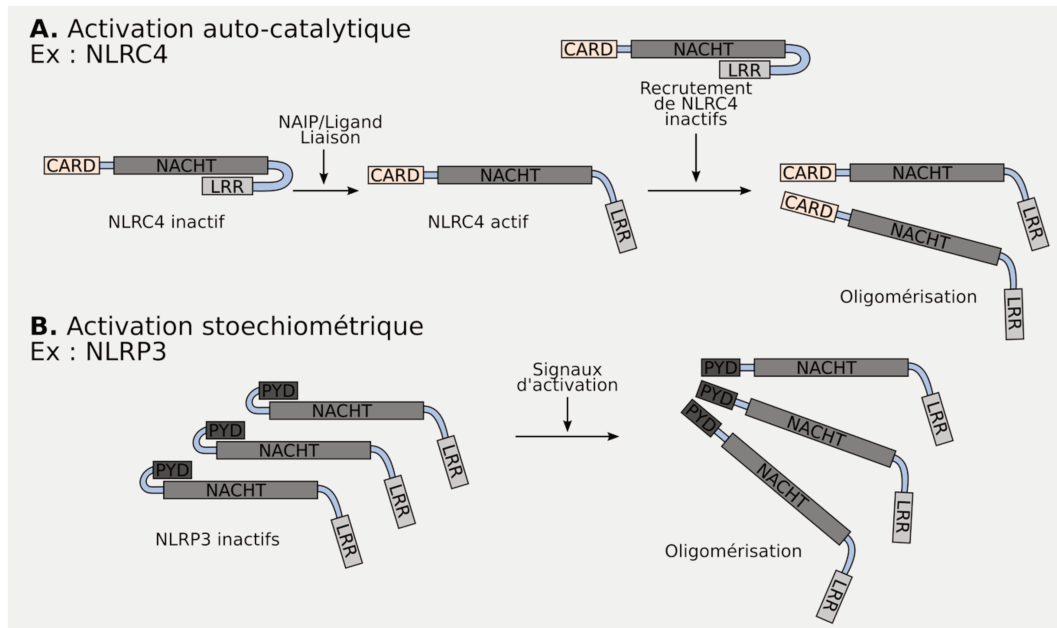


Figure 1.7 – **Modèles de formation des oligomères actifs de récepteurs de l’inflammasome.** A. Modèle d’activation autocatalytique, démontré pour NLRC4. Le domaine LRR de NLRC4 est replié sur le domaine NACHT et maintient NLRC4 dans une conformation inactive. Suite à la liaison du complexe NAIP/ligand sur NLRC4, il se produit une levée de l’inhibition ce qui entraîne le recrutement et l’activation d’autres protéines NLRC4. B. Modèle d’activation stoechiométrique, hypothétique pour NLRP3. NLRP3 est gardé dans une conformation inactive grâce au domaine PYD. Les signaux d’activation entraînent la levée d’inhibition par le domaine PYD et l’assemblage des protéines actives.

protéique. Elle interagit avec NLRP3 et régule son oligomérisation. Etant donné que cette protéine est localisée au niveau des centrosomes, elle pourrait permettre de localiser l’assemblage de l’inflammasome au niveau des centrosomes. Cependant son activité kinase n’est pas essentielle pour l’activation de l’inflammasome. NEK7 n’est pas importante pour la formation des inflammasomes AIM2 et NLRC4 [81–83].

Nucléation des protéines ASC et pro-caspase-1 Suite à l’assemblage du récepteur, l’adaptateur ASC est recruté à ce complexe grâce à des interactions homotypiques PYD-PYD et forme de longs filaments hélicoïdaux [84–86]. Les domaines CARD des protéines ASC sont ainsi exposés à la surface de ces filaments et permettent le recrutement et la nucléation de filaments de pro-caspase-1 via des interactions homotypiques CARD-CARD [85, 86]. Le rassemblement des filaments d’ASC en un *speck* semble être dépendant de la présence du domaine CARD d’ASC, étant donné que des filaments d’ASC, mais pas de *specks*, sont formés dans des cellules exprimant seulement le domaine PYD d’ASC [55]. Ainsi, à partir de la détection d’une faible quantité de signaux d’activation, il se produit une amplification de ce signal via le recrutement de grandes quantités d’ASC et d’encore plus grandes quantités de pro-caspase-1.

Les récepteurs des inflammasomes ne possédant pas de domaines PYD, comme

NLRC4 et NLRP1, peuvent recruter directement la pro-caspase-1 et ne forment donc pas de *specks*. Ceci entraîne le déclenchement de la pyroptose mais ne permet pas une maturation efficace des pro-cytokines. Cette maturation requiert la formation des *specks* d'ASC [55, 64].

Activation de la caspase-1

L'activation de la pro-caspase-1 est nécessaire pour le clivage efficace de ses substrats. Ceci est réalisé grâce à la dimérisation de cette protéine puis son clivage auto-protéolytique [64, 87]. Le recrutement de la pro-caspase-1 dans les inflammasomes et la formation de filaments de cette protéine facilite sa dimérisation [88]. La dimérisation de la pro-caspase-1 (forme p46) permet d'activer faiblement la protéine. Ceci entraîne ensuite son clivage protéolytique. Deux sites de clivage existent : au niveau des zones charnières soit entre le domaine CARD et la sous-unité p20, soit entre les sous-unités p20 et p10 (figure 1.8). Ce dernier type de clivage permet d'augmenter le répertoire de substrats de la caspase-1, alors que le premier entraîne la dissociation de l'enzyme du complexe et son inactivation [88]. La forme active très efficace de la caspase-1 serait ainsi constituée d'un dimère p33/p10, dimère dont l'auto-clivage conduit à la génération d'un dimère p20/p10 [88]. Ce dimère n'est plus accroché à l'inflammasome et, du fait de son manque de stabilité dans les cellules, est rapidement dissocié ce qui aboutit à l'inactivation de la caspase-1. De plus, la même étude a montré que le type cellulaire et le nombre de sites de recrutement pour la pro-caspase-1, autrement dit la taille de l'inflammasome, contrôlaient le type d'autoclivage de la caspase-1. Les neutrophiles ont été ainsi décrits comme un type cellulaire dans lequel l'activation de la caspase-1 était prolongée [88].

L'activation complète et le clivage auto-protéolytique de la pro-caspase-1 est nécessaire pour le clivage des pro-cytokines. Cependant, il a été montré que le déclenchement de la pyroptose en aval des inflammasomes NLRC4 et AIM2 pouvait être effectué sans clivage autoprotéolytique de la pro-caspase-1 indépendamment de la protéine ASC. L'inflammasome indépendant d'ASC ne forme pas de *specks* mais plutôt plusieurs *puncta* de caspase-1 dans la cellule [64].

Conséquences de l'activation de l'inflammasome

L'assemblage de l'inflammasome conduit à l'activation de la protéase caspase-1. Cette enzyme a d'abord été identifiée comme étant une *interleukin-converting enzyme* (ICE), soit une enzyme de maturation des interleukines. Cependant, d'autres substrats ont été ensuite découverts. En effet, la deuxième conséquence de l'activation de l'inflammasome est le déclenchement de la mort cellulaire, appelée pyroptose.

Mort cellulaire par pyroptose La mort cellulaire par pyroptose est déclenchée suite à l'activation des caspases inflammatoires, comprenant la caspase-1 mais aussi la

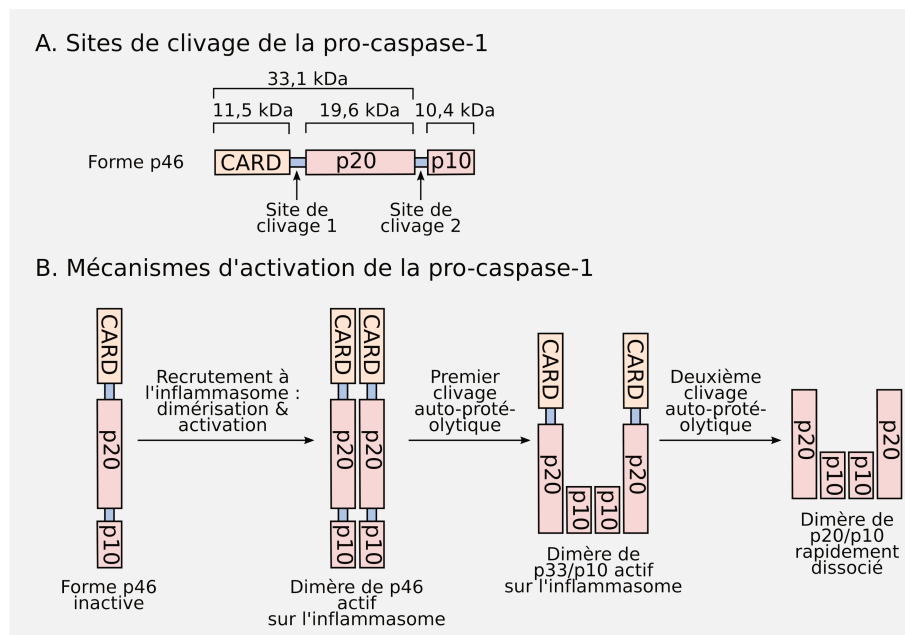


Figure 1.8 – **Mécanisme d'activation de la caspase-1.** A. La pro-caspase-1 est divisée en trois domaines : un domaine CARD permettant son recrutement à l'inflammasome, et deux sous-unités catalytiques p20 et p10. Il existe deux sites de clivage dans cette protéine, situés entre les domaines. B. La pro-caspase-1 est sous forme inactive dans le cytosol. Suite à son recrutement à l'inflammasome, elle se dimérise, ce qui permet d'activer faiblement son activité catalytique. Suite à un premier clivage auto-protéolytique situé entre les domaines p10 et p20, un dimère p33/p10 se forme. Ce dimère est très actif et est toujours situé sur l'inflammasome. Ensuite, un second clivage auto-protéolytique se produit, permettant de former le dimère p20/p10, dissocié de l'inflammasome et qui devient rapidement inactif.

caspase-11 chez la souris ou les caspase-4 et caspase-5 chez l'homme. Comme expliqué dans la section précédente 1.4.2, la caspase-1 est activée par les inflammasomes, contrairement à la caspase-11. De plus, la caspase-11 n'est pas capable de cliver les cytokines pro-inflammatoires. Nous détaillerons les mécanismes d'activation de cette caspase ainsi que ses rôles dans l'activation de l'inflammasome dans la section suivante 1.5.2.

La pyroptose se caractérise par un gonflement de la cellule, une lyse et un relargage du contenu cytosolique, probablement liée à la formation de pores [46]. Le déclenchement de la pyroptose dépend d'une protéine, la gasdermine-D (GSDMD), qui est un substrat des caspases inflammatoires [89–91]. Son clivage résulte en la génération d'un fragment N terminal responsable de la formation de pores dans la membrane plasmique [90]. La manière dont la gasdermine-D entraîne la pyroptose et le lien avec les pores formés reste à être précisé.

Maturation et relargage des cytokines pro-inflammatoires Premièrement, les cytokines pro-inflammatoires, synthétisées sous forme de pro-cytokines dans les cellules, sont maturées par clivage protéolytique, leur permettant ainsi de pouvoir exercer leurs fonctions biologiques. Plus particulièrement, deux cytokines ont été identifiées : l'IL-1 β et l'IL-18. Ces cytokines sont sécrétées dans le milieu extracellulaire suite à leur clivage. Le clivage de l'IL-1 β est à la fois nécessaire et suffisant pour déclencher sa sécrétion [92]. Cependant, l'IL-1 β et l'IL-18 ne possèdent pas de séquence signal et sont donc relarguées de manière dite non conventionnelle, c'est-à-dire de manière indépendante de la voie de sécrétion plus habituelle passant par le reticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi [93]. Les voies empruntées par ces cytokines sont toujours mal comprises et les différentes mises en évidence expérimentales existantes sont complexes et controversées. Plusieurs mécanismes de sécrétion par les macrophages ont été proposés pour l'IL-1 β (figure 1.9).

Une première série de mécanismes pourrait être dépendante de vésicules. Les premières hypothèses suggéraient que l'IL-1 β était sécrétée suite à l'exocytose de lysosomes ou au bourgeonnement de microvésicules. Plusieurs contre-arguments ont été avancés en opposition à ce modèle : (i) l'IL-1 β est maturée dans le cytosol [84, 94] et (ii) les macrophages ayant des déficiences dans la voie de sécrétion lysosomale sécrètent la cytokine normalement [84]. Les exosomes, ces vésicules remplies de contenu cytosolique et qui se forment à partir des membranes des endosomes tardifs, pourraient également permettre le relargage de l'IL-1 β [95]. Cette hypothèse est cependant controversée.

Les autres mécanismes seraient indépendants des vésicules. Tout d'abord, l'autophagie pourrait conduire à la sécrétion d'IL-1 β , comme le montre une étude utilisant des cellules cultivées dans un milieu pauvre, même si ce ne semble pas être le mécanisme principal de sécrétion dans les conditions où le milieu de culture est riche [96]. Puisque la pyroptose et la sécrétion d'IL-1 β sont concomitantes, plusieurs études ont proposé un mécanisme de sécrétion d'IL-1 β passif suite à la lyse cellulaire résultant du déclenchement de la pyroptose [97–99]. Cependant, la sécrétion d'IL-1 β peut avoir lieu en absence

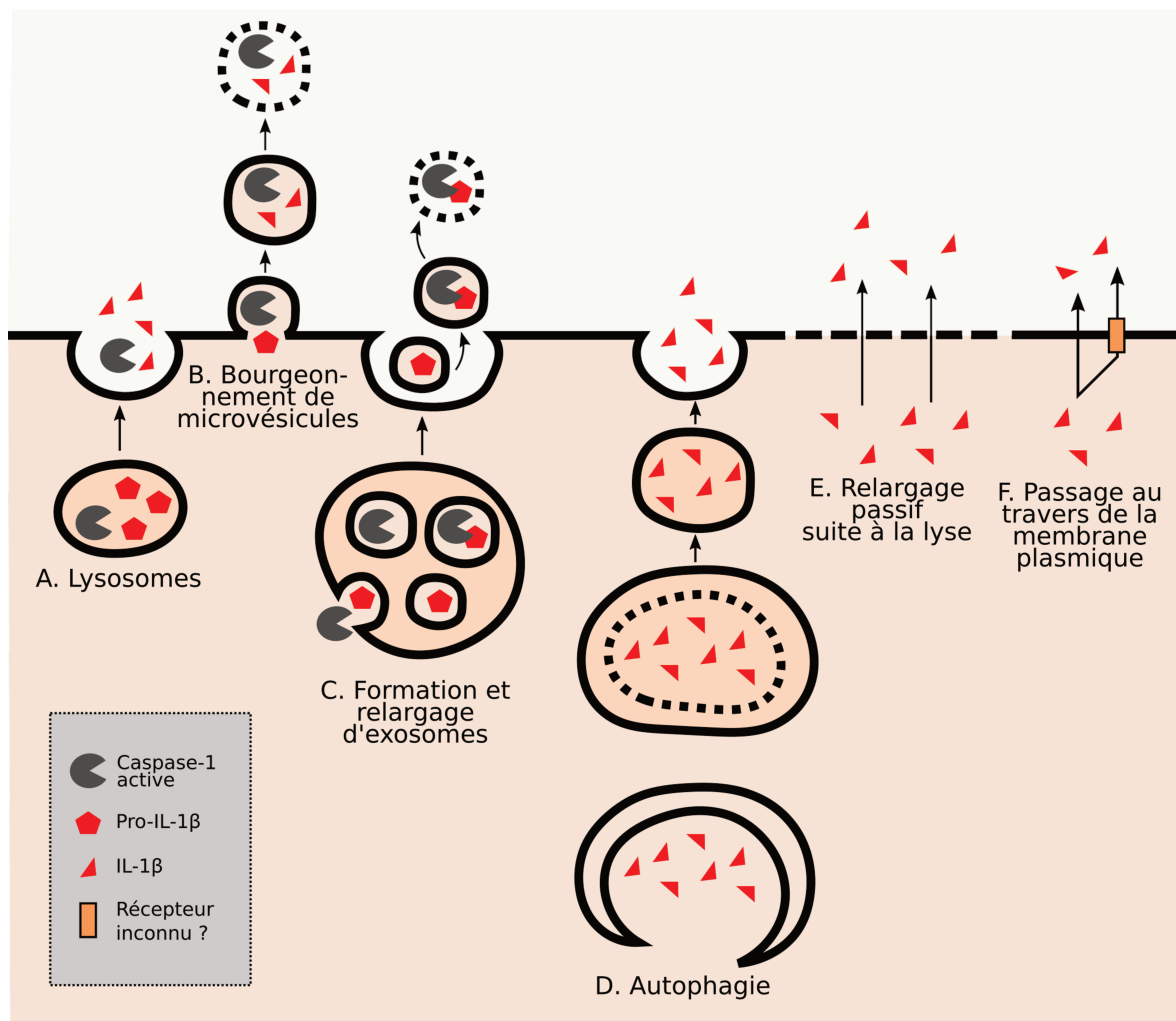


Figure 1.9 – **Voies de relargage de l'IL-1 β proposées.** A. Relargage de l'IL-1 β via les exosomes. B. Relargage suite au bourgeonnement de microvésicules. C. Formation et relargage d'exosomes. D. Formation de vésicules d'autophagies. E. Relargage de l'IL-1 β passivement suite à la lyse des cellules, ou à travers les pores formés par la gasdermine-D. F. Passage au travers de la membrane plasmique, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un transporteur.

de pyroptose et donc de lyse cellulaire, ce qui est notamment observé dans les neutrophiles [100, 101]. Des pores de 10-15 nm de diamètre sont formés par la protéine GSDMD aboutissant au déclenchement de la lyse cellulaire [102, 103]. Ceci permet d'envisager une sécrétion de l'IL-1 β mature, protéine d'environ 4,5 nm de diamètre, à travers ces pores [104]. Enfin, un passage de l'IL-1 β directement à travers la membrane plasmique, soit seul ou via un transporteur a été proposé [97, 105–107]. Une étude récente a montré que le clivage de l'IL-1 β , qui se produit dans le cytosol, permettait sa relocalisation à la membrane plasmique au niveau d'îlots de PIP2 (phosphatidyl inositol diphosphate) grâce à la présence de motifs polybasiques exposés suite à ce clivage. Dans ces conditions, il peut être sécrété. Par ailleurs, le clivage de la protéine GSDMD par la caspase-1 permet d'augmenter cette vitesse de sécrétion [92].

La sécrétion de l'IL-18, concomitante de celle de l'IL-1 β , est peu étudiée. L'hypothèse généralement acceptée est que la voie empruntée par cette cytokine est la même que celle empruntée par l'IL-1 β [108].

1.5 Mécanismes d'activation et de régulation de l'inflammasome NLRP3

Jusqu'ici nous avons exposé ce qui est connu des mécanismes d'assemblage de l'inflammasome et les événements qui en découlent. Nous allons dans cette partie nous intéresser aux signaux et mécanismes qui permettent de déclencher l'activation de l'inflammasome. Comme chaque inflammasome a un mécanisme d'activation particulier, nous ne détaillerons que ce qui concerne l'inflammasome NLRP3. De plus, comme dans la partie précédente, sauf si cela est précisé différemment, nous détaillerons ces mécanismes dans les cellules sur lesquelles nous avons travaillé par la suite et qui sont les mieux caractérisées, à savoir les macrophages. Cette partie a fait l'objet de deux revues, présentées en annexes A.1.

1.5.1 L'activation canonique de l'inflammasome NLRP3 nécessite deux signaux

L'inflammasome NLRP3 est activé en réponse à une grande variété de PAMP et de DAMP parmi lesquels on peut citer l'hyperglycémie, les céramides, certains acides gras, des agrégats protéiques dont la protéine β -amyloïde, les cristaux (de cholestérol, d'urate de sodium MSU (*monosodium urate*), d'amiante, de silice, de pyrophosphate de calcium, d'alun, d'hémozoïne formés lors de l'infection par *Plasmodium*), l'ATP extracellulaire, l'acide hyaluronique, les toxines bactériennes formant des pores ou encore certains acides nucléiques bactériens et viraux [109, 110]. La grande diversité de ces activateurs suggère que NLRP3 n'est pas le récepteur liant directement ces activateurs. En effet, l'ac-

tivation de NLRP3 nécessite deux signaux : un signal de *priming* ou signal 1 et un signal d'activation ou signal 2 (figure 1.10). C'est ce que nous allons détailler par la suite.

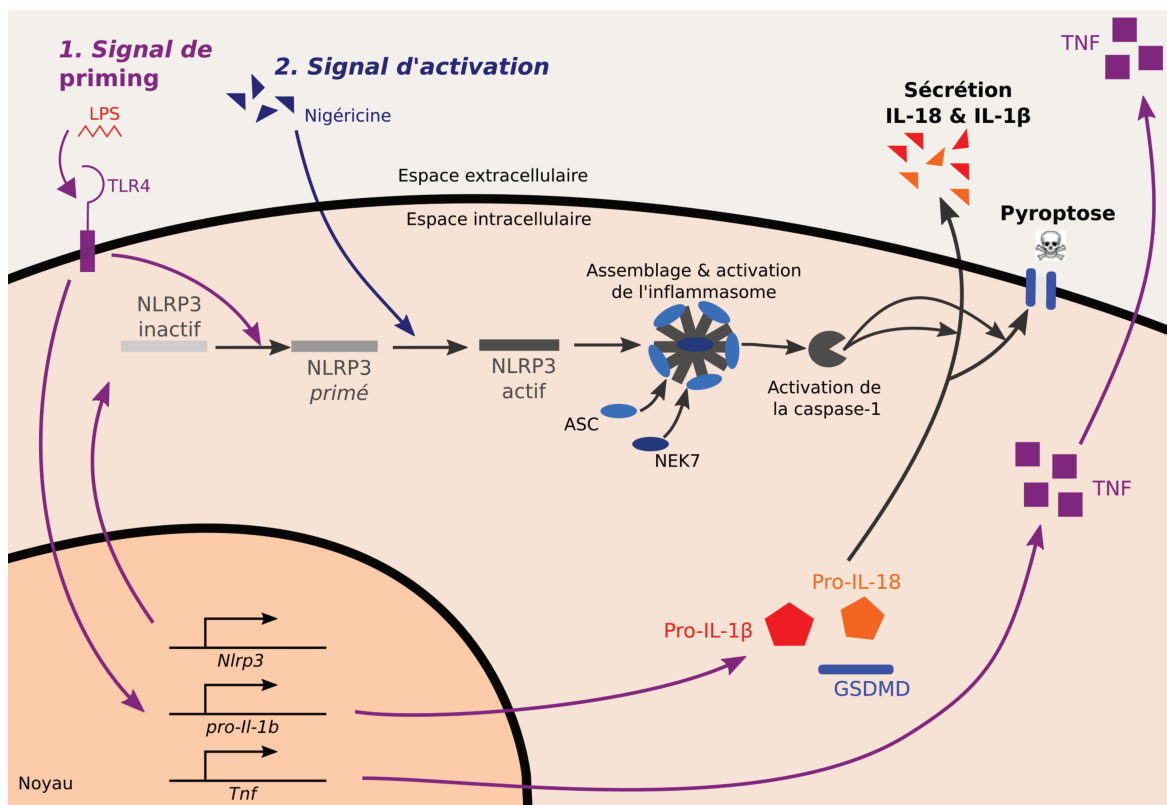


Figure 1.10 – **Activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages.** L'activation de l'inflammasome NLRP3 requiert deux signaux. Le signal 1, ou signal de *priming*, permet d'induire la transcription de *Nlrp3*, *Tnf* et la *pro-Il-1b*. D'autre part, ce signal agit aussi indépendamment de la transcription. Un signal 2, ou signal d'activation, est également nécessaire. Suite à cela, NLRP3 devient actif et assemble un inflammasome, plateforme multiprotéique contenant NLRP3, ASC, NEK7 et la pro-caspase-1. La formation de ce complexe permet l'activation de la caspase-1 et le clivage de ses substrats : les pro-cytokines et la gasdermine-D. Cette dernière forme des pores au niveau de la membrane plasmique et déclenche la pyroptose. De plus, les cytokines matures sont sécrétées par les cellules.

Signal de *priming* ou signal 1

Le *priming* se fait via différents signaux captés par leurs récepteurs, récapitulés dans le tableau 1.3. Ces signaux sont soit des PAMP/DAMP (comme le LPS), soit des protéines synthétisées suite à la mise en place de la réponse inflammatoire (comme le TNF).

Les signaux de *priming* permettent l'activation de la voie de signalisation NF- κ B, qui déclenche notamment la synthèse du TNF, de la pro-IL-1 β et de NLRP3. En effet, *Nlrp3* est peu exprimé dans les macrophages au repos et, comme expliqué auparavant, la *pro-IL-1b* ne l'est pas du tout [115]. Des lignées cellulaires exprimant *Nlrp3* à des niveaux équivalents à ceux induits suite au *priming* n'ont plus besoin de ce signal pour activer l'inflammasome NLRP3, mais seulement du signal d'activation [76, 115, 116]. Ces données ont donc longtemps restreint le rôle du signal 1 à un rôle dépendant uniquement de

Signaux de <i>priming</i> (Exemples)	Récepteurs	Références
LPS, bactéries...	TLR	[111]
TNF	TNFR1 et TNFR2	[112]
IL-1	IL-1R	[111]
HMGB1	RAGE	[113]
Anaphylatoxines (C3a, C5a)	C3aR, C5aR	[114]

Tableau 1.3 – Exemples de différents signaux de *priming* et de leurs récepteurs.

la transcription.

Cependant, plusieurs équipes ont détecté l'activation de l'inflammasome suite à des temps de *priming* trop courts pour permettre la transcription (moins de 2h) [117–119]. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ces observations. Premièrement, le signal de *priming* pourrait entraîner une relocalisation des protéines nécessaires à la constitution de l'inflammasome. Deuxièmement, le *priming* pourrait réguler des protéines accessoires non connues. Troisièmement, le *priming* régulerait des modifications post-traductionnelles sur NLRP3 principalement mais aussi sur d'autres protéines nécessaires à la formation de l'inflammasome [119].

Ces observations ont conduit à diviser le *priming* en une phase précoce et une phase tardive, respectivement indépendantes et dépendantes de la transcription [118]. Par la suite, d'autres phases ont également été décrites : un *priming* court, un *priming* intermédiaire, un *priming* long ainsi qu'un *priming* extra-long (figure 1.11).

Le *priming* court (0-30min) et le *priming* intermédiaire (30min - 2h) La première phase est mise en place durant environ trente minutes après l'engagement des récepteurs et est dépendante d'IRAK1. En l'état actuel des connaissances, seuls les récepteurs TLR semblent être impliqués dans l'activation via le *priming* court. Cette signalisation implique notamment les protéines MyD88, IRAK1 et IRAK4 [117–119]. De plus, l'utilisation de composés inhibiteurs du complexe I de la mitochondrie, entraînant donc la production de ROS (*reactive oxygen species*) mitochondriaux, peuvent servir de signal 1 lors du *priming* court, suggérant ainsi que les ROS mitochondriaux sont importants dans cette signalisation [76].

La phase suivante est déclenchée suite à la dégradation de la protéine IRAK1. Cette phase est impliquée dans le *priming* avant que la transcription et la traduction aient pu s'achever, soit environ entre 30 min et 2h après le signal 1 [117, 118].

Le *priming* long (2h - 12h) La troisième phase de *priming*, le *priming* long, est définie lorsque que la transcription devient possible. La protéine MyD88 est de nouveau nécessaire dans cette phase, ainsi que la protéine TRIF [117]. De plus, les protéines FADD et caspase-8 sont également impliquées en aval de ces signaux et permettent l'activation de la voie NF- κ B [120]. Cependant, des résultats contradictoires ont été publiés, montrant que la voie NF- κ B n'était pas impactée dans les souris déficientes en caspase-8 par

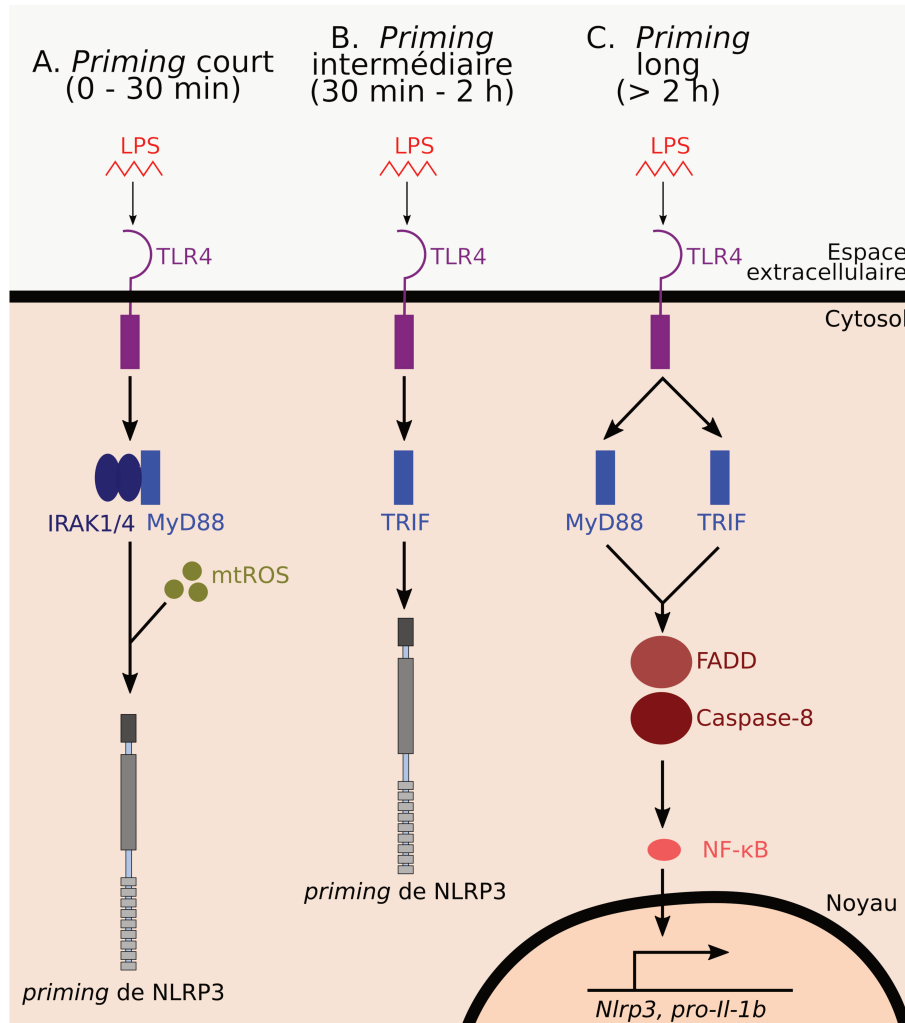


Figure 1.11 – **Voies de signalisation activées au cours du *priming*.** A. Le *priming* court passe par la voie MyD88 et nécessite IRAK1 et IRAK4, ainsi que la présence de ROS mitochondriaux (mtROS). B. Le *priming* intermédiaire passe par la voie TRIF. C. Le *priming* long active la transcription. Il passe à la fois par l’adaptateur MyD88 et l’adaptateur TRIF. Il permet l’activation de la voie de signalisation NF-κB. Les protéines FADD et caspase-8 sont également impliquées dans cette voie de signalisation.

rapport aux souris sauvages [121].

Le priming extra-long (plus de 12h) Une stimulation très longue des cellules peut conduire à une inhibition de l'activation de l'inflammasome. Physiologiquement, ceci permet d'empêcher une activation permanente et par conséquent délétère de l'inflammation en cas d'infection longue durée avec un pathogène par exemple. Ce processus, appelé désensibilisation se produit suite à l'engagement des TLR. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette régulation. Tout d'abord, la signalisation déclenchée par le LPS permet la production d'IFN de type I (figure 1.1), qui agissent ensuite de façon autocrine et paracrine sur les cellules, leur permettant de synthétiser les protéines iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) et TRIM30 (*tripartite motif 30*). Ces molécules inhibent l'activation de NLRP3 par la production de NO (*oxyde nitrique*) pour la première, et par la diminution de la production de ROS pour la seconde [122, 123]. D'autre part, les IFN de type I entraînent la production d'IL-10, protéine qui inhibe la synthèse de la pro-IL-1 β (figure 1.12) [124]. Enfin, l'induction de la protéine p62 permet d'activer la dégradation des mitochondries endommagées, signal nécessaire à l'activation de NLRP3 [125].

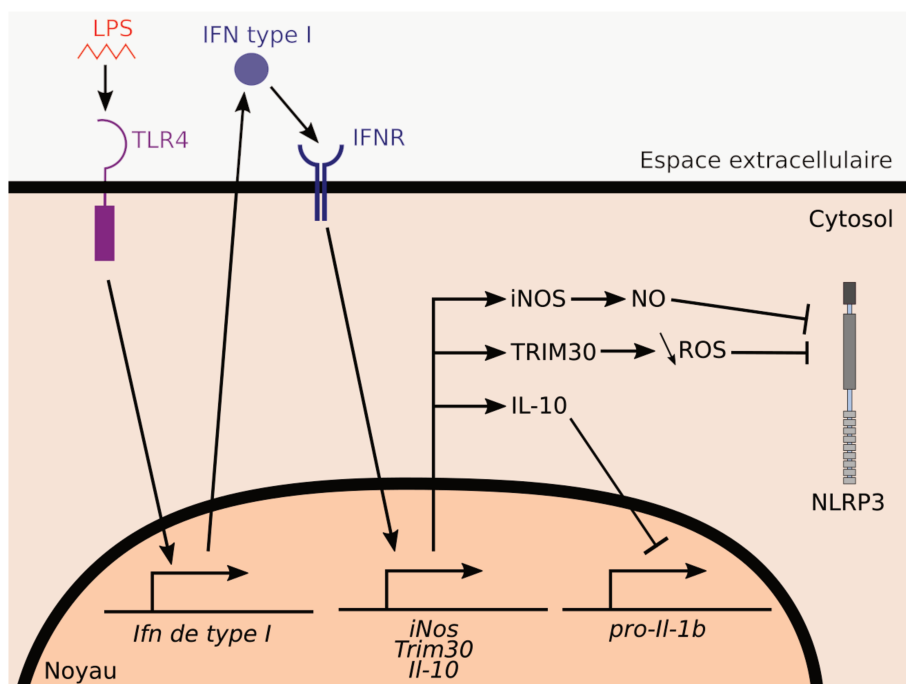


Figure 1.12 – **Mécanismes de la désensibilisation par les IFN de type I.** Les IFN de type I induits suite au *priming* extra-long induisent à leur tour, via leur récepteur IFNR, l'enzyme iNOS, TRIM30 et l'IL-10. La production de NO par iNOS inhibe NLRP3. TRIM30 entraîne une diminution de la production de ROS, ce qui inhibe également NLRP3. L'IL-10 inhibe la synthèse de pro-IL-1 β .

Signal d'activation ou signal 2

Les signaux d'activation peuvent être classés en trois catégories : (i) les molécules qui entraînent la formation de pores, (ii) les molécules qui endommagent les mitochondries

et (iii) les molécules qui déstabilisent les lysosomes [111, 126]. Ces signaux d'activation sont très diversifiés et activent ainsi beaucoup de voies de signalisations différentes. Cependant, plusieurs mécanismes communs ont pu être dégagés.

Le rôle des flux d'ions La classe d'activateurs qui déclenche des flux d'ions entraîne la formation ou l'ouverture de pores dans la membrane des cellules. On y trouve notamment l'ATP, qui active le récepteur purinergique P2X7R (canal à potassium dont l'ouverture est contrôlée par l'ATP). De plus, la toxine bactérienne nigéricine s'implante dans la membrane des cellules et permet la formation de pores [127–129]. Un dernier exemple est la perméabilisation de la membrane due au complexe d'attaque membranaire formé suite à l'activation du complément [130]. L'apparition de ces pores entraîne un efflux de potassium, signal d'activation commun à presque tous les activateurs de NLRP3 (sauf l'imiquimode [131]). Ce signal est spécifique de l'inflammasome NLRP3, étant donné que les inflammasomes AIM2 et NLRC4 ne sont pas inhibés par des concentrations élevées de potassium dans le milieu extracellulaire [128, 132].

D'autre part, un afflux de calcium interviendrait dans l'activation de l'inflammasome. Le calcium peut provenir du milieu extracellulaire ou des lieux de stockage de la cellule comme le réticulum endoplasmique. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet de l'influx de calcium. Le premier est son entrée dans la mitochondrie et l'induction de dommages, or, comme expliqué dans la partie suivante, les dommages mitochondriaux sont un signal d'activation de l'inflammasome [133, 134]. Le deuxième est son action inhibitrice de l'adénylate cyclase, entraînant la diminution de la production d'AMP cyclique (AMPC). Or, l'AMPC est un inhibiteur de NLRP3, agissant probablement par compétition inhibitrice dans le domaine de fixation à l'ATP [111, 133, 135]. Cependant, il a également été proposé que l'influx de calcium est induit pour contrebalancer l'efflux de potassium. Dans ce cas, il ne correspondrait qu'à un effet secondaire permettant d'équilibrer le potentiel électrochimique de la cellule et n'aurait aucun rôle dans l'activation de l'inflammasome [129, 134].

Plusieurs études récentes ont montré l'implication de l'efflux d'ions chlorure Cl^- dans l'activation de l'inflammasome. L'utilisation d'un inhibiteur de l'efflux de chlorure permet d'empêcher l'activation de l'inflammasome [136]. Le LPS permet la relocalisation de canaux de chlorure, les CLIC (*chloride intracellular ion channel*), à la membrane plasmique, où ils pourraient faciliter l'efflux de chlorure après le signal d'activation [137, 138]. Cet efflux, se produisant en amont de l'efflux de potassium, permet l'assemblage de *specks* d'ASC nucléés par NLRP3. Cependant, ces *specks* sont inactifs. Suite à l'efflux de potassium, NEK7 se lie à NLRP3, permettant son oligomérisation, ce qui achève la formation de l'inflammasome et aboutit à l'activation des *specks* [139].

Le rôle des mitochondries Les mitochondries sont les principaux producteurs de ROS dans la cellule. Le rôle des ROS dans l'activation de NLRP3 est controversé. Alors

que certaines études pointent une nécessité de ces composés pour l'activation de l'inflammasome, d'autres ont montré que les antioxydants permettaient eux aussi d'activer l'inflammasome [140]. D'autre part, une étude a montré que l'ADN mitochondrial oxydé, présent hors des mitochondries suite à leur endommagement, serait capable de se fixer sur NLRP3 et permettrait d'induire son activation en présence du signal de *priming* [141]. Les cardiolipides mitochondriaux ont aussi été décrits comme ligand du LRR de NLRP3, permettant son activation [142]. Ceux-ci sont relocalisés à la membrane externe des mitochondries suite aux ROS générés lors de la phase de *priming* [143]. NLRP3 s'associe aux mitochondries lors de son activation et la caspase-1 s'associe aux cardiolipides mitochondriaux. Ces observations mettent en avant le rôle de plateforme joué par la mitochondrie en permettant de rapprocher spatialement les éléments constitutifs des inflammasomes [143].

Le rôle de la déstabilisation des phagolysosomes Cette voie de signalisation se produit en aval des signaux d'activation cristallins (silice, amiante, cholestérol...) et pour lesquels une endocytose a lieu. Le phagosome formé devient ensuite phagolysosome par fusion avec un lysosome. La déstabilisation (rupture) du phagolysosome, plutôt que les cristaux phagocytés, serait le signal activateur de l'inflammasome. Le relargage de la cathepsine B, une protéase lysosomiale, dans le cytosol pourrait être en cause dans l'activation de l'inflammasome [144]. Cependant, ces études sont basées sur l'utilisation d'inhibiteurs de la cathepsine B et l'utilisation de macrophages déficients en cathepsine B ne montre pas de défauts d'activation de la caspase-1 [145]. D'autre part, une étude a montré que la phagocytose n'est pas nécessaire pour l'activation de l'inflammasome mais que ce serait les interactions se produisant entre la membrane plasmique et les cristaux qui seraient importantes [146].

Ainsi, il n'existe pas de mécanismes moléculaires clairement établis dans l'activation de NLRP3 à l'exception de l'efflux de potassium qui est généralement accepté. Cependant il existe un état des macrophages, appelé « hyperactivation » [147], dans lequel ceux-ci sécrètent de l'IL-1 β tout en restant en vie. Le relargage d'IL-1 β se fait via les pores de gasdermine-D ce qui met en avant un rôle non pyroptotique de la GSDMD. Cet état est déclenché suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3 par des lipides oxydés libérés suite à la mort de cellules (oxPAPC), ou par des dérivés du peptidoglycane bactérien [148, 149]. La sécrétion d'IL-1 β indépendamment de la mort cellulaire est un état décrit également chez monocytes humains [150] ainsi que chez les neutrophiles [101]. Cet état ne correspond pas à une faible activation de l'inflammasome dans laquelle la pyroptose ne serait simplement pas détectée. Ceci est notamment démontré par le fait que l'hyperactivation n'est pas sensible à l'inhibition de l'efflux de potassium [147, 149]. De plus, les fonctions mitochondriales ne sont pas altérées lors de l'activation de l'inflammasome dans les cellules en état d'hyperactivation et la caspase-11, mais pas son activité catalytique, serait

nécessaire pour la sécrétion d'IL-1 β observée dans ces conditions [147, 151]. Pour finir, l'activation de l'hyperactivation par les oxPAPC est médiée par l'interaction entre CD14 et oxPAPC, puis par l'internalisation de CD14, mais ne dépend pas de TLR4 [151].

1.5.2 L'activation de NLRP3 par la voie non canonique

On parle d'inflammasome non canonique lorsqu'un complexe ressemblant à un inflammasome est formé. Ce complexe ne se conforme pas aux trois constituants habituels, que sont le senseur, ASC et la caspase-1 [152]. L'inflammasome non canonique, contenant la caspase-11, est formé en réponse aux bactéries Gram négatives (figure 1.13) [153–156]. Le LPS cytosolique se lie directement sur ces caspases. Une étude a montré que les bactéries produisaient des vésicules à partir de leur membrane externe, contenant le LPS, vésicules qui sont endocytées par les cellules [157]. Les GBP (*guanylate binding protein*) facilitent la reconnaissance entre la caspase-11 et le LPS provenant de ces vésicules ou provenant des bactéries localisées dans les vacuoles, comme *Salmonella enterica* [158, 159]. Ceci permet l'oligomérisation et l'activation de la caspase-11 (chez la souris, correspondant aux caspases-4 et -5 chez l'homme) [154]. L'activation de cette caspase n'entraîne pas la maturation des cytokines pro-inflammatoires. En revanche, elle conduit au clivage de la gasdermine-D et à la formation de pores, responsables de la pyroptose [89]. Ceci permet ensuite l'activation de l'inflammasome NLRP3, probablement suite à l'efflux de potassium déclenché par la formation de ces pores [160], et à la maturation des cytokines.

1.5.3 Localisation subcellulaire des constituants de l'inflammasome NLRP3 au cours de l'activation

La localisation subcellulaire des différents composants de l'inflammasome est un élément de contrôle de son activation (figure 1.14). NLRP3 est une protéine à la fois cytosolique et localisée au niveau du reticulum endoplasmique [161, 162]. Suite à son activation, NLRP3 est recruté au niveau des membranes du reticulum endoplasmique associées à la mitochondrie, les MAM (*mitochondrial associated membrane*) [142, 161, 163]. Ceci est indépendant d'ASC [163, 164] et semble avoir lieu lors de la phase de *priming* [143]. En effet, suite au traitement au LPS, NLRP3 migre le long des microtubules grâce à la protéine MARK4 (*microtubule affinity regulating kinase 4*) pour atteindre les mitochondries [165]. La relocalisation de NLRP3 sur les mitochondries permet/est due à son interaction avec des éléments mitochondriaux : (i) les cardiolipides qui interagissent avec le domaine LRR de NLRP3 [142], (ii) la protéine MAVS (*mitochondrial antiviral signaling*) qui interagit avec le domaine PYD [163], (iii) la protéine cFLIP (*cellular FLICE-like inhibitory protein*) qui interagit également avec le domaine LRR [166, 167]. Le rôle de la protéine MAVS est cependant controversé. D'autres constituants de l'inflammasome sont également relocalisés sur la mitochondrie. La pro-caspase-1 est dans le cytosol en l'absence d'activation,

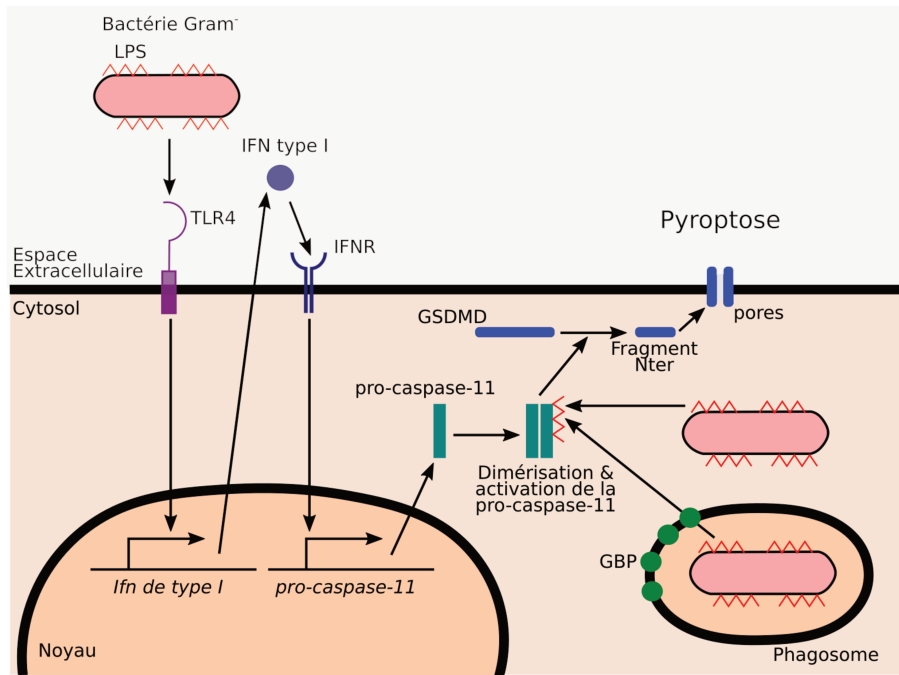


Figure 1.13 – **Mécanisme d'activation de l'inflammasome non canonique.** Les bactéries Gram négatives sont détectées via le TLR4 des cellules immunitaires, ce qui déclenche la production des IFN de type I qui induisent l'expression de la caspase-11. Le LPS intracellulaire des bactéries cytosoliques est détecté par la caspase-11. De plus, le LPS des bactéries vacuolaires est détecté par la caspase-11 grâce aux GBP. Ceci conduit à l'activation de la caspase-11 qui clive la gasdermine-D. Celle-ci forme des pores dans la membrane plasmique, ce qui déclenche la pyroptose.

puis a une localisation mitochondriale suite au signal de *priming*. Ceci est sans doute permis grâce à une interaction avec les cardiolipides [143]. De plus, la protéine ASC est principalement trouvée dans le noyau mais se rencontre aussi au niveau des mitochondries dans des macrophages au repos [62, 162]. Sa localisation mitochondriale augmente suite à l'activation de NLRP3 [143].

Les mitochondries sont recrutées à proximité du reticulum endoplasmique suite au signal d'activation. Ceci se fait via un transport sur les microtubules grâce à la dynéine et à l'acétylation de la tubuline [162]. Cette acétylation pourrait être due à l'inhibition de la déacétylase SIRT2 (*silencing information regulator two 2*), causée par des dommages mitochondriaux qui diminuent la production de NAD^+ [162]. NLRP3 peut alors s'oligomériser et interagir avec ASC au niveau des MAM [164, 168]. Une étude récente a montré que NLRP3 interagit également avec des molécules de phosphatidylinositol-4-phosphate du trans-Golgi, celui-ci étant éparpillé suite aux signaux d'activation. Ceci permet de former des *puncta* de NLRP3 et initie l'oligomérisation et l'assemblage d'un *speck* d'ASC [169]. La libération du *speck* des MAM semble être dépendante de la phosphorylation de NLRP3 par la protéine PKD (*protein kinase D*), trouvée au niveau de l'appareil de Golgi [168]. La formation du *speck* est alors possible. Celui-ci semble apparaître au niveau des centrosomes [165], là où se trouve la protéine NEK7 [82, 83, 170]. Ceci suggère un rôle des microtubules dans cette formation et pourrait expliquer la présence d'un *speck* unique

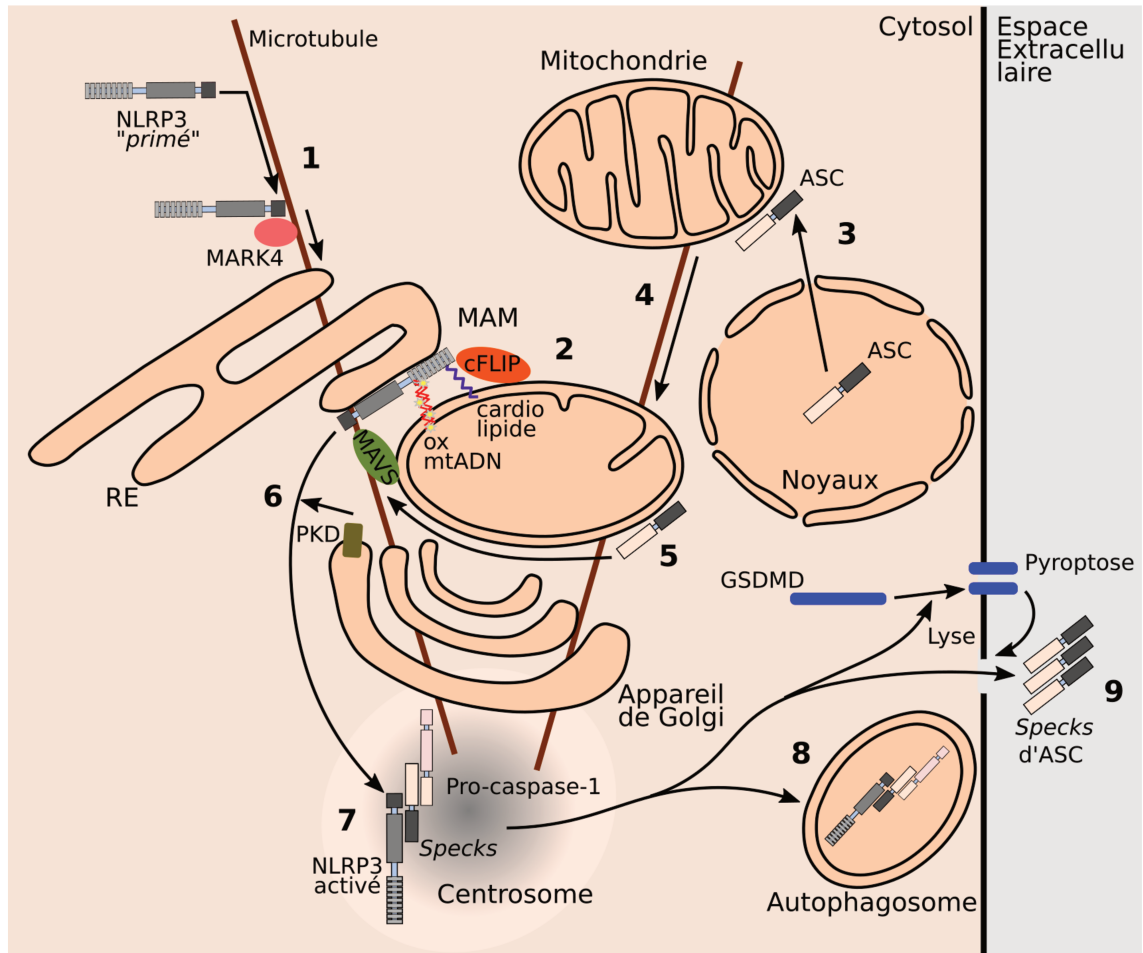


Figure 1.14 – **Trafic cellulaire des éléments constituant l'inflammasome.** 1. Suite au *priming* de NLRP3, celui-ci est dirigé au niveau des MAM à l'aide de la protéine microtubulaire MARK4. 2. Là, il interagit avec différentes molécules, dont les protéines MAVS et cFLIP, les cardiolipides, et l'ADN mitochondrial oxydé. 3, 4, 5. Suite au signal d'activation, ASC, localisé dans le noyau, est dirigé vers les mitochondries et peut interagir avec NLRP3. 6. La phosphorylation de NLRP3 par la PKD permet de libérer le complexe. 7. La formation des *specks* a lieu au niveau du centrosome. 8 et 9. Les *specks* sont éliminés par autophagie (8) ou sont libérés suite à la lyse cellulaire (9).

par cellule. Cependant, d'autres études ont montré que le *speck* et le centrosome étaient distincts [171].

Ces *specks* ont ensuite deux devenir possibles. Soit ils sont libérés par les cellules et deviennent alors un signal d'activation de l'inflammasome dans les cellules voisines suite à leur phagocytose [84, 172]. Soit ils seront dégradés suite à leur ubiquitination, un signal pour leur capture par les autophagosomes [173, 174].

1.5.4 Rôle des modifications post-traductionnelles dans l'activation de l'inflammasome NLRP3

Les modifications post-traductionnelles

Ubiquitination L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle dont un des premiers rôles décrit correspond à la dégradation des protéines porteuses de ce motif, nécessaire pour le maintien de l'homéostasie cellulaire [175]. Néanmoins, beaucoup d'autres rôles de l'ubiquitination existent, comme la régulation du trafic intracellulaire des protéines ou l'activation de voies de signalisation [175, 176].

Cette modification correspond à la liaison covalente (liaison isopeptidique) d'une protéine, l'ubiquitine, au niveau des résidus lysines des protéines cibles. Elle est effectuée successivement par les enzymes E1 (*ubiquitin-activating enzyme*), E2 (*ubiquitin-conjugating enzyme*) et E3 (*ubiquitin ligase*) (figure 1.15). Il existe plus de 600 E3 chez les humains, assurant la spécificité d'ubiquitination [177]. Elles sont divisées en trois familles selon leurs modalités d'action [178]. Cette modification est réversible grâce à la présence d'enzymes appelées déubiquitinases ou DUB, dont une centaine existent chez l'homme [179]. Les DUB sont quant à elles divisées en cinq familles selon leurs modes d'action.

L'ubiquitine contient sept résidus lysines (K6, K11, K29, K27, K33, K48, K63). Elle peut ainsi être elle-même ubiquitinée, ce qui permet la formation de chaînes d'ubiquitines. Ces chaînes peuvent être linéaires ou peuvent contenir des fourches si plusieurs résidus lysines d'une même ubiquitine sont modifiés. Ainsi, on parlera par exemple d'ubiquitination avec des chaînes liées en K48 lorsque plusieurs ubiquitines sont liées entre elles par leurs résidus lysines K48 [180]. Un code d'ubiquitination permettant de décrire quel type d'ubiquitination a quelles conséquences essaye d'émerger, mais ne reste pas universel.

Phosphorylation De la même façon que l'ubiquitination, la phosphorylation est réversible. C'est la modification post-traductionnelle la plus courante, avec environ 30% des protéines chez l'homme qui sont modifiées par phosphorylation [181]. Cette modification est importante dans le déroulement des voies de signalisation.

La phosphorylation permet l'ajout d'un résidu phosphate (PO_4) au niveau de la chaîne latérale des résidus d'acides aminés tyrosine, sérine et thréonine. Elle est effectuée par des enzymes appelées kinases (plus de 500 kinases existent chez l'homme) et ôtée par des phosphatases (plus de 200 phosphatases existent chez l'homme) [181].

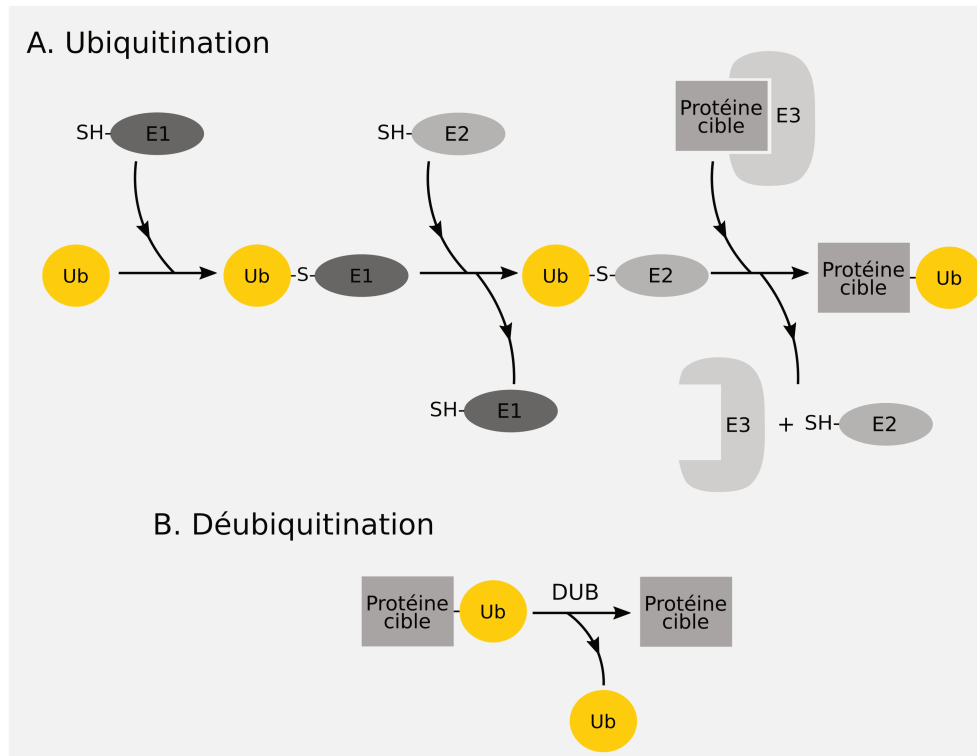


Figure 1.15 – **Ubiquitination et déubiquitination.** A. L'ubiquitination nécessite l'action de trois enzymes successives : E1, E2 et E3. B. La déubiquitination est réalisée grâce à des déubiquitinases (DUB). Ub : ubiquitination.

Autres modifications Le tableau 1.4 récapitule les principales modifications post-traductionnelles trouvées chez les Eucaryotes [182].

Modifications post-traductionnelles de NLRP3...

...au cours de la phase de *priming* Ces modifications sont résumées dans le tableau 1.5. En 2007 fût découverte une interaction entre une protéine associée à une ubiquitine ligase appelée SGT1 (*suppressor of G2 allele of SKP1*), la chaperonne HSP90 (*heat shock protein 90*), et le domaine LRR de NLRP3. Ces protéines permettraient de garder NLRP3 sous forme inactive mais prête à être activée. Ces observations impliquaient pour la première fois une protéine reliée à l'ubiquitine dans les mécanismes de contrôle de l'activation de NLRP3 [183]. Les domaines LRR et NACHT, contrairement au domaine PYD de NLRP3, peuvent être ubiquitinés en K48 et K63 [184]. D'autres modifications post-traductionnelles ont aussi été révélées par la suite.

La phosphorylation du résidu sérine S198 (correspondant au résidu S194 chez la souris) de NLRP3 par JNK1 (*c-Jun N terminal kinase 1*) est nécessaire dans les voies de signalisation du *priming* dépendantes et indépendantes de la transcription. Elle se produit en aval des adaptateurs MyD88 et TRIF [185]. Cette phosphorylation entraîne la déubiquitination de NLRP3 et son oligomérisation. Cette observation est cohérente avec des études précédentes qui ont montré que NLRP3 est ubiquitiné dans les cellules au repos, et déubiquitiné suite au *priming* non-transcriptionnel de manière dépendante des ROS

Modification post-traductionnelle	Résidu(s) modifié(s)	Enzymes
Phosphorylation	Tyrosine, Sérine, Thréonine	Kinases, phosphatases
Glycosylation	Asparagine, Sérine, Thréonine	Glycosyltransférases, Déglycosylases
Acétylation	Lysine	Acétyltransférases, dé-acétylases
Méthylation	Lysine, arginine	Méthyltransférases, dé-méthylases
Ubiquitination	Lysine	E1, E2, E3, DUB
Sumoylation	Lysine	SUMO E1, SUMO E2, SUMO E3, SENP
S-Nitrosylation	Cystéine, méthionine	
Prénylation	Cystéine	Farnesyltransférases, géranylgeranyltransférases
Myristoylation	Glycine	N-Myristoyltransférases
Palmitoylation	Cystéine	Protéine DHHC acyltransférases, protéine acyl thioesterases
Sulfatation	Tyrosine	Sulfatases, désulfatases
Glycation	Lysine	
Nitratation	Tyrosine	Denitrases
Chlorination	Tyrosine	Myeloperoxydases
Oxidation/réduction (dont S-glutathionylation)	Cystéine	Peroxydases, oxydases, glutathione, thioredoxine
Carbonylation	Lysine, proline, arginine, threonine	

Tableau 1.4 – **Récapitulatif des principales modifications post-traductionnelles existantes.**
DUB : déubiquitinasés, SENP : *sentrin/SUMO-specific proteases*.

mitochondriaux [76]. Plus récemment, il a été montré que NLRP3 serait en fait ubiquitiné de façon transitoire avec des chaînes K63 suite au *priming* par le LPS [186]. Cette ubiquitination serait effectuée par l'ubiquitine ligase Pellino2.

De plus, l'augmentation de la quantité de protéine NLRP3 suite au *priming* transcriptionnel serait due certes à sa synthèse *de novo*, mais également à une stabilisation de la protéine limitant sa destruction. En effet, l'ubiquitination de NLRP3 sur le résidu K691 (K689 chez la souris) par l'ubiquitine ligase FBXL2 (*F-box/LRR repeat protein 2*) permet la dégradation de NLRP3 par le protéasome [187, 188]. En revanche, suite au signal de *priming*, l'ubiquitine ligase FBXO3 (*F-box protein 3*) ubiquitine FBXL2, ce qui entraîne sa déstabilisation et permet d'augmenter la demi-vie de NLRP3. Enfin, d'autres modifications ont été décrites, comme la S-glutathionylation de NLRP3, même si son rôle dans la phase de *priming* n'est pas établi [189].

Modification	Localisation	Effet	Enzyme	Référence
Phosphorylation	S198	Activateur	JNK1	[185]
Déubiquitination	?	Activateur	?	[76]
Ubiquitination	?	Activateur	Pellino2	[186]
	K691	Inhibiteur	FBXL2	[187]
S-glutathionylation	?	?	?	[189]

Tableau 1.5 – Modifications post-traductionnelles de NLRP3 se produisant lors de la phase de *priming*.

...au cours de la phase d'activation Ces modifications sont résumées dans le tableau 1.6. L'assemblage de l'inflammasome NLRP3 nécessite la déubiquitination de NLRP3 par la déubiquitinase BRCC3 (*BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 3*) [184]. Cette déubiquitination est apparue comme un signal commun à tous les activateurs et permettant l'activation de l'inflammasome. Elle ne semble pas dépendre des ROS mitochondriaux, contrairement à la déubiquitination se produisant pendant la phase de *priming* [76]. BRCC3 est une déubiquitinase ciblant spécifiquement les chaînes K63 et agit sur le domaine LRR de NLRP3 [184]. D'autre part, l'ubiquitine ligase ARIH2 (*ariadne homolog 2*) est observée dans les *specks* d'ASC [190]. Elle permet l'ubiquitination de NLRP3 avec des chaînes K48 et K63 ce qui inhibe l'activation de l'inflammasome mais n'entraîne pas la dégradation de NLRP3 [190]. L'ubiquitination de NLRP3 peut également conduire à sa dégradation dans certains cas. Ainsi, la dopamine, signal inhibiteur de l'inflammasome, permet l'augmentation de la production d'AMPC, molécule qui se lie à NLRP3. Ceci entraîne l'ubiquitination de NLRP3 avec des chaînes K48 via l'ubiquitine ligase MARCH7 (*Membrane Associated RING-CH 7*) [191]. Cette ubiquitination permet ensuite la dégradation de NLRP3 par autophagie [191]. Pour finir, l'ubiquitine ligase Cullin-1 est associée à NLRP3 dans les cellules au repos. Suite aux signaux d'activation, cette protéine se dissocie de NLRP3, permettant ainsi son activation [192].

D'autre part, une étude récente a montré que plusieurs sites de NLRP3 étaient SUMOylés (SUMO : *small ubiquitin-like modifier*), dont le résidu K689 (murin), et que ces modifications permettaient d'empêcher l'activation de NLRP3. La SUMOylation de NLRP3 est faite par la SUMO E3 ligase MAPL (*mitochondrial-anchored protein ligase*). De plus, la désSUMOylation de NLRP3, effectuée par les enzymes SENP6 (*sentrin/SUMO-specific protease 6*) et SENP7, contribue à l'activation de l'inflammasome [193].

La phosphorylation de NLRP3 est également impliquée dans son activation. La liaison des acides biliaires ou des éicosanoïdes avec les récepteurs TGR5 (*transmembrane G protein-coupled receptor-5*) et EP4 (*prostaglandin E receptor 4*) entraîne la production d'AMPc, ce qui aboutit à l'activation de la PKA. Ceci permet la phosphorylation inhibitrice de NLRP3 sur le résidu S295 (S291 chez la souris). L'inhibition de NLRP3 se fait via son ubiquitination mais n'entraîne pas sa dégradation [194, 195]. Cependant, la phosphorylation du même résidu S295 par la PKD est aussi nécessaire à l'activation de l'inflammasome [168]. En effet, cette phosphorylation serait impliquée dans la transition de NLRP3 des MAM au cytosol lors de l'activation. Etant donné que les mutants de NLRP3 mimant l'état phosphorylé ou déphosphorylé sont tous deux inactifs, un modèle de phosphorylation transitoire a été proposé. En effet, cette phosphorylation empêcherait le recrutement de NLRP3 aux MAM et permettrait sa libération des MAM [168]. De plus, l'assemblage de l'inflammasome nécessiterait également la déphosphorylation du résidu S5 (S3 chez la souris) de NLRP3 [196], étant donné que cette phosphorylation empêche le recrutement de la protéine ASC par répulsion électrostatique. Il a été proposé que la phosphatase PP2A (*protein phosphatase 2A*) interviendrait dans cette déphosphorylation [196, 197]. Cependant, l'implication de cette déphosphorylation dans la phase de *priming* ou d'activation n'est pas clairement établie. Enfin, la phosphorylation du résidu Y861 (Y859 chez la souris) inhibe l'activation de l'inflammasome via la dégradation de NLRP3 par autophagie [174, 198]. Suite aux signaux d'activation, la phosphatase PTPN22 (*protein tyrosine phosphatase non receptor type 22*) est recrutée sur NLRP3 de manière dépendante d'ASC et maintient la maturation de la pro-IL-1 β en déphosphorylant le résidu Y861 [198].

Modification	Localisation	Effet	Enzyme	Référence
Déubiquitination	LRR	Activateur	BRCC3	[184]
Ubiquitination	NACHT et LRR	Inhibiteur	ARIH2	[190]
	NACHT et LRR	Inhibiteur	MARCH7	[191]
	?	Inhibiteur	Cullin1	[192]
Phosphorylation	S295	Inhibiteur	PKA	[194, 195]
		Activateur	PKD	[168]
Déphosphorylation	Y861	Activateur	PTPN22	[174, 198]
	S5	Activateur	PP2A	[196]
DésSUMOylation	K689 et autres	Activateur	SENP6 et SENP7	[193]

Tableau 1.6 – **Modifications post-traductionnelles de NLRP3 se produisant lors de la phase d'activation.**

...au cours de la phase de désensibilisation Ces modifications sont résumées dans le tableau 1.7. L'ubiquitine ligase TRIM31, dont l'expression est induite par le LPS et l'IL-1 β suite à des long temps de *priming*, entraîne l'ubiquitination de NLRP3 avec des chaînes K48, responsable de sa dégradation par le protéasome [199]. De plus, comme déjà mentionné auparavant, les IFN de type I, induits suite à de longues expositions au LPS, permettent d'induire l'expression de l'enzyme iNOS de façon autocrine et/ou paracrine. Cette enzyme produit du NO, responsable de la S-nitrosylation du domaine LRR de NLRP3. Cette modification empêche l'oligomérisation de ASC [122].

Modification	Localisation	Effet	Enzyme	Référence
Ubiquitination	?	Inhibiteur	TRIM31	[199]
S-nitrosylation	LRR	Inhibiteur	?	[122]

Tableau 1.7 – **Modifications post-traductionnelles de NLRP3 se produisant lors de la phase de désensibilisation.**

Modifications post-traductionnelles d'autres protéines

Ces modifications sont résumées dans le tableau 1.8

Modifications post-traductionnelles d'ASC ASC est ubiquitinée avec des chaînes linéaires par l'ubiquitine ligase HOIL-1L (*heme-oxidized IRP2 ubiquitin ligase 1L*) appartenant au complexe LUBAC (*linear ubiquitin chain assembly complex*), ce qui permet son recrutement sur NLRP3, l'assemblage et l'activation de l'inflammasome [200]. Suite à une infection virale, le résidu K174 d'ASC est ubiquitiné avec des chaînes K63 par TRAF3, ce qui stabilise la protéine et permet l'assemblage de l'inflammasome [201]. Suite au signal de *priming*, ASC est ubiquitiné avec des chaînes K63, puis cette protéine est déubiquitinée par USP50 (*ubiquitin specific peptidase 50*) après l'activation de NLRP3 [202]. Enfin, l'ubiquitination d'ASC avec des chaînes K63 permet la dégradation des inflammasomes par autophagie [173]. La régulation de l'activité de la protéine ASC est également réalisée par phosphorylation. En effet, le domaine PYD d'ASC exprimé de façon ectopique dans les cellules est phosphorylé en réponse à l'exposition au TNF [60]. De plus, le résidu Y146 (Y144 chez la souris) d'ASC, appartenant au domaine CARD, est phosphorylé suite aux signaux d'activation, ce qui dépend des kinases SYK (*spleen tyrosine kinase*) et JNK [203].

Modifications post-traductionnelles de la pro-caspase-1 La procaspase-1 est également ubiquitinée avec des chaînes K63 dans son domaine CARD par cIAP2 (*cellular inhibitor of apoptosis 2*) [204]. Cette ubiquitination n'entraîne pas la dégradation de la protéine mais ses conséquences ne sont pas connues. De plus, la pro-caspase-1 est également directement inhibée par les ROS. Ceci se fait par la S-glutathionylation inhibitrice des résidus C362 et C397 [140].

Modifications post-traductionnelles de la pro-IL-1 β Suite au *priming* par le LPS, la pro-IL-1 β est ubiquitinée sur le résidu K133 avec des chaînes K63, mais également au niveau d'autres résidus. Cette protéine est alors localisée dans un complexe comprenant les protéines RIPK1/3, la pro-caspase-8 et A20 [205]. A20 est une protéine qui permet d'ajouter des chaînes K48 d'ubiquitines et d'enlever des chaînes K63. Elle entraîne une diminution de l'ubiquitination en K63 de la pro-IL-1 β , ce qui diminue la maturation de la protéine. Ainsi, l'ubiquitination de la pro-IL-1 β facilite sa maturation.

Modifications post-traductionnelles de la gasdermine-D Une étude récente a montré que des modifications post-traductionnelles régulent aussi l'activité de la gasdermine-D. Ainsi, il a été montré que l'oxydation de la gasdermine-D par les ROS facilitait son clivage par la caspase-1 [206].

Protéine modifiée	Modification	Localisation	Effet	Enzyme	Référence
ASC	Ubiquitination	K174	Activateur	TRAF3	[201]
	Ubiquitination	?	Activateur	LUBAC	[200]
	Ubiquitination	?	Inhibiteur	?	[173]
	Déubiquitination	?	Activateur	USP50	[202]
	Phosphorylation	PYD	?	?	[60]
	Phosphorylation	Y146	Activateur	SYK/JNK	[203]
Caspase-1	Ubiquitination	CARD	Activateur	cIAP-2	[204]
	S-glutathionylation	C362 et C397 (p10)	Inhibiteur	?	[140]
Pro-IL-1 β	Ubiquitination	K133	Inhibiteur	A20	[205]
GSDMD	Oxydation	C38, C268, C467, C56, and	Activateur	?	[206]

Tableau 1.8 – **Modifications post-traductionnelles des principales protéines impliquées dans l'inflammasome NLRP3.**

Une étude récente a montré que les déubiquitinases USP7 et USP47 étaient nécessaires pour une activation optimale de l'inflammasome. Cependant, la protéine ciblée par ces enzymes n'a pas été décrite [207].

1.5.5 L'inflammasome NLRP3 dans les autres types cellulaires

NLRP3 est principalement exprimé dans les cellules hématopoïétiques mais également dans certaines cellules épithéliales [208]. L'activation de l'inflammasome NLRP3 est principalement étudiée dans les macrophages. Cependant, les voies de signalisation dépendent souvent du type cellulaire dans lequel elles sont mises en place. En effet, l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans différents types cellulaires montre des différences avec les macrophages.

Ainsi, dans les monocytes humains il est observé que la stimulation par la LPS est suffisante pour déclencher la sécrétion d'IL-1 β . Des études ont proposé un mécanisme qui passerait par une sécrétion d'ATP autocrine se produisant après le signal de *priming* et qui permettrait donc de fournir le signal d'activation à ces cellules[209]. Cependant, la sécrétion d'ATP n'est pas indispensable pour conduire à la sécrétion d'IL-1 β même si elle en accélère l'abondance et la cinétique [209]. Plus récemment, la voie d'activation de l'inflammasome en réponse à ce signal de *priming* a été décrite dans les monocytes humains suite au traitement au LPS [150]. Cette voie est appelée voie alternative en opposition à la voie d'activation canonique et n'est pas présente dans les macrophages ni dans les monocytes murins. Cette voie est déclenchée suite au signal de *priming*. Elle est dépendante de l'adaptateur TRIF mobilisé en aval du LPS, et des protéines FADD (*Fas-associated protein with death domain*), RIPK1, et la caspase-8. Elle permet l'activation de la caspase-1 sans former de *specks* d'ASC. Cette activation conduit à la maturation des cytokines pro-inflammatoires mais ne conduit pas au déclenchement de la pyroptose [150]. La comparaison de cette voie avec la voie canonique d'activation de l'inflammasome est détaillée dans le tableau 1.9.

	Voie canonique (ex : les macrophages murins)	Voie alternative (ex : les monocytes humains)
Signaux	<i>priming</i> (ex : TLR4 agonistes) + activation	<i>priming</i> (ex : TLR4 agonistes)
Adaptateur	TRIF ou MyD88	TRIF
Autres protéines		RIPK1, FADD, Caspase-8
Efflux de potassium	Nécessaire	Pas nécessaire
Formation des <i>specks</i> d'ASC	Oui	Non
Sécrétion des cytokines pro-inflammatoires	Oui	Oui
Pyroptose	Oui	Non

Tableau 1.9 – Comparaison des voies d'activation canonique et alternative de l'inflammasome NLRP3.

Deux études ont montré que les neutrophiles étaient largement impliqués dans la sécrétion d'IL-1 β en réponse à des infections bactériennes avec des Staphylocoques [210, 211]. L'inflammasome NLRP3 est activé dans les neutrophiles seulement en réponse aux signaux d'activation solubles mais pas aux signaux particuliers comme les cristaux [212]. Enfin, l'activation de l'inflammasome NLRC4 dans ces cellules n'entraîne pas l'activation de la pyroptose mais seulement la sécrétion d'IL-1 β . Il serait ainsi intéressant de tester ceci pour l'inflammasome NLRP3 [101].

Les cellules épithéliales peuvent aussi activer l'inflammasome NLRP3 [213].

1.6 Les maladies liées à l'inflammasome NLRP3

La partie précédente a détaillé les mécanismes connus de contrôle de l'activation de l'inflammasome NLRP3. Ces mécanismes sont essentiels, comme en attestent le développement de maladies auto-inflammatoires qui se développent lorsque l'activation des inflammasomes est dérégulée. Nous détaillerons dans cette partie les maladies liées aux dérégulations de l'inflammasome NLRP3.

1.6.1 Les *Cryopyrin-associated periodic syndrome* (CAPS)

Description de la pathologie

Ces maladies sont des maladies auto-inflammatoires [214]. Ce sont également des maladies rares affectant un à deux individus pour un million de personnes au Etats-Unis, un individu sur 360 000 en France [215]. Les hommes et les femmes sont atteints de manière égale. Dans la plupart des cas, l'apparition de la maladie se fait tôt durant l'enfance. Néanmoins, le diagnostic peut être fait tardivement à cause de la rareté de la maladie et des symptômes qui peuvent être légers.

Les CAPS se déclinent en trois phénotypes cliniques dont les caractéristiques sont décrites dans le tableau 1.10 [216]. Cependant, il existe un spectre continu de phénotypes cliniques pour ces maladies.

Phénotype clinique	Symptômes
FCAS (<i>Familial cold autoinflammatory syndrome</i>)	Rougeurs, fièvre et douleurs articulaires induites par le froid
MWS (<i>Muckle-Wells syndrome</i>)	Urticaire, fièvre, surdité, arthrite non reliés à l'exposition au froid
NOMID/CINCA (<i>Neonatal onset multisystem inflammatory disorder, Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome</i>)	Fièvre, urticaire, sur-croissance de l'épiphyse des os longs, méningites stériles chroniques

Tableau 1.10 – **Symptômes associés aux trois phénotypes cliniques des CAPS** : FCAS, MWS et NMOID/CINCA, du moins sévère au plus sévère.

Les symptômes peuvent être séparés en deux groupes. Le premier comprend ceux qui sont présents lors des crises : éruptions cutanées ressemblant à de l'urticaire, fièvre, maux de tête et de ventre, fatigue, conjonctivite, symptômes musculaires et squelettiques tels que de l'arthralgie, arthrite, myalgie. Le second groupe de symptômes comprend ceux dus à une inflammation chronique et apparaissent sur le long terme : surdité, perte de la vue, problèmes cognitifs, dommages dans le système nerveux central, retards de croissance, déformation des os et des articulations, ostéoporose, amylose AA (dépôts de protéines insolubles dans les tissus, ici des substance amyloïdes dérivées de la protéine amyloïde sérique A) et problèmes rénaux [217].

Les causes de la maladie

Ces maladies sont directement liées à des mutations gain de fonction sur la protéine NLRP3, autrement appelée cryopyrine, entraînant alors une perte de contrôle de son activation. Ce lien entre NLRP3 et ces maladies a été fait en 2001 [218]. Ces mutations sont à transmission autosomale dominante, ce qui implique que l'histoire familiale aide au diagnostic. Aujourd'hui, 210 variants de la séquence de NLRP3 ont été décrits, dont 97 sont pathogéniques ou probablement pathogéniques (base de données Infevers, <https://infevers.umai-montpellier.fr/web/search.php?n=4>). Cependant, l'association entre la présence d'une mutation et le phénotype ne peut pas toujours être faite [217]. Ceci s'explique d'une part par le fait que ces maladies ont une pénétrance incomplète : certains individus sont porteurs d'une mutation à l'état hétérozygote mais ne présentent aucun symptômes. De plus, des patients porteurs de la même mutation peuvent avoir des phénotypes différents, ce qui montre l'importance de facteurs génétiques et environnementaux dans le développement de la maladie [219]. D'autre part, une étude a montré que chez certains patients, les mutations de NLRP3 ne sont pas présentes dans toutes les cellules, on parle alors d'individus mosaïques. Or, la présence de mutations dans NLRP3 n'est pas détectée par les moyens utilisés de façon classique dans ces cas-là [220]. Ainsi, le séquençage du gène *NLRP3* peut permettre de confirmer le diagnostic, même si dans 10 % des FCAS, 25 % des MWS et environ la moitié des patients porteurs de CINCA/NOMID, aucune mutation n'est trouvée [221–223].

La plupart de ces mutations sont des mutations ponctuelles faux-sens localisées principalement dans le domaine NACHT de NLRP3, et presque exclusivement dans l'exon 3 [224]. Les mutations *de novo* qui apparaissent sont souvent les mêmes que celles déjà existantes parmi les patients porteurs de CAPS [225]. Chez ces patients, l'activation de l'inflammasome est indépendante de la présence du signal d'activation [226]. Les mécanismes permettant à ces mutations d'entraîner un gain de fonction de la protéine ne sont pas clairs, même si des hypothèses proposent une oligomérisation spontanée des mutants NLRP3 [225]. Afin de mieux comprendre ces pathologies, des souris portant les mutations *Nlrp3*^{L351P}, *Nlrp3*^{R258W}, *Nlrp3*^{A350V} ont été créées [227, 228]. Cependant, certaines de ces mutations se sont révélées létales pour la souris [227] ce qui souligne des différences de réponses entre la souris et l'homme et complexifie ces études.

Les traitements

Comme expliqué précédemment, le diagnostic des CAPS peut mettre plusieurs années avant d'être posé. Généralement, plus le phénotype est sévère et plus le diagnostic est établi rapidement. La plupart des symptômes disparaissent si les traitements sont donnés suffisamment tôt [229].

Avant l'apparition des traitements utilisés aujourd'hui, ces maladies étaient traitées par la prise de médicaments anti-inflammatoires et l'évitement du froid [229]. Aujourd'hui,

d'hui, les traitements existants pour les patients CAPS ciblent principalement l'IL-1. Ils sont efficaces pour les trois phénotypes décrits précédemment, quelle que soit la sévérité des symptômes [230–232]. Il existe trois agents bloquant la signalisation de l'IL-1 utilisés : l'Anakinra, le Riloncept et le Canakinumab [229, 233]. L'Anakinra correspond au récepteur recombinant IL-1Ra, antagoniste du récepteur de l'IL-1 (figure 1.2). Il permet donc d'empêcher l'action à la fois de l'IL-1 β et de l'IL-1 α . La courte demi-vie de ce traitement impose des injections sous-cutanées quotidiennes. Il permet de traiter tous les patients porteur de CAPS de plus de 8 mois [234]. Le Riloncept consiste en un leurre soluble du récepteur de l'IL-1. Il bloque également à la fois les actions de l'IL-1 β et de l'IL-1 α . La demi-vie, plus longue que pour l'Anakinra, permet une prise du médicament une fois par semaine. Il est utilisé dans le traitement des patients porteurs de FCAS et de MWS de plus de 12 ans [235]. Les patients CAPS ont une réponse incomplète à ces deux traitements [231, 236]. Enfin, le Canakinumab est un anticorps monoclonal humain de haute affinité dirigé contre l'IL-1 β . Du fait de sa longue demi-vie, il est administré toutes les huit semaines via une injection sous-cutanée. Il permet de traiter toutes les formes de CAPS chez des patients de plus de 2 ans [237].

Le développement des CAPS est dû à des mutations gain de fonction dans NLRP3 aboutissant à son activation incontrôlée. Les traitements de ces maladies ne ciblent que l'IL-1 β . Or cette cytokine n'est pas la seule conséquence de l'activation de l'inflammasome NLRP3. En effet, nous avons vu dans la partie précédente que la pyroptose (permettant le relargage de DAMP) et la sécrétion d'IL-18 étaient également associés à l'activation de l'inflammasome NLRP3. Ces événements peuvent participer au développement des symptômes [238–240]. De plus, l'IL-1 β n'est pas uniquement produite par l'inflammasome NLRP3. Ainsi, le blocage de sa signalisation peut avoir des effets immunosuppresseurs plus larges que ceux liés à NLRP3 [233]. C'est pourquoi, des traitements ciblant l'activation de NLRP3 pourraient être plus appropriés.

1.6.2 Les maladies multifactorielles

En plus de ces implications dans les maladies auto-inflammatoires, l'inflammasome NLRP3, et plus généralement les inflammasomes, sont liés au développement de maladies multifactorielles dont les maladies neurodégénératives (sclérose en plaques, maladies de Parkinson et d'Alzheimer), les maladies métaboliques (athérosclérose, diabète de type 2, obésité) et les cancers [241, 242]. L'inflammasome contribue soit au déclenchement de ces maladies, soit à leur développement [243].

Les maladies métaboliques

L'obésité est associée à des altérations métaboliques et inflammatoires chroniques de plusieurs organes (le pancréas, le tissu adipeux, le foie, le coeur et les muscles). Ces altérations sont regroupées sous le nom de syndrome métabolique, qui inclut la résistance

à l'insuline, le dysfonctionnement des cellules β du pancréas, la stéatose hépatique non alcoolique ou l'athérosclérose. Le développement et les complications de ces maladies sont liés à la présence d'IL-1 β et d'IL-18 [244, 245].

L'inflammasome NLRP3 et l'obésité L'obésité est caractérisée par une expansion du tissu adipeux, due à l'hypertrophie des adipocytes et à son infiltration par des cellules immunitaires [246]. L'inflammation associée entraîne des dysfonctionnements des adipocytes et la production d'acides gras libres et d'accumulations lipidiques [247]. De plus, à cause de l'expansion limitée du tissu adipeux, le surplus de gras peut se retrouver dans la circulation ou dans d'autres organes [248]. Ainsi, les acides gras saturés et les céramides peuvent servir de signal de *priming* pour NLRP3 [249, 250]. Cependant, le rôle des acides gras saturés dans le *priming* reste controversé et semble être dépendant de la flore microbienne [251, 252]. L'expression de NLRP3, d'ASC et de la caspase-1 est augmentée dans les cellules adipeuses des individus obèses [253, 254]. L'obésité peut ensuite entraîner des maladies métaboliques, comme l'athérosclérose ou le diabète de type 2, discutés plus bas.

L'inflammasome NLRP3 et l'athérosclérose L'athérosclérose conduit au rétrécissement progressif des vaisseaux sanguins suite à un métabolisme lipidique déséquilibré. Les cristaux de cholestérol et les cellules immunitaires du sang s'accumulent au niveau de la paroi des artères, limitant l'afflux sanguin aux organes [255]. En conséquence, des complications comme des attaques cardiaques ou cérébrales peuvent survenir et être mortelles. L'IL-18 ainsi que l'IL-18R sont anormalement abondantes dans les plaques d'athérome [243] et l'expression de NLRP3 est augmentée dans les artères et les monocytes des patients [256]. Ces deux caractéristiques sont positivement corrélées avec la sévérité des symptômes [257]. Le rôle de l'IL-1 β dans le développement des plaques est controversé [243, 258, 259]. De plus, les modèles murins qui développent de l'athérosclérose spontanément ont des symptômes réduits si leurs cellules de moelle osseuse sont *Nlrp3*^{-/-}, *Il1r*^{-/-} ou *Asc*^{-/-} [260]. La présence de LDL (*low density lipoprotein*) oxydées permet de donner à la fois le signal de *priming* via les TLR et le signal d'activation via la formation de cristaux de cholestérol intracellulaires, permettant ainsi l'activation de l'inflammasome [260, 261]. D'autre part, le TNF synthétisé au niveau des plaques d'athérome en réponse à l'inflammation qui s'y produit permet également le *priming* de NLRP3 [112, 252]. Enfin, d'autres lipides, dont les acides gras saturés (acides palmitiques ou stéariques), peuvent activer l'inflammasome NLRP3 [261].

L'inflammasome NLRP3 et le diabète de type 2 Le diabète de type 2 se développe suite à l'apparition d'une résistance à l'insuline. C'est une maladie auto-inflammatoire chronique avec une circulation élevée de TNF, d'interleukines et d'adipokines, des protéines libérées par le tissu adipeux et ayant des fonctions similaires aux cytokines [246]. Le rôle de l'IL-1 β dans cette maladie est établi : il entraîne une résistance à l'insuline

[262] ainsi que le dysfonctionnement et la mort des cellules β pancréatiques [263]. De plus, des études cliniques bloquant la signalisation IL-1 ont montré une amélioration du contrôle de la glycémie et du fonctionnement des cellules β pancréatiques chez les patients [264–266]. Des souris déficientes en *Nlrp3*, *Asc* ou *caspase-1* ont une meilleure tolérance au glucose et une meilleure sensibilité à l'insuline que les souris sauvages (WT, *wild type*) en réponse à un régime gras (*high fat diet*, HFD) [267–270]. Chez les patients, l'hormone IAPP (*islet amyloid polypeptide*) est sécrétée en même temps que l'insuline par les cellules β pancréatiques et peut former des fibrilles amyloïdes dans les îlots du pancréas [271]. Ces fibrilles sont un signal d'activation de l'inflammasome agissant selon le même mécanisme que celui déclenché par les cristaux [272]. De plus, les acides gras saturés (acide palmitique et céramides) qui sont présents en cas d'alimentation grasse activent également l'inflammasome NLRP3 [262, 268]. En effet, l'acide palmitique entraîne une augmentation de la production de ROS mitochondriaux dans les cellules en perturbant le processus d'autophagie [262]. Une alimentation comprenant des acides gras polyinsaturés empêche l'apparition d'une résistance à l'insuline dans les modèles de souris où le diabète de type 2 est induit par un régime gras (HFD) [273]. Enfin, les céramides permettent l'activation de la voie NF- κ B et le *priming* de NLRP3 [249, 252].

L'inflammasome NLRP3 et la goutte Lors de cette maladie, des taux d'acides uriques sanguins élevés sont détectés même si ce n'est pas une condition suffisante au développement de la maladie. Elle se caractérise par des douleurs articulaires dues à des réactions inflammatoires dirigées contre les cristaux de MSU au niveau des articulations qui entraînent l'activation de NLRP3 [87].

Les maladies neurodégénératives

Les protéines mal repliées peuvent permettre une activation de l'inflammasome en donnant le signal de *priming* ou le signal d'activation [252].

L'inflammasome NLRP3 et la maladie d'Alzheimer L'accumulation de plaques de protéines β -amyloïde dans le cerveau est une caractéristique des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Elle provient du mauvais repliement de protéines β -amyloïde suite au clivage du précurseur amyloïde. Les fibrilles de protéines β -amyloïde entraînent l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la production d'IL-1 β par la voie d'activation reposant sur la rupture des lysosomes et le relargage de la cathepsine-B dans le cytosol [274]. Le lien entre l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la pathogenèse a été établi. En effet, des modèles de souris développant spontanément la maladie montrent une diminution de la sécrétion chronique de protéine β -amyloïde, de l'inflammation neuronale et des problèmes cognitifs si elles sont également déficientes en NLRP3 et caspase-1 [275]. De plus, les patients ont une augmentation de l'activation de la caspase-1 dans le cerveau [275]. L'administration d'inhibiteurs de la cathepsine-B dans les modèles de souris

développant spontanément la maladie montre une amélioration de la mémoire et une diminution des plaques β -amyloïde, ce qui indique que l'inflammasome NLRP3 pourrait être une cible thérapeutique pour cette maladie [276].

L'inflammasome NLRP3 et la maladie de Parkinson La maladie de Parkinson est causée par la mort des neurones de la substance noire produisant la dopamine ainsi que par des agrégats composés principalement d' α -synucléine dans les neurones [277]. Ces agrégats peuvent former des fibrilles et être déposés dans le milieu extracellulaire, ce qui entraîne la sécrétion d'IL- 1β par les astrocytes et les cellules microgliales [278, 279], cytokine associée à la progression de la maladie. L' α -synucléine fibrillaire permet l'activation de l'inflammasome NLRP3 via la phagocytose, la cathepsine B et les ROS [280]. De manière similaire à la maladie d'Alzheimer, un lien entre l'inflammasome NLRP3 et la progression de la maladie a été établi *in vivo*. Des souris chez lesquelles cette maladie est induite par l'injection de substances neurotoxiques deviennent résistantes à son développement en l'absence de la protéine NLRP3 [191]. Comme expliqué dans la partie 1.5.4, la dopamine est un signal inhibiteur de l'activation de l'inflammasome NLRP3 via l'AMPC qui entraîne une ubiquitination par l'ubiquitine ligase MARCH7 et une dégradation de NLRP3 [191].

L'inflammasome NLRP3 et la sclérose en plaques La sclérose en plaques est une maladie auto-immune déclenchée par la production de lymphocytes T CD4⁺ dirigés contre la myéline. Ces cellules infiltrent le système nerveux central, attaquent les oligodendrocytes, et entraînent une démyélinisation [281]. Les souris utilisées comme modèles de cette maladie deviennent résistantes à son développement dans les cas où la caspase-1, l'IL-1 α , l'IL-1 β ou l'IL-18 sont absents [282–284]. De plus, les souris ne produisant pas de protéine NLRP3 sont plus résistantes à la démyélinisation et à la perte des oligodendrocytes que les souris sauvages lors de l'induction de la maladie [285]. Cependant, le rôle de NLRP3 dans la sclérose en plaques est controversé et non établi dans toutes les situations induisant la maladie. Ainsi, toutes les scléroses en plaques ne seraient pas dépendantes de NLRP3 et la sécrétion d'IL-1 β observée serait le reflet de l'activation d'autres inflammasomes [243].

1.7 Objectifs des travaux

Malgré les avancées récentes sur le sujet, les mécanismes moléculaires d'activation de l'inflammasome NLRP3 sont encore mal compris. Or, cet inflammasome est mis en cause dans le développement de nombreuses maladies multifactorielles fréquentes dans la population (diabète de type 2, athérosclérose, maladies neurodégénératives...). De plus, des mutations gains de fonction dans la protéine NLRP3 entraînent le développement d'un syndrome auto-inflammatoire rare, désigné par l'acronyme CAPS. Les traitements existants pour les patients atteints de CAPS ne sont pas efficaces pour traiter ces maladies multifactorielles, ce qui montre l'importance de la recherche de nouveaux inhibiteurs spécifiques de l'activation de l'inflammasome NLRP3. Pour ce faire, il est d'abord nécessaire d'arriver à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires d'activation de l'inflammasome NLRP3.

Il a été montré que les modifications post-traductionnelles de NLRP3 étaient importantes pour contrôler l'activation de l'inflammasome. Ainsi, nos travaux se sont intéressés à préciser et à compléter le rôle des modifications post-traductionnelles de NLRP3. Pour ceci, nous avons :

1. localisé les sites de NLRP3 porteurs de modifications post-traductionnelles;
2. étudié l'impact de ces modifications post-traductionnelles sur l'activation de l'inflammasome;
3. essayé de comprendre par quels mécanismes moléculaires ces modifications post-traductionnelles permettent de réguler l'activation de l'inflammasome.

Notes :

1. Les histogrammes présentés correspondent à la moyenne des valeurs obtenues pour chaque réplicat d'une expérience et la barre d'erreur correspond à l'écart-type.
2. La numérotation des résidus des séquences correspond à la numérotation utilisée par la base de données <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

Sommaire

2.1 Clonages et plasmides	51
2.2 Bactéries	51
2.2.1 Cultures bactériennes	51
2.2.2 Transformations bactériennes	51
2.3 Cellules	52
2.3.1 Cultures cellulaires	52
2.3.2 Génération de lignées cellulaires	53
2.4 Génération des souris knock-in <i>Nlrp3</i>^{K568R/K568R}	53
2.4.1 Validation des guides	53
2.4.2 Injection des embryons	54
2.4.3 Génotypage des souris	55
2.4.4 Séquençage des souris	55
2.4.5 Souris utilisées dans les expériences	56
2.5 Activation de l'inflammasome canonique	56
2.6 Infections bactériennes	57
2.6.1 <i>Francisella tularensis novicida</i>	57
2.6.2 <i>Escherichia coli</i>	58
2.7 Inhibition de l'efflux de potassium lors de l'activation de l'inflammasome	58
2.8 Utilisation des inhibiteurs de l'inflammasome	58
2.9 Transfection des siARN	59
2.10 Transfection au CaCl₂	60
2.11 Précipitation des protéines présentes dans le surnageant	60
2.12 « Pull-down » de protéines	60
2.13 Western Blot	61
2.14 Test ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	61
2.15 Détection du LDH	62

2.16 Incorporation d'iodure de propidium et de YO-PRO™-1	62
2.17 Immunofluorescence	62

2.1 Clonages et plasmides

La séquence WT de NLRP3 a été clonée dans le vecteur pENTRTM1A (Invitrogen, A10462). Ce vecteur a ensuite été utilisé comme base pour la mutagenèse dirigée afin d'obtenir des mutations ponctuelles dans NLRP3 avec le kit QuickChangeTM II (Agilent Technologies, 200524). Les recommandations du fournisseur ont été suivies, à l'exception près des amorces utilisées (purification « salt free », synthesis scale 0,01 μ M, commandées chez Eurofin Genomics, séquences détaillées dans la table A.1). Les séquences de NLRP3 obtenues dans le vecteur pENTRTM1A ont ensuite été transférées dans le plasmide pInducer21 (addgene #46948) via la technique de clonage GatewayTM (kit GatewayTM pENTRTM1A Dual Selection Vector, Invitrogen, A10462) en suivant les recommandations du fournisseur.

Le plasmide pCR3-V62-MetFlag-hNACHT, contenant la séquence du domaine NACHT de NLRP3 humain étiquetée d'un Flag, a été gracieusement fournie par le Dr. Jürg Tschopp et le Dr. Fabio Martinon (Université de Lausanne, Suisse). Le kit QuickChangeTM II, en combinaison avec les amorces détaillées dans la table A.1, a été utilisé pour obtenir les mutants K377R et K377E du domaine NACHT.

Le plasmide pDEST-myc-A20 a été amplifié à partir d'un stock provenant du Dr. Walden Harper (Harvard Medical School, Boston). Enfin, le vecteur codant pour Flag-RIPK1 a été gracieusement fourni par le laboratoire du Pr. Junying Yuan (Harvard Medical School, Boston).

2.2 Bactéries

2.2.1 Cultures bactériennes

Les bactéries *Escherichia coli* (souches DH5 α et J53) et *Staphylococcus aureus* ont été cultivées en milieu LB (*lysogeny broth*, liquide ou agar) à 37 °C.

Les bactéries *Francisella tularensis novicida*, souche Utah (U112) et le mutant isogénique pour lequel les gènes de l'îlot de pathogénicité sont manquants (Δ FPI) ont été cultivées en milieu *tryptic soy broth* à 0,1 % de cystéine à 37 °C.

2.2.2 Transformations bactériennes

Les bactéries compétentes *Escherichia coli* DH5 α préparées au laboratoire ont été utilisées pour amplifier les plasmides. Elles ont été cultivées sur milieu LB. Les transformations ont été réalisées par la méthode du choc thermique. 50 μ L de bactéries ont été incubées sur glace 30 min avec 1 μ L de plasmide. Elles ont ensuite subi le choc thermique à 42 °C pendant 45 sec puis ont été replacées sur glace pendant 2 min. Afin de permettre l'expression des gènes et plus particulièrement des gènes de résistance nouvellement acquis par la bactérie, celles-ci ont été cultivées 1h à 37 °C sur milieu LB liquide et sous

agitation. Suite à cette étape, les bactéries ont été sélectionnées sur boîtes LB contenant l'antibiotique approprié : ampicilline 100 µg/mL, (Euromedex, EU0400-D) ou kanamycine 50 µg/mL (Sigma-Aldrich, K4000).

2.3 Cellules

2.3.1 Cultures cellulaires

Toutes les cellules utilisées dans les expériences ont été cultivées à une température de 37 °C et dans une atmosphère à 5 % de CO₂.

Les cellules appartenant à la lignée U937, lignée de monocytes humains, ont été cultivées en milieu RPMI (*Roswell park memorial institute*) 1640 GlutaMAXTM-I (Gibco, 61870-010) additionné de 10 % de SVF (serum de veau fœtal). Ces cellules ont été gracieusement données par le laboratoire du Dr. Thomas Henry (Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon). Après l'ensemencement de ces cellules en vue d'une expérience, elles ont été différenciées en macrophages via l'addition de PMA (*phorbol myristate acetate*, InvivoGen, tlr1-pma) à 50 ng/mL pendant 16h.

Les cellules appartenant à la lignée de macrophages de souris immortalisés (appelées iBMDM pour *immortalized bone marrow derived macrophages*) ont été cultivées en milieu DMEM (*Dulbecco modified eagle medium*) GlutaMAXTM-I (Gibco, 61965-026) additionné de 10 % de SVF. Ces cellules ont été gracieusement offertes par le laboratoire du Dr. Emad Alnemri (Thomas Jefferson University, Philadelphia).

Les lignées cellulaires HEK293T Lenti-XTM (cellules HEK293T, *human embryonic kidney*, optimisées pour la production de lentivirus, Takara, 632180) et HEK293 ont été cultivées en milieu DMEM GlutaMAXTM-I additionné de 10 % de SVF. Elles ont été respectivement offertes par le Dr. Philippe Mangeot (Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon) et le laboratoire du Dr. Junying Yuan.

Les macrophages primaires murins ou BMDM ont été différenciés à partir de cellules de moëlle osseuse de souris cultivées en milieu de différenciation DMEM GlutaMAXTM-I complété de 10 % de M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*), 50 mM d'Hepes (Gibco, 15630-056), 5 mM de sodium pyruvate (Gibco, 11360-070). Au jour J₀, la moëlle osseuse contenue dans les tibias et fémurs des souris a été rincée par du milieu de culture afin d'en récupérer les cellules et de les mettre en culture à une concentration de 0,5 × 10⁶ précurseurs/mL (dans des boîtes Dutscher, 430591). Au jour J₃, les précurseurs sont nourris en rajoutant 40 % en volume de milieu de différenciation par rapport au volume déjà contenu dans la boîte. Enfin, au jour J₆, les cellules sont prêtes à être utilisées pour les expériences. Elles sont décollées de la boîte après rinçage au DPBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline* sans calcium ni magnésium, Gibco, 14190-144) et addition de DPBS puis

placement à 4 °C le temps qu'elles n'adhèrent plus. Sauf indications contraires, ces cellules sontensemencées à une densité de $0,5 \times 10^6$ cellules/mL dans les expériences.

2.3.2 Génération de lignées cellulaires

Les lignées cellulaires U937 *NLRP3* KO [286] et iBMDM *NLRP3* KO [287] ont été gracieusement fournies par les laboratoires des Dr. Thomas Henry et Emad Alnemri, respectivement.

La génération de lignées cellulaires *NLRP3* KI a été élaborée de la façon suivante. Les cellules HEK293T Lenti-X ont été mises en culture en flasque T175 à J_0 puis à J_1 chaque flasque a été transfectée au polyéthylèneimine (2 μ M) avec 30 ng de plasmide pCMVR8.74 (Addgen #22036), 10 ng de plasmide pMD2.G (Addgen #12259) et 40 ng de plasmide pInducer21-*NLRP3* KI dans 15mL d'Opti-MEM. Le milieu de culture a été remplacé par du DMEM complet 4h après la transfection. Le lendemain, à J_2 , le milieu de culture a été de nouveau changé. A J_3 , le milieu de culture a été collecté, filtré avec des filtres 0,45 μ m (Dutscher, SLHV033RS), et placé à 4 °C et les cellules ont été remises en culture. A J_4 , l'opération effectuée à J_3 est répétée. Les surnageants filtrés contenant les virus ont ensuite été ultracentrifugés sur coussin de sucrose (20 %) pendant 1,5h à 30 krpm, 4 °C. Le culot contenant les virus a été resuspendu en milieu de culture approprié aux cellules à transduire pendant 1h. Les cellules *NLRP3* KO ont été infectées avec les virus, puis centrifugées 1h à 37 °C et 1500 rpm et remises en culture. 96h plus tard, les cellules positives pour la GFP (*green fluorescent protein*) ont été triées et amplifiées avant de pouvoir être utilisées. Dans ces cellules, le gène *NLRP3* KI est placé sous contrôle d'un promoteur inductible à la doxycycline.

2.4 Génération des souris knock-in *Nlrp3*^{K568R/K568R}

La création de souris *knock-in* sur *Nlrp3* a été approuvée par le comité d'éthique (APAFIS#12355-2017102611052779 v5).

2.4.1 Validation des guides

Le site <http://crispr.mit.edu/job/4376805238714947> a été utilisé pour trouver la séquence de différents ARN guides pouvant être utilisés afin d'obtenir une cassure double brin de l'ADN autour du site A1703 de *NLRP3*. Deux guides ont été retenus pour leur score élevé, le peu de cibles secondaires non voulues qui pourraient être reconnues, notamment placées dans des gènes, et la faible distance par rapport au site PAM. Ces caractéristiques sont récapitulées dans le tableau 2.1.

Les guides A et C ont été clonés dans le vecteur pSpCas9(BB)-2A-GFP (pX458, Addgene #48138). Ces plasmides ont ensuite été électroporés individuellement dans des iBMDM

Guide	Score	Cibles secondaires (dont dans des gènes)	Distance du site PAM	Séquence 5' - 3'
A	77	91 (3)	27	ACTTGCCGTAATTTTCTAGT
B	70	229 (27)	47	CCTCTTTGGCCTTGTAACCC
C	69	175 (11)	33	TTTGTGTCCGATTCTCTT
D	66	216 (26)	30	CCTGGTTTACAAGGCCAAAG
E	64	233 (11)	0	AATTACGGCAAGTTTGAAAA
F	54	245 (15)	15	AAGGTCCTACTAGAAAATTA

Tableau 2.1 – **Caractéristiques des différents ARN guides pouvant être utilisés pour générer une cassure double brins autour du site A1703 de NLRP3.** Six guides peuvent potentiellement être utilisés. Leur score, nombre de cibles secondaires non voulues, leur distance par rapport au site PAM ainsi que leur séquence sont résumés. Les deux guides en gras sont ceux qui ont été retenus et dont l'efficacité a été testée par la suite.

par le système de transfection Neon®, Invitrogen. Pour cela, les cellules ont été resuspendues dans le tampon R (fourni dans le kit de transfection) et mélangées à l'ADN (1,5 µg/µL) à électroporer (volume de 10 % par rapport au volume de resuspension des cellules). Ce mélange a été aspiré dans la seringue Neon en évitant de faire des bulles et l'électroporation a été réalisée avec le programme suivant : 1720 V, 20 ms, 1 pulse. Les cellules ont ensuite été remises en culture en milieu DMEM GlutaMAX™-I à 20 % de SVE. Selon l'état des cellules, 24h à 72h après l'électroporation, les cellules positives pour la GFP ont été triées et clonées (elles sont isolées en puits de plaques 96 puits). Lorsque les clones se sont multipliés, leur ADN génomique a été extrait grâce au kit Nucleospin®Tissue (Macherey-Nagel, 740952.50), et la région autour de la mutation a été amplifiée par PCR (amorce sens mNLRP3K568R_F et amorce anti-sens mNLRP3K568R_R, cf. [A.2](#)) et séquencée.

2.4.2 Injection des embryons

Cette partie a été effectuée par le Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (PBES) à l'ENS de Lyon. La protéine Cas9 provenant de *Streptococcus pyogenes* (PNABio, CP02) et le tracrARN (TriLink, purification PAGE et HPLC) ont été fournis par cette plateforme. Le crARN de séquence 5' ACUUGCCGUAUUUUUCUAGU-GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG 3' a été commandé chez Eurogentec (purification HPLC). Le tracrARN et le crARN portent chacun deux modifications chimiques (2'-O-methyl et 3'-phosphorothioate) sur les nucléotides en position 69 à 71 et 1 à 3 respectivement. L'oligodésoxynucléotide simple brin d'une longueur de 112 paires de bases (5' GGAGTTGTTTCAGATCTTCTGAACCGAGACGTGAAGGTCTTACTAGAAAATTACGGC-AAGTTTGAAAGAGGATATCTGATTTTTGTTGTCCGATTCTCTTTGGCCTTGTA 3') a été commandé chez Integrated DNA Technologies (IDT, qualité PAGE Ultramer®DNA Oligo). Cette matrice, utilisée par la cellule comme modèle lors de la réparation, contient 3 mu-

tations par rapport à la séquence WT de *Nlrp3* : C1675T (mutation silencieuse permettant l'invalidation du site PAM), A1703G (mutation permettant d'obtenir la mutation voulue K568R sur NLRP3) et C1707A (mutation silencieuse permettant l'insertion d'un site de restriction EcoRV utilisé pour le génotypage). Les embryons de souches de souris C57BL6/J ont été électroporés dans une solution à 500 ng/ μ L de Cas9, 200 ng/ μ L d'ARN guide (tracrARN et crARN hybridés) et 200 ng/ μ L de ssODN [288]. Pour les zygotes micro-injectés, le capillaire contenait une solution à 50 ng/ μ L de Cas9, 25 ng/ μ L d'ARN guide (tracrARN et crARN hybridés) et 10 ng/ μ L de ssODN.

2.4.3 Génotypage des souris

Après récupération de tissus provenant des souris (généralement un doigt provenant de souris âgées de deux semaines), l'ADN est extrait en incubant le tissu 30 min à 95 °C dans 75 μ L de tampon de lyse alcaline (0,3 μ g/ μ L de protéinase K, 25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA, pH 12), puis placé 5 min à 4 °C avant de rajouter 75 μ L de tampon de neutralisation (40 mM Tris-HCl, pH 5).

Deux PCR ont ensuite été réalisées en utilisant à chaque fois 1 μ L de la solution d'ADN précédemment préparée avec l'enzyme GoTaq G2 DNA polymérase (Promega, M7841) à 5 U/ μ L. L'amorce sens mNLRP3K568R_F, en combinaison avec l'amorce antisens mNLRP3K568wt_R ou mNLRP3K568Rki_R (A.2) ont été utilisées pour réaliser deux PCR par animal permettant d'amplifier les séquences de *Nlrp3* WT ou mutées respectivement. Le programme PCR utilisé est le suivant : 95 °C 2 min, 30 cycles (95 °C 30 sec, 56 °C 30 sec, 72 °C 30 sec), 72 °C 5 min, 4 °C ∞ .

Une autre PCR est réalisée avec les amorces sens mNLRP3K568R_F et antisens mNLRP3K568R_R (A.2), 1 μ L d'ADN précédemment préparé et l'enzyme GoTaq G2 DNA polymérase à 5 U/ μ L avec le programme PCR suivant : 95 °C 2 min, 30 cycles (95 °C 30 sec, 55,5 °C 30 sec, 72 °C 30 sec), 72 °C 5 min, 4 °C ∞ . Le produit de cette PCR (5 μ L) est ensuite digéré par l'enzyme de restriction EcoRV (0,2 U/ μ L, New England Biolabs, RO195S) 30 min à 37 °C en tampon NEBuffer3.1 (New England Biolabs, B7203S).

2.4.4 Séquençage des souris

Extraction d'ARN

Les BMDM ont été traités au LPS à 50 ng/mL pendant 8h afin d'augmenter la transcription du gène *Nlrp3*. Ils ont ensuite été rincés au DPBS puis lysés 5 min à température ambiante dans du TRIzol (Life Technologies, 15596018), 1 mL par puits (de plaque 6 puits) et placés à -20 °C. Le lendemain, 200 μ L de chloroforme a été ajouté et les tubes ont été vortexés pendant 15 sec, puis incubés 2 à 3 min à température ambiante et centrifugés à 12000 g pendant 15 min à 4 °C. La phase aqueuse obtenue a ensuite été récupérée et les ARN ont été précipités par addition de 500 μ L d'isopropanol. Après 10 min d'incubation

à température ambiante, le mélange a été centrifugé à 12000 g pendant 10 min à 4 °C. Le culot a alors été resuspendu dans 1 mL d'éthanol à 75 %, vortexé, puis centrifugé à 15000 g, 15 min, 4 °C. Après avoir fait sécher le culot contenant les ARN, ceux-ci ont été resuspendus par 10 min d'incubation à 60 °C dans 100 µL d'eau sans RNases.

Les ARN ont ensuite été purifiés en suivant les instructions du kit NucleoSpin®RNA Clean up (Macherey-Nagel, 740948).

Reverse-transcription et amplification par PCR

Les ARN ont ensuite été rétro-transcrits en suivant les recommandations du kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, A38000).

Les primers mNLRP3_4F_Not1 et mNLRP3_3103R_BamHI (A.2) ont été utilisés pour réaliser une PCR (programme : 98 °C 30 sec, 35 cycles (98 °C 10 sec, 64 °C 30 sec, 72 °C 1 min), 72 °C 5 min, 4 °C ∞) avec la Phusion polymérase (ThermoFisher, F-530L).

Séquençage

Les produits de PCR ont ensuite été amplifiés par la Taq-polymérase (72 °C 10 min) afin de pouvoir poursuivre par un clonage TOPO (TOPO™ TA Cloning™ kit, Invitrogen, 450641) en suivant les recommandations du constructeur. Plusieurs clones obtenus ont ensuite été envoyés au séquençage (Eurofin Genomics).

2.4.5 Souris utilisées dans les expériences

Les souris ont été élevées en animalerie « Specific Pathogen Free » (SPF). Les souris *Nlrp3*^{K568R/K568R} ont été croisées au minimum deux fois avec des souris WT C56BL6/J avant d'avoir été utilisées dans les expériences *in vitro*. Les BMDM ont été extraits de souris âgées de 7 à 10 semaines. A chaque fois que cela a été possible, les souris WT et *Nlrp3*^{K568R/K568R} utilisées dans une même expérience provenaient de la même portée et étaient de même sexe.

2.5 Activation de l'inflammasome canonique

Le lendemain de la mise en culture des BMDM, ceux-ci ont été traités avec 5 ng/mL de LPS pendant 8h au total pour donner le signal de *priming*. Des incubations plus longues ou des doses différentes seront indiquées dans les légendes des figures concernées. Les différents signaux de *priming* utilisés et leurs conditions d'utilisation sont indiqués dans la table 2.2.

Le HKSA (heat killed *Staphylococcus aureus*) a été préparé au laboratoire après avoir mis en culture en milieu LB une souche de *Staphylococcus aureus* provenant d'un patient hospitalisé à Lyon, puis avoir fait bouillir celle-ci pendant 30 min à 100 °C en DPBS. La

Premier signal	Dose	Temps d'incubation	Fournisseur, Référence
LPS (<i>E. coli</i> O111 :B4)	5 ng/mL (0,1-2000 ng/mL)	8h (10 min - 24h)	Sigma-Aldrich, L3024
Pam3CSK4	3-300 ng/mL	8-24h	Invivogen, ttrl-pms
Flagelline FLA-ST	5 µg/mL	8-24h	Invivogen, ttrl-stfla
Poly(I :C) HMW	0,5-1 µg/mL	8-24h	Invivogen, ttrl-pic
Poly(I :C) LMW	0,5-50 µg/mL	8-24h	Invivogen, ttrl-picw
HKLM	$2,5 \times 10^7$ - 10^8 bactéries/mL	8-24h	Invivogen, ttrl-hklm
HKSA	$2,25 \times 10^8$ bactéries/mL	8-24h	Préparé au laboratoire
Imiquimod (R837)	50 µg/mL	8-24h	Invivogen, ttrl-imq
FSL-1	50-100 ng/mL	8-24h	Invivogen, ttrl-fsl
ssRNA40/LyoVec™	0,25-2,5 µg/mL	8-24h	Invivogen, ttrl-lrna40
ODN1826	20 µM	8-24h	Invivogen, ttrl-1826
PMA	5-500 ng/mL	8-24h	Invivogen, ttrl-pma
TNF	5-500 ng/mL	8-24h	Peptotech 315-01A

Tableau 2.2 – **Signaux de priming**. Nom, concentrations, temps d'incubation, fournisseur et référence.

mort de la souche a été vérifiée par une culture sur boîte LB n'ayant donné aucune colonie.

Les seconds signaux ou signaux d'activation ont été délivrés aux cellules selon les temps et les dosages indiqués dans la table 2.3. Pour les signaux ayant un temps d'incubation supérieur à 2h, ceux-ci ont été ajoutés au bout de 6h de *priming* et laissés sur les cellules le temps indiqué (ce qui fait que le temps total de *priming* est augmenté étant donné que ce signal n'a pas été retiré du milieu).

Second signal	Dose	Temps d'incubation	Fournisseur, Référence
ATP	2 mM	30 min	Sigma-Aldrich, A2383-25G
HLLoMe	0,2-1 mM	1h	Invivogen, ttrl-pms
Imiquimod (R837)	5-20 µg/mL	2h	Invivogen, ttrl-imq
MSU	0,05-0,2 mg/mL	16h	Invivogen, ttrl-msu-25
Nigéricine	20 µg/mL	1h	Invivogen, ttrl-nig-5
Silice	20 µg/mL	16h	Préparée au laboratoire

Tableau 2.3 – **Signaux d'activation**. Nom, concentrations, temps d'incubation, fournisseur et référence.

2.6 Infections bactériennes

2.6.1 *Francisella tularensis novicida*

Les cellules ont été traitées avec l'IFN-γ à 100 U/ml (11343534, Immunotools) 16h avant l'infection. Puis, la quantité de bactérie indiquée dans les figures a été ajoutée aux cellules. Les plaques ont ensuite été centrifugées 15 min à 1000 g, puis incubées 1h à 37 °C

et 5 % de CO₂. Passé ce délai, les cellules ont été rincées, puis du nouveau milieu contenant en plus 10 µg/ml de gentamicine (15750060, ThermoFisher) est ajouté aux cellules. Le temps d'incubation ensuite suivi correspond au temps d'infection indiqué sur les figures.

2.6.2 *Escherichia coli*

La quantité de bactérie (souche J53) indiquée dans les figures a été ajoutée aux cellules. Les plaques ont ensuite été centrifugées 15 min à 1000 g, puis incubées 1h à 37 °C et 5 % de CO₂. Passé ce délai, les cellules ont été rincées, puis du nouveau milieu contenant en plus 10 µg/ml de gentamicine (15750060, ThermoFisher) est ajouté aux cellules. Le surnageant des cellules est ensuite récupéré le lendemain matin de l'infection (environ 16h plus tard) puis analysé par test ELISA.

2.7 Inhibition de l'efflux de potassium lors de l'activation de l'inflammasome

Une solution de KCl à 1 M diluée dans de l'eau distillée et filtrée à l'aide d'un filtre à 0,45 µm (Dutcher, 146561) est préparée et la quantité nécessaire pour obtenir une concentration finale de 10-50 mM de KCl dans le milieu est ajoutée sur les cellules. L'activation de l'inflammasome canonique se fait ensuite comme expliqué précédemment.

2.8 Utilisation des inhibiteurs de l'inflammasome

Différents inhibiteurs de l'inflammasome ont été testés sur les BMDM. La table [2.4](#) récapitule les conditions d'utilisation de ces composés.

Composé	Dose (μM)	Incubation avec premier signal	Incubation avec premier et second signaux	Référence	Fournisseur, référence
Bay 11-7082	0,5-1	15 min avant le premier signal	15 min avant le second signal	[289]	Santa Cruz Biotechnology, sc-200615
CAS 509093-47-4	0,5-10	En même temps que le premier signal	En même temps que le premier signal	[118, 290]	Tocris, 5665
Colchicine	0,5-10	30 min avant le premier signal	30 min avant le second signal	[162]	Sigma-Aldrich, C9754
CRT 0066101	0,1-1	1h avant le premier signal	1h avant le second signal	[168]	Tocris, 4975/10
CY-09	10-30	30 min avant le premier signal	30 min avant le second signal	[78]	Tocris, 6436
Forskolin	10-50	15 min avant le premier signal	15 min avant le second signal	[135]	Sigma-Aldrich, F6886-10MG
G5	0,1-1	15 min avant le premier signal	15 min avant le second signal	[184]	Millipore, 662125-10MG
MCC950	0,1-1	15 min avant le premier signal	15 min avant le second signal	[186, 291]	Sigma-Aldrich, PZ0280-25MG
Mito-TEMPO	100-500	10 min avant le premier signal	10 min avant le premier signal	[76]	Sigma-Aldrich, A7250-5MG
Parthénolide	0,1-1	15 min avant le premier signal	15 min avant le second signal	[289]	INCONNUE
SP600125	10-50	1h avant le premier signal	1h avant le premier signal	[292]	Euromedex S1460

Tableau 2.4 – **Inhibiteurs.** Nom, molécules inhibée, concentrations utilisées, conditions d'incubation, référence bibliographique et commerciale des inhibiteurs de l'inflammasome utilisés.

2.9 Transfection des siARN

Les siARN (murins) utilisés ont été commandés chez Dharmacon sous forme de « smart pool » (mélange de 4 siARN différents qui ciblent un même ARN, siGENOME). Les séquences des siARN et leurs références sont données en table A.3.

Les BMDM ont été mis en culture à des densités de $0,1 \times 10^6$ (pour des conditions de 24h de premier signal seul ou avec premier et second signaux) ou $0,2 \times 10^6$ cellules/mL (pour des conditions de 8h de premier signal seul) dans 100 μL en plaque 96 puits. Le lendemain, 4 pmol ou 16 pmol de siRNA, respectivement à la densité de cellule précédente, ont été pré-incubées 20 min en présence de 0,15 μL de lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, 13778150) dans un volume de 30 μL d'optiMEM (Gibco, 31985-047). Le mélange a ensuite été ajouté au milieu de culture déjà présent sur les cellules. Le milieu a été changé 6h après. Les cellules ont été stimulées avec les activateurs de l'inflammasome 48h après transfection.

2.10 Transfection au CaCl_2

Les cellules HEK293 ont étéensemencées à 50-60 % de confluence. Le lendemain, un volume de solution 1 (contenant le plasmide à 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans 250 mM de CaCl_2) correspondant à $\frac{1}{6}$ du volume de milieu de culture des cellules à transférer a été ajouté goutte à goutte à un volume équivalent de solution 2 (180 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 12 mM D-glucose, 50 mM Hepes) et incubé 20 min à température ambiante puis vortexé et déposé goutte à goutte sur les cellules. Le milieu a été changé 4h après la transfection. Les cellules ont été utilisées (pour immunoprécipitation ou western blot) généralement 24h après la transfection.

2.11 Précipitation des protéines présentes dans le surnageant

Les cellules ont été cultivées dans du milieu Opti-MEM afin de n'avoir ni SVF (problématique lors des western blot), ni manque de nutriments ou de facteurs de croissance pouvant conduire à une inhibition de l'activation de l'inflammasome [173] étant donné la longueur des temps de stimulation. Après la stimulation des cellules, le surnageant a été récupéré et centrifugé pour enlever les éventuels débris cellulaires et cellules mortes puis incubé 30 min à 4 °C en présence de 10 % d'acide trichloroacétique (Sigma-Aldrich, T0699). Il a ensuite été centrifugé 15 min à 13 krpm, 4 °C, puis rincé deux fois à l'acétone pré-refroidi à -20 °C. Le précipité obtenu a été séché à l'air et resuspendu dans du Sample Buffer 2X (SB2X :100 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 % Glycerol, 4 % β -mercapto-ethanol, bleu de bromophenol).

2.12 « Pull-down » de protéines

Les cellules ont été décrochées de leur boîte de culture à l'aide d'une raclette (*cell scraper*) puis rincées au DPBS deux fois. Elles ont ensuite été lysées en tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,05 % Sodium deoxycholate, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 1 M NaF, 200 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSE, cocktail d'inhibiteurs de protéases sans EDTA (cOmpleteTM, Roche, 5056489001)) pendant 1h à 4 °C. Le lysat obtenu a été centrifugé à 13 krpm 10 min à 4 °C. Environ 5 % en volume du surnageant a été gardé pour analyse du lysat total par western blot. Le reste de surnageant a été réparti sur les billes préalablement équilibrées en tampon RIPA et incubé en rotation toute la nuit à 4 °C. Les immunoprécipitations anti-Flag ont été réalisées à l'aide des billes recouvertes d'anticorps anti-Flag (Sigma-Aldrich, A220) et les immunoprécipitations anti-NLRP3 ont été réalisées avec 0,8 μg d'anticorps anti-NLRP3 (Adipogen, AG-20B-0014) incubé avec des billes Ultralink A/G (Thermo Fisher Scientific, 53133). Concernant les précipitations

de protéines liant l'ATP, des billes 5'-ATP-agarose (Sigma-Aldrich, A2767) ont été utilisées. Le lendemain, les billes ont été rincées six fois en tampon RIPA et éluées en SB2X.

2.13 Western Blot

Après la stimulation des cellules, le milieu est enlevé, les cellules sont rincées au DPBS et lysées en SB2X (*sample buffer 2X*) à 4 °C. Les échantillons sont ensuite bouillis à 100 °C pendant 5-10 min et déposés sur gels d'acrylamide (SDS-PAGE). Après la migration, effectuée à 20-35 mA par gel dans du tampon de migration (186,5 mM glycine, 24,8 mM Tris base, 0,1 % SDS), les protéines ont été transférées sur membrane PVDF (PolyVinylidene Fluoride, polyfluorure de vinylidène) pendant 30 min à 25 V via un transfert semi-sec (Biorad) dans du tampon de transfert (25 mM Tris base, 192 mM glycine, 20 % ethanol, pH ajusté à 8,3). Les membranes ont ensuite été bloquées 30 min dans du TBS-T (10 mM Tri-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween20) contenant 5 % de lait, de BSA ou de gélatine selon l'anticorps primaire utilisé (cf. table A.4). Puis elles ont été transférées dans une solution d'anticorps primaire dilué dans du TBS-T à 5 % de lait, BSA ou gélatine selon l'anticorps primaire (cf. table A.4) et placée sous agitation toute la nuit à 4 °C. Le lendemain, les membranes ont été rincées trois fois pendant 10 min dans du TBS-T, puis incubées avec l'anticorps secondaire dilué dans du TBS-T contenant 2 % de lait pendant 30 min à température ambiante (cf. table A.5). Les membranes ont ensuite été de nouveau rincées selon le même protocole que précédemment. La révélation a été effectuée à l'aide d'ECL (*enhanced chemiluminescence*) mis en contact 1 min avec la membrane (ECL préparé au laboratoire : mélange équi-volumique des solutions suivantes : ECL 1 (2,5 mM luminol (Sigma-Aldrich-Aldrich, A-8511), 0,4 mM acide p-coumaric (Sigma-Aldrich C-9008), 100 mM Tris-HCl pH 8,6) et ECL 2 (0,02 % H₂O₂, 100 mM Tris-HCl pH 8,6) ou ECL commercial (ECL Prime, GE Healthcare) selon les anticorps, cf. table A.4). Les images ont été prises avec un Chemidoc (Biorad).

2.14 Test ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Les tests ELISA utilisés pour la détection de l'IL-1 β , l'IL-1 α et du TNF murins ou humains proviennent de R&D Systems (DY401, DY400-05, DY410 respectivement). Les tests ont été réalisés comme expliqué ci-après. Les plaques ELISA (Sarstedt, 85.1581200) sont « coatées », c'est-à-dire recouvertes de 50 μ L d'anticorps de capture dilué dans du tampon borate (0,1 M d'acide borique, 25 mM de sodium tetraborate decahydrate, pH 8,2) et placées toute la nuit à 4 °C. Le lendemain, chaque puits est rincé quatre fois avec 300 μ L de tampon de lavage (DPBS additionné de 0,05 % de Tween20), puis bloqué avec 100 μ L de tampon de blocage (DPBS additionné de 1 % de BSA) durant 1h, et rincé comme précédemment. Les échantillons, si besoin préalablement dilués en tampon de dilution (0,1 %

BSA, 0,05 % Tween 20, dilués en DPBS), ont été déposés dans la plaque et incubés toute la nuit à 4 °C. Le lendemain, les puits ont été rincés, puis incubés 2h à température ambiante avec 50 µL d'anticorps secondaire. Après rinçages, les puits ont été incubés 20 min avec de la streptavidine-HRP et ont été rincés de nouveau avant d'être révélés grâce à 100 µL de substrat TMB (BD Biosciences, 555214). La réaction est stoppée via l'addition de 50 µL de solution stop (2 M acide sulfurique). L'absorbance à 450 nm et 570 nm des puits est ensuite lue.

Pour les tests ELISA ayant servi à détecter l'IL-18 murine et l'HMGB1, des kits particuliers ont été utilisés (Invitrogen BMS618/3TEN et Antibodies online, ABIN5523372 respectivement), et les tests ont été réalisés en suivant les indications du fournisseur.

2.15 Détection du LDH

La détection du LDH a été réalisée avec le kit « Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH) » (Roche, 04744926001). A la fin de la stimulation des cellules, 50 µL de surnageant a été incubé à l'abri de la lumière avec 50 µL de tampon de réaction (fraîchement préparé à partir des instructions fournies par le kit) jusqu'à ce que la coloration des puits change (avec un plafond de 30 min maximum). Puis, 25 µL de solution stop a été ajoutée et l'absorbance a été lue à 492 nm et 620 nm.

2.16 Incorporation d'iodure de propidium et de YO-PROTM-1

Les BMDM utilisés pour ces expériences ont étéensemencés à une densité de $0,3 \times 10^6$ cellules/mL dans 100 µL en plaques 96 puits à fonds transparents plats et rebords noirs (Greiner Bio-One, 6655090). Le lendemain et 1h avant de procéder à la phase de lecture, les cellules ont été traitées avec les colorants suivants : Hoechst 33342 à 0,2 µg/mL (Immunochemistry technologies, 639), iodure de propidium à 1,25 µg/mL (Immunochemistry technologies, 638), YO-PROTM-1 Iodide à 1 µM (Invitrogen, Y3603). Les cellules ont été traitées juste avant la phase de lecture. Les cellules ayant incorporé les colorants ont été dénombrées à l'aide de photographies (2 champs par puits) prises au microscope *High Content Screening Yokogawa Confocal Quantitative* (CQ1) et analysées via le logiciel CQ1.

2.17 Immunofluorescence

Dans les expériences d'immunofluorescence, les cellules ont étéensemencées à $0,3 \times 10^6$ cellules/mL en plaques 24 puits dans 500 µL. Au fond de ces puits ont été préalablement déposées des lamelles de verre rincées à l'acétone et séchées à l'air libre. Après le traitement des cellules, celles-ci ont été rincées au DPBS (avec calcium/magnesium

et pH ajusté à 7,1 (Gibco, 14040133)) et fixées dans 250 μ L de PFA 4 % pendant 20 min. Après un nouveau rinçage au DPBS, la PFA a été coincée avec du tampon glycine (0,1 M Glycine dans du DPBS) pendant 10 min. Les cellules ont été ensuite rincées deux fois en DPBS, puis perméabilisées au Triton (0,1 % Triton X-100 (Amresco, 0694-1L), 0,2 % BSA en DPBS) pendant 30 min. Les lamelles ont ensuite été incubées 1h avec l'anticorps anti-ASC (dilution $\frac{1}{100}$ en DPBS à 0,5 % BSA, soit 2 μ g/mL, Santa Cruz Biotechnology sc-22514-R). Puis elles ont été lavées quatre fois 5 min en DPBS à 0,2 % BSA et incubées 30 min avec l'anticorps secondaire dilué $\frac{1}{300}$ (6,7 μ g/mL) en DPBS à BSA 0,5 % (anticorps dirigé contre l'IgG de Lapin Alexa Fluor 660, Invitrogen, A21074). Les cellules ont ensuite été lavées en DPBS à 0,2 % BSA 5 min, puis incubées 5 min avec du Hoechst 33342 à 0,2 μ g/mL, puis lavées encore deux fois. Enfin, les lamelles ont été rincées à l'eau distillée, puis séchées et montées sur lames dans 10 μ L de solution de montage (50 % Glycerol, 0,5 M propylgallate dilués en DPBS) et scellées au vernis. Elles ont été observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (AxioImager Z1 de Zeiss) et les images ont été analysées à l'aide du logiciel d'ImageJ.

Chapitre 3

Résultats : Etude de l'impact de plusieurs modifications post-traductionnelles de NLRP3 dans l'activation de l'inflammasome

Sommaire

3.1 NLRP3 est phosphorylé et ubiquitiné sur différents sites	65
3.1.1 Identification des sites de modifications post-traductionnelles de NLRP3	65
3.1.2 Sumoylation des résidus lysine de NLRP3	69
3.1.3 Bilan : les modifications post-traductionnelles de NLRP3	71
3.2 Etude des conséquences fonctionnelles des modifications post-traductionnelles de NLRP3 en lignées cellulaires	75
3.2.1 Construction des lignées cellulaires reconstituées pour NLRP3	75
3.2.2 Etude phénotypique des lignées cellulaires	79

Objectifs de l'étude

Les modifications post-traductionnelles de NLRP3, et notamment l'ubiquitination et la phosphorylation, sont impliquées dans la régulation de son activation, aussi bien lors de la phase de *priming* que lors de la phase d'activation [293]. Cependant, les sites précis portant ces modifications ainsi que les enzymes impliquées dans la mise en place ou dans le retrait de ces modifications ne sont encore que très peu décrits. Les objectifs de cette partie sont d'identifier de nouveaux sites de modifications post-traductionnelles de NLRP3 et de décrire leurs rôles dans l'activation de l'inflammasome. Nous espérons ainsi trouver de nouveaux points de contrôles de l'activation de l'inflammasome, ce qui à terme pourrait se révéler utile dans l'élaboration de nouvelles thérapies pour les patients atteints de pathologies dans lesquelles NLRP3 est impliqué, comme notamment les maladies métaboliques (athérosclérose, diabète de types II...), les maladies neurodégénératives (sclérose en plaque, maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson...), les cancers [242, 243]... De plus, certaines mutations ponctuelles de NLRP3 ont un effet gain de fonction, entraînant le développement d'une maladie auto-inflammatoire appelée CAPS, via des processus qui ne sont actuellement pas élucidés. L'identification de sites modifiés post-traductionnellement sur cette protéine pourrait éclairer la compréhension de ces mécanismes, notamment si le site en question se situe au niveau des sites mutés chez les patients CAPS.

Le Dr. Bénédicte Py a réalisé l'expérience décrite en figure 3.1, le Dr. Thomas Henry a réalisé les expériences décrites en figures 3.3 et 3.4. M.G. a réalisé les expériences décrites sur toutes les autres figures.

3.1 NLRP3 est phosphorylé et ubiquitiné sur différents sites

3.1.1 Identification des sites de modifications post-traductionnelles de NLRP3

Première méthode utilisée et résultats

Cette partie a été réalisée par le Dr. Bénédicte Py, CIRI, Lyon. Afin d'identifier les sites de modifications post-traductionnelles présents sur la protéine NLRP3, il a tout d'abord été nécessaire de purifier la protéine en question. Des macrophages murins immortalisés *Nlrp3* KO reconstitués pour sur-exprimer NLRP3-Flag (cellules NG5) ont été utilisés afin d'obtenir de grandes quantités de la protéine [287]. De plus, comme la recherche des sites d'ubiquitination était l'intérêt principal porté par cette étude, les cellules ont été traitées avec un inhibiteur d'isopeptidases, appelé G5 [294, 295], permettant ainsi d'augmenter la présence des formes ubiquitinées des protéines dans les cellules. Une

immunoprécipitation anti-Flag a ensuite permis la purification des protéines NLRP3 à partir des lysats cellulaires.

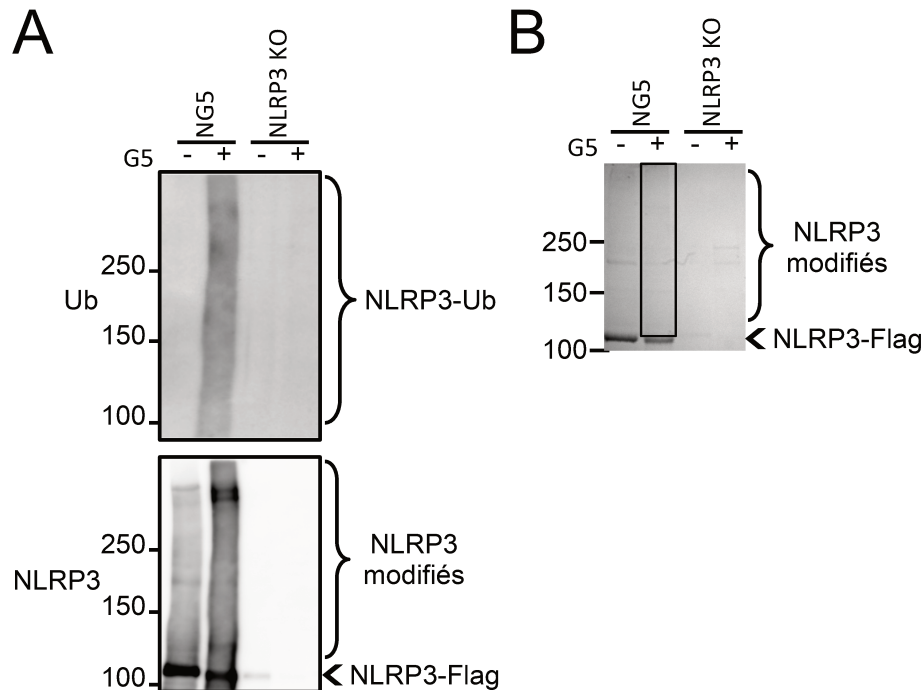


Figure 3.1 – **Purification des formes modifiées et non modifiées de la protéine NLRP3.** Les cellules NG5 (iBMDM *Nlrp3* KO surexprimant NLRP3-Flag) ont été traitées ou non avec le G5 (2,5 μ M, 2h), puis NLRP3 a été purifié par une immunoprécipitation anti-Flag. Les échantillons obtenus ont été analysés par western blot (A) et sur gel de Coomassie (B). Le rectangle indique la partie du gel qui a été découpée et envoyée pour l'analyse en spectrométrie de masse.

L'analyse d'une petite fraction des protéines immunoprécipitées par western blot (figure 3.1 A, gel du bas) révèle un *smear* au dessus de la protéine NLRP3, indiquant que celle-ci est modifiée post-traductionnellement dans les cellules NG5 au repos (figure 3.1 A, gel du haut). De plus, le traitement au G5 a effectivement permis d'augmenter la quantité de formes ubiquitinées de NLRP3 (figure 3.1 A, gel du haut).

Ceci étant confirmé, la fraction restante des protéines immunoprécipitées a été déposée sur un gel révélé au Coomassie et la portion contenant les formes modifiées de NLRP3 (correspondant au rectangle sur la figure 3.1 B) a ensuite été envoyée pour analyse en spectrométrie de masse à la plateforme Taplin (collaboration avec le Dr Steve Gygi et le Dr Ross Tomaino, Harvard Medical School, Boston). Pour cette analyse, les échantillons ont d'abord été traités à la trypsine, protéase qui permet de cliver les protéines après un résidu lysine (K) ou arginine (R), en laissant toutefois des sites non clivés (figure 3.2), avant d'avoir été séquencés par spectrométrie de masse. Comme les modifications post-traductionnelles des protéines n'affectent pas la totalité des protéines cellulaires, la détection de deux peptides ne différant en masse que d'un motif « GG » ou d'un grou-

pement phosphate permet d'identifier les sites d'ubiquitination et de phosphorylation respectivement.

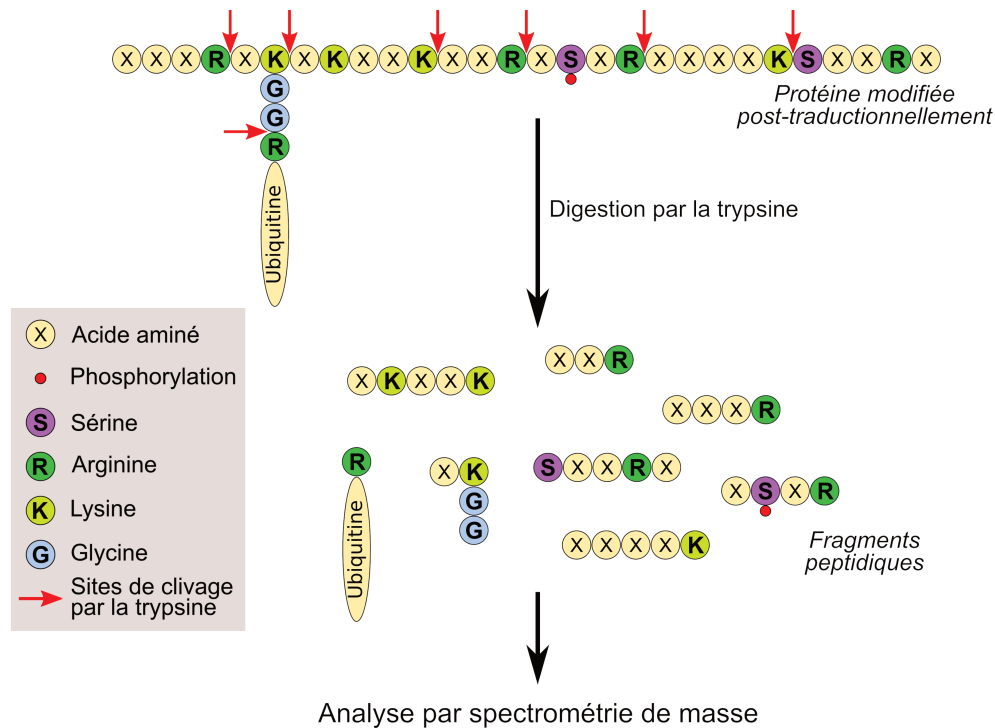


Figure 3.2 – **Principe de la préparation des protéines pour l'analyse des modifications post-traductionnelles par spectrométrie de masse.** Les lysats cellulaires ont été traités à la trypsine afin de fragmenter les protéines en peptides, qui ont ensuite été séquencés par spectrométrie de masse.

Les résultats obtenus ont permis d'identifier plusieurs modifications post-traductionnelles portées par NLRP3 murin : deux sites d'ubiquitination K373 (K377 chez l'homme) et K568 (K570 chez l'homme) ainsi que deux sites de phosphorylation S157 (S161 chez l'humain) et S685.

Deuxième méthode utilisée et résultats

Une autre méthode a été utilisée par la suite par le Dr. Thomas Henry (CIRI, Lyon) afin d'étudier de façon beaucoup plus large comment l'ubiquitination des protéines cellulaires varie suite à l'entrée cytosolique d'une bactérie, *Francisella tularensis novicida*. Cette étude a pour objectif de rechercher le rôle de l'ubiquitination dans les mécanismes de mise en place d'une immunité cytosolique. Pour ce faire, des macrophages murins immortalisés ont été infectés avec deux types de bactéries *Francisella tularensis novicida* de souche Utah. Une première bactérie est appelée U112 et est sauvage. Une seconde bactérie, isogénique avec U112, est appelée Δ FPI (*Francisella pathogenicity island*) en raison de l'absence de l'îlot de pathogénicité de son génome, ce qui empêche la bactérie de sortir du phagosome et d'entrer dans le cytosol après avoir été phagocytée par la cellule (figure 3.3) [296, 297]. En effet, l'îlot de pathogénicité contient notamment les gènes codant pour

le système de sécrétion de type VI, essentiel à la sortie du phagosome [297]. La bactérie U112 est ainsi capable d'activer une immunité cytosolique, contrairement à la bactérie Δ FPI utilisée comme contrôle.

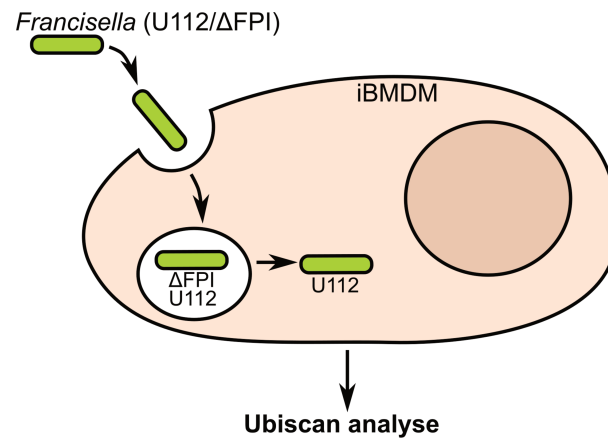


Figure 3.3 – Infection des macrophages par la bactérie *Francisella tularensis novicida*. Les bactéries U112 et Δ FPI sont phagocytées par le macrophage. La bactérie U112 s'échappe ensuite du phagosome pour entrer dans le cytosol. Au contraire, la bactérie Δ FPI reste dans le phagosome.

Suite à ces infections, l'ubiquitome des lysats cellulaires a été analysé. La méthode utilisée est un peu différente de celle vue précédemment. L'ubiquitine est une protéine qui se lie sur l'azote N ϵ de la chaîne latérale d'un résidu lysine de la protéine cible. Cette liaison se fait avec la fonction acide carboxylique du dernier résidu d'acide aminé de l'ubiquitine, protéine qui se termine par -RGG. Après l'action de la trypsine, les fragments peptidiques qui contiennent des lysines qui étaient ubiquitinées dans la protéine initiale porteront ainsi le motif -K ϵ GG. Un anticorps reconnaissant spécifiquement ce motif a été utilisé pour purifier les peptides initialement ubiquitinés, puis ceux-ci ont été séquencés par spectrométrie de masse.

Ce protocole permet de comparer les variations d'ubiquitination des protéines cellulaires entre le cas où l'immunité cytosolique est activée et le cas où elle ne l'est pas. NLRP3 a été détecté parmi les nombreuses protéines pour lesquelles des variations d'ubiquitination sur certains résidus ont été identifiées (figure 3.4).

Le résidu lysine K285 (K289 chez l'homme) est ubiquitiné dans deux des trois réplicats dans les conditions d'infection avec U112 comme avec Δ FPI. De manière similaire, le résidu lysine K543 est ubiquitiné dans les conditions d'infection avec U112 et Δ FPI. Le résidu lysine K426 (K430 chez l'humain) est ubiquitiné dans le cas de l'infection par Δ FPI mais pas par U112. A l'inverse, deux réplicats sur trois indiquent que le résidu K506 (K510 chez l'humain) est ubiquitiné en présence de la souche U112 mais déubiquitiné en présence de la souche Δ FPI.

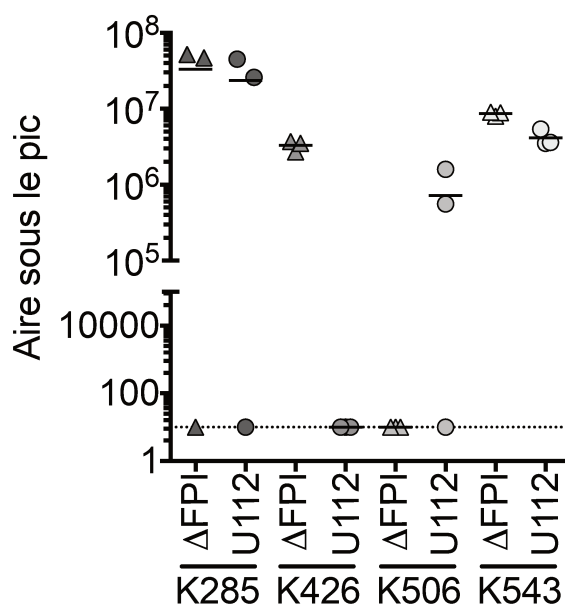


Figure 3.4 – **Ubiquitination des résidus lysines K285, K426, K506 et K543 de NLRP3 murins.** L'aire sous le pic est positivement corrélée avec l'ubiquitination du résidu. Pour chaque condition, des triplicats ont été analysés.

3.1.2 Sumoylation des résidus lysine de NLRP3

La SUMOylation est une modification post-traductionnelle qui ressemble beaucoup à l'ubiquitination [298]. De la même manière, il se forme une liaison isopeptidique entre la fonction acide carboxylique des deux résidus glycines en C terminal de la protéine SUMO et la fonction amine de la chaîne latérale d'un résidu lysine de la protéine cible (figure 3.5). Les deux résidus glycines se trouvent exposés en C terminal de la protéine SUMO suite au clivage de celle-ci par l'enzyme d'activation E1. Les motifs consensus pour beaucoup de SUMOylation (jusqu'à 50 % des protéines SUMOylées par SUMO2) sont « ψ -K-X-E » ou « E/D-K-X- ψ », où « ψ » représente un résidu hydrophobe et « X » n'importe quel résidu d'acide aminé [299–301]. Or les lysines identifiées précédemment n'appartiennent pas à de tels motifs consensus (figure 3.10), ce qui confirme leur ubiquitination. Cependant, il est important de noter que d'autres séquences consensus existent [302–304].

De plus, de la même façon que pour l'ubiquitination, la SUMOylation de NLRP3 peut être détectée suite à une purification de NLRP3 par immunoprécipitation puis une analyse par western blot en utilisant des anticorps anti-SUMO (figure 3.6). La révélation des lysats totaux montre que l'anticorps est effectivement capable de reconnaître la SUMOylation. Après la purification de NLRP3, aucun *smear* n'est détecté, ce qui indique que le traitement au LPS de NLRP3 n'induit pas sa SUMOylation. De façon intéressante, l'intensité du *smear* n'est pas augmentée par le traitement au G5, molécule décrite pour inhiber les isopeptidases et pas spécifiquement les déubiquitinases.

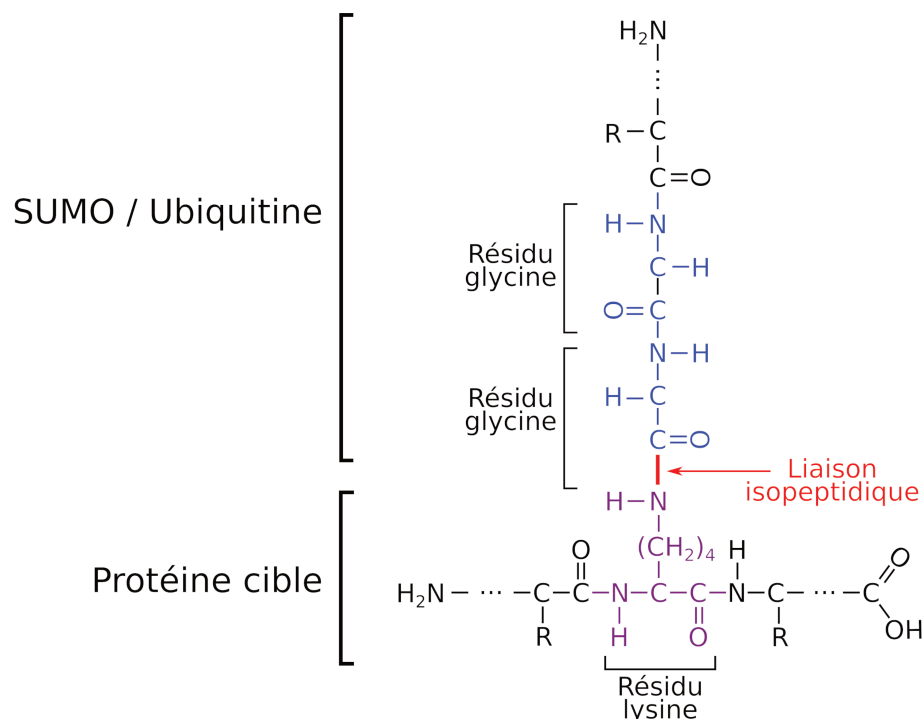


Figure 3.5 – **Liaison isopeptidique.** Liaison isopeptidique formée entre la fonction amine d'un résidu lysine de la protéine cible et la fonction acide carboxylique du résidu glycine en C terminal de l'ubiquitine ou du SUMO.

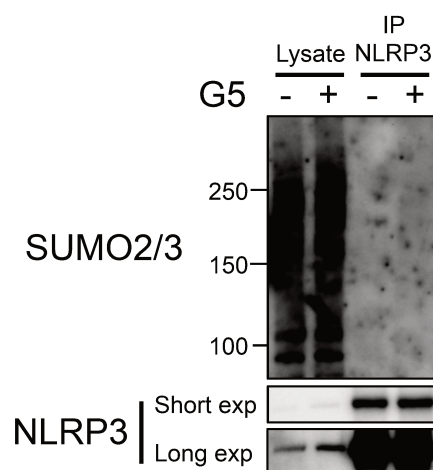


Figure 3.6 – **NLRP3 n'est pas SUMOylé.** Les iBMDM (*immortalized bone marrow derived macrophages*) ont été traitées au LPS pendant 4h à 50 ng/ml, puis traitées ou non au G5 (15 min à 0,5 μ M). NLRP3 a été purifié par immunoprécipitation, puis la présence de SUMO2/3 a été testée par western blot.

3.1.3 Bilan : les modifications post-traductionnelles de NLRP3

Localisation des résidus modifiés post-traductionnellement sur NLRP3

Les modifications post-traductionnelles de NLRP3 identifiées au cours des deux études précédentes sont replacées sur les différents domaines de la protéine (figure 3.7).

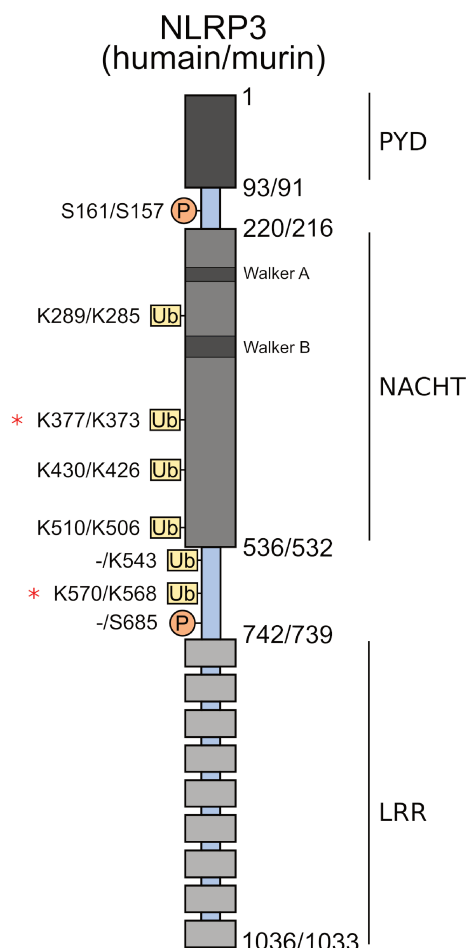


Figure 3.7 – **Bilan des modifications post-traductionnelles identifiées sur NLRP3.** Le schéma montre la localisation des modifications post-traductionnelles dans les différents domaines de NLRP3. Les domaines charnières sont indiqués en blancs. La numérotation des résidus est indiquée, humaine/murine. Le signe « - » désigne la non conservation du résidu entre l'humain et le souris. Les astérisques rouges indiquent les sites pour lesquelles des substitutions ont été associées à des patients CAPS.

Les sites identifiés comme étant modifiés post-traductionnellement se situent dans le domaine NACHT ou dans les régions qui l'entourent. Parmi les sites identifiés, deux lysines (K373 et K568) correspondent à des sites où des mutations par substitutions ont été associées à des patients CAPS. De plus, il est à noter que les sites de variations responsables des CAPS recensés se situent pour la plupart dans cette région, ce qui montre l'importance du domaine NACHT dans le contrôle de l'activation de NLRP3.

Conservation des résidus modifiés post-traductionnellement entre les espèces

Afin de se rendre compte dans une première approche de l'importance de ces sites, leur conservation au sein des espèces a été testée. Les espèces ont été choisies parmi les Mammifères en prenant des organismes modèles utilisés en recherche ainsi que des espèces éloignées sur le plan évolutif.

Le résidu S157 est fortement conservé entre les espèces testées, sauf chez le chien (*Canis lupus familiaris*) (figure 3.8) pour lequel cette sérine est remplacée par une thréonine, un résidu dont la chaîne latérale a des propriétés chimiques très proches de la sérine (polaire, non chargée) et qui peut également être porteur d'une phosphorylation (figure 3.9). Le résidu S685 est conservé entre les espèces testées, sauf chez l'homme (*Homo sapiens*) et le macaque (*Macaca mulatta*) (figure 3.8). Chez ces espèces, ce résidu est remplacé par une méthionine, résidu n'ayant pas les mêmes propriétés que la sérine (figure 3.9) et ne pouvant pas être phosphorylé.

Homo sapiens (human)	RSRFQCIEDRNARLGE S VSLNKRYTRLRLIKEH	177
Macaca mulatta (Rhesus monkey)	RSRFQCIEDRNARLGE S VSLNKRYTRLRLIKEH	177
Mus musculus (mouse)	RSRFYSIKDRNARLGE S VDLNSRYTQLQLVKEH	173
Rattus norvegicus (rat)	RSRFYSIKDRNARLGE S VDLNRRYTQLQLVKEH	175
Castor canadensis (castor)	RSRFHCIEDRNARLGE S VNLNKRYTRLRLVKEH	175
Canis lupus familiaris (dog)	RSRFQCIKDRNARLGE T VNLNKRYTRLRLVKEH	168
Sus scrofa (pig)	RSRFQCIKDRNARLGE S VNLNKRFTRLRLIKEH	172
Bos taurus (cow)	RSKFQCIKDRNARLGE S VNLNKRFTRLRLIKEH	172
Equus caballus (horse)	RSRFQCIKDRNARLGE S VNLNKRYTRLCLLKEH	168
Lagenorhynchus obliquidens (dolphin)	RSRFQCIKDRNARLGE S VNLNKRFTRLRLIKEH	172
	. * .*:**:*.** *:*: * **	
Homo sapiens (human)	ENCHRVESLSLGFHLN M PKEEEEEEEK-----EG	698
Macaca mulatta (Rhesus monkey)	ENCHRVESLSLGFHLN M PKEEEEEEEK-----EG	698
Mus musculus (mouse)	KNCHRVKTL S LGFHLN S PKEEEEEERR-----GG	696
Rattus norvegicus (rat)	KNCHRVKTL S LGFHLN S PKEEEEEERK-----GS	698
Castor canadensis (castor)	ENCSSVETL S LGFHLN S PKEEEEEEE-----ES	696
Canis lupus familiaris (dog)	ENCCRVESLSL R LLHN S PKEEEEEEEENEKEM	697
Sus scrofa (pig)	ENCRHVESLSL R LLHN S PKEEEEEEE-EEIEEDV	700
Bos taurus (cow)	ENCRHVESLSL R LLHN S PKEEEEEEE-----EEV	695
Equus caballus (horse)	ENCRSVESLSL R LL N S P KEEEEEE-EEEEEDGV	696
Lagenorhynchus obliquidens (dolphin)	ENCHHVESLSL R LLHN S SKEEEEEEEEEEKEEV	701
	:** :::**: **: * *****	

Figure 3.8 – Alignements des séquences de NLRP3 correspondant aux résidus entourant les sites identifiés comme étant porteur de phosphorylation. Les sites correspondant aux sites de phosphorylation détectés chez la souris sont indiqués en rouge. L'alignement des séquences orthologues de *Nlrp3* a été réalisé grâce à ClustalW. Le signe « * » indique les résidus totalement conservés; « : » et « . » les résidus avec de fortes et de faibles similarités de propriétés respectivement.

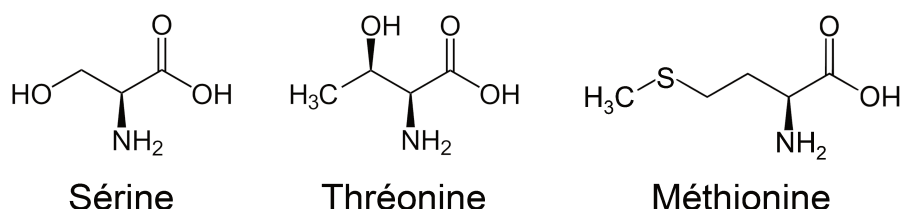


Figure 3.9 – Formules chimiques développées des acides aminés sérine, thréonine et méthionine.

La même démarche a été suivie pour tester la conservation des résidus lysines (figure 3.10). Les résidus K285, K426, K506 et K568 sont totalement conservés chez les espèces

choisies. Le résidu K373 est aussi très fortement conservé, sauf chez la vache, espèce pour laquelle le résidu correspond à une arginine, acide aminé aux propriétés très similaires à la lysine, sauf que celui-ci ne peut pas porter de chaînes d'ubiquitine (figure 3.11). Enfin, le résidu K543 est quant à lui peu conservé : un résidu lysine est présent chez la souris, le rat et le castor, alors que chez l'homme et le macaque c'est une valine qui est à cette position, et chez le chien, le cochon, la vache, le cheval et le dauphin c'est une asparagine qui est présente. Or comme il est décrit dans la figure 3.11, ces acides aminés n'ont pas de propriétés chimiques communes avec la lysine.

Ainsi, si l'on considère que le degré de conservation d'un résidu protéique entre différentes espèces reflète l'importance de ce résidu pour la fonction de la protéine, alors les résidus K285, K426, K506, K568 et dans une moindre mesure les résidus S157 et K373 sont très importants pour le fonctionnement de NLRP3. Cependant, rien n'indique que ce sont les modifications post-traductionnelles qu'ils portent qui sont essentielles, ni que ces résidus sont importants dans la régulation de l'activation de l'inflammasome, étant donné les nombreuses fonctions non canoniques de NLRP3 [305, 306]. A l'inverse, le résidu K543, très peu conservé, semble être moins important pour le fonctionnement de NLRP3.

**CHAPITRE 3. RÉSULTATS : ETUDE DE L'IMPACT DE PLUSIEURS MODIFICATIONS
POST-TRADUCTIONNELLES DE NLRP3 DANS L'ACTIVATION DE L'INFLAMMASOME**

Homo sapiens (human)	GDLIMSCCPDPNPPPIHKIVRKPSRILFLMDGFD	307
Macaca mulatta (Rhesus monkey)	GDLIMSCCPDPNPPPIRKIVSKPSRILFLMDGFD	307
Mus musculus (mouse)	ADLIVSCWPDNPVCKILCKPSRILFLMDGFD	301
Rattus norvegicus (rat)	ADLIISCWPDNPVCKILCKPSRILFLMDGFD	303
Castor canadensis (castor)	GDLIASCCPDNPVHKIVRKPSRILFLMDGFD	303
Canis lupus familiaris (dog)	GDLIVSCCPDPNPPICKIVSKPSRILFLMDGFD	298
Sus scrofa (pig)	GDLIASCCPGNPPIGKIVSKPSRILFLMDGFD	302
Bos taurus (cow)	GDLIASCCPGNPPIGKIVSKPSRILFLMDGFD	302
Equus caballus (horse)	GDLIVSCCPDPKPPIGKILSKPSRILFLMDGFD	298
Lagenorhynchus obliquidens (dolphin)	GDLIASCCPGNPPIGKIVSKPSRILFLMDGFD	302
	.*** ** *.:** : ** : *****	
Homo sapiens (human)	LLDHPRHVEILGFSEAKRKEYFFKYFSDEAQR	393
Macaca mulatta (Rhesus monkey)	LLDHPRHVEILGFSEAKRKEYFFKYFSDEAQR	393
Mus musculus (mouse)	LLDHPRHVEILGFSEAKRKEYFFKYFSNELQAR	389
Rattus norvegicus (rat)	LLDHPRHVEILGFSEAKRKEYFFKYFSNELQAR	391
Castor canadensis (castor)	LLDHPRHVEVILGFSEAKRKEYFFKYFSNEVQAK	391
Canis lupus familiaris (dog)	LLDRPRHVEILGFSEAKRKEYFFKYFSDEQQAT	386
Sus scrofa (pig)	LLGRARHVEILGFSEAKRKEYFFKYFSDEQQAR	390
Bos taurus (cow)	LLGQARHVEILGFSEARRKEYFLKYFSDEQQAR	390
Equus caballus (horse)	LLDRPRHVEILGFSEAKRKEYFFKYFSDEQQAH	386
Lagenorhynchus obliquidens (dolphin)	LLGRARHVEILGFSEVKKKEYFFKYFSDEQQAR	390
	.: **:*****.:****:****:* **	
Homo sapiens (human)	VCWIVCTGLKQOMESGKSLAQTSKTTAVYVFF	446
Macaca mulatta (Rhesus monkey)	VCWIVCTGLKQOMESGKSLAQTSKTTAVYVFF	446
Mus musculus (mouse)	VCWIVCTGLKQOMETGKSLAQTSKTTAVYVFF	442
Rattus norvegicus (rat)	VCWIVCTGLKQOMETGKSLAQTSKTTAVYVFF	444
Castor canadensis (castor)	VCWIVCTGLKQMQSGKSLAQTSKTTAVYVFF	444
Canis lupus familiaris (dog)	VCWIVCTGLKQOMDSGNLAQTSKTTTSVYIFF	439
Sus scrofa (pig)	VCWIVCTGLKQOMDSGKSLARTSKTTAVYIFF	443
Bos taurus (cow)	VCWIVCTGLKQOMDSGKSLARTSKTTAVYIFF	443
Equus caballus (horse)	VCWIVCTGLKQOMDSGKSLAQTSKTTAVYVFF	439
Lagenorhynchus obliquidens (dolphin)	VCWIVCTGLKQOMDSGKSLARTSKTTAVYIFF	443
	*****:*. **.:*****:* **	
Homo sapiens (human)	LQKADVSAFLRMNLFQKEVDCEKFYSFIHMTFQ	526
Macaca mulatta (Rhesus monkey)	LQKADVSAFLRMNLFQKEVDCEKFYSFIHMTFQ	526
Mus musculus (mouse)	LQKTDVSAFLRMNVFQKEVDCERFYSFSHMTFQ	522
Rattus norvegicus (rat)	LQKTDVSAFLRMNVFQKEVDCERFYSFSHMTFQ	524
Castor canadensis (castor)	LQKVDVSAFLRMNIFQKEVDCEKYYSFIHMTFQ	524
Canis lupus familiaris (dog)	LQKADVSAFLRMNLFQKEVDCEKFYSFIHMTFQ	519
Sus scrofa (pig)	LQKADVSAFLRMNLFQKEVDCEKFYSFIHMTFQ	523
Bos taurus (cow)	LQKADVSAFLRMNLFQKEVDCEKFYSFIHMTFQ	523
Equus caballus (horse)	LQRADASAFRLMNLQKEVDCEKFYSFIHMTFQ	519
Lagenorhynchus obliquidens (dolphin)	LQKADVSAFLRMNLFQKEVDCEKFYSFIHMTFQ	523
	.:*. ***:*****.:*** *****	
Homo sapiens (human)	AMYILLEEEKEGRT-NV-PGSRLKLP SRDVTVL	561
Macaca mulatta (Rhesus monkey)	AMYILLEEEKEGRT-NV-PGSCLKLP SRDVTVL	561
Mus musculus (mouse)	AMYILLEEEAEGETVRKGPGGCSDLLNRDVKVL	559
Rattus norvegicus (rat)	AMYILLEEEEGVTVRKGPEGCSDLLNRDVKVL	561
Castor canadensis (castor)	AMYILLEEEEDVMMRK-VPGSLELPNRDVTVL	560
Canis lupus familiaris (dog)	AMYILLEEEEQGRM-RNLPSWSSKLPNRDVKVL	555
Sus scrofa (pig)	AMYILLEEKEDQGEM-RNVPRSKLP SRDVTVL	559
Bos taurus (cow)	AMYILLEEDNHGEM-RNTPQACSKLPNRDVKVL	559
Equus caballus (horse)	AMYILLEDEEQGSV-RNMPWGRSNLPNRDVSVL	555
Lagenorhynchus obliquidens (dolphin)	AMYILLEEENQEM-RNMQRSSKLPNRDVTVL	559
	*****.: . . . * .***.**	
Homo sapiens (human)	PSRDVTVLLENYGKFEKGYLIFVVRFLFGLVNQ	586
Macaca mulatta (Rhesus monkey)	PSRDVTVLLENYGKFEKGYLIFVVRFLFGLVNQ	586
Mus musculus (mouse)	LNRDVKVLLENYGKFEKGYLIFVVRFLFGLVNQ	584
Rattus norvegicus (rat)	LNRDVKVLLENYGKFEKGYLIFVVRFLFGLVNQ	586
Castor canadensis (castor)	PNRDVTVLLENYGKFEKGYLIFVVRFLFGLVNQ	585
Canis lupus familiaris (dog)	PNRDVKVLLENYGKFEKGYLIFVVRFLFGLVNQ	580
Sus scrofa (pig)	PSRDVTVLLENYGKFEKGYLIFVVRFLFGLVNQ	472
Bos taurus (cow)	PNRDVKVLLENYGKFEKGYLIFVVRFLFGLVNQ	584
Equus caballus (horse)	PNRDVSVLLENYGKFEKGYLIFVVRFLFGLVNQ	580
Lagenorhynchus obliquidens (dolphin)	PNRDVTVLLENYGKFEKGYLIFVVRFLFGLVNQ	584
	.**:*****:***	

Figure 3.10 – **Alignement des séquences de NLRP3 entourant les sites identifiés comme étant porteur d'ubiquitination.** Les sites correspondant aux sites de phosphorylation détectés chez la souris sont indiqués en rouge. L'alignement des séquences orthologues de *Nlrp3* a été réalisé grâce à ClustalW. « * » indique les résidus totalement conservés; « : » et « . » les résidus avec de fortes et de faibles similarités de propriétés respectivement.

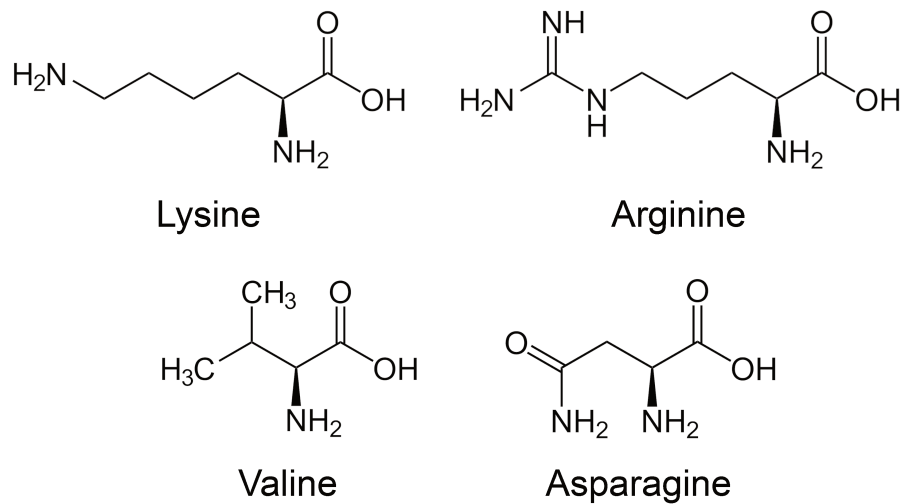


Figure 3.11 – Formules chimiques développées des acides aminés lysine, arginine, valine et asparagine.

3.2 Etude des conséquences fonctionnelles des modifications post-traductionnelles de NLRP3 en lignées cellulaires

3.2.1 Construction des lignées cellulaires reconstituées pour NLRP3

Afin d'étudier l'impact des modifications post-traductionnelles précédemment identifiées sur l'activation de NLRP3, des lignées cellulaires exprimant des mutants ponctuels de NLRP3 ont été générées. L'objectif est ici de remplacer le résidu qui est modifié post-traductionnellement par un résidu qui a des propriétés physico-chimiques les plus proches possible afin de ne pas perturber la structure tridimensionnelle de la protéine, mais qui ne peut pas être modifié ou qui mime la modification. Ainsi, les lysines identifiées comme porteuse d'une ubiquitine ont été remplacées par une arginine (cf figure 3.11). Cette mutation permet de mimer une déubiquitination constitutive de ce résidu. Les sérines identifiées comme porteuses d'une phosphorylation ont été mutées en alanine afin de mimer une déphosphorylation constitutive du résidu. A l'inverse, elles ont également été mutées en acide aspartique pour mimer une phosphorylation constitutive (cf figure 3.12).

Des monocytes humains immortalisés (U937) *NLRP3* KO ainsi que des BMDM murins immortalisés (iBMDM) *Nlrp3* KO ont été utilisés pour générer les lignées cellulaires reconstituées [286, 287]. Pour ce faire, ces cellules ont été transduites par un vecteur contenant le gène codant pour NLRP3 muté sous le contrôle d'un promoteur inductible à la doxycycline. Ceci permet de pouvoir contrôler le niveau d'expression de ce gène via la modulation du temps d'incubation des cellules avec la doxycycline ainsi que la dose de doxycycline utilisée. Avant de commencer les études phénotypiques, le niveau d'expres-

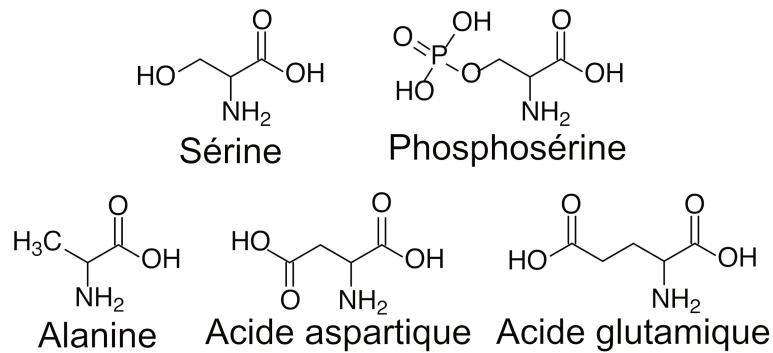


Figure 3.12 – Formules développées de la sérine, la phosphosérine, l’alanine, l’acide aspartique et l’acide glutamique.

sion de NLRP3 dans les cellules reconstituées a été vérifié (figure 3.13). Les lignées cellulaires U937 reconstituées expriment NLRP3, et ce de manière dépendante du temps d’exposition à la doxycycline (figure 3.13). De plus, les niveaux d’expression de NLRP3 sont comparables à ceux induits par le traitement des cellules U937 sauvages au LPS pendant 2h. Ainsi, les biais induits par une surexpression de gènes sont évités par ce système. Les lignées cellulaires iBMDM mutées sur les lysines expriment NLRP3 suite au traitement à la doxycycline (figure 3.13 B). Cependant, les niveaux sont plus faibles que ceux trouvés dans les cellules WT, même sans traitement au LPS. Pour finir, l’expression des mutants sérines en cellules iBMDM est à un niveau comparable à celui induit suite à l’infection des cellules iBMDM WT par *Escherichia coli* (figure 3.13 C). De plus, il est important de noter que les différents mutants s’expriment à des niveaux similaires entre eux (à l’intérieur des trois groupes A, B et C correspondant à trois expériences distinctes), ce qui est essentiel pour pouvoir comparer les phénotypes d’activation de l’inflammasome par la suite. Ainsi, toutes les lignées cellulaires sont validées pour une expression physiologique de NLRP3 et autorisant la comparaison des différents mutants.

L’étude des mutants NLRP3 K373R et NLRP3 K568R étant détaillée dans les chapitres suivants, nous nous intéresserons ici à l’étude des autres mutants.

Enfin, une dernière étape de validation de cette stratégie est nécessaire. En effet, une étude récente a montré que le traitement par la doxycycline pouvait inhiber la synthèse de la pro-IL-1 β ainsi que la sécrétion d’IL-1 β dans les cellules traitées au LPS et à la nigéricine [307]. Il a donc fallu vérifier si la doxycycline avait les mêmes effets que ceux décrits précédemment. Dans l’étude menée par Zhang et al., la doxycycline a été utilisée à des concentrations qui se situent entre 5 et 20 $\mu\text{g/ml}$ pendant 24h, alors que les doses que nous avons utilisées se situent entre 0,1 et 1 $\mu\text{g/ml}$ pendant 2 à 24h, selon les expériences. Dans nos conditions expérimentales, le traitement des iBMDM WT à la doxycycline n’entraîne pas de variations de sécrétion d’IL-18, d’IL-1 β ou de TNF par rapport aux conditions sans traitement à la doxycycline (figure 3.14 A). De plus, nous n’avons pas observé de diminution de la quantité de pro-IL-1 β synthétisée dans les cellules traitées au LPS et à la doxycycline par rapport aux cellules traitées au LPS seulement (figure 3.14 B).

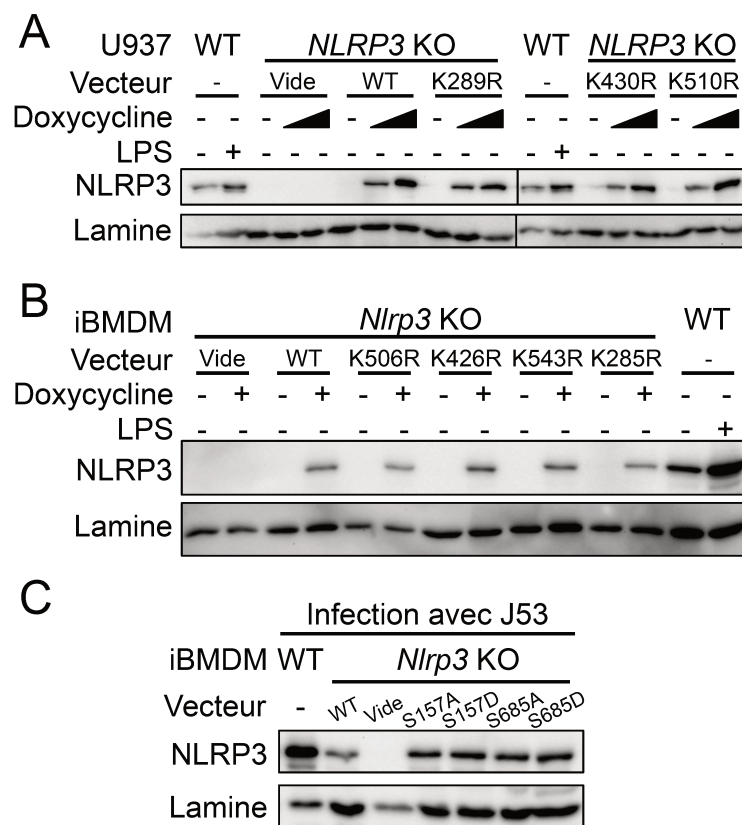


Figure 3.13 – Contrôle du niveau d'expression de *NLRP3* dans les lignées cellulaires *NLRP3* KO reconstituées. A. Les cellules U937 ont été traitées au LPS (50 ng/ml) durant 2h. Les cellules U937 *NLRP3* KO reconstituées avec des mutants lysines de *NLRP3* ont été traitées à la doxycycline (1 µg/ml) pendant 2h ou 4h. L'expression de *NLRP3* a été vérifiée par western blot sur les lysats cellulaires. B. Les cellules iBMDM *Nlrp3* KO reconstituées avec différents mutants lysines de *NLRP3* ont été traitées à la doxycycline (1 µg/ml) pendant 24h et les iBMDM WT ont été traitées au LPS (50 ng/ml) pendant 4h, puis les lysats cellulaires ont été analysés par western blot. C. Les cellules iBMDM WT ont été infectées par la souche J53 d'*E. coli* pendant 16h. Les cellules iBMDM *Nlrp3* KO reconstituées pour exprimer les mutants sérine de *NLRP3* ont été traitées à la doxycycline à 2 µg/ml pendant 16h. Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés par western blot.

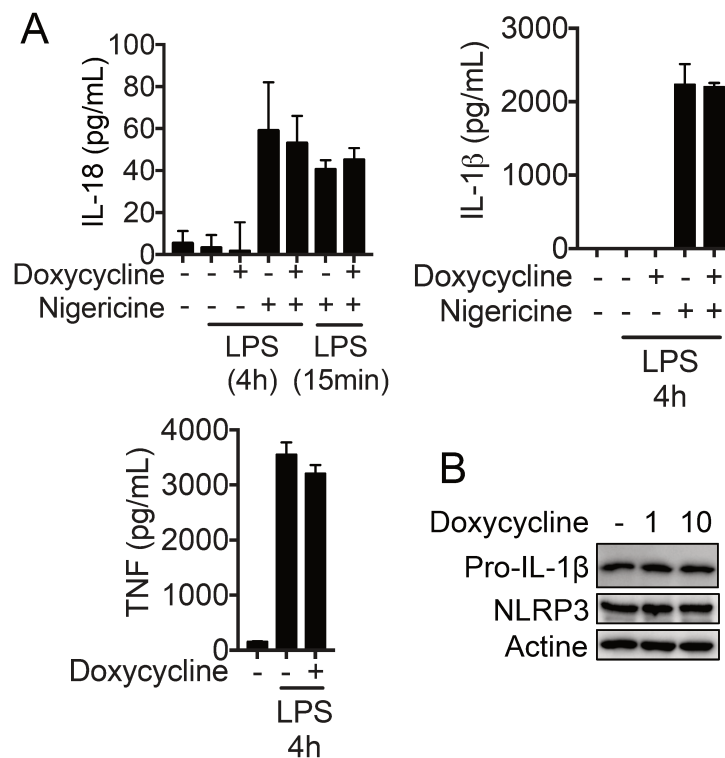


Figure 3.14 – **La doxycycline n'inhibe pas le priming des iBMDM.** A. Les iBMDM ont été traités à la doxycycline (1 µg/ml, 2h), puis au LPS (50 ng/ml, 4h), puis à la nigéricine (20 µg/ml, 1h). Le contenu des surnageants en IL-18, IL-1β et TNF a ensuite été analysé par test ELISA. B. Les iBMDM ont été traités à la doxycycline (doses indiquées en µg/ml, 2h), puis au LPS (50 ng/ml, 4h). Les cellules ont ensuite été rincées et lysées avec du SB2X et les lysats ont été analysés par western blot.

3.2.2 Etude phénotypique des lignées cellulaires

Stimulation des cellules par des signaux activant spécifiquement l'inflammasome NLRP3

Afin d'étudier l'impact des différentes mutations générées sur NLRP3 dans l'activation de l'inflammasome, les cellules ont été traitées avec les composés qui activent spécifiquement l'inflammasome NLRP3. Suite au traitement par le LPS et la nigéricine des cellules U937 sauvages et des cellules *NLRP3* KO reconstituées lentiviralement avec NLRP3 WT, la sécrétion d'IL-1 β est similaire, ce qui conforte le fait que les cellules reconstituées fonctionnent de la même manière que les cellules contenant le gène *NLRP3* endogène (figure 3.15, panel de gauche). De plus, même si quelques différences de sécrétion d'IL-1 β entre les mutants des lysines de NLRP3 peuvent être remarquées sur ce graphique (figure 3.15, panel de gauche), celles-ci n'étaient pas reproductibles d'une expérience à une autre. Le traitement au LPS seul des mutants qui miment une déubiquitination constitutive des lysines n'a pas conduit à la sécrétion d'IL-1 β (figure 3.15, panel de gauche). Ceci indiquerait que l'ubiquitination des résidus lysines étudiés ici ne semble pas être un mécanisme clé pour empêcher l'activation de NLRP3 et empêcher le développement d'un phénotype de type CAPS. Enfin, la sécrétion de TNF observée suite au traitement au LPS indique que les différents types cellulaires ont tous une voie NF- κ B fonctionnelle et qu'ils sont présents en quantités similaires (figure 3.15, panel de droite). D'autre part, le phénotype des iBMDM reconstitués avec les mutants lysines de NLRP3 a aussi été testé. La même tendance de sécrétion d'IL-1 β a été observée (données non montrées). Cependant, la sécrétion d'IL-1 β était très faible, ce qui peut être expliqué par la faible expression de NLRP3 dans ces cellules (cf figure 3.13 B).

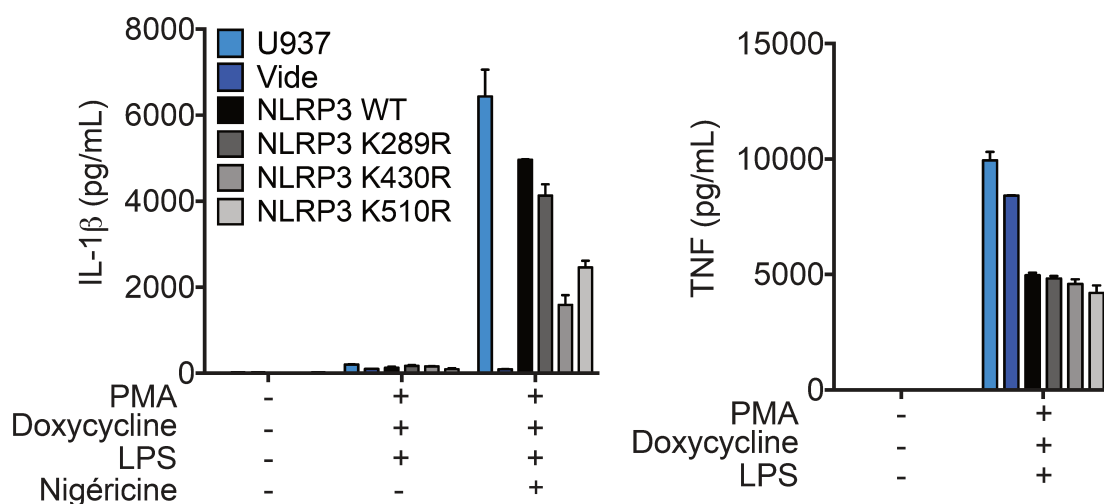


Figure 3.15 – Les cellules qui expriment les mutants lysines de NLRP3 sécrètent de l'IL-1 β en quantité similaire aux cellules sauvages. Les cellules ont été différenciées à la PMA (50 ng/ml, 24h), puis traitées à la doxycycline (1 μ g/mL, 2h), puis stimulées au LPS (50 ng/mL, 4h) et enfin traitées à la nigéricine (20 μ g/mL, 1h). Les surnageants ont ensuite été analysés par test ELISA.

De la même manière que précédemment, l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les iBMDM reconstitués avec les mutants des sérines de NLRP3 a aussi été étudiée, en suivant la sécrétion d'IL-1 β par ces cellules déclenchée par leur traitement avec les activateurs spécifiques de cet inflammasome. La sécrétion d'IL-1 β est amoindrie lorsque NLRP3 muté sur la sérine S157 est exprimé, et augmentée lorsque NLRP3 muté sur la sérine S685 est exprimé par rapport à l'expression de la forme sauvage de NLRP3 (Figure 3.16). Cependant la répétition de ces expériences plusieurs fois a fait ressortir que les différences de sécrétion d'IL-1 β entre les mutants des sérines n'étaient pas significatives. Ainsi, les phosphorylations et déphosphorylations des résidus sérine S157 et S685 ne semblent pas être impliquées dans l'activation de l'inflammasome NLRP3.

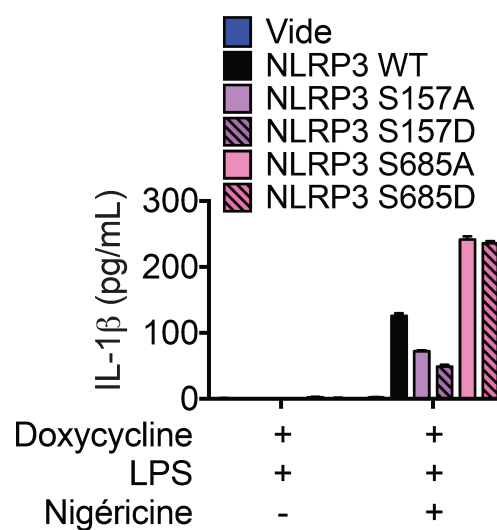


Figure 3.16 – Les cellules qui expriment les mutants des sérines de NLRP3 sécrètent de l'IL-1 β en quantités similaires aux cellules sauvages. Les iBMDM ont été traités à la doxycycline (0,1 μ g/ml, 24h) puis au LPS (50 ng/ml, 8h) et à la nigéricine (20 μ g/ml, 2h). Les surnageants ont ensuite été récupérés puis analysés par test ELISA.

Modèles infectieux

Comme expliqué en introduction, NLRP3 peut être activé par un vaste panel de stimuli, comprenant des infections par des bactéries, des parasites, des champignons, l'ingestion de cristaux par phagocytose..., déclenchant différentes voies de signalisation. L'activation pas les signaux LPS et nigéricine des cellules exprimant NLRP3 muté sur des sérines ou des lysines n'a montré aucune dérégulation de l'activation de l'inflammasome. D'autres signaux activateurs ont donc été testés sur ces mutants de NLRP3 pour vérifier si les modifications post-traductionnelles des résidus étudiés précédemment seraient nécessaires pour contrôler l'activation de NLRP3 lors du déclenchement de voies de signalisation différentes.

Infection avec *Escherichia coli* Les cellules ont été infectées par la bactérie *Escherichia coli* de souche J53, afin d'activer l'inflammasome NLRP3 [308]. La sécrétion d'IL-1 β est similaire entre les différents types cellulaires (mutants lysines de NLRP3) suite à l'infection par J53 (figure 3.17). De la même manière, aucune différence reproductible de sécrétion d'IL-1 β entre les différents mutants sérines de NLRP3 n'a pas pu être remarquée (données non montrées). Ceci confirme donc les conclusions de la section précédente.

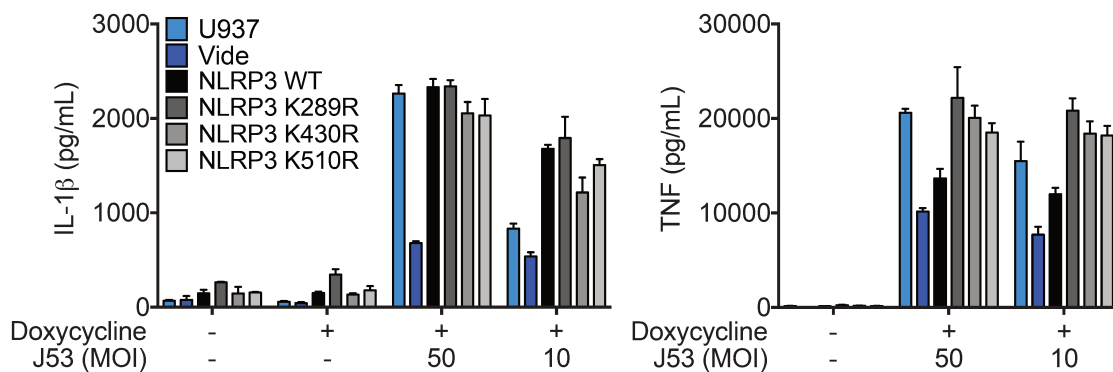


Figure 3.17 – Les cellules U937 exprimant des mutants de NLRP3 au niveau des lysines ubiquitinées sécrètent des quantités similaires d'IL-1 β après infection par J53. Les cellules ont été différenciées à la PMA (50 ng/ml, 48h), puis traitées à la doxycycline (0,2 μ g/ml, 3h) et infectées avec la souche J53 d'*E. coli* à MOI (*multiplicity of infection*) 50 ou 10 pendant 1h, puis elles ont été rincées et traitées à la gentamicine (10 μ g/ml, 16h). Les surnageants ont ensuite été analysés par test ELISA.

Infection avec *Francisella tularensis novicida* Pour terminer l'exploration phénotypique des mutants de NLRP3 aux sites où ont été localisées les modifications post-traductionnelles, une infection avec *Francisella tularensis novicida* a été réalisée. En effet, c'est par la comparaison de l'infection par U112 et Δ FPI de cellules iBMDM que les résidus lysines K295, K430, K506 et K543 de NLRP3 ont été identifiés comme étant porteurs d'une ubiquitination. Cette bactérie est responsable de l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages humains, mais pas dans les cellules murines [309], c'est pourquoi seulement les U937 ont été utilisées ici. Seuls les iBMDM *Nlrp3* KO ont été reconstitués avec NLRP3 portant des mutations sur les résidus sérines, ils n'ont donc pas été étudiés dans cette partie. De plus, *Francisella tularensis novicida* active également l'inflammasome AIM2 [310, 311]. Il a donc été nécessaire de déterminer dans quelles conditions les bactéries activent majoritairement NLRP3.

Le pré-traitement des cellules à l'IFN- γ permet d'augmenter l'expression des composants de l'inflammasome (NLRP3, ASC et pro-caspase-1) [312–314]. De plus, l'IFN- γ permet d'induire l'expression des GBP, un groupe de protéines inductibles par les interférons, et notamment de GBP5, qui permet l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse aux infections bactériennes [312]. Les GBP permettent également d'activer la caspase-11 et donc l'inflammasome non canonique [158]. Cependant, le rôle de ces

protéines dans l'activation de l'inflammasome canonique NLRP3 est controversé [158]. En outre, l'IFN- γ a aussi été décrit comme inhibiteur de l'activation de NLRP3, notamment via l'induction d'iNOS, une enzyme responsable de la formation d'oxyde nitrique NO, ce qui entraîne la S-nitrosylation de NLRP3 empêchant son oligomérisation [315]. Etant donné ces conclusions contradictoires sur le rôle de l'IFN- γ , nous avons testé des infections avec *Francisella tularensis novicida* à différentes MOI et pendant différentes durées, avec ou sans pré-traitement à l'IFN- γ . Ceci nous a permis de déterminer dans quelles conditions la différence de sécrétion d'IL-1 β est la plus marquée entre les cellules U937 WT et NLRP3 KO, ce qui indique que dans ces conditions, c'est l'inflammasome NLRP3 qui est activé majoritairement, et dans une moindre mesure l'inflammasome AIM2. Ce sont les conditions suivantes qui ont été retenues : pré-traitement à l'IFN- γ , MOI 100, 6h d'infection.

La sécrétion d'IL-1 β par les cellules exprimant les mutants NLRP3 K289R, NLRP3 K430R et NLRP3 K510R ne montre pas de différences importantes et reproductibles avec les cellules exprimant NLRP3 WT, à la fois pour l'infection avec U112 et avec Δ FPI (figure 3.18).

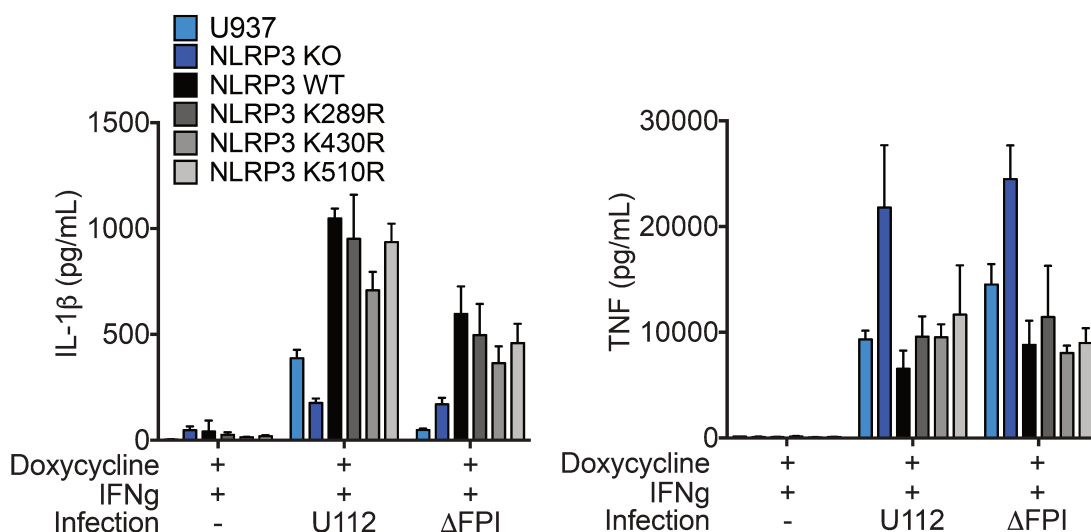


Figure 3.18 – La sécrétion d'IL-1 β par les U937 exprimant NLRP3 K289R, NLRP3 K430R ou NLRP3 K510R est similaire à celle des cellules exprimant NLRP3 WT suite à l'infection par *Francisella tularensis novicida*. Les U937 pré-traitées pendant 16h à l'IFN- γ , puis traitées à la doxycycline (0,2 μ g/ml, 24h) ont été infectées par *Francisella tularensis novicida* (souches U112 ou Δ FPI) pendant 1h à MOI 100, puis elles ont été rincées et traitées à la gentamicine (10 μ g/ml, 6h) et les surnageants ont été analysés par test ELISA.

Bilan : intégration des différents résultats

Au cours de ces expériences, aucune différence significative de sécrétion d'IL-1 β par les cellules exprimant les mutants de NLRP3 n'est ressortie par rapport aux cellules expri-

mant NLRP3 WT. Les résultats de toutes les expériences sont présentés dans les tableaux 3.1 et 3.2. Les variations observées entre les différentes expériences et les différents stimuli utilisés montrent que les lignées cellulaires ne semblent pas être un modèle adapté à l'étude de ces modifications post-traductionnelles de NLRP3.

	iBMDM			
	S157A	S157D	S685A	S685D
LPS	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND
LPS Nigéricine	-	-	+	+
	=	+	+	+
LPS ATP	-	-	+	-
	=	+	+	+
LPS Imiquimode	-	=	=	ND
	=	=	=	=
LPS HLLOMe	=	+	+	+
LPS Silice	ND	ND	ND	ND
LPS MSU	ND	ND	ND	ND
	=	+	+	+
<i>Francisella tularensis novicida</i>	X	X	X	X
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
	=	-	-	-
	+	+	-	+

Tableau 3.1 – **Résumé des résultats obtenus lors des expériences menées sur les cellules reconstituées avec NLRP3 muté sur les résidus sérines phosphorylés.** La table présente la sécrétion d'IL-1 β obtenue dans le surnageant après stimulation des cellules reconstituées avec les mutants de NLRP3 par rapport à la sécrétion d'IL-1 β obtenue suite à la stimulation des cellules reconstituées avec NLRP3 sauvage. « ND » (non détecté) désigne les expériences qui ont été faites mais qui n'ont pas permis de détecter de l'IL-1 β , « + », « = », « - » indiquent une sécrétion d'IL-1 β respectivement supérieure, égale, inférieure à celle des cellules reconstituées avec NLRP3 sauvage. « X » indique que le stimulus n'a pas été testé.

	U937			iBMDM			
	K289R	K430R	K510R	K285R	K426R	K506R	K543R
LPS	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND ND	ND ND ND	ND ND ND	ND ND ND
LPS Nigéricine	= =	- -	- =	- = +	- - -	- - =	- + +
LPS ATP	X	X	X	ND - =	ND - -	ND - =	ND + +
LPS Imiquimode	ND	ND	ND	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND
LPS HLLOMe	ND	ND	ND	ND =	ND -	ND =	ND +
LPS Silice	X	X	X	ND	ND	ND	ND
LPS MSU	X	X	X	ND	ND	ND	ND
<i>Francisella tularensis novicida</i>	- - =	- - =	- = +	X	X	X	X
<i>Escherichia coli</i>	= =	= =	- =	X	X	X	X

Tableau 3.2 – **Résumé des résultats obtenus lors des expériences menées sur les cellules reconstituées avec NLRP3 muté sur les résidus lysines ubiquitinés.** La table présente la sécrétion d'IL-1 β obtenue dans le surnageant après stimulation des cellules reconstituées avec les mutants de NLRP3 par rapport à la sécrétion d'IL-1 β obtenue suite à la stimulation des cellules reconstituées avec NLRP3 sauvage. « ND » (non détecté) désigne les expériences qui ont été faites mais qui n'ont pas permis de détecter de l'IL-1 β , « + », « = », « - » indiquent une sécrétion d'IL-1 β respectivement supérieure, égale, inférieure à celle des cellules reconstituées avec NLRP3 sauvage. « X » indique que le stimulus n'a pas été testé.

Chapitre 4

Etude de l'activation du mutant

***Nlrp3*^{K568R/K568R}**

4.1 Article en préparation

Ubiquitination of NLRP3 K568 prevents NLRP3 inflammatory activity upon priming

Marine Gros Lambert^a, Amaury Rey^a, Charlotte De Rosny^a, Séverine Chautard^a, Tingting Niu^a, Thomas Henry^a, Bénédicte Py^a

^a Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), ENS de Lyon, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, UCBL1, 69007 Lyon, France

B.P. performed the experiments presented in figure 1 A et B ; M.G. performed the other experiments. M.G. and B.P. have designed the experiments and written the paper.

We thank Drs. Steve Gigy and Ross Tomaino for mass spectrometry experiments. We also thank Suzy Markossian and Marie Teixeira for their help during the realisation of knock-in mice. Finally, we thank Isabelle Durieux for the technical help.

Abstract

NLRP3 is a cytosolic PRR that forms a multiproteic platform upon activation by PAMPs or DAMPs. This platform is essential to mediate the inflammatory response through activation of caspase-1 that controls the secretion of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and inflammatory cell death named pyroptosis that releases additional DAMPs. NLRP3-dependent inflammation is involved in various multifactorial conditions and gain-of-function mutations are associated with CAPS hereditary auto-inflammation. NLRP3 activation is physiologically tightly controlled and required two signals: a priming signal given by TLR stimulation and an activation signal given by pore forming molecules, lysosomal destabilization or mitochondrial damages. The precise molecular mechanisms by which NLRP3 is activated after these signals remain elusive. However, NLRP3 ubiquitination was shown to regulate its activation. Using mass spectrometry we show that NLRP3 is ubiquitinated on lysine K568 associated to CAPS. We show that K568 is ubiquitinated upon NLRP3 priming by TLR4 ligand LPS. Using CRISPR/Cas9 approach, we have generated *Nlrp3*^{K568R/K568R} knock-in mice impaired for the ubiquitination of NLRP3 K568 residue. Priming with LPS is sufficient to activate caspase-1 and triggers the secretion of modest but robust amounts of IL-1 β in *Nlrp3*^{K568R/K568R} primary BMDMs. This IL-1 β secretion occurs without neither ASC speck formation nor pyroptosis. Despite the lack of activation signal, this IL-1 β secretion remains dependent on potassium efflux and NLRP3 ATPase activity. Altogether, our study reveals ubiquitination of NLRP3 on K568 as a new inhibitory checkpoint after priming, blocking NLRP3 activation in the absence of further activation signals.

INTRODUCTION

Inflammation is a part of innate immune response triggered to protect the organism from infections or tissue damages. This process is activated following the sensing of PAMPs (pathogen associated molecular patterns) or DAMPs (damage associated molecular patterns) by PRRs (pattern recognition receptors) expressed by innate immune cells. This leads to the secretion of proinflammatory cytokines which allow infection clearance or tissue damages repair [1]. NLRP3 (nucleotide-binding domain leucine-rich repeat [LRR] and pyrin-containing receptor 3) is a cytosolic PRR that assembles a multiproteic platform named inflammasome upon activation. The inflammasome comprised also an adaptor protein ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain [CARD]) and an effector protein pro-caspase-1. The inflammasome assembly in the cells results in the pro-caspase-1 autoproteolytic cleavage and activation [2]. The active caspase-1 produced cleaves its substrates including pro-cytokines produced in the cytosol, pro-IL(interleukin)-1 β and pro-IL-18, and GSDMD (gasdermin-D). The generated N terminal fragment of GSDMD forms pores across the plasma membrane, allowing the release of the cleaved cytokines as well as the pro-inflammatory cell death, called pyroptosis [3–8]. Besides, IL-1 β secretion was shown to also occur independently of GSDMD, even if less efficient [9]. In line with this, pro-inflammatory cytokines can be released in absence of pyroptosis [4, 10–12].

NLRP3 inflammasome activation is a process that needs to be tightly controlled. Indeed, autosomal dominant gain of function mutation in NLRP3, almost always due to missense mutations, leads to the development of an autoinflammatory disease called cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS) [13]. Depending on the mutation of NLRP3 and other factors, this disease has diverse clinical manifestations among which the appearance of cold-induced urticaria, episodic fever, arthralgia, deafness and central nervous system impairment [14]. Moreover, inappropriate activation of NLRP3 inflammasome is also linked to the severity and the disease progression of many multifactorial diseases, including multiple sclerosis, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, cancer, type II diabetes, atherosclerosis [15–17]. The anti-IL-1 β -based therapies, successful against CAPS, are not efficient to treat the multifactorial diseases, probably because the drugs do not target IL-18 and pyroptosis [18]. Thus, the understanding of the molecular mechanisms of NLRP3 inflammasome activation would be one of the key knowledge for the discovery of new drugs preventing inflammasome activation.

NLRP3 inflammasome assembles downstream of diverse stimuli as metabolites, protein aggregates, crystals, extracellular ATP, hyaluronic acid, pore-forming bacterial toxins including nigericin, bacterial and viral nucleic acids [19–22]. This great diversity of activators excludes the possibility of their direct interaction with NLRP3 but they rather induce different signalling pathways all converging to NLRP3 activation. NLRP3 activation stages are not yet fully understood. The current model proposes a two steps process

for the canonical inflammasome activation. First, a priming signal, typically provided by LPS (lipopolysaccharide) binding to TLR4 (toll-like receptor 4) that activates the NF- κ B (nuclear factor κ B) pathway. This triggers the transcription of pro-inflammatory genes, among which *Nlrp3* itself, *pro-il-1b*, and *Tnf* (tumor necrosis factor) [23]. The priming signal has also transcription independent roles, probably relying on post-translational modifications [24–27]. However, primed NLRP3 is not active. An activation signal, provided by nigericin, extracellular ATP or crystals for instance, is required to activate NLRP3. The mechanisms of action of these activation signals are not elucidated, although potassium efflux, a common feature downstream of most of the activators of NLRP3, is thought to be central in this process [28, 29]. Several studies have shown that NLRP3 ubiquitination prevents the inflammasome assembly [27, 30].

In this study we report that NLRP3 K568 is a site of ubiquitination for NLRP3 upon priming. The impairment of this ubiquitination, by the NLRP3 K568R substitution, leads to the secretion of IL-1 β in small amounts but in a reproducible manner after priming of BMDMs (murine bone marrow derived macrophages), in the absence of pyroptosis. This secretion occurs without ASC specks formation, but still requires ASC. Moreover, it requires also the potassium efflux and the ATPase activity of NLRP3. Altogether, our study reveals a new control checkpoint of the NLRP3 pathway with NLRP3 K568 ubiquitination blocking NLRP3-dependent IL-1 β secretion following LPS priming.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Constructs Kit QuickChangeIITM (Agilent Technologies, 200524) in combination with the kit GatewayTM pENTRTM 1A Dual Selection Vector (Invitrogen, A10462) were respectively used to insert point mutations in *Nlrp3* gene and to transfer the mutated gene in pInducer21 (Addgene, 46948) vector under a doxycyclin inducible promoter, according to manufacturer's instructions.

Cells U937 cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640) supplemented with 1X penicillin/streptomycin (P/S) and 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco). Immortalized bone marrow derived macrophages (BMDMs) WT, *Nlrp3* KO and *Nlrp3* KO reconstituted with NLRP3-Flag (NG5), a kind gift from Dr. Emad Alnemri (Thomas Jefferson University, Philadelphia) [31], were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % FBS (Gibco) and 1X P/S. Human embryonic kidney (HEK) 293T Lenti-XTM (Takara, 632180) were cultured in DMEM supplemented with 10 % FBS (Gibco) and 1X P/S and transfected with both pInducer21-NLRP3, pCMVR8.74, and pMD2.G, using polyethylenimine (PEI, 2 μ M). The lentiviral-containing supernatant was used to transduce *NLRP3* knock out U937 cells (gift from Dr. Thomas Henry's lab, Centre international de recherche en infectiologie, Lyon, France) [32]. Positive cells were FACS-sorted based on GFP fluorescence. BMDMs were obtained after

flushing the bone marrow and seeding the precursors at 0.5×10^6 cells/ml in DMEM supplemented with 10 % FBS (Gibco), 10 % macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), 5 mM Hepes (Gibco) and 5 mM sodium pyruvate for 6 days. For trichloroacetic acid (TCA)-precipitation assay, the cells were cultured in Eagle's minimum essential medium (Opti-MEM, Gibco).

Generation of *Nlrp3*^{K568R/K568R} knock-in mice Guide design was made using <http://crispr.mit.edu/job/4376805238714947> website. The efficiency of the proposed guide (5' ACUUGCCGUAUUUUCUAGU 3') was tested after cloning this sequence in pSpCas9(BB)-2A-GFP (pX458, Addgene 48138) and electroporating the vector in immortalized BMDMs (transfection Neon, Invitrogen). GFP-positive cells were then FACS-sorted and cloned in 96-well plates. We then performed DNA-extraction of the cells (Nucleospin Tissue, Macherey-Nagel, 740952.50), PCR amplification of the region surrounding the putative mutated site and checked DNA cleavage by sequencing. C57Bl6/J mice (Charles River) embryos were microinjected with a solution composed of 50 ng/ μ L of Cas9 (PNABio, CP02), 25 ng/ μ L of guide RNA (mix of tracrRNA (TriLink) and crRNA (5' ACUUGCCGUAUUUUCUAGUGUUUUA-GAGCUAUGCUGUUUUG 3', Eurogentec) chemically modified with both 2'-O-methyl and 3'-phosphorothioate on residues 69-71 and 1-3 respectively) and 10 ng/ μ L of ssODN (5' GGAGGTTGTTTCAGATCTTCTGAACCGAGACGTGAAGGTCTTACTAGAAAAT-TACGGCAAGTTTGAAGAGGATATCTGATTTTTGTTGTCCGATTCCTCTTTGGCCTTGTA 3', Integrated DNA Technologies). The pups were then genotyped by specific PCRs (forward primer 5' AAGACTGACGTCTCCGCTTTC 3' and reverse primers 5' CGGACAA-CAAAAATCAGATAGCCTT 3' and 5' CGGACAACAAAATCAGATATCCTC 3') and by EcoRV (New England Biolabs, RO195S) digestion of the PCR products obtained with primers forward 5' AAGACTGACGTCTCCGCTTTC 3' and reverse 5' TTGGCCTTGGCTTTCACCTCA 3'. Chimeric mice were then backcrossed for at least 2 generations (*in vitro* experiments) or 5 generations (*in vivo* experiments) with C57Bl6/J mice (Charles River). Mice were maintained in specific pathogen-free conditions (PBES, ENS Lyon rodent facility) and used between 7-10 weeks old for the experiments. Husbandry and all studies were approved of the ethical committee (APAFIS#12355-2017102611052779 v5).

Inflammasome activation U937 were phorbol myristate acetate (PMA)-differentiated for 16h, then primed with LPS (40 ng/ml) (Sigma-Aldrich, L3024) for 3h, and activated with nigericin (20 μ g/ml) (Invivogen, tlrl-nig-5) for another 1h. BMDMs were primed for 8h with either 5 ng/ml LPS or 300 ng/ml Pam3CSK4 (Invivogen, tlrl-pms) or 2.5×10^8 bacteria/ml Heat killed *Listeria monocytogenes* (Invivogen, tlrl-hklm) or 2.25×10^8 bacteria/ml Heat killed *Staphylococcus aureus* (home prepared) or 100 ng/ml FSL-1 (Invivogen, tlrl-fsl) or 1 μ g/ml Poly(I:C) (Invivogen, tlrl-pic and tlrl-picw) or 5 μ g/ml Flagellin (Invivogen, tlrl-stfla) or 2.5 μ g/ml ssRNA40 (tlrl-lrna40) or 50 μ g/ml imiquimod

(Invivogen, tlr1-imq) or 20 μ M CpG (Invivogen, tlr1-1826). They were then activated with either 20 μ g/ml 1h nigericin or 1 mM 1h HLLoMe (Invivogen, tlr1-pms) or 20 μ g/ml 2h imiquimod or 0.2 mg/ml 16h monosodium urate MSU (Invivogen, tlr1-msu-25) or 20 μ g/ml 16h silica (home prepared). The inhibitor compounds Bay-7082 (Santa-Cruz Biotechnology; sc-200615) and CY-09 (Tocris, 5665) were added 15 min and 30 min respectively prior to LPS. Necrostatin-1 (Abcam, ab221984) was added at the same time as LPS and used at 90 mM dose.

siRNA siRNA were ordered as SmartPool (Dharmacon). BMDMs were seeded in 96-well plates using 0.1 or 0.2 x 10⁶ cells/ml and transfected with 4 pmol or 16 pmol of siRNA respectively and 0.15 μ L of Lipofectamin RNAiMAX (Invitrogen, 13778150). The media was changed after 6h and the cells were used after 48h.

Immunoprecipitation (IP) Cells were lysed using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05 % Sodium deoxycholate, 1 % Triton X-100, 0.1 % SDS, 1 M NaF, 200 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSE, protease inhibitors (cOmpleteTM, Roche, 5056489001)). NLRP3 was immunoprecipitated using either anti-Flag beads (Sigma-Aldrich, A220) or anti-NLRP3 antibody in combination with A/G beads (Thermo Fisher Scientific, 53133). The beads were then washed six times in RIPA buffer and the proteins were eluted in sample buffer (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 % Glycerol, 4 % β -mercaptoethanol, bromophenol blue).

Western blot Proteins contained in the supernatant were TCA-precipitated for 30 min and then the pellet obtained was washed twice with ice-cold acetone before elution in sample buffer. Cells were lysed in sample buffer. Samples were analyzed by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. After blocking, membranes were incubated at 4°C overnight with anti-actin (Millipore, MAB1501), anti-ASC (Santa Cruz Biotechnology, sc-22514-R), anti-caspase-1 (home made by Junying Yuan's lab, Harvard Medical School, Boston), anti-caspase-11 (Biolegend, 647201), anti-GSDMD (Abcam, ab209845), anti-IL-1 β (R&D Systems, MAB4011), anti-lamin (Santa Cruz biotechnology, sc-374015), anti-NEK7 (Abcam, ab133514), anti-NLRP3 (Adipogen, AG-20B-0014), anti-ubiquitin (Cell Signaling Technology 3933), and revealed with HRP-conjugated secondary antibodies (Promega and SouthernBiotech).

Mass spectrometry analysis NG5 and *Nlrp3* KO iBMDMs were stimulated with G5 (2.5 μ M, 2h), Flag-immunoprecipitated and analyzed by Coomassie staining. Bands containing NLRP3 and its modified forms were cut and sent for mass spectrometry analysis (collaboration with Dr. Steve Gygi, Harvard Medical School).

Propidium Iodide (PI) and YOPRO-1 incorporation assay Cells were stained with Hoechst 33342 (0.2 µg/ml, Immunochemistry technologies, 639), PI (1.25 µg/ml, Immunochemistry technologies, 638), YO-PRO-1 Iodide (491/509) (1 µM, Invitrogen, Y3603) and then analyzed with High Content Screening Yokogawa Confocal Quantitative (CQ1) for monitoring real time incorporation of the dyes.

Immunofluorescence Cells were fixed with paraformaldehyde (4 %, 20 min), quenched with glycine (0.1 M, 10 min), and permeabilized (0.1 % Triton X-100, 0.2 % Bovine serum albumin (BSA)) for 30 min. They were then stained with primary antibody (ASC at 2 µg/ml in 5 % BSA, Santa Cruz Biotechnology, sc-22514-R) for 1h and stained with Alexa Fluor 660 secondary antibody (6.7 µg/ml, Invitrogen, A21074) for 30 min. Finally, they were incubated with Hoechst 33342 (0.2 µg/ml) for 5 min. The slices were observed with AxioImager Z1 (Zeiss) and the images were analyzed with ImageJ software.

Lactate dehydrogenase (LDH) assay Cell supernatants were analyzed for LDH contents with the Cytotoxicity Detection kit^{PLUS} (Roche, 04744926001) according to the manufacturer's instructions.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Cell supernatants were analyzed for IL-1β (R&D Systems, DY401), IL-1α (R&D Systems, DY400-05) and TNF (R&D Systems, DY410) contents according to the manufacturer's instructions.

RESULTS

NLRP3 is ubiquitinated on lysine K568

In order to identify NLRP3 ubiquitination sites, we analyzed by mass spectrometry purified ubiquitinated NLRP3. Immortalized murine *Nlrp3* KO BMDMs reconstituted by retroviral transduction to express NLRP3-Flag (NG5 clone) [27] were treated with G5 deubiquitinases inhibitor to increase NLRP3 ubiquitination level [30], and NLRP3-Flag was immunoprecipitated (IP). Western blot (WB) analysis of a small fraction of the immunoprecipitates confirmed that G5 treatment increases NLRP3 ubiquitination observable as a high molecular weight smear (figure 1 A). The immunoprecipitates were then separated by SDS-PAGE and stained by coomassie, and the gel cube corresponding to ubiquitinated NLRP3 smear was analyzed by mass spectrometry (Drs. S. Gygi and R. Tomaino, Taplin facility, Harvard Medical School, Boston, MA) (figure 1 B). This analysis identified lysine K568 (corresponding to K570 in human) as ubiquitinated. K568 is located in a domain referred as NAD, between the NACHT and the leucine rich repeat (LRR) domains in NLRP3 sequence, and is highly conserved among Mammalian species (figure 1 C). Notably, K570N substitution has been identified in a cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) patient [33]. Although this K570N substitution is somatic and only 9,4 %

of the leukocytes bear the mutation, this patient suffers neonatal onset multisystem inflammatory disease (NOMID), the most severe form of CAPS, suggesting a critical role of this lysine in NLRP3 function.

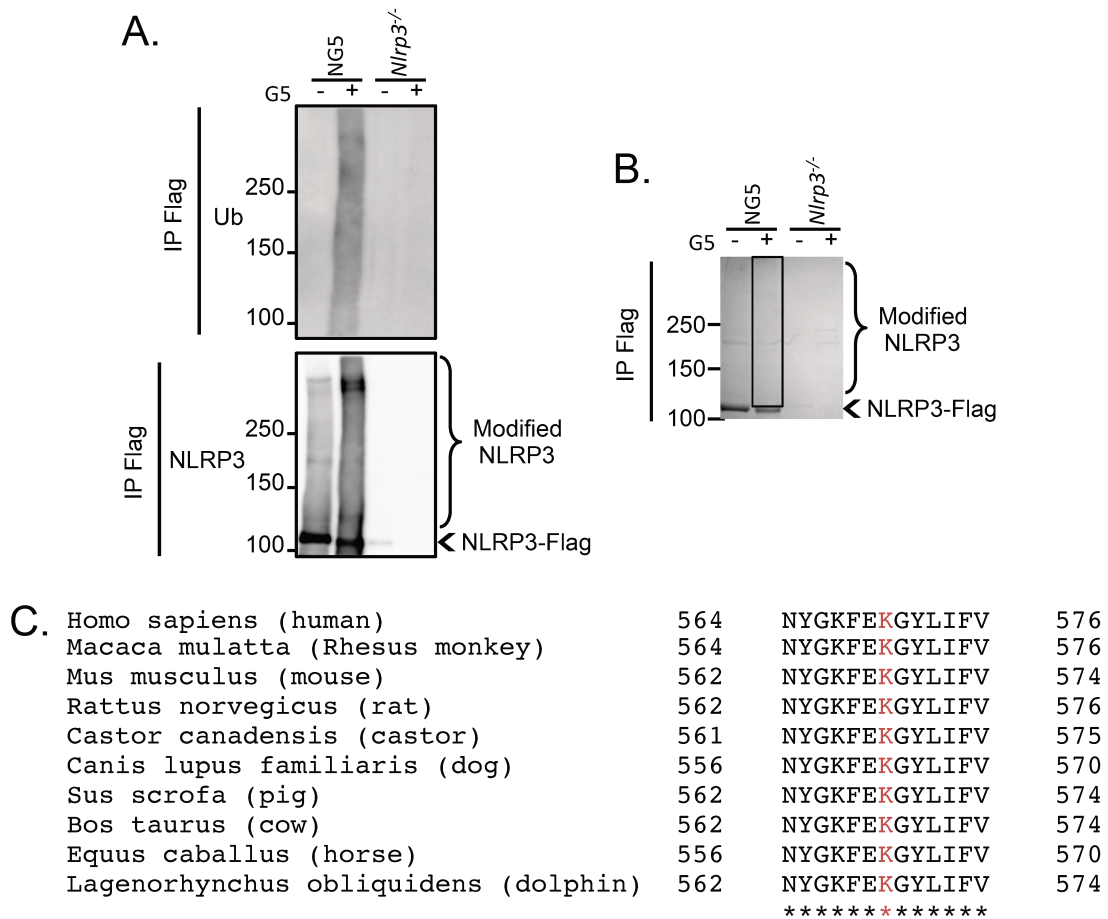


Figure 1: Identification of NLRP3 K570 as an ubiquitination site. A. and B. Murine immortalized BMDMs from *Nlrp3*^{-/-} mice reconstituted to express NLRP3-Flag (NG5) were treated with G5 (2.5 μ M, 2h) and anti-Flag IP were analyzed by WB for NLRP3 and Ub to check NLRP3-Flag IP and ubiquitination (A), and Coomassie staining followed by LC-MS/MS mass spectrometry analysis of the indicated gel cube (black rectangle) to identify ubiquitinated peptides (B). C. ClustalW alignment of NLRP3 orthologs surrounding the K568 site of ubiquitination, highlighted in red. "*" indicates fully conserved residues.

In order to study the impact of NLRP3 K570 ubiquitination, this lysine was substituted by an arginine, sharing close structure and chemical properties with the lysine but improper to ubiquitination. Thus, NLRP3 K570R mimics NLRP3 constitutively deubiquitinated on K568. We reconstituted a human monocytic cell line U937 invalidated for *NLRP3* by CRISPR/Cas9 [32] with lentiviral vectors pInducer21-hNLRP3 WT, K570R mutant coding for doxycycline-inducible *NLRP3* forms. NLRP3 K570N and D305N mutations identified in CAPS patients were included as controls. In this reconstitution system, all NLRP3 forms are expressed at similar level than endogenous NLRP3 in LPS-treated U937 (supplemental figure S1 A). As expected, LPS treatment was sufficient to induce IL-1 β secretion in PMA-differentiated U937 expressing *NLRP3* K570N and D305N CAPS mutations (sup-

plemental figure S1 B) [34]. As opposite, U937 reconstituted with *NLRP3* K570R secrete IL-1 β only after coordinated priming with LPS and activation with nigericin, similarly to cells expressing WT. LPS-dependent TNF secretion was similar in all the U937 lines (supplemental figure S1 B), indicating no defect in NF- κ B pathway in those cells. Altogether, our results indicate that K570 is a site of ubiquitination in NLRP3. The K570N polymorphism is associated with CAPS. However, substitution of K570 to N leads to a stronger gain of function than the substitution to R blocking ubiquitination and therefore absence of ubiquitination on K570 is not responsible for the entire the gain of function of the CAPS associated K570N.

***Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs secrete IL-1 β and activate caspase-1 in response to LPS priming.**

To circumvent loss of fine-tuned regulation pathways and derivation issues inherent to cell lines, we next generated C57BL6/J *Nlrp3* knock-in mice expressing the NLRP3 K568R allele by CRISPR/Cas9 technology. Three base substitutions were inserted in the genome of the mice (numbered according to the NCBI *Nlrp3* genomic reference): a1703g codes for the missense mutation K568R, the silent mutation c1675t invalidates the PAM site targeted by the crRNA and avoids several rounds of DNA breaks and the silent mutation c1707a adds an EcoRV restriction site used for genotyping (supplemental figure S2 A). ssODN, crRNA and tracrRNA were in parallel microinjected and electroporated in zygotes for protocol set up in our facility (supplemental figure S2 B). Mice genotyping was realized by two methods in order to avoid errors. First, a specific PCR using oligos that specifically anneal with the WT or a1703g mutated (KI) locus. Second, PCR amplification of the region surrounding the mutation site followed by EcoRV digestion (supplemental figure S2 C). In addition, PCR amplification products of the latter PCR were sequenced by Sanger after Topo cloning for the positive F0 chimeric mice and F1 mice to exclude additional mutations. The chimeric mutant mice obtained were then backcrossed with C57BL6/J mice for five generations in order to suppress any off-target mutations on other gene and cDNA of *Nlrp3* was fully sequenced to exclude additional mutations in the gene of interest (supplemental figure S2 A). Heterozygous *Nlrp3*^{+/K568R} are viable and fertile. The mutated allele spread through generations following a Mendelian transmission, suggesting no associated lethality (supplemental figure S2 D). Finally, NLRP3 K568R mice do not display any spontaneous inflammatory phenotype (data not shown).

We then used primary BMDMs from these mice to investigate the impact of NLRP3 K568R mutation. In BMDMs, NLRP3 K568R is expressed at same basal level as NLRP3 WT and induced similarly by LPS when detected by WB (supplemental figure S2 E). Low doses of LPS (1-10 ng/ml) were sufficient to trigger modest but robust and reproducible secretion of IL-1 β in *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs, but not in WT BMDMs in which secretion of IL-1 β depends on an additional activation signal as expected (figure 2 A). LPS-induced TNF

secretion were indistinguishable in *Nlrp3*^{K568R/K568R} and WT BMDMs, excluding a defect in the regulation of the NF- κ B pathway (figure 2 A). While, LPS-induced IL-1 β secretion by *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs was detectable by ELISA as early as 6h post treatment (data not shown), levels of IL-1 β in the cell media increased during the 24h and stabilized up to 48h of LPS treatment (figure 2 B). Heterozygous *Nlrp3*^{+/K568R} BMDMs showed an intermediate phenotype, confirming that K568R is a gain-of-function mutation. 17 kDa mature IL-1 β was detected by WB in the supernatant of LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs, while 33 kDa pro-IL-1 β was induced similarly in *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs as compared to WT (figure 2 C). In addition, cleaved caspase-1 was detected in lysates of LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs, and in a lesser amount in *Nlrp3*^{+/K568R} BMDMs but not in WT BMDMs (figure 2 D). Altogether, these results show that LPS-mediated priming of NLRP3 K568R is sufficient to activate caspase-1 and trigger mature IL-1 β secretion.

***Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs do not undergo pyroptosis nor plasma membrane permeabilization in response to LPS**

We then tested if *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs treated with LPS underwent pyroptosis while secreting IL-1 β . Similarly to WT BMDMs, *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs did not release LDH upon priming with LPS for 8h or even 24h, but required additional activation with nigericin (figure 3 A, and supplemental figure S3). As several studies recently reported IL-1 β secretion upon plasma membrane permeabilization but without pyroptosis, we next measured propidium iodide and Yopro dies uptake [4, 10–12]. Surprisingly, LPS priming do not cause plasma membrane permeabilization in *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs, similarly as in WT BMDMs (figure 3 B). As a positive control, further addition of nigericin led to the permeabilization of more than 60 % of the cells (figure 3 C). Altogether, these results indicate that LPS does not trigger neither pyroptosis nor plasma membrane permeabilization in *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs. Surprisingly, the alarmin IL-1 α was released by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs, questioning the current dogma that alarmins are released passively following cell membrane permeabilization (figure 3 D).

Secretion of IL-1 β by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs requires inflammasome components, but occurs in the absence of speck formation

As expected, LPS-induced IL-1 β secretion in *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs was totally impaired by the knock-down (KD) of *Nlrp3* expression with siRNA (figure 4 A). Consistent with the coordinated release of mature IL-1 β and cleavage of caspase-1 in *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs (figure 2), secretion of IL-1 β was significantly reduced by *caspase-1* KD, indicating that IL-1 β release depended on caspase-1 activation (figure 4 A). Residual IL-1 β release in the LPS-treated *caspase-1* KD *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs may be caused by incomplete KD efficiency (supplemental figure S4). As controls, both *Nlrp3* and *caspase-1* expression KD has no impact on inflammasome independent LPS-induced

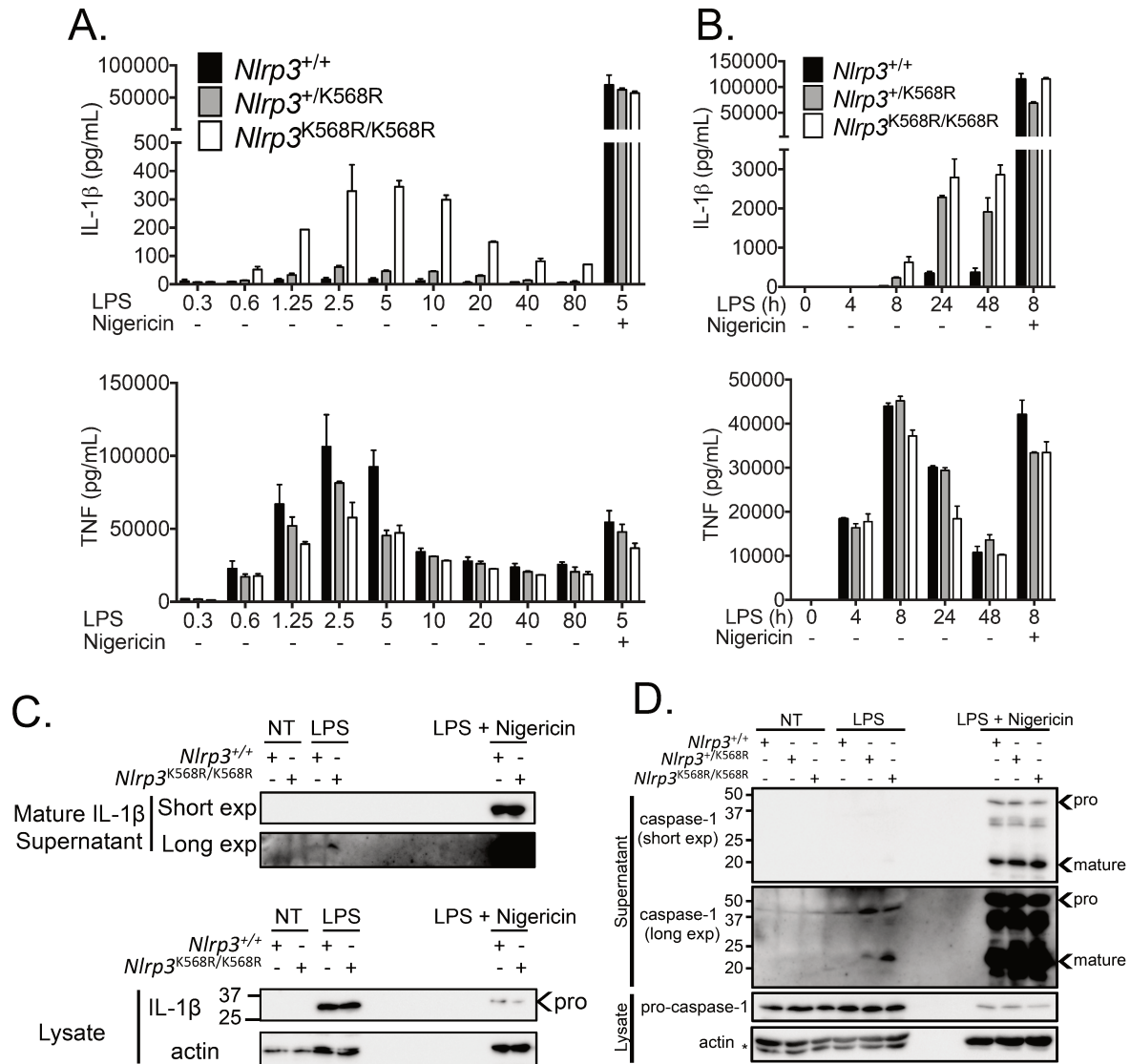


Figure 2: *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs secrete IL-1 β in response to LPS priming through caspase-1 activation. A. *Nlrp3*^{+/+} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs were primed with LPS (as indicated in ng/ml, 8h) and treated with nigericin (20 μ g/ml, 1h). Cell-free supernatants were then collected and IL-1 β and TNF secretion were analyzed by ELISA. This experiment is representative of two independent experiments. B. *Nlrp3*^{+/+} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs were primed with LPS (5 ng/ml for the indicated time) and treated with nigericin (20 μ g/ml, 1h). Cell-free supernatants were then collected and, IL-1 β and TNF secretion were analyzed by ELISA. This experiment is representative of two independent experiments. Error bars represent 1 SD from the mean. C. and D. *Nlrp3*^{+/+}, *Nlrp3*^{+/K568R} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs were treated with LPS (5 ng/ml, 8h), and then with nigericin (20 μ g/ml, 1h). Cell lysates and TCA-concentrated supernatants were analyzed by WB for IL-1 β (C) and caspase-1 (D) (5 to 10 times more samples loaded for untreated and LPS only treated compared to LPS and nigericin treatments). Anti-actin WB is used as loading control. Upper arrows indicate the pro-form of the proteins (pro-caspase-1) and lower arrows indicate the cleaved forms (caspase-1). The star indicates an unspecific band. Pro: proforms pro-IL-1 β and pro-caspase-1; mature: mature forms of caspase-1 p20; exp: exposure.

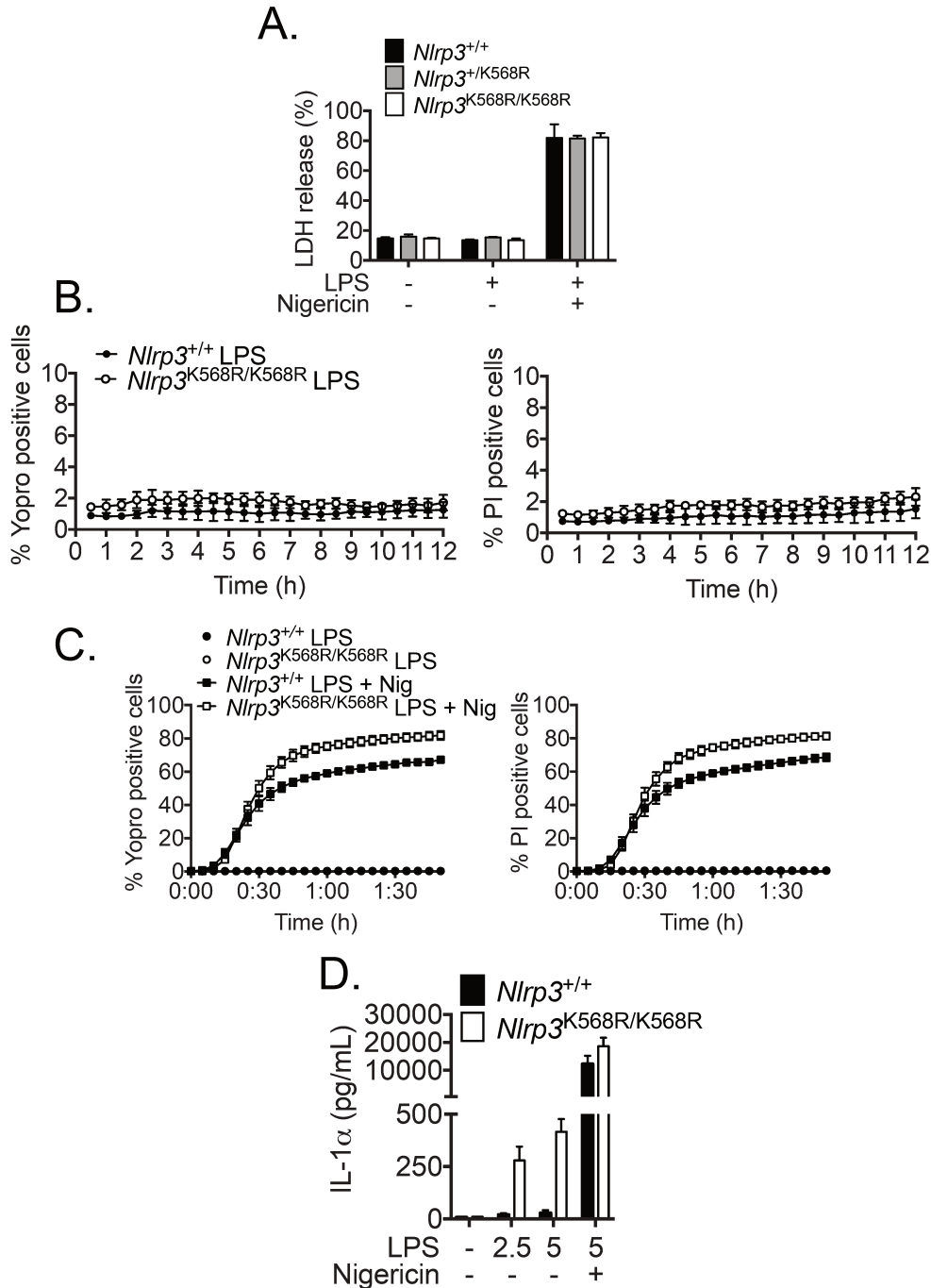


Figure 3: *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs do not undergo pyroptosis after LPS stimulation. A. *Nlrp3*^{+/+} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs were treated with LPS (5 ng/ml, 8h), followed by nigericin (20 μ g/ml, 1h). Cell-free supernatants were then analyzed for LDH content. This experiment is representative of two independent experiments. B. *Nlrp3*^{+/+} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs were pre-treated with Yopro-1 and propidium iodide (PI) (1h) before being treated with LPS (5 ng/ml). Dyes incorporation was monitored by microscopy (times are indicated following LPS treatment). This experiment is representative of four independent experiments. C. *Nlrp3*^{+/+} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs were pre-treated with Yopro-1 and propidium iodide (PI) (1h) and then treated with LPS (5 ng/ml, 4h) and nigericin (Nig, 20 μ g/ml). Dyes incorporation was monitored by microscopy (times are indicated following nigericin treatment). D. *Nlrp3*^{+/+} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs were treated with LPS (5 ng/ml, 8h) and nigericin (20 μ g/ml, 1h) and IL-1 α release in the supernatant was determined by ELISA. This experiment is representative of two independent experiments. Error bars represent 1 SD from the mean.

TNF secretion, but inhibited inflammasome-dependent IL-1 β release in BMDMs treated with LPS and nigericin (figure 4 A). We next investigated whether secretion of IL-1 β by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs was dependent on the known components of the NLRP3 inflammasome. Indeed, KD of the expression of the adaptor *Asc* or *Nek7* lead to a significant decrease in IL-1 β secretion by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs (figure 4 A). As controls, both *Asc* and *Nek7* expression KD has no impact on inflammasome independent LPS-induced TNF secretion, but inhibited inflammasome-dependent IL-1 β release in BMDMs treated with LPS and nigericin (figure 4 A), and siRNA efficiency was assessed by WB (supplemental figure S4). As expected, KD of the expression of *caspase-11* did not inhibit IL-1 β secretion by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs (figure 4 A). Altogether, these results supported that IL-1 β secretion by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs relies on the NLRP3 inflammasome components, independently of LPS sensing by the caspase-11 within the non-canonical inflammasome. NLRP3 inflammasome activation usually leads to ASC multimerization in specks visible by microscopy [35]. Unexpectedly, no ASC speck could be observed in *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs treated with LPS for 8h or 24h, while as controls LPS and nigericin induced robust formation of specks in both WT and *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs (figure 4 B). Therefore, although IL-1 β secretion by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs depends on the NLRP3 inflammasome components, it occurs in the absence of ASC specks.

Secretion of IL-1 β by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs is probably independent of RIPK1/FADD/caspase-8 signaling, but depends on RIPK3

LPS-triggered NLRP3-dependent secretion of IL-1 β by live cells without ASC speck formation was reminiscent of the alternative NLRP3 inflammasome pathway described in human monocytes [36]. We therefore tested whether, similarly to the alternative pathway, IL-1 β secretion by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs depended on the RIPK1/FADD/caspase-8 signaling axis. KD of *caspase-8* expression increased IL-1 β release by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs and WT BMDMs (figure 5 A). Because LPS-triggered TNF induces necroptosis in BMDMs in the absence of protective *caspase-8* expression [37], we hypothesized that this increase was a consequence of the cell membrane permeabilization acting as an activation signal for NLRP3. Indeed, *caspase-8* KD had no impact in the presence of the RIPK1 inhibitor Nec-1 (Necrostatin-1) blocking necroptosis (figure 5 B). Therefore, our results do not support a role for caspase-8 in the signaling of IL-1 β release by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs, but these results should be interpreted with caution as the efficiency of *caspase-8* KD may be incomplete. We then tested the impact of *Ripk1* and *Fadd* expression. Our preliminary results showed that *Ripk1* and *Fadd* KD increased IL-1 β release by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} and WT BMDMs (figure 5 C). Although the effect of *Fadd* KD could be interpreted by the induction of necroptosis and additional controls in the presence of Nec-1 should be performed,

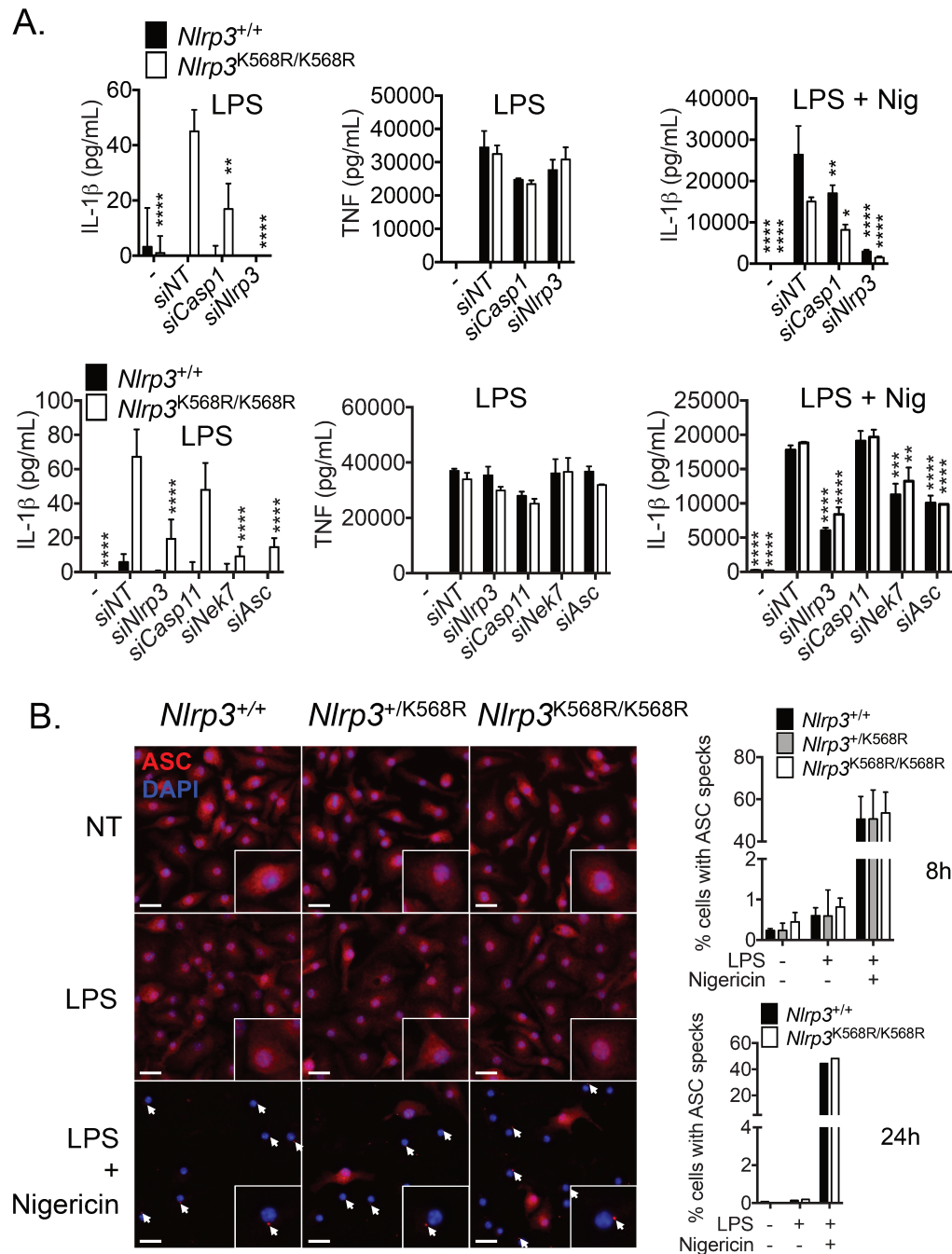


Figure 4: **Secretion of IL-1 β by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs requires inflammasome components but occurs in the absence of speck formation.** A. *Nlrp3*^{+/+} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs were transfected with siRNAs targeting *Nlrp3*, *Asc*, *Nek7*, *Casp11* or *Casp1* or non targeting siRNAs (*siNT*). 48h later, cells were treated with LPS (5 ng/ml, 8h) and nigericin (Nig, as indicated). Cell-free supernatants were collected and analyzed by ELISA. Statistical analysis was performed for graphs showing IL-1 β secretion with a two-way ANOVA comparing KD of the indicated genes with *siNT*. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.005$; ***: $p < 0.0002$; ****: $p < 0.0001$. This experiment is representative of three independent experiments. B. *Nlrp3*^{+/+}, *Nlrp3*^{+/K568R} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs were primed with LPS (10 ng/ml, 8h in the left and upper right panels or 5 ng/ml, 24h in the right bottom panel) and stimulated with nigericin (20 μ g/ml, 1h). ASC was revealed using anti-ASC antibody (red) and nuclei were then stained with DAPI (blue). Arrows indicate ASC specks. Scale bars represent 10 nm. Percentage of cells with ASC specks at 8h and 24h as quantified based on 1,000 cells in 10 fields per conditions. Error bars represent 1 SD from the mean. This experiment is representative of three independent experiments.

the effect of *Ripk1* KD excluded the requirement of the same RIPK1/FADD/caspase-8 signaling axis as described in the alternative inflammasome pathway in human monocytes [36]. Finally, we tested the effect of related RIPK3. *Ripk3* KD strongly impaired IL-1 β release by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} (figure 5 D). RIPK3 is critical in necroptosis signaling. However, we could exclude a role of necroptosis in IL-1 β release by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDM because cells are not permeabilized in these conditions (figure 3), IL-1 β release is not inhibited by Nec-1 (figure 5 B), and finally KD of the expression of *Mkl1* that forms the necroptosis-associated pores had no impact on IL-1 β release by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDM (figure 5 E). Therefore, we concluded that RIPK3 controlled IL-1 β release by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} by a pathway that remained to be established.

Secretion of IL-1 β by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs requires cytosolic K⁺ efflux

Potassium efflux from the cytosol is a common trigger for NLRP3 inflammasome activation by a wide range of activators including membrane permeabilizers such as nigericin, and particulate matters [28, 29]. No impact has been described upon LPS priming and the LPS-induced alternative inflammasome pathway in monocytes is independent of K⁺ efflux [36]. Unexpectedly, IL-1 β secretion by *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs treated with LPS was blocked by increased extracellular K⁺ used to prevent K⁺ efflux (figure 6 A). As controls, LPS-triggered TNF secretion was not impacted by increased extracellular K⁺, while secretion of IL-1 β by LPS priming followed by activation with nigericin was abolished (figure 6 A). Noteworthy, higher concentration of extracellular K⁺ are required to inhibit IL-1 β by LPS priming followed by activation with nigericin in *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs as compared to WT BMDMs.

Secretion of IL-1 β by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs requires NLRP3 ATPase activity

NLRP3 ATPase activity is critical for NLRP3 inflammasome assembly in BMDMs primed with LPS and activated by second signals [38]. Bay11-7082 and CY-09 NLRP3 ATPase activity inhibitors [39, 40] both reduced specifically the release of IL-1 β but not TNF by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs, suggesting that NLRP3 ATPase activity was required for the activation of NLRP3 K568R by LPS (figure 6 B and C).

Secretion of IL-1 β by *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs is restricted to priming with LPS (and maybe flagellin) and requires IRAK4

In addition to the classically used LPS, NLRP3 can be primed in BMDMs by a number of agonists of PRRs including TLRs, RAGE, NOD2 agonists, as well as by cytokines TNF, IL-1 and proteins of the complement system C3a and C5a [23, 41–47]. In our settings,

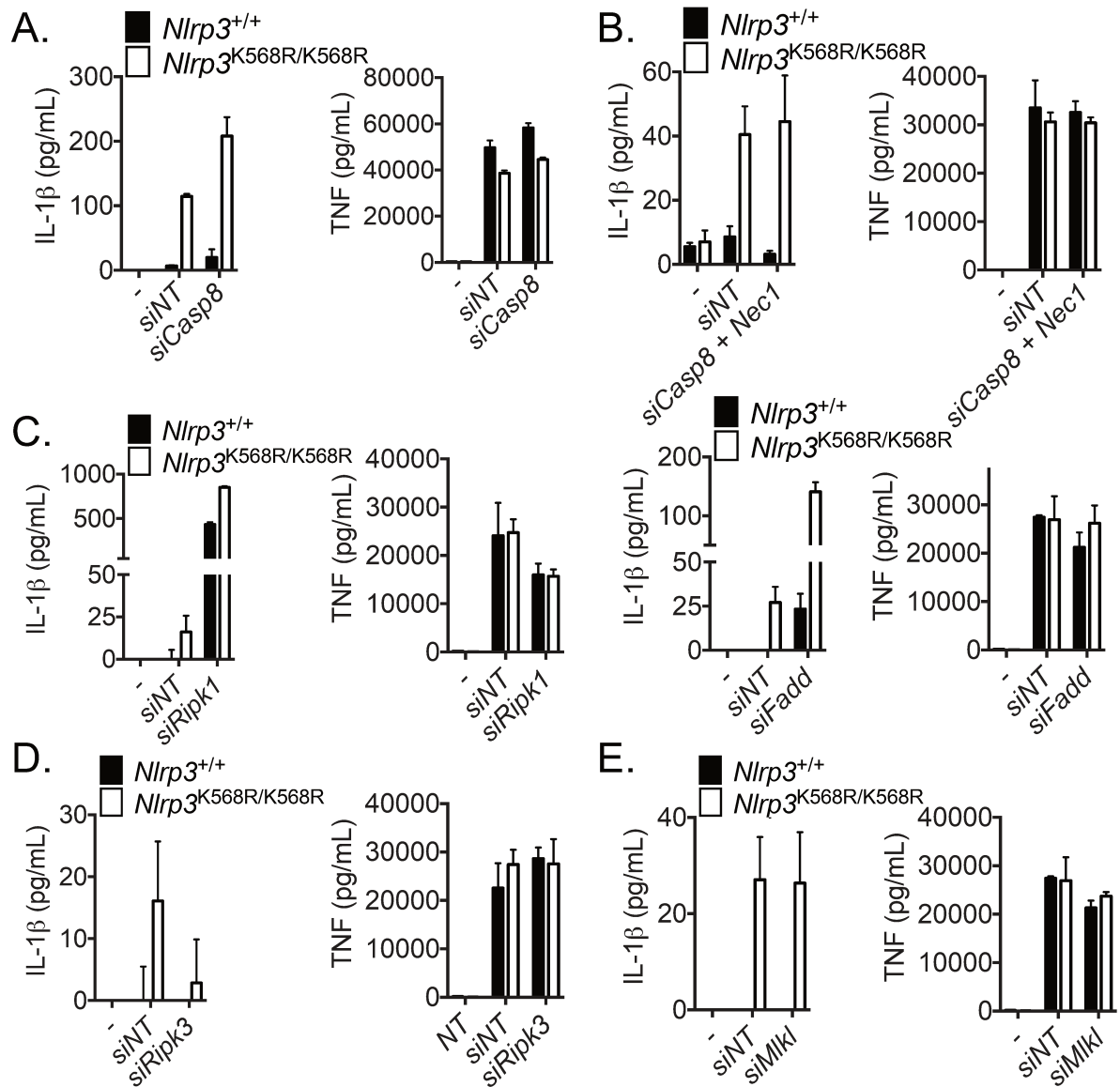


Figure 5: Secretion of IL-1 β by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs is probably independent of RIPK1/ FADD/Casp8 signaling, but depends on RIPK3. *Nlrp3*^{+/+} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs were transfected with siRNAs targeting *Casp8* (A and B), *Ripk1* (C), *Fadd* (C), *Ripk3* (D), *Mlkl* (E) or non targeting siRNAs (*siNT*). 48h later, cells were treated with LPS (5 ng/ml, 8h) (A, C, D, E) or with necrostatin-1 (Nec1, 90mM, 8h) and LPS (5 ng/ml, 8h) (B). Cell-free supernatants were collected and analyzed by ELISA. Error bars represent 1 SD from the mean.

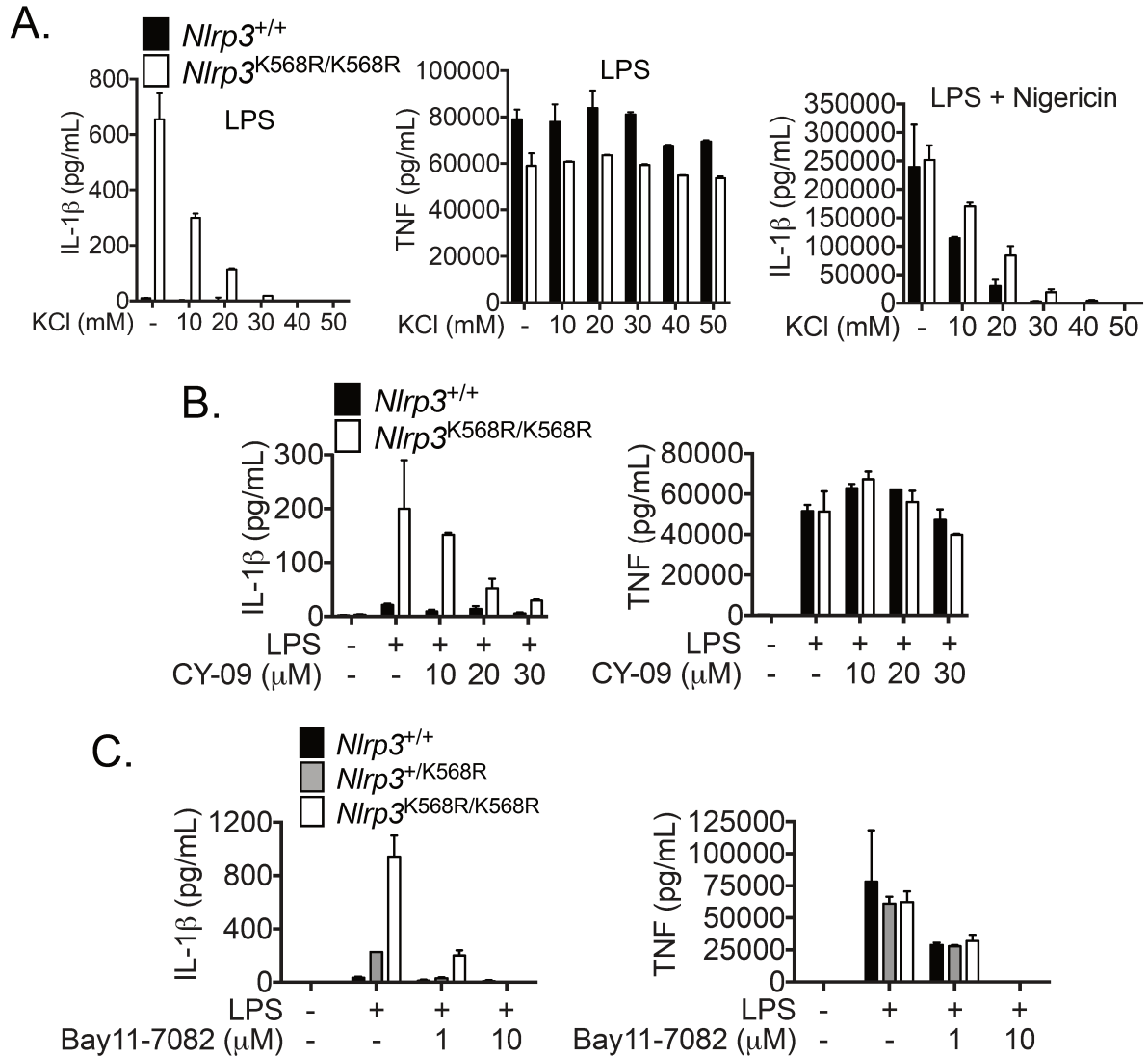


Figure 6: Secretion of IL-1 β by LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs requires K⁺ cytosolic efflux and NLRP3 ATPase activity. A. *Nlrp3*^{+/+} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs media was supplemented with KCl (amounts indicated on the graphs) and the cells were then primed with LPS (5 ng/ml, 8h) and activated with nigericin (20 μ g/ml, 1h). Cell-free supernatants were collected and analyzed by ELISA. This experiment is representative of two independent experiments. B. and C. *Nlrp3*^{+/+} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs were treated as indicated with CY-09 (8h) (B) or Bay-11-7082 (8h) (C), amounts indicated on the graphs and were primed with LPS (5 ng/ml, 8h). Cell-free supernatant were collected and analyzed by ELISA. These experiments are representative of two independent experiments. Error bars represent 1 SD from the mean.

treatments with LPS (TLR4 agonist), heat killed *Staphylococcus aureus* (TLR2 agonist), imiquimod (TLR7/8 agonist), flagellin (TLR5 agonist), Pam3CSK4 (TRL1/2 agonist) and heat killed *Listeria monocytogenes* (TLR2 agonist) induced *pro-il-1b* expression in BMDMs, but not Poly(I:C) (TLR3 agonist), FSL-1 (TLR2/6 agonist), ssRNA40 (TLR7 agonist), PMA (PKC activator) (figure 7 A). Among those which induced *pro-il-1b*, all of them primed NLRP3 inflammasome in BMDMs that secreted mature IL-1 β if treated with nigericin as the activation signal (supplemental figure S5 A). On the opposite, only LPS and flagellin triggered IL-1 β release from *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs after 8h and 24h (figure 7 A, and data not shown). However, results obtained with flagellin need to be interpreted with caution as it could result from flagellin contamination with LPS. Additional experiments using [*Nlrp3*^{K568R/K568R}; *Tlr4*^{-/-}] BMDMs will be performed to test the specificity.

We then investigated the signaling pathway downstream of LPS that controlled the secretion of IL-1 β by *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs. As expected, *Tlr4* KD reduced IL-1 β release from LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs (figure 7 B). However, TLR4 is required for the induction of NF- κ B-dependent transcription as monitored by TNF secretion (figure 7 B), including pro-IL-1 β . Thus, this experience could not be conclusive on the role of TLR4 in NLRP3 K568R activation by LPS. Further experiments will be conducted using secretion substrates constitutively expressed including IL-1 α and IL-18. As TLR4 signals through both the MyD88 and TRIF adaptors, we then tested their implication. KD of either *Myd88* or *Trif* partially reduced IL-1 β release from LPS-treated *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs (figure 7 C). However, both contributed to NF- κ B activation downstream of LPS, as monitored by LPS-induced TNF secretion and IL-1 β release in BMDMs treated with LPS and nigericin as an activation signal (figure 7 C), as described [27]. Therefore their separated KD most likely partially reduced pro-IL-1 β synthesis in these settings. Since siRNA-mediated KD efficiency is incomplete, these results could not discriminate if partial inhibition of IL-1 β released was caused by incomplete KD or contribution of both MyD88 and TRIF to NLRP3 K568R activation. Additional experiments using [*Nlrp3*^{K568R/K568R}; *Myd88*^{-/-}] and [*Nlrp3*^{K568R/K568R}; *Trif*^{-/-}] BMDMs will be shortly performed to address this point.

Second, IRAK1 and IRAK4 are proteins downstream of MyD88 and TRIF pathways and were shown to be required during the priming phase of inflammasome activation [25, 26]. Moreover, a recent study has shown a negative role for IRAK1 in inflammasome activation [48]. Thus, the roles of IRAK1 during inflammasome activation are not yet fully understood and still controversial. KD of *Irak4* lead to a decrease in IL-1 β secretion following LPS treatment of *Nlrp3*^{K568R/K568R} cells, involving this protein in the signaling events required for the NLRP3 K568R activation (figure 7 D). Moreover, KD of *Irak1* lead to a slight increase in IL-1 β secretion (figure 7 D), in line with the study of Humphries et al. However, 24h of LPS stimulation of the *Irak1* and *Irak4* knockdowned cells did not reveal any IL-1 β secretion impairment, probably meaning that different pathways are activated at those late time points and could be redundant (supplemental figure S5 B). Finally, LPS and nigericin treatments of the cells showed that *Irak4* KD, but not *Irak1*, impaired IL-1 β

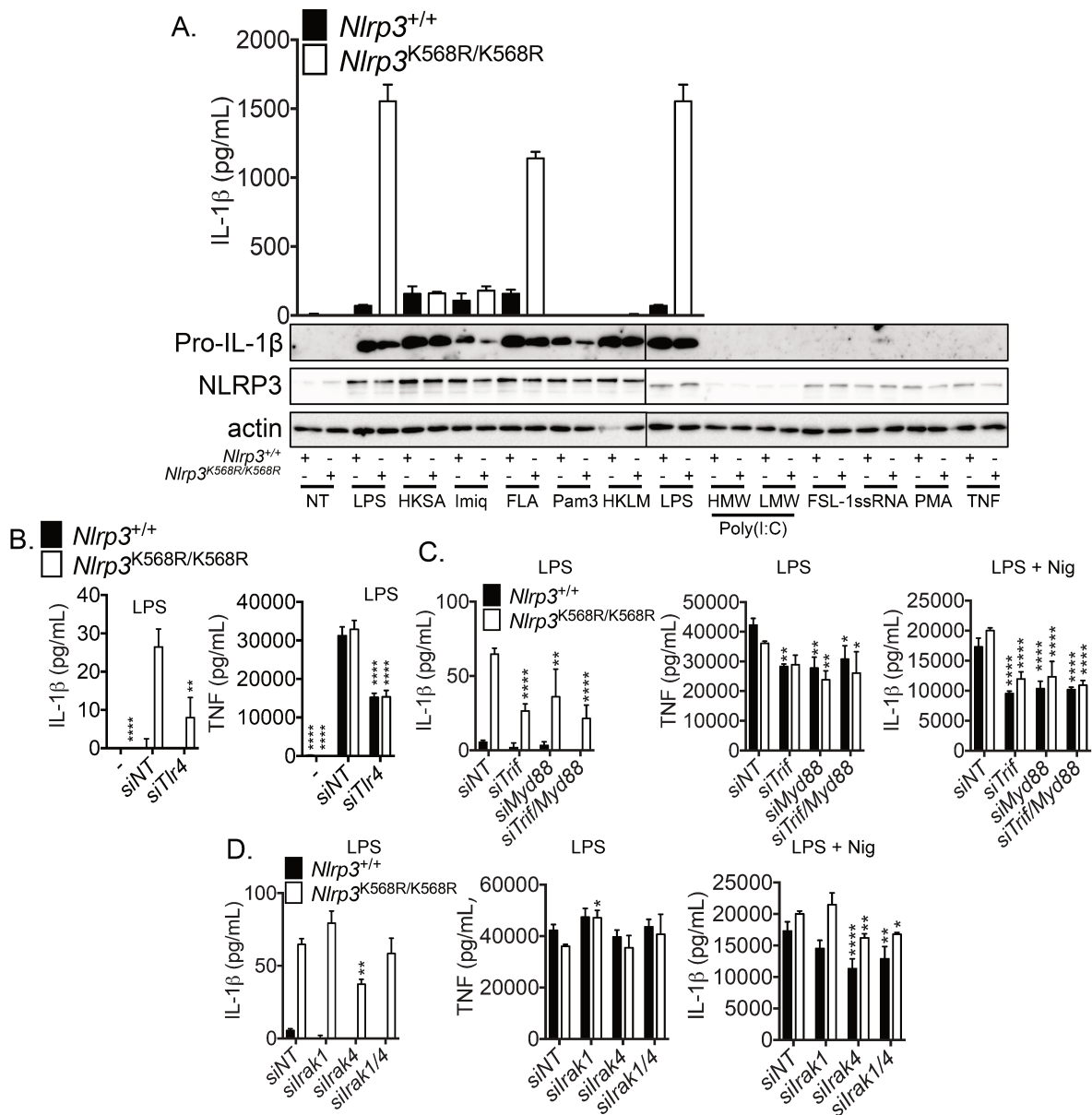


Figure 7: Secretion of IL-1 β by *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs is restricted to LPS and flagellin priming and requires IRAK4. A. *Nlrp3*^{+/+} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs were primed for 8h with different TLRs agonists: LPS, Heat killed *Staphylococcus aureus* (HKSA), Imiquimod (Imiq), Flagellin (FLA), Pam3CSK4 (Pam3), Heat killed *Listeria monocytogenes* (HKLM), Poly(I:C) (HMW, high molecular weight or LMW, low molecular weight), the synthetic lipopeptide Pam2CGDPKHPKSF (FSL-1), ss RNA40/LyoVec (ssRNA), PMA or TNE Cells were then lysed and analyzed by WB. Cell-free supernatants were collected and analyzed by ELISA. This experiment is representative of two independent experiments. Anti-actin WB is used as a loading control. B, C and D. *Nlrp3*^{+/+} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs were transfected with siRNAs targeting *Tlr4*, *Trif*, *Myd88*, *Irak1*, *Irak4* or non targeting siRNAs (*siNT*). 48h later, cells were treated with LPS (5 ng/ml, 8h) and nigericin (Nig, 20 μ g/ml, 1h). Cell-free supernatants were collected and analyzed by ELISA. Two-way ANOVA were performed to compare KD of indicated genes to *siNT*. *: p<0.05; **: p<0.005; ***: p<0.0002; ****: p<0.0001. This experiment is representative of three independent experiments.

secretion in *Nlrp3*^{+/+} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs (figure 7 D). Altogether, these preliminary results indicate that TRIF and IRAK4 are required for IL-1 β secretion mediated by LPS treatment of NLRP3 K568R. However, MyD88 and IRAK1 are less important, with IRAK1 showing a slight inhibitory effect.

NLRP3 K568 is a site of ubiquitination following priming signal

Several studies have highlighted the requirement of NLRP3 deubiquitination for its activation [27, 30]. More precisely, couples of studies have shown that NLRP3 is ubiquitinated in response to priming, and then deubiquitinated in response to activation signal [48, 49]. However, these findings are still controversial [27, 50]. Both NLRP3 NACHT and LRR domains are ubiquitinated [30], meaning that there are several ubiquitination sites on NLRP3. Thus, we wanted to better understand the roles played by ubiquitination in NLRP3 activation and to link NLRP3 K568R atypical activation with K568 deubiquitination. First, we noticed that LPS treatment leads to an increase in the ubiquitination level of NLRP3 WT and K568R (figure 8 A). However, the increase observed is much more important in NLRP3 WT compared to NLRP3 K568R, confirming that K568 is indeed a site of ubiquitination (figure 8 A). Moreover, these results indicate that this site is probably polyubiquitinated. Finally, because the level of NLRP3 ubiquitination was low and similar in untreated condition and because NLRP3 K568R is not active at steady state, we hypothesized that NLRP3 K568 is not a site of ubiquitination important for keeping the unprimed NLRP3 inactive. These results indicate that NLRP3 K568 ubiquitination could be a mechanism triggered after LPS treatment in WT BMDMs to prevent an uncontrolled activation of the inflammasome in absence of all required signals. However, due to the levels of IL-1 β secreted by the primed mutant cells, this modification is not the only mechanism keeping NLRP3 primed inactive.

We then wondered which ubiquitin ligase is involved in NLRP3 K568 ubiquitination. First, we screened several ubiquitin ligases, known to be involved in inflammasome activation, for their ability to prevent IL-1 β secretion following LPS stimulation. Most of them, including TRIM31 [48, 49], FBXL2 [51], ARIH2 [52], MARCH7 [53] and CBL-B [54], were identified to directly ubiquitinate NLRP3. However, for the others, A20 [55, 56] and Pellino2 [48], the link with NLRP3 inflammasome activity was established, but no direct NLRP3 ubiquitination was found. We have first knockdowned these proteins one by one in *Nlrp3*^{+/+} BMDMs and followed IL-1 β secretion after LPS priming. *Tnfrsf10* (gene coding for A20) knockout was already known to lead to IL-1 β secretion following LPS stimulation [55], and *siTnfrsf10* confirmed this result (figure 8 B). However, none of the other KD has triggered IL-1 β secretion (figure 8 B), rejecting the hypothesis of the involvement of these different ubiquitin ligases in K568 ubiquitination. Finally, because the phenotype described after A20 knockdown was similar to the phenotype observed after mutating K568 in NLRP3, we wanted to test *in vitro* the ubiquitination of NLRP3 K568 by this ubiq-

ubiquitin ligase. Plasmids containing NLRP3, WT or mutated on K568, were transfected into 293 cells, in combination or not with a plasmid coding for A20-Myc. As a positive control, a plasmid coding for RIPK1-Flag, a known target of A20, was also transfected into 293 cells with or without the plasmid coding for A20. However, A20 is known to both ubiquitinate RIPK1 by adding K48-linked ubiquitin chains and to deubiquitinate RIPK1 by removing K63-linked ubiquitin chains [57]. NLRP3 and RIPK1 proteins were purified by NLRP3 and Flag immunoprecipitation respectively, and their ubiquitination level was revealed by WB (supplemental figure S6). NLRP3 WT and NLRP3 K568R were not differentially ubiquitinated in 293 cells, which could mean that the E3 ubiquitin ligase involved in K568 ubiquitination is not expressed by this cell type (supplemental figure S6). Co-expression of A20 with NLRP3 WT or K568R did not lead to any changes in NLRP3 ubiquitination status (supplemental figure S6). However, the positive control show that indeed the presence of A20 leads to a deubiquitination of RIPK1, a mechanism already shown. However, the E3 ubiquitin ligase activity of A20 was not revealed by this condition. Altogether, these results indicate that TRIM31, FBXL2, ARIH2, MARCH7, CBL-B, Pellino2 and A20 are not involved in NLRP3 K568 ubiquitination.

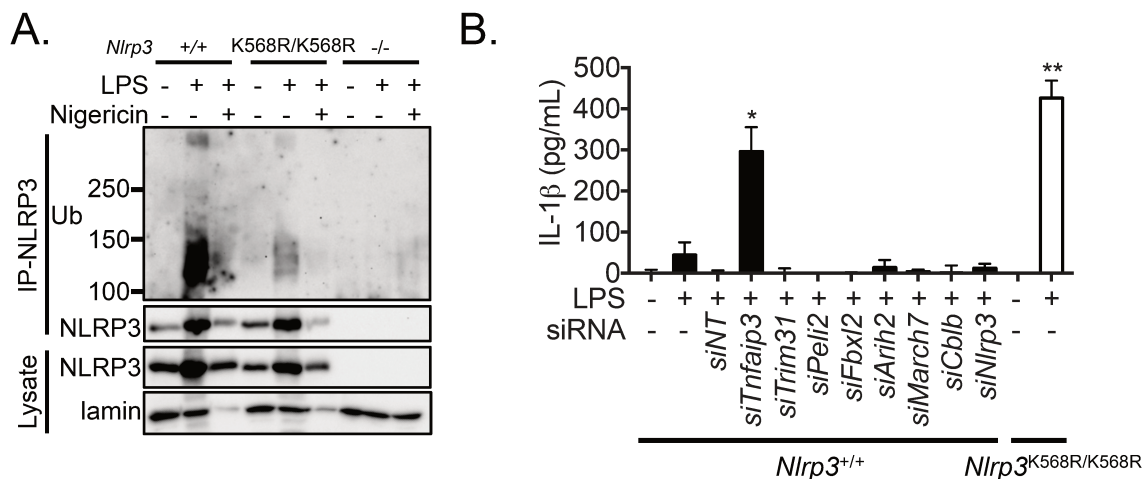


Figure 8: NLRP3 K568 is ubiquitinated following LPS priming signal. A. *Nlrp3*^{+/+}, *Nlrp3*^{K568R/K568R} and *Nlrp3*^{-/-} BMDMs were treated with LPS (5 ng/ml, 8h) followed by nigericin (20 µg/ml, 1h). NLRP3 was immunoprecipitated from cell lysates and analyzed for ubiquitination by WB. This experiment is representative of two independent experiments. Anti-lamin WB is used as a loading control. B. *Nlrp3*^{+/+} BMDMs were transfected with siRNAs targeting *Nlrp3*, *Tnfaip3*, *Trim31*, *Peli2*, *Fbxl2*, *Arih2*, *March7*, *Cblb*, or non targeting siRNAs (*siNT*). 48h later, *Nlrp3*^{+/+} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} cells were treated with LPS (5 ng/ml, 8h). Cell-free supernatants were collected and analyzed by ELISA. Two-way ANOVA was used to compare the effect of the KD of each genes with siNT. *: p<0.05; **: p<0.005; ***: p<0.0002; ****: p<0.0001. This experiment is representative of two independent experiments. Error bars represent 1 SD from the mean.

DISCUSSION

In this study we identified K568 (K570 in human) as a new lysine residue modified by ubiquitination on NLRP3. Interestingly, this is a site of polymorphism found in CAPS patients (K570N) but not in the alleles of the general population [33, 58]. One of the patients described carries the mutation at the heterozygous state [58]; the other one has a CINCA/NOMID syndrome, the most severe one among CAPS, but carries this mutation in only 10 % of his leukocytes [33]. This highlights the fact that the activation of NLRP3 K570N is very highly dysregulated. Linking the ubiquitination of K568 found in mouse cells with the patients, our hypothesis was then that the ubiquitination of this lysine is a key mechanism to control NLRP3 activation. To test this hypothesis, we have constructed a NLRP3 mutant in which the lysine residue is replaced by an arginine residue to mimic the constitutive deubiquitination of this site. This mutant was then used to reconstitute *NLRP3* knock-out cell lines and to generate knock-in mice. The study of mutant cell lines has revealed that NLRP3 K570N but not NLRP3 K570R secrete IL-1 β after LPS priming. These results mean that the development of CAPS in NLRP3 K570N patient is not merely due to the impairment in the ubiquitination of this residue, but could also be explained by a change in the protein structure. This hypothesis is also in line with the fact that the two CAPS patients described associated to this site carry the same mutation K570N. This could be a coincidence and could mean that other mutations at this site are not yet described or this could mean that other mutations at this site are not pathogenic. Using *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs, we could detect low levels of IL-1 β secretion after LPS priming. These different results indicate the limits of using cell lines when moderated phenotypes are studied. Finally, we tried unsuccessfully to monitor IL-18 secretion after LPS priming of *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs. If IL-18 is indeed secreted by the mutant, the amounts could be below the detection limit of the ELISA test. A mean to detect IL-18, if present, would be to concentrate the proteins found in the supernatants before analyzing by ELISA. These additional experiments are currently performed in our laboratory.

NLRP3 mutations leading to CAPS are mostly found at the heterozygous state in patients [13, 59]. Indeed, the mutations are autosomal dominants. In our study, *Nlrp3*^{+ /K568R} BMDMs display an intermediate phenotype in terms of IL-1 β secretion between *Nlrp3*^{+ /+} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs. However, at extra-late time points (24h of LPS stimulation), *Nlrp3*^{+ /K568R} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} display almost the same phenotype. These observations could be explained by the fact that a strong CAPS mutation, like K570N, would lead to such a high NLRP3 activation that the presence of one mutated allele would be sufficient to trigger a maximal IL-1 β secretion. This secretion could be limited by the quantity of pro-IL-1 β produced in the cytosol, by the regulation through IL-10 autocrine secretion [60], or by other unknown mechanisms. Looking at very early time points of LPS priming in CAPS mutated NLRP3 cells would maybe reveal differences between heterozygous and homozygous cells for the mutations. Concerning NLRP3 K568R,

the mutation leads to a slightly dysregulated state, and not fully active state, which could explain the differences of IL-1 β secretion between the heterozygous and homozygous BMDMs. Strikingly, CAPS also display an incomplete penetrance. Indeed, some individuals carry a NLRP3 CAPS-associated mutation without developing the disease. This could be explained by unknown environmental and genetic factors that interfere with NLRP3 activation [61]. Our experiments were performed on syngenic mice and every mutated mouse used had the same phenotype. However, the use of other mice strains or other animal facility would then maybe lead to different results.

The IL-1 β secretion by *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs is observed after 6h minimum of LPS priming. This could mean that the early and intermediate priming pathways previously described [25, 26] do not lead to NLRP3 K568R activation, on the contrary to the late pathway. Moreover, IRAK4, but not IRAK1 was also shown to be involved in the late pathway, which is consistent with the results obtained with siRNA experiments. However, pro-IL-1 β is synthesised into the cytosol after few hours of priming and IL-1 β secretion cannot be used as a readout to follow the early and intermediate pathways. Besides, the time needed to detect IL-1 β secretion is longer than the time needed for IL-1 β synthesis, which could reflect a late activation of NLRP3 K568R or the time necessary to reach a level of IL-1 β detectable by ELISA. Monitoring IL-18 or IL-1 α secretion would allow us to follow the relevance of these pathways for NLRP3 K568R activation.

Priming was initially thought to act through transcription, and thus to only increase the quantity of NLRP3 and pro-IL-1 β into the cytosol of the cells [23]. However, it was later evidenced that the priming also triggers transcription-independent pathways, which probably involve post-translational modifications [24–26]. NLRP3 K568R activation after priming could lead to the hypothesis that the increase of NLRP3 K568R amounts into the cytosol is sufficient to trigger its oligomerisation and activation, independently of post-translational modifications. The oligomerisation status of NLRP3 K568R after priming will thus have to be deciphered.

In our study, NLRP3 K568R activated by LPS triggers neither pyroptosis nor membrane permeabilization after LPS priming. Recent observation by others also reported IL-1 β secretion in the absence of pyroptosis, describing a state in macrophages called hyperactivation during which IL-1 β is secreted by living cells [4, 10–12]. However, during the hyperactivation state, macrophages secrete IL-1 β continuously for at least 96h [12], revealing increasing amounts over time. Here, we described an IL-1 β secretion that reaches a plateau at 24h after LPS challenge, probably indicating that NLRP3 K568R activation is distinct from hyperactivation and is still responsive to some inhibitory regulation preventing a continuous IL-1 β secretion after 24h. This leads to the question of how caspase-1 activation could trigger pro-IL-1 β cleavage and secretion without triggering pyroptosis. Firstly, it would be very informative to test if the GSDMD is cleaved upon LPS priming of *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs and if IL-1 β is secreted through a GSDMD-dependent pathway or through microvesicles [4, 62]. The fact that we were not able to detect membrane

permeabilization after LPS priming in *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs suggest a mechanism independent of GSDMD. We have tried to knockdown *Gsdmd* in *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs but cannot find efficient siRNAs. Thus, these questions would be answered with the use of [*Gsdmd*^{-/-}; *Nlrp3*^{K568R/K568R}] BMDMs (breeding in progress). Secondly, Dick et al. have described that, downstream of NLRC4 inflammasome, IL-1 β secretion requires high amounts of activated caspase-1 and ASC specks formation while to trigger pyroptosis, low levels of cleaved caspase-1 are enough and ASC speck formation is dispensable [63, 64]. These findings are not in line with our results, in which IL-1 β secretion is observed without ASC specks formation but pyroptosis is not detected, highlighting the complexity and variability of the pathways involved in inflammasome activation. However, we could hypothesize that high amounts of active caspase-1 are able to trigger both IL-1 β secretion and pyroptosis but on the contrary low levels of active caspase-1 are not able to trigger pyroptosis but only IL-1 β secretion. Thirdly, an additional checkpoint could control pyroptosis at the level of GSDMD. A recent study has highlighted the fact that GSDMD cleavage occurs after ROS release, which oxidize GSDMD, allowing the protein to be efficiently cleaved by caspase-1 [65]. Thus, it would be informative to assess the release of ROS after LPS priming in *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs to try to explain the absence of pyroptosis despite caspase-1 cleavage. Fourthly, another hypothesis would be that the absence of activation signal prevents the activation of an unknown lytic substrate of caspase-1 which would be necessary to trigger pyroptosis [66].

IL-1 β secretion occurring in the absence of pyroptosis has also been described in other cell types, as murine neutrophils [66], and human monocytes [36]. Neutrophils are resistant to pyroptosis, however, monocytes and macrophages are not. Gaidt et al. have shown that the inflammasome in human monocytes after LPS treatment is not an "all-or-nothing" response, but instead an alternative inflammasome is formed, which leads to a 10 times less abundant secretion of IL-1 β than after LPS and nigericin [36]. This alternative inflammasome pathway is absent in murine macrophages and murine monocytes. The alternative inflammasome activation share common features with the activation of NLRP3 K568R: low-levels of IL-1 β secretion, absence of pyroptosis and absence of ASC specks formation. Here we have shown that ASC and NEK7 are still required for NLRP3 K568R activation after priming, even though the interactions between those proteins remain to be investigated. Moreover, the alternative inflammasome is activated through caspase-8, FADD and RIPK1, a pathway that does not seem to be required for NLRP3 K568R activation. Moreover, the alternative inflammasome activation is independent of potassium efflux on the contrary to NLRP3 K568R activation. Indeed, our study highlights for the first time that the potassium efflux could be an event triggered during the LPS priming, independently of the activation step, while it is usually thought that it is a signal occurring after the activation step [28, 29]. Thus, we can hypothesize that low intracellular potassium concentration is not linked to the activation phase but more generally it is a signal required upstream of NLRP3 activation, but not sufficient. Moreover, recent papers

have described that the chloride efflux is an event triggered before potassium efflux and necessary for inflammasome activation [67, 68]. Besides, Green et al. have demonstrated that chloride efflux allows the formation of reversible ASC specks, and that potassium efflux then recruits NLRP3 to these specks and fully activate NLRP3 inflammasome [69]. Thus, the necessity of chloride efflux during NLRP3 K568R activation under LPS priming has to be investigated. The inhibition of NLRP3 K568R activation by the use of MCC950 (data not shown), an inhibitor of chloride efflux [40], is an argument in favor of this requirement. However, the mechanisms of action of MCC950 are not so clear and other effects of this compound have been described, as an inhibition of ASC oligomerisation [70] and an inhibition of K63 ubiquitination of NLRP3 triggered after priming [48]. Thus, our findings have revealed a new pathway, different from the alternative inflammasome, and which activation is prevented by NLRP3 K568 ubiquitination. However, the activation of this pathway in other cell types able to activate an inflammasome, as dendritic cells, peritoneal macrophages, neutrophils, mast cells or monocytes [66, 71] worth to be studied for knowing if NLRP3 K568 deubiquitination also intervenes in the regulation of the inflammasome activation in other myeloid cells.

Our study depicts for the first time the ubiquitination of the lysine residue K568 on NLRP3. For now, only another site K689 has been identified to be ubiquitinated on NLRP3 [51, 72]. The ubiquitination of the lysine K689, mediated by the E3 ubiquitin ligase FBXL2, had been described as a signal for NLRP3 proteasomal degradation, preventing its activation [51]. LPS treatment of the cells lead to a decrease in NLRP3 ubiquitination and thus a decrease in NLRP3 degradation, leading to its activation [27, 50, 51]. However, our study and others [48, 73] have shown that LPS priming induces NLRP3 ubiquitination. The apparent contradiction can be explained by the use of different cell types in these studies: U937 (immortalized and human cells) and immortalized BMDMs in one hand and BMDMs (primary and mouse cells) in the other. Thus, the relevance of NLRP3 K568 ubiquitination in human cells remains to be explored. In our study, we have only investigated the ubiquitination level of NLRP3 after 8h of priming. However, in order to collect more information about the pathways involved, it would be interesting to decipher if the ubiquitination of NLRP3 K568 after priming occurs at shorter time points. Humphries et al have shown that the ubiquitination appears after 1.5h of LPS priming. However, they did not considered time points longer than 3h. Then, a time course study of ubiquitination of NLRP3 WT and K568R would be informative to understand when precisely K568 ubiquitination occurs and when it is important.

The important difference of ubiquitination levels between NLRP3 WT and NLRP3 K568R after LPS priming indicates several things. First, it could reveal that K568 is polyubiquitinated. Second, it could also mean that the ubiquitination of K568 triggers and controls the ubiquitination of several other sites. Besides, Humphries et al. showed that only K63 polyubiquitination occurs after LPS priming. In our study, we have not investigated which type of ubiquitin chains is added on NLRP3 K568, but this will be realised shortly.

Furthermore, the fact that NLRP3 K568R is more ubiquitinated after LPS priming as compared with untreated condition reveals that K568 is not the only lysine residue of NLRP3 that is ubiquitinated after LPS priming. Finally, several E3 ubiquitin ligases were revealed to be important in the course of NLRP3 inflammasome activation. Some of them were shown to directly ubiquitinate NLRP3, including TRIM31 [49], FBXL2 [51], ARIH2 [52], MARCH7 [53] and CBL-B [54]. However, for others including A20 [55, 56] and Pellino2 [48], despite the established link with NLRP3 inflammasome activity, no direct NLRP3 ubiquitination was demonstrated. Our study failed to reveal any involvement of any of these E3 ubiquitin ligases on targeting NLRP3 K568. However, the use of E3 ubiquitin ligase knock-out instead of knock-down could give clearer results. Given the evidence that the human genome encodes between 600 and 1,000 E3 ligases [74], a wide screen using siRNA would have to be performed to find which ones are responsible for targeting NLRP3 K568. Functional redundancies between E3s could be a problem for this kind of approach. Moreover, exploring the autoinflammatory diseases caused by an E3 ubiquitin ligase loss of function, as was realized concerning A20 [55, 56], could also be helpful in finding a potential candidate.

Our study was exclusively based on *in vitro* experimentations conducted on primary BMDMs. Moreover, *Nlrp3*^{K568R/K568R} mice do not display any spontaneous inflammation (data not shown), in contrast with the phenotype observed in NLRP3 CAPS mouse models (hair loss, skin rash, abnormal skeletal development, delayed growth, lethality...) [75–77]. More precise *in vivo* studies will soon be performed. First, blood cells numeration (total WBC, RBC, platelets, monocytes, lymphocytes, neutrophils), serum levels of inflammatory cytokines and markers (IL-1 β , IL-18, SAA, IFN- γ , HMGB1, IL-1 α , TNF, IL-6, G-CSF), body weight and longevity follow-up will be investigated. Second, in order to try to trigger inflammation in those mice, we could place them in a colder environment [78] or place the mice in a non "specific pathogen free" animal facility and follow the development of CAPS symptoms. Third, the survival of *Nlrp3*^{K568R/K568R} mice compared to *Nlrp3*^{+/+} mice to the endotoxic shock will be monitored. This challenge is provoked by LPS intraperitoneal injection known to mimic sepsis observed in patients [79–82]. Here we expect that *Nlrp3*^{K568R/K568R} mice would die more than WT mice. Fourth, because NLRP3 K568R is more active than NLRP3 WT, at least *in vitro*, we could hypothesize that bacterial clearance following infection would be more efficient in *Nlrp3*^{K568R/K568R} mice compared to WT mice. Thus, mice could be challenge for bacterial or parasital infection with bacteria or parasites known to activate NLRP3 inflammasome (*Toxoplasma gondii* [83], *Listeria monocytogenes* [84], *Klebsiella pneumoniae* [85]...) and then the bacterial or parasital load could be quantified to test the hypothesis. Fifth, as NLRP3 was described to be involved in a lot of multifactorial diseases, the impact of NLRP3 K568R in those diseases could be evaluated through NLRP3 knock-in mice. Indeed, following low-grade inflammation (metabolic inflammation, glucose tolerance, thymic involution, cognitive decline in aging mice...), in *Nlrp3*^{K568R/K568R} mice could be performed [86].

In conclusion, the work presented here highlights NLRP3 K568 ubiquitination as a new inhibitory checkpoint that prevents NLRP3 activation following priming in the absence of further activation signal.

REFERENCES

- [1] Medzhitov R, Janeway CA (1997) Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91(3):295–298. [2](#)
- [2] Martinon F, Burns K, Tschopp J (2002) The inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular Cell* 10(2):417–426. [2](#)
- [3] Aglietti RA, et al. (2016) GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(28):7858–7863. [2](#)
- [4] Evavold CL, et al. (2017) The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity*. [2](#), [9](#), [22](#)
- [5] Kayagaki N, et al. (2015) Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* 526(7575):666–671.
- [6] Liu X, et al. (2016) Inflammasome - activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* 535(7610):153–158.
- [7] Sborgi L, et al. (2016) GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *The EMBO Journal* 35(16):1766–1778.
- [8] Shi J, et al. (2015) Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 526(7575):660–665. [2](#)
- [9] Monteleone M, et al. (2018) Interleukin-1 β Maturation Triggers Its Relocation to the Plasma Membrane for Gasdermin-D-Dependent and -Independent Secretion. *Cell Reports* 24(6):1425–1433. [2](#)
- [10] Wolf AJ, et al. (2016) Hexokinase Is an Innate Immune Receptor for the Detection of Bacterial Peptidoglycan. *Cell* 166(3):624–636. [2](#), [9](#), [22](#)
- [11] Zanoni I, et al. (2016) An endogenous caspase-11 ligand elicits interleukin-1 release from living dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)* 352(6290):1232–1236.
- [12] Zanoni I, Tan Y, Di Gioia M, Springstead JR, Kagan JC (2017) By Capturing Inflammatory Lipids Released from Dying Cells, the Receptor CD14 Induces Inflammasome-Dependent Phagocyte Hyperactivation. *Immunity* 47(4):697–709.e3. [2](#), [9](#), [22](#)

-
- [13] Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD (2001) Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle–Wells syndrome. *Nature genetics* 29(3):301–305. [2](#), [21](#)
- [14] Shinkai K, McCalmont TH, Leslie KS (2008) Cryopyrin-associated periodic syndromes and autoinflammation. *Clinical and Experimental Dermatology* 33(1):1–9. [2](#)
- [15] Schroder K, Zhou R, Tschopp J (2010) The NLRP3 inflammasome: A sensor for metabolic danger? *Science (New York, N.Y.)* 327(5963):296–300. [2](#)
- [16] Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R (2012) Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481(7381):278–286.
- [17] Guo H, Callaway JB, Ting JPY (2015) Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature Medicine* 21(7):677–687. [2](#)
- [18] Dinarello CA, Simon A, van der Meer JWM (2012) Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature reviews. Drug discovery* 11(8):633–652. [2](#)
- [19] Gros Lambert M, Py BF (2018) Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. *Journal of Inflammation Research* 11:359–374. [2](#)
- [20] Jo EK, Kim JK, Shin DM, Sasakawa C (2016) Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cellular and Molecular Immunology* 13(2):148–159.
- [21] Ratsimandresy RA, Dorfleutner A, Stehlik C (2013) An Update on PYRIN Domain-Containing Pattern Recognition Receptors: From Immunity to Pathology. *Frontiers in Immunology* 4.
- [22] Elliott EI, Sutterwala FS (2015) Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. *Immunological Reviews* 265(1):35–52. [2](#)
- [23] Bauernfeind FG, et al. (2009) Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *Journal of Immunology* 183(2):787–791. [3](#), [14](#), [22](#)
- [24] Schroder K, et al. (2012) Acute lipopolysaccharide priming boosts inflammasome activation independently of inflammasome sensor induction. *Immunobiology* 217(12):1325–1329. [3](#), [22](#)
- [25] Lin KM, et al. (2014) IRAK-1 bypasses priming and directly links TLRs to rapid NLRP3 inflammasome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(2):775–780. [17](#), [22](#)

-
- [26] Fernandes-Alnemri T, et al. (2013) Cutting edge: TLR signaling licenses IRAK1 for rapid activation of the NLRP3 inflammasome. *Journal of Immunology* 191(8):3995–3999. [17](#), [22](#)
- [27] Juliana C, et al. (2012) Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *The Journal of Biological Chemistry* 287(43):36617–36622. [3](#), [6](#), [17](#), [19](#), [24](#)
- [28] Pétrilli V, et al. (2007) Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death and Differentiation* 14(9):1583–1589. [3](#), [14](#), [23](#)
- [29] Muñoz-Planillo R, et al. (2013) K⁺ efflux is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity* 38(6):1142–1153. [3](#), [14](#), [23](#)
- [30] Py BF, Kim MS, Vakifahmetoglu-Norberg H, Yuan J (2013) Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Molecular Cell* 49(2):331–338. [3](#), [6](#), [19](#)
- [31] Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES (2009) AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458(7237):509–513. [3](#)
- [32] Lagrange B, et al. (2018) Human caspase-4 detects tetra-acylated LPS and cytosolic Francisella and functions differently from murine caspase-11. *Nature Communications* 9(1):242. [3](#), [7](#)
- [33] Tanaka N, et al. (2011) High Incidence of NLRP3 Somatic Mosaicism in Patients With Chronic Infantile Neurologic, Cutaneous, Articular Syndrome. *Arthritis and rheumatism* 63(11):3625–3632. [6](#), [21](#)
- [34] Carta S, et al. (2015) Cell stress increases ATP release in NLRP3 inflammasome-mediated autoinflammatory diseases, resulting in cytokine imbalance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(9):2835–2840. [8](#)
- [35] Fernandes-Alnemri T, et al. (2007) The pyroptosome: A supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death and Differentiation* 14(9):1590–1604. [12](#)
- [36] Gaidt MM, et al. (2016) Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity* 44(4):833–846. [12](#), [14](#), [23](#)
- [37] Holler N, et al. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature Immunology* 1(6):489–495. [12](#)

-
- [38] Duncan JA, et al. (2007) Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(19):8041–8046. [14](#)
- [39] Juliana C, et al. (2010) Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *The Journal of Biological Chemistry* 285(13):9792–9802. [14](#)
- [40] Jiang H, et al. (2017) Identification of a selective and direct NLRP3 inhibitor to treat inflammatory disorders. *The Journal of Experimental Medicine* 214(11):3219–3238. [14, 24](#)
- [41] Alexiou P, Chatzopoulou M, Pegklidou K, Demopoulos VJ (2010) RAGE: A multi-ligand receptor unveiling novel insights in health and disease. *Current Medicinal Chemistry* 17(21):2232–2252. [14](#)
- [42] Xiang M, et al. (2011) Hemorrhagic Shock Activation of NLRP3 Inflammasome in Lung Endothelial Cells. *The Journal of Immunology* 187(9):4809–4817.
- [43] Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE (2006) Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nature Immunology* 7(12):1250–1257.
- [44] Meylan E, Tschopp J, Karin M (2006) Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442(7098):39–44.
- [45] Mitchell JA, Paul-Clark MJ, Clarke GW, McMaster SK, Cartwright N (2007) Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. *Journal of Endocrinology* 193(3):323–330.
- [46] Franchi L, Eigenbrod T, Núñez G (2009) Cutting edge: TNF- α mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *Journal of Immunology* 183(2):792–796.
- [47] Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL (2014) Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1319:82–95. [14](#)
- [48] Humphries F, et al. (2018) The E3 ubiquitin ligase Pellino2 mediates priming of the NLRP3 inflammasome. *Nature Communications* 9. [17, 19, 24, 25](#)
- [49] Song H, et al. (2016) The E3 ubiquitin ligase TRIM31 attenuates NLRP3 inflammasome activation by promoting proteasomal degradation of NLRP3. *Nature Communications* 7. [19, 25](#)
- [50] Song N, et al. (2017) NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation. *Molecular Cell* 68(1):185–187. [19, 24](#)

-
- [51] Han S, et al. (2015) Lipopolysaccharide Primes the NALP3 Inflammasome by Inhibiting Its Ubiquitination and Degradation Mediated by the SCFFBXL2 E3 Ligase. *The Journal of Biological Chemistry* 290(29):18124–18133. [19](#), [24](#), [25](#)
- [52] Kawashima A, et al. (2017) ARIH2 Ubiquitinates NLRP3 and Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 199(10):3614–3622. [19](#), [25](#)
- [53] Yan Y, et al. (2015) Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell* 160(1-2):62–73. [19](#), [25](#)
- [54] Liu Q, Guo H, Xiao Y, Zhao Y, Zhang J (2014) E3 ubiquitin ligase Cbl-b inhibits NLRP3 inflammasome activation by targeting NLRP3 for ubiquitination (INM6P.405). *The Journal of Immunology* 192(1 Supplement):122.2–122.2. [19](#), [25](#)
- [55] Duong BH, et al. (2015) A20 restricts ubiquitination of pro-interleukin-1 β protein complexes and suppresses NLRP3 inflammasome activity. *Immunity* 42(1):55–67. [19](#), [25](#)
- [56] Rajamäki K, et al. (2018) Haploinsufficiency of A20 impairs protein-protein interactome and leads into caspase-8-dependent enhancement of NLRP3 inflammasome activation. *RMD open* 4(2):e000740. [19](#), [25](#)
- [57] Wertz IE, et al. (2004) De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 down-regulate NF-kappaB signalling. *Nature* 430(7000):694–699. [20](#)
- [58] Li C, et al. (2017) Gene mutations and clinical phenotypes in 15 Chinese children with cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS). *Science China. Life Sciences*. [21](#)
- [59] Aksentijevich I, et al. (2002) De Novo CIAS1 Mutations, Cytokine Activation, and Evidence for Genetic Heterogeneity in Patients With Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease (NOMID). *Arthritis and rheumatism* 46(12):3340–3348. [21](#)
- [60] Gurung P, et al. (2015) Chronic TLR Stimulation Controls NLRP3 Inflammasome Activation through IL-10 Mediated Regulation of NLRP3 Expression and Caspase-8 Activation. *Scientific Reports* 5. [21](#)
- [61] Schuh E, et al. (2015) Expanding spectrum of neurologic manifestations in patients with NLRP3 low-penetrance mutations. *Neurology® Neuroimmunology & Neuroinflammation* 2(4). [22](#)
- [62] Cypryk W, Nyman TA, Matikainen S (2018) From Inflammasome to Exosome—Does Extracellular Vesicle Secretion Constitute an Inflammasome-Dependent Immune Response? *Frontiers in Immunology* 9. [22](#)

-
- [63] Broz P, von Moltke J, Jones JW, Vance RE, Monack DM (2010) Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host & Microbe* 8(6):471–483. [23](#)
- [64] Dick MS, Sborgi L, Rühl S, Hiller S, Broz P (2016) ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes. *Nature Communications* 7:11929. [23](#)
- [65] Wang Y, et al. (2019) Mitochondrial ROS promote macrophage pyroptosis by inducing GSDMD oxidation. *Journal of Molecular Cell Biology*. [23](#)
- [66] Chen KW, et al. (2014) The Neutrophil NLRC4 Inflammasome Selectively Promotes IL-1 β Maturation without Pyroptosis during Acute Salmonella Challenge. *Cell Reports* 8(2):570–582. [23](#), [24](#)
- [67] Domingo-Fernández R, Coll RC, Kearney J, Breit S, O’Neill LAJ (2017) The intracellular chloride channel proteins CLIC1 and CLIC4 induce IL-1 β transcription and activate the NLRP3 inflammasome. *The Journal of Biological Chemistry* 292(29):12077–12087. [24](#)
- [68] Tang T, et al. (2017) CLICs-dependent chloride efflux is an essential and proximal upstream event for NLRP3 inflammasome activation. *Nature Communications* 8(1):202. [24](#)
- [69] Green JP, et al. (2018) Chloride regulates dynamic NLRP3-dependent ASC oligomerization and inflammasome priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(40):E9371–E9380. [24](#)
- [70] Coll RC, et al. (2015) A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nature Medicine* 21(3):248–255. [24](#)
- [71] Nakamura Y, et al. (2009) Mast cells mediate neutrophil recruitment and vascular leakage through the NLRP3 inflammasome in histamine-independent urticaria. *The Journal of Experimental Medicine* 206(5):1037–1046. [24](#)
- [72] Wan P, et al. (2019) Cullin1 binds and promotes NLRP3 ubiquitination to repress systematic inflammasome activation. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* p. fj201801681R. [24](#)
- [73] Shim DW, et al. (2017) BOT-4-one attenuates NLRP3 inflammasome activation: NLRP3 alkylation leading to the regulation of its ATPase activity and ubiquitination. *Scientific Reports* 7(1):15020. [24](#)
- [74] Deshaies RJ, Joazeiro CAP (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annual Review of Biochemistry* 78:399–434. [25](#)

-
- [75] Brydges SD, et al. (2009) Animal Models of Inflammasomopathies Reveal Roles for Innate but not Adaptive Immunity. *Immunity* 30(6):875–887. [25](#)
- [76] Bonar SL, et al. (2012) Constitutively activated NLRP3 inflammasome causes inflammation and abnormal skeletal development in mice. *PloS One* 7(4):e35979.
- [77] Bertoni A, et al. (2015) Cryopyrin associated periodic syndromes (CAPS): Immunological characterization of knock-in mouse model to exploit novel approaches for the modulation of the NLRP3 inflammasome. *Pediatric Rheumatology Online Journal* 13(Suppl 1):P200. [25](#)
- [78] Aksentijevich I, et al. (2007) The clinical continuum of cryopyrinopathies: Novel CIAS1 mutations in North American patients and a new cryopyrin model. *Arthritis and Rheumatism* 56(4):1273–1285. [25](#)
- [79] Morrison DC, Ryan JL (1987) Endotoxins and disease mechanisms. *Annual Review of Medicine* 38:417–432. [25](#)
- [80] Klosterhalfen B, et al. (1992) Time course of various inflammatory mediators during recurrent endotoxemia. *Biochemical Pharmacology* 43(10):2103–2109.
- [81] Mózes T, et al. (1991) Serum levels of tumor necrosis factor determine the fatal or non-fatal course of endotoxic shock. *Immunology Letters* 27(2):157–162.
- [82] Remick DG, et al. (1990) Role of tumor necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced pathologic alterations. *The American Journal of Pathology* 136(1):49–60. [25](#)
- [83] Gorfu G, et al. (2014) Dual Role for Inflammasome Sensors NLRP1 and NLRP3 in Murine Resistance to *Toxoplasma gondii*. *mBio* 5(1):e01117–13. [25](#)
- [84] Kanneganti TD, et al. (2006) Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 440(7081):233–236. [25](#)
- [85] Willingham SB, et al. (2009) NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) Facilitates In Vivo Caspase-1 Activation, Necrosis, and HMGB1 Release via Inflammasome-Dependent and -Independent Pathways. *The Journal of Immunology* 183(3):2008–2015. [25](#)
- [86] Youm YH, et al. (2013) Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low grade inflammation to functional decline in aging. *Cell metabolism* 18(4):519–532. [25](#)

Supplemental figures

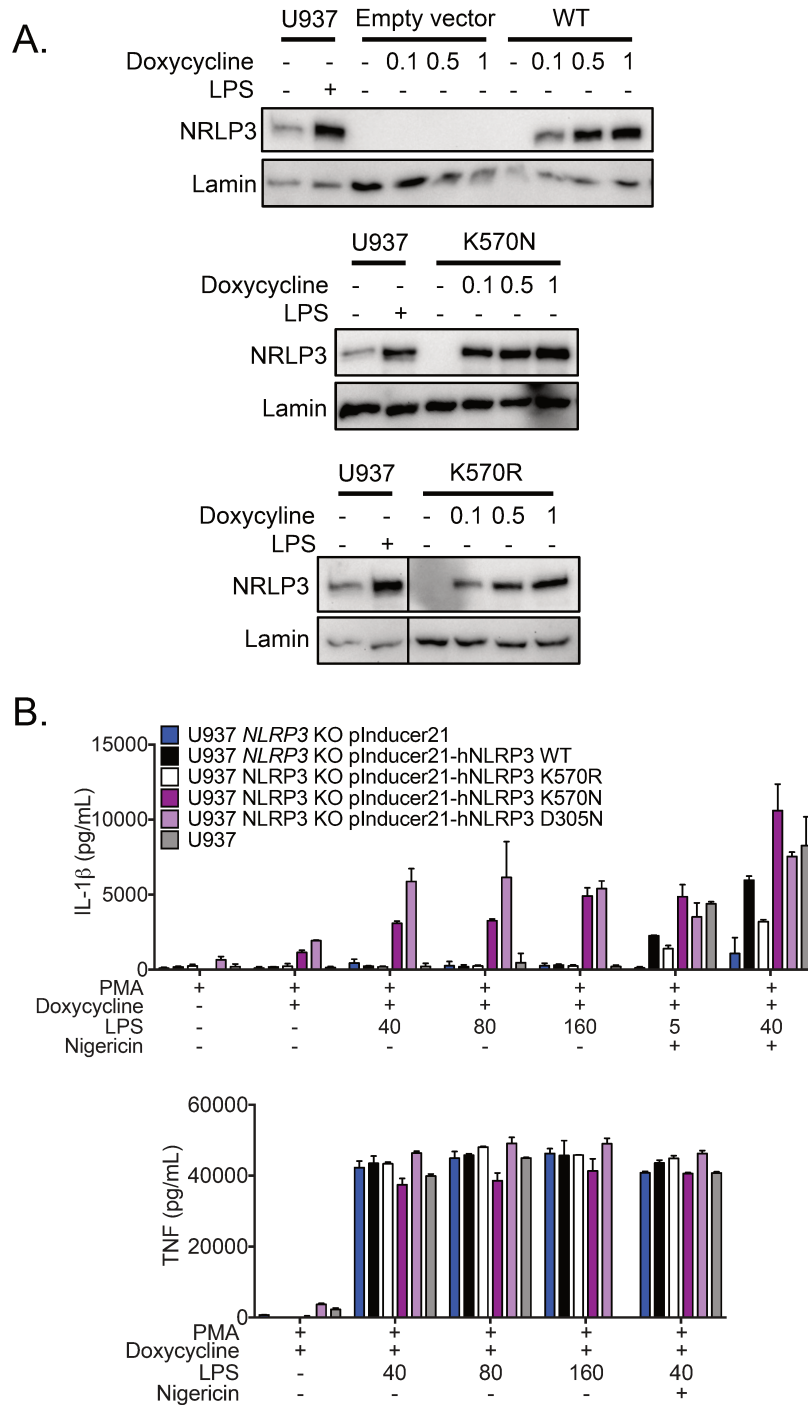


Figure S1: ***NLRP3* KO U937 reconstituted with *NLRP3* K570R require priming with LPS and activation with nigericin to secrete IL-1 β .** *NLRP3* KO U937 cells (human monocytic cell line) were reconstituted with the indicated *NLRP3* mutants under the control of a promoter inducible by doxycycline. The cells were PMA-differentiated into macrophages for 16h. A. Then, U937 WT were treated with LPS (40 ng/ml, 3h) and reconstituted *NLRP3* KO U937 were treated with doxycycline (doses indicated in μ g/ml, 5h). *NLRP3* expression was analyzed by WB on the cell lysates. The bottom panel corresponds to the same membrane, but some lanes have been removed. This experiment is representative of two independent experiments. Anti-lamin WB is used as a loading control. B. The cells were then treated with doxycycline (0.5 μ g/ml) for 1h followed by LPS for 3h with the indicated doses (ng/ml) and then activated with nigericin (15 μ g/ml, 1h). Cell-free supernatants were analyzed by ELISA. This experiment is representative of three independent repetitions. Error bars represent 1 SD from the mean.

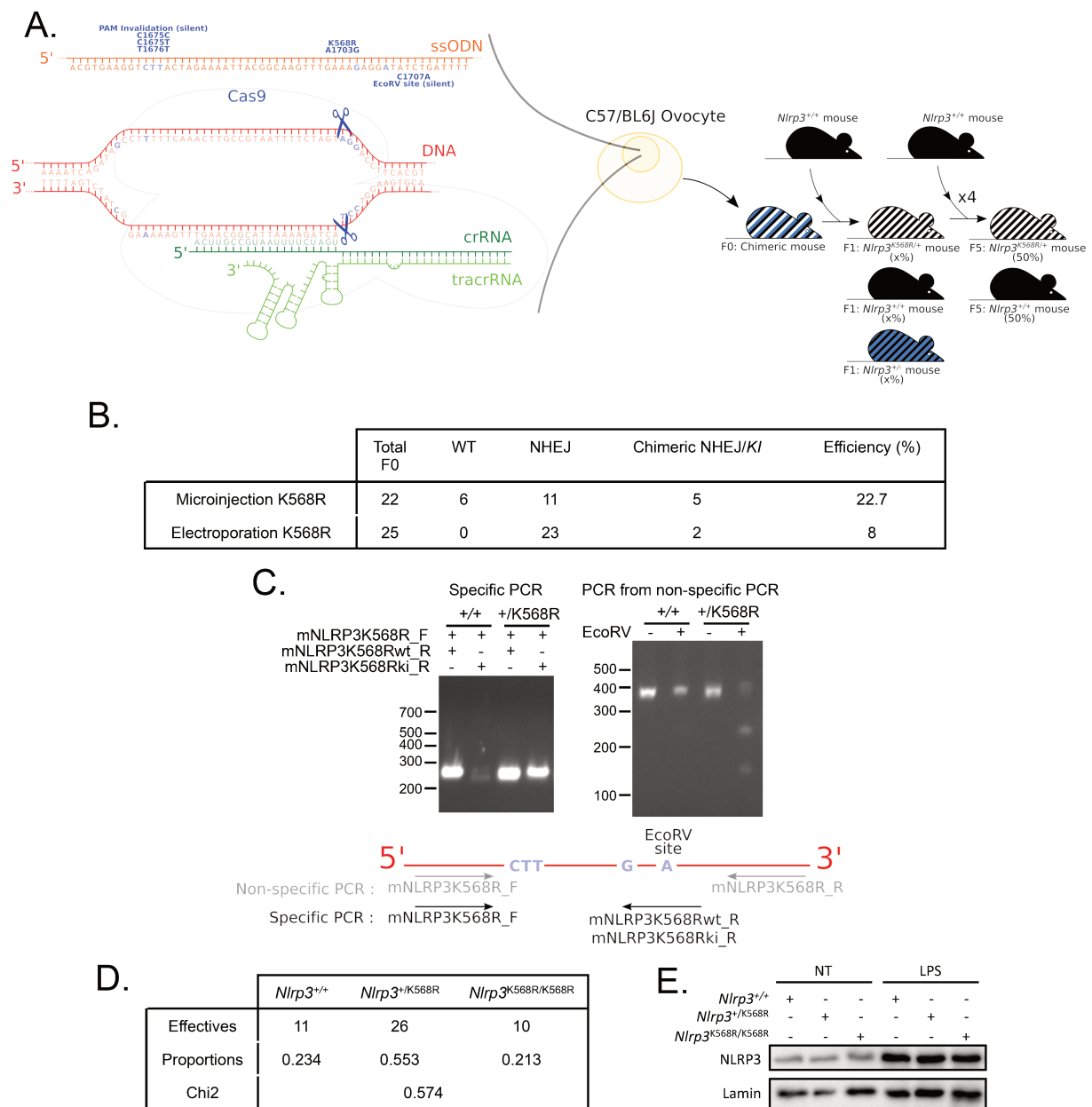


Figure S2: **Generation of *Nlrp3*^{K568R/K568R} knock-in mice using CRISPR/Cas9 technology.** A. Experimental design of *Nlrp3*^{K568R/K568R} KI mice generation by CRISPR/Cas9 technology. The embryos from WT C57BL6/J were injected with the Cas9 protein, ssODN (containing mutations leading to the K568R missense mutation, invalidating the PAM sequence by silent mutation, and inserting an EcoRV restriction site by a silent mutation), hybridized crRNA and specific tracrRNA and injected in foster mother. F0 mice obtained were then genotyped and backcrossed with WT C57BL6/J mice for 5 generations to suppress putative off-target mutations. B. Efficiency of the CRISPR/Cas9 technology. C. Genotyping of the mice. The mice were genotyped with both a specific PCR which amplify specifically the WT or the mutated region of *Nlrp3* (left) and following an enzymatic digestion with a restriction enzyme (site present only in the mutant mice) of PCR fragment (right). D. Genetic repartition of the *Nlrp3* alleles following heterozygous mice crossing. The χ^2 test ($0.574 < 3.84$) show a Mendelian transmission of the allele. E. NLRP3 expression in BMDMs from *Nlrp3*^{+/+}, *Nlrp3*^{+/K568R} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} littermates mice following LPS stimulation (50 ng/ml, 8h). Anti-lamin WB is used as a loading controls. This experiment is representative of two independent experiments.

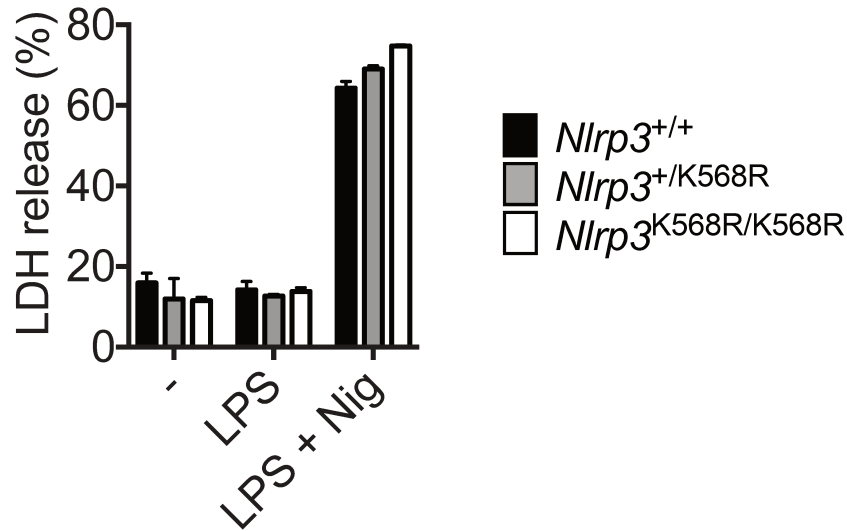


Figure S3: *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs do not undergo pyroptosis after LPS stimulation. *Nlrp3*^{+/+}, *Nlrp3*^{+/K568R} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs were stimulated for 24h with LPS (10 ng/ml) or for 8h with LPS (10 ng/ml) and 1h with nigericin (20 μ g/ml). Cell-free supernatants were then analyzed for LDH content. This experiment is representative of two independent experiments. Error bars represent 1 SD from the mean.

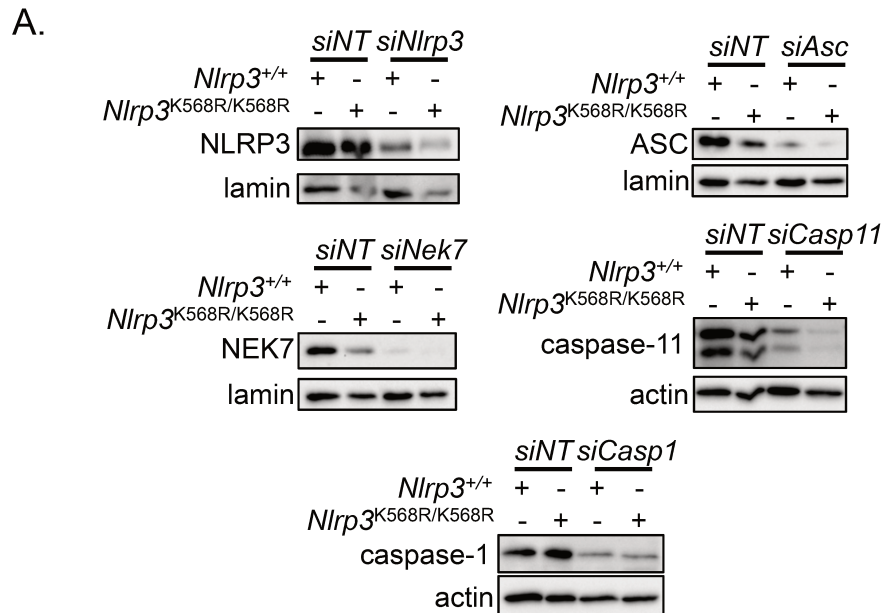


Figure S4: Efficiency of the knock-downs by siRNA. *Nlrp3*^{+/+} and *Nlrp3*^{K568R/K568R} BMDMs were transfected with siRNAs targeting *Nlrp3*, *Asc*, *Nek7*, *Casp11* or *Casp1* or non targeting siRNAs (*siNT*). 48h later, cells lysates were analyzed by WB to test the expression of the genes targeted by siRNA. Anti-actin and anti-lamin WB are used as loading controls.

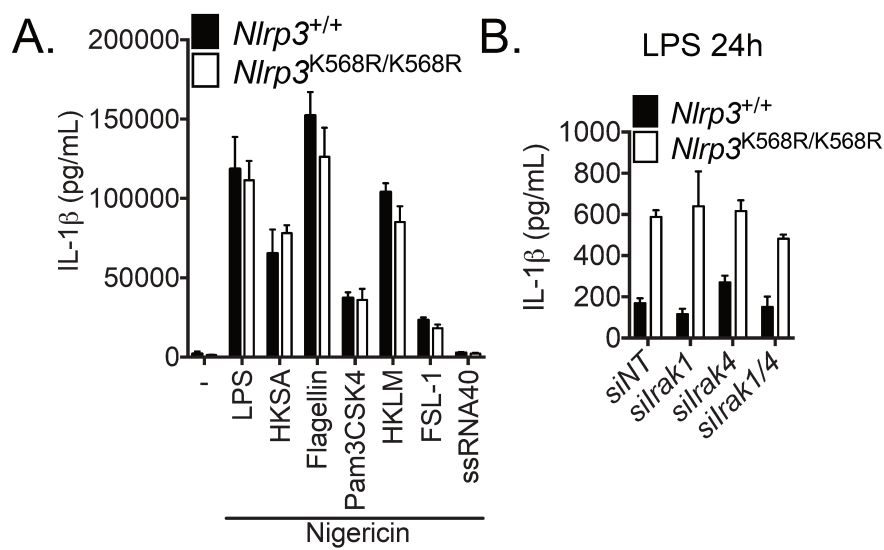


Figure S5: **Secretion of IL-1 β by $Nlrp3^{K568R/K568R}$ BMDMs is restricted to LPS and flagellin priming, and requires IRAK4.** A. $Nlrp3^{+/+}$ and $Nlrp3^{K568R/K568R}$ BMDMs were primed for 24h with different TLRs agonists: LPS, Heat killed *Staphylococcus aureus* (HKSA), flagellin (FLA), Pam3CSK4 (Pam3), Heat killed *Listeria monocytogenes* (HKLM), the synthetic lipopeptide Pam2CGDPKHPKSF (FSL-1), ssRNA40 followed by 1h of nigericin (20 μ g/ml). Cell-free supernatants were collected and analyzed by ELISA. This experiment is representative of two independent experiments. B. $Nlrp3^{+/+}$ and $Nlrp3^{K568R/K568R}$ BMDMs were transfected with siRNAs targeting *Irak1* or *Irak4* or non targeting siRNAs (*siNT*). 48h later, cells were treated with LPS (5 ng/ml, 24h). Cell-free supernatants were collected and analyzed by ELISA. This experiment is representative of three independent experiments. Error bars represent 1 SD from the mean

4.2 Bilan des résultats

La figure 4.1 compare l'activation de l'inflammasome NLRP3 K568R et de l'inflammasome NLRP3 sauvage.

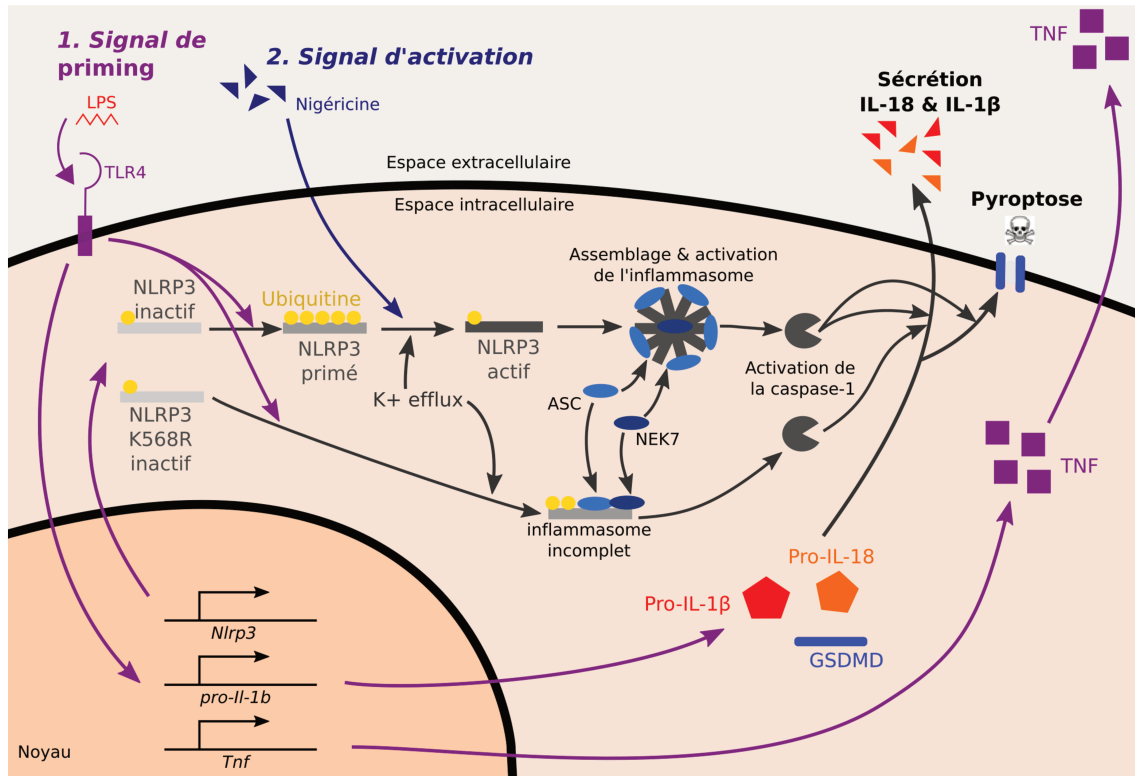


Figure 4.1 – Mécanismes d'activation de NLRP3 K568R dans les macrophages murins suite au signal de *priming*. Le LPS se lie au récepteur TLR4 localisé sur la membrane plasmique des macrophages et donne le signal dit de *priming*. Ceci entraîne l'activation de la voie de signalisation NF-κB, ce qui permet la synthèse des protéines NLRP3, pro-IL-1β, et TNF. De plus, l'ubiquitination du résidu K568 de NLRP3 ne pouvant avoir lieu dans le cas du mutant NLRP3 K568R suite au signal de *priming*, NLRP3 K568R devient un peu actif. Ceci permet alors le clivage et l'activation de la caspase-1 et le clivage puis la sécrétion d'IL-1β, sans qu'il n'y ait déclenchement de la pyroptose. La sécrétion d'IL-1β est dépendante d'un efflux de potassium, de l'activité ATPase de NLRP3 ainsi que de la présence d'ASC et de NEK7 (l'interaction de NLRP3 avec ASC et NEK7 dans ces conditions n'a pas été démontrée).

Chapitre 5

Résultats : Etude de l'activation du mutant *Nlrp3*^{K373R/K373R}

Sommaire

5.1	Le mutant NLRP3 K377R ne montre pas de phénotype d'activation significativement différent de NLRP3 WT en lignées cellulaires	125
5.2	Construction et génotypage des souris <i>Nlrp3</i> ^{K373R/K373R}	127
5.3	Etude du phénotype inflammatoire des BMDM <i>Nlrp3</i> ^{K373R/K373R}	129
5.3.1	Etude de la sécrétion d'IL-1 β	129
5.3.2	Etude de la pyroptose	129
5.4	Etude de la liaison à l'ATP	133

Objectifs de l'étude

L'étude menée pour identifier les sites de modifications post-traductionnelles de NLRP3 a mis en évidence plusieurs sites de phosphorylation et plusieurs sites d'ubiquitination, dont deux sites pour lesquels des variants CAPS existent, K373 et K568 (cf chapitre 3). L'examen des sites de phosphorylation n'a apporté aucun résultat quant à une régulation de l'activation de l'inflammasome par ces modifications (cf chapitre 3). En revanche, l'exploration des conséquences de la déubiquitination du résidu lysine K568 a permis révéler un mécanisme nouveau de régulation de l'inflammasome, au cours duquel l'ubiquitination de ce résidu lors du *priming* empêcherait une faible activation de la caspase-1, activation qui conduit au clivage et à la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β sans déclencher la pyroptose (cf chapitre 4). Dans cette partie, nous nous intéressons à l'impact de l'ubiquitination du second résidu lysine de NLRP3 identifié, K373, dans la régulation de l'activation de l'inflammasome. Une patiente dont le syndrome CAPS a été associé à la mutation de cette lysine (NLRP3 K377E) a été recensée [316]. Nous pouvons donc formuler la même hypothèse que précédemment concernant la lysine K568, à savoir que l'ubiquitination du résidu K377 permet de contrôler l'activation de l'inflammasome et d'empêcher une suractivation de NLRP3. C'est à partir de cette hypothèse que les travaux présentés ci-après ont été réalisés. Il est cependant important de noter ici que la mère de la patiente porte également la mutation K377E à l'état hétérozygote, sans montrer de symptômes auto-inflammatoires [316]. D'autre part, comme exposé en partie 3.1.3, le résidu K373 (murin) est conservé dans toutes les espèces testées, excepté chez la vache, pour lequel il est remplacé par une arginine, acide aminé aux propriétés chimiques très proches de la lysine sauf qu'il ne peut pas porter de chaînes d'ubiquitines. Ces deux dernières observations ne sont pas en faveur de l'hypothèse proposée, au contraire. Toutes ces données semblent indiquer que l'ubiquitination du résidu K373 pourrait être importante dans le contrôle de l'activation de l'inflammasome sans être essentielle dans tous les cas, contrôle qui pourrait dépendre également d'autres facteurs génétiques et environnementaux. Afin d'éclaircir tous ces points, nous avons étudié dans cette partie l'activation du mutant NLRP3 K373R, mutant mimant une déubiquitination constitutive de ce résidu.

La lignée de souris NLRP3 *knock-in* étudiée dans cette partie a été préalablement réalisée au laboratoire (figure 5.2). La structure du domaine NACHT de NLRP3 présentée en figure 5.6 a été réalisée par le Dr. Olivier Walker et le Dr. Maggy Hologne. M.G. a réalisé les expériences présentées dans les autres figures.

5.1 Le mutant NLRP3 K377R ne montre pas de phénotype d'activation significativement différent de NLRP3 WT en lignées cellulaires

Nous avons d'abord étudié le phénotype d'activation du mutant NLRP3 K373R dans des lignées cellulaires. Les cellules U937 (lignées de monocytes humains immortalisés) *NLRP3* KO ont été reconstituées lentiviralement avec NLRP3 sauvage ou mutant placé sous le contrôle d'un promoteur inductible par la doxycycline. Le mutant K377R utilisé permet d'étudier l'effet de la déubiquitination de ce résidu de NLRP3. D'autre part, des mutants correspondant à des variants CAPS ont été inclus dans ces expériences : NLRP3 K377E et NLRP3 D305N. En comparant les mutants K377R et K377E, nous espérons pouvoir séparer les effets dus à l'ubiquitination de ce résidu de ceux non liés à cette modification post-traductionnelle (changements de structure dus à la mutation...). La mutation NLRP3 D305N entraîne une maladie CAPS (MWS ou CINCA/NOMID selon les patients) détaillée dans la littérature [222, 317–319] et servira de contrôle positif pour le phénotype CAPS *in vitro*.

L'expression de NLRP3 dans les lignées cellulaires générées a été vérifiée par western blot (figure 5.1 A). Toutes les lignées synthétisent des quantités similaires de protéines NLRP3 suite à l'induction de l'expression de *NLRP3* par la doxycycline, quantité qui augmente avec la dose de doxycycline utilisée (figure 5.1 A). Enfin, à une dose de 0,5 µg/ml de doxycycline, la quantité de NLRP3 synthétisée est proche de celle induite suite au traitement au LPS des cellules U937 non reconstituées (figure 5.1 A). C'est donc à cette dose là que seront traitées les cellules par la suite afin d'étudier l'activation de l'inflammasome. Le traitement au LPS des cellules exprimant NLRP3 K377R ou NLRP3 K377E n'induit aucune sécrétion d'IL-1β, contrairement aux cellules exprimant NLRP3 D305N (figure 5.1 B, panel du haut). Le traitement au LPS et à la nigéricine n'entraîne pas de sécrétion d'IL-1β par les cellules NLRP3 KO, ce qui confirme que la sécrétion d'IL-1β observée est due à l'activation spécifique de l'inflammasome NLRP3 par les signaux LPS et nigéricine (figure 5.1 B, panel du haut). Par contre, le traitement au LPS et à la nigéricine entraîne une sécrétion d'IL-1β similaire dans les différentes lignées (figure 5.1 B, panel du haut). La sécrétion de TNF suite au traitement au LPS est également similaire entre les lignées, ne montrant pas de dérégulation de la voie NF-κB dans les cellules, et confirmant l'efficacité du signal de *priming* pour toutes les cellules (figure 5.1 B, panel du bas).

En conclusion, l'étude phénotypique des lignées U937 exprimant le mutant NLRP3 K377R n'a pas permis de révéler une dérégulation des mécanismes d'activation de l'inflammasome chez ce mutant.

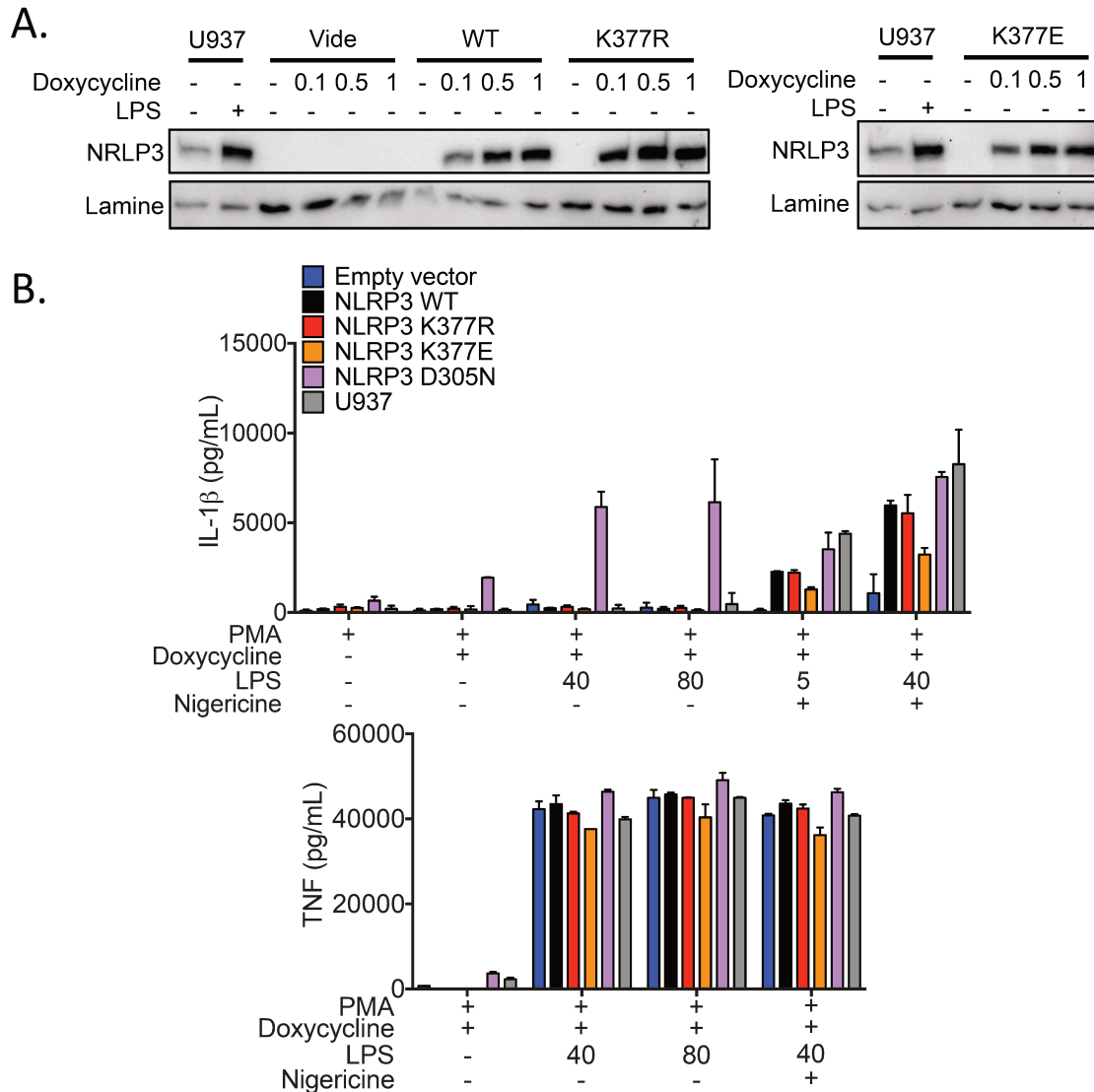


Figure 5.1 – Les mutants *NLRP3* K377R et K377E ne sécrètent pas d'IL-1 β suite au traitement au LPS, contrairement au mutant CAPS D305N. Les cellules U937 sauvages et *NLRP3* KO reconstituées rétroviralement avec différents mutants de *NLRP3* sous le contrôle d'un promoteur inducible par la doxycycline ont été différenciées à la PMA (50 ng/ml) pendant 16h. A. Les cellules U937 sauvages ont ensuite été traitées au LPS pendant 3h (40 ng/ml) et les cellules reconstituées ont été traitées avec différentes doses de doxycycline (indiquées en μ g/ml). Les lysats cellulaires ont été analysés par western blot. B. Les cellules ont été traitées à la doxycycline (0,5 μ g/ml, 1h), puis au LPS (doses indiquées en ng/ml, 3h) et enfin à la nigéricine (15 μ g/ml, 1h). Les surnageants ont ensuite été analysés par test ELISA.

5.2 Construction et géotypage des souris *Nlrp3*^{K373R/K373R}

Des souris *Nlrp3*^{K373R/K373R} ont été préalablement générées via la technique de CRISPR/Cas9 au laboratoire selon une méthode similaire à celle utilisée lors de la création des souris *Nlrp3*^{K568R/K568R}. L'utilisation d'une matrice erronée comme modèle lors de la réparation des cassures de l'ADN faite par l'enzyme Cas9 a permis l'insertion de plusieurs mutations : C1071A, mutation silencieuse (L357L) mais permettant une invalidation du premier site PAM; A1118G, conduisant à la mutation faux sens K373R; G1122A, mutation silencieuse (R374R) permettant à la fois une invalidation d'un deuxième site PAM et l'insertion d'un site de restriction MboII, utilisé lors du géotypage.

De la même façon que lors de la création des souris *Nlrp3*^{K568R/K568R}, l'efficacité des ARN guides utilisés et le géotypage ont été validés avant la construction des souris. Les ARN guides ont été choisis à l'aide site <http://crispr.mit.edu/>. Ils ont ensuite été clonés dans le vecteur px458, qui contient en outre la séquence codant pour la GFP et la protéine Cas9. Ce vecteur a été introduit par électroporation dans des BMDM immortalisés (iBMDM). Les cellules effectivement électroporées ont ensuite été triées (cellules positives pour la GFP) puis cultivées individuellement. L'ADN de chaque clone a ensuite été extrait et séquencé autour du site d'intérêt, c'est-à-dire autour du site où l'on cherche à introduire les mutations. Les PCR utilisées pour le géotypage (détails ci-après) ont été validées *in vitro* grâce à l'utilisation de BMDM immortalisés *Nlrp3* KO qui ont été reconstitués rétroviralement avec *Nlrp3* sauvage ou *Nlrp3* contenant les mutations C1071A, A1118G et G1122A. L'ADN de ces cellules a ensuite été extrait et les PCR utilisées lors du géotypage ont été mises au point.

Les souris ont été géotypées par deux méthodes différentes, afin de limiter les erreurs. Une première méthode consiste en la réalisation de deux PCR dites spécifiques. Elles permettent d'amplifier de manière spécifique soit la séquence d'ADN sauvage, soit celle contenant la mutation. Ici, nous avons utilisé une amorce anti-sens commune pour les deux PCR. A l'inverse, l'amorce sens sera complémentaire soit de la séquence sauvage, soit de la séquence mutée, ce qui permettra l'amplification de l'une ou de l'autre séquence (figure 5.2 A, panel de gauche). Une deuxième méthode utilisée en complément est aussi basée sur la réalisation d'une PCR. Cette PCR permet d'amplifier la région d'ADN autour des mutations insérées, grâce à l'utilisation d'amorces complémentaires de séquences situées de part et d'autre des mutations. De plus, le site de restriction MboII ajouté lors de l'invalidation du site PAM n'est pas présent dans la séquence d'ADN sauvage amplifiée par cette PCR. Ainsi, la digestion par MboII du produit de PCR permet d'identifier les séquences sauvages ou mutées (figure 5.2 A, panel de droite).

Les embryons de souris de souche C57BL6/J ont été micro-injectés avec les ARN guides, la matrice d'ADN erronée et l'ARN messenger de la protéine Cas9, puis implantés dans une mère porteuse. Parmi les treize souriceaux nés, un seul était chimérique (figure 5.2 B). Cette souris chimérique a été croisée avec une souris C57BL6/J sauvage. Les souris

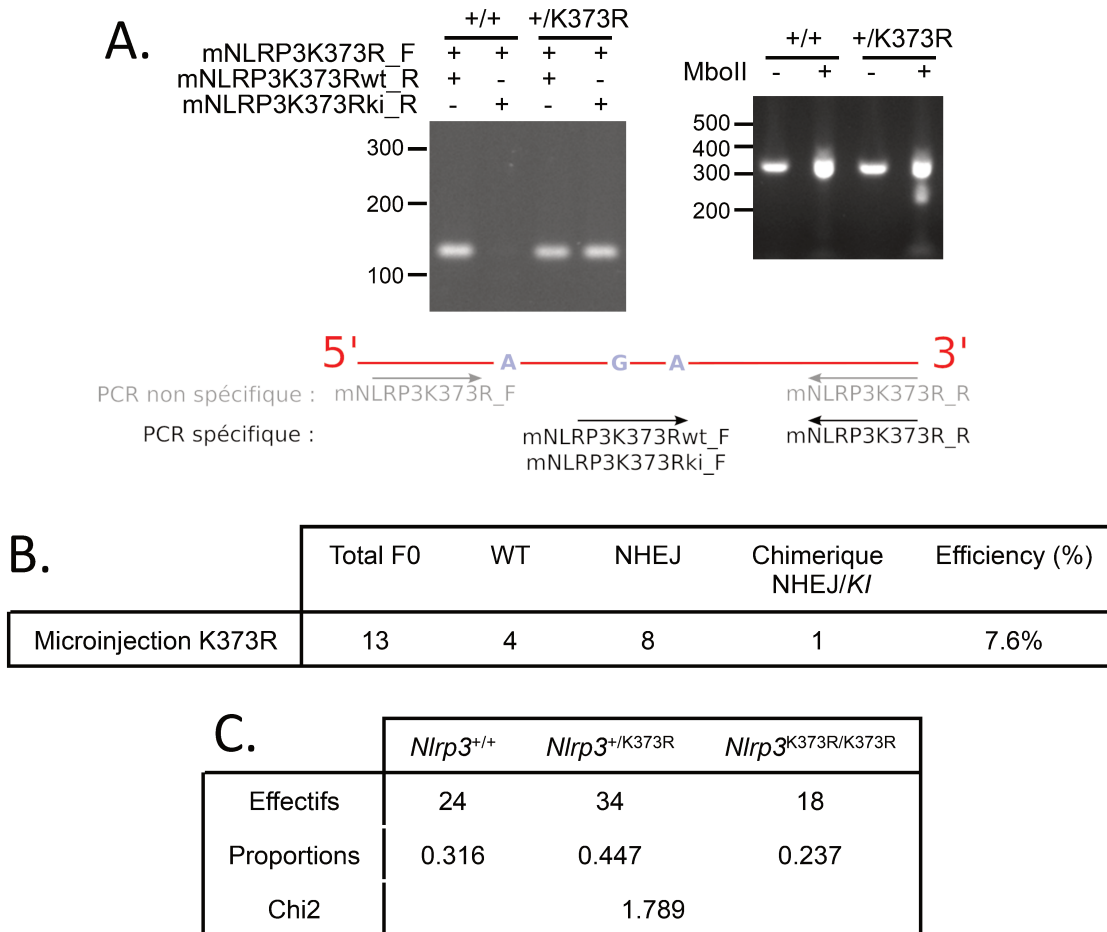


Figure 5.2 – **Génération des souris *Nlrp3*^{K373R/K373R} knock-in.** A. Génotypage des souris mutantes. Le panel du bas représente les mutations insérées dans l'ADN (de 5' en 3' : C1071A, A1118G et G1122A) ainsi que les amorces utilisées pour les PCR des panels du haut. Le génotypage se fait d'une part par une PCR dite spécifique (panel en haut à gauche). Grâce à des amorces de PCR spécifiques (en noir dans le panel du bas) de l'ADN sauvage ou mutant, les séquences sauvages ou mutantes seront spécifiquement amplifiées. D'autre part, la séquence d'ADN contenant la mutation est amplifiée par PCR (amorces en gris sur le panel du bas), puis l'enzyme de restriction MbolI est utilisée pour digérer les produits de PCR obtenus. Seules les séquences mutées seront digérées, du fait de l'insertion de ce site de restriction en même temps que l'invalidation du site PAM. B. Efficacité du CRISPR/Cas9 par microinjection. C. Proportions des différents génotypes obtenus après croisement de souris hétérozygotes. Le test du χ^2 de 1,789 (<3,84) ne montrant pas de différences significatives de transmission de l'allèle muté par rapport à une transmission mendélienne.

hétérozygotes obtenues ont été croisées de nouveau avec des souris C57BL6/J sauvages et ainsi de suite pendant 2 et 5 générations avant de pouvoir être croisées entre elles pour obtenir des souris homozygotes pour la mutation utilisées dans les expériences *in vitro* et *in vivo* respectivement. Ceci permet d'éliminer toutes les mutations non voulues qui auraient pu apparaître en même temps que les mutations voulues. Les croisements des souris ont révélé une transmission de l'allèle muté au fil des générations suivant les lois de Mendel (figure 5.2 C). De plus, les souris homozygotes pour la mutation ne montrent pas de phénotype auto-inflammatoire spontané, ni de létalité particulière par rapport aux souris sauvages.

5.3 Etude du phénotype inflammatoire des BMDM *Nlrp3*^{K373R/K373R}

5.3.1 Etude de la sécrétion d'IL-1 β

La première étape dans la caractérisation du phénotype associé à la mutation NLRP3 K373R a consisté à analyser la réponse des BMDM mutés suite à leur exposition à différents stimuli. Les BMDM *Nlrp3*^{+/+} ou *Nlrp3*^{K373R/K373R} synthétisent la protéine NLRP3 en quantité similaire suite à l'exposition au LPS (figure 5.3 A). De plus, le traitement au LPS pendant 8h des BMDM *Nlrp3*^{K373R/K373R} entraîne une faible mais reproductible sécrétion d'IL-1 β (Figure 5.3 B). Les BMDM *Nlrp3*^{+/K373R} affichent quant à eux un phénotype intermédiaire de sécrétion d'IL-1 β (Figure 5.3 B). Ces résultats sont très similaires à ceux observés dans les BMDM *Nlrp3*^{K568R/K568R}.

D'autre part, une expérience très préliminaire et qui nécessite d'être répétée a montré que des temps d'incubation avec le LPS plus long (24h ou 48h) permettaient d'augmenter la quantité d'IL-1 β sécrétée par les BMDM *Nlrp3*^{K373R/K373R} (figure 5.3 C). Ici, contrairement aux BMDM *Nlrp3*^{K568R/K568R}, la sécrétion d'IL-1 β continue d'augmenter à 48h par rapport à 24h de temps de *priming* (figure 5.3 C).

Enfin, les cellules ont été traitées avec les deux signaux d'activation de l'inflammasome. Là encore, les résultats présentés sont préliminaires et nécessitent d'être confirmés. Aucune différence de sécrétion d'IL-1 β n'a pu être mise en évidence suite au traitement des cellules avec du LPS, suivi d'un traitement avec de la nigéricine, de l'ATP ou du HLLoMe (figure 5.3 D). Par contre, il semble qu'il y ait une sécrétion d'IL-1 β deux à trois fois plus importante dans les BMDM *Nlrp3*^{K373R/K373R} par rapport aux BMDM *Nlrp3*^{+/+} lorsque ceux-ci sont activés avec les cristaux de MSU ou de silice (figure 5.3 D).

5.3.2 Etude de la pyroptose

L'activation de l'inflammasome par le premier et second signal permet le clivage des pro-cytokines cytosoliques ainsi que de la gasdermine-D, dont le fragment N terminal gé-

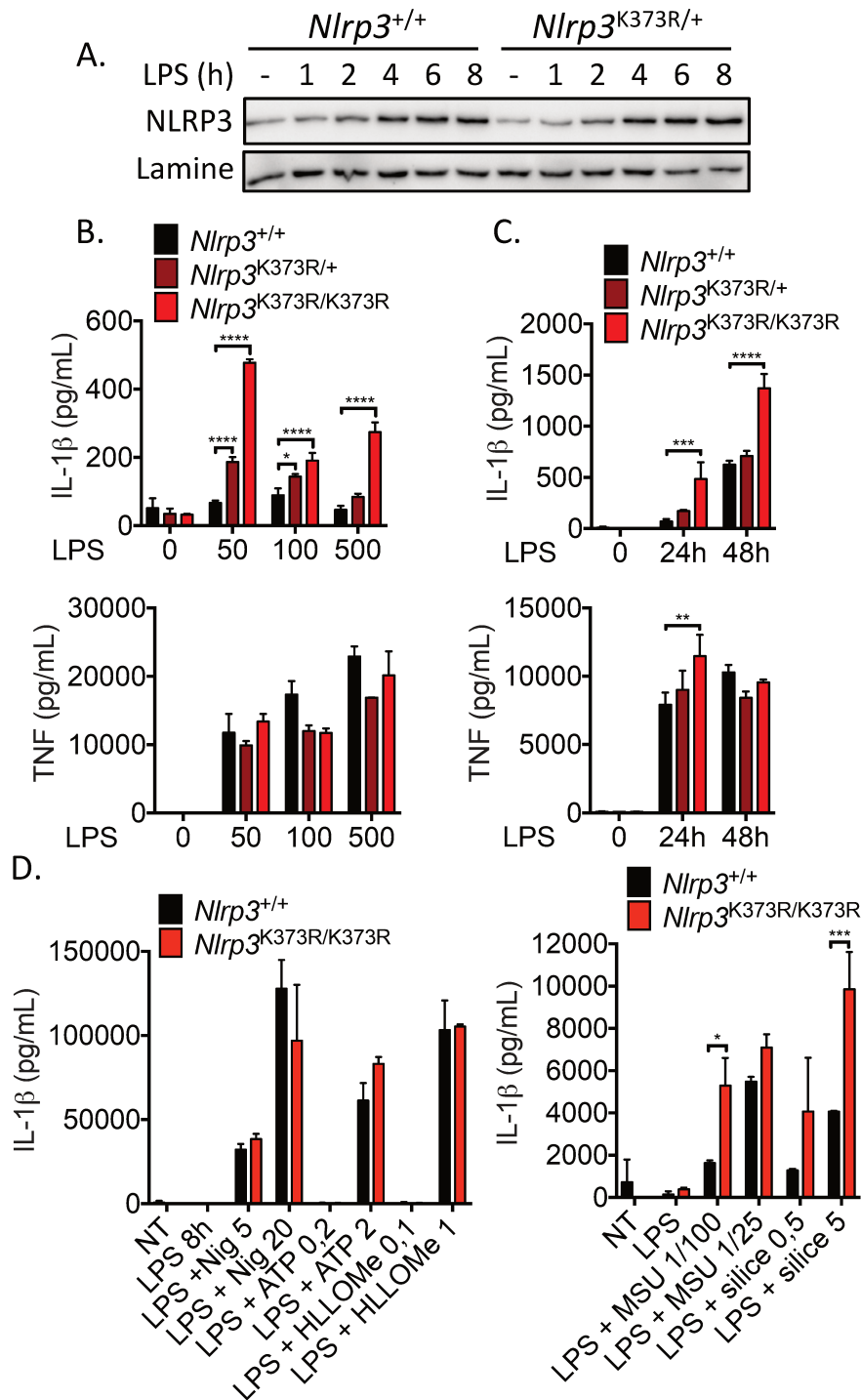


Figure 5.3 – Les BMDM $Nlrp3^{K373R/K373R}$ sécrètent de l'IL-1 β suite *priming* par le LPS. A. Les BMDM ont été traités au LPS (50 ng/ml, temps indiqués sur le graphique), puis la quantité de NLRP3 dans les lysats cellulaires a été analysée par western blot. B et C. Les BMDM ont été traités au LPS pendant 8h à différentes doses (B) ou au LPS à 50 ng/ml pendant différents temps (C), puis les surnageants ont été récupérés et analysés par test ELISA. D. Les BMDM ont été traités au LPS pendant 8h puis avec différents signaux d'activation (Nig : nigéricine, en μ g/ml, 1h; ATP en mM, 30 min; HLLoMe en mM, 1h; MSU : monosodium urate, 1/100 correspond à 0,05 mg/ml et 1/25 à 0,2 mg/ml, 16h; silice en μ g/ml, 16h). Les surnageants ont ensuite été récupérés et analysés par test ELISA. Les analyses statistiques ont été faites grâce à une ANOVA bivariée (* : p < 0.05; ** : p < 0.005; *** : p < 0.0002; **** : p < 0.0001).

néeré forme des pores dans la membrane plasmique des cellules. Ces pores permettent le relargage des cytokines et sont également nécessaires mais pas suffisants pour le déclenchement de la mort cellulaire par pyroptose [89, 149, 153, 155].

Nous avons donc essayé d'observer la formation des pores dans la membrane plasmique des cellules. Pour cela, l'incorporation de Yopro et d'iodure de propidium a été suivie au cours du temps par microscopie après le traitement des cellules au LPS. En effet, ces marqueurs sont capables d'entrer dans les cellules qui ont été perméabilisées et plus précisément ils sont assez petits pour passer à travers les pores de gasdermine-D [103, 320, 321]. Pour les deux doses de LPS utilisées (5 ng/ml et 100 ng/ml), nous n'avons pas pu mettre en évidence l'incorporation de l'un ou l'autre des marqueurs (figure 5.4).

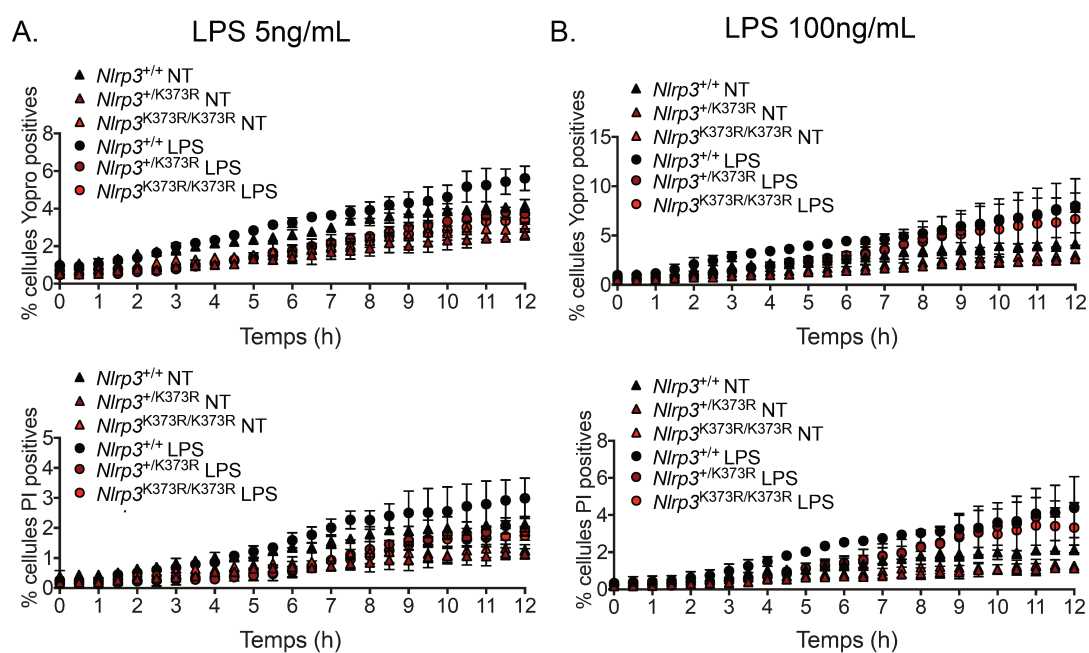


Figure 5.4 – Suivi de la perméabilisation cellulaire après le traitement des BMDM au LPS. A. et B. Les BMDM ont été incubés avec du Yopro (panels du haut) ou de l'iodure de propidium (panels du bas), puis traités au LPS à 5 ng/ml (A) ou 100 ng/ml (B). L'incorporation des colorants a été suivie par microscopie (l'axe des abscisses indique les temps après ajout de LPS).

Etant donné que le mutant $NLRP3^{K373R}$ semble être plus sensible à l'activation que $NLRP3^{WT}$, l'hypothèse d'une activation plus rapide de l'inflammasome suite aux signaux de *priming* et d'activation peut être posée. La cinétique d'activation du mutant $NLRP3^{K373R}$ a donc été déterminée. Pour cela, nous avons suivi l'incorporation des marqueurs Yopro et iodure de propidium au cours du temps après stimulation des cellules déjà pré-activées avec différents signaux activateurs. Ceci n'a pas permis de mettre en évidence des différences de cinétique d'incorporation (figure 5.5), sauf éventuellement un léger retard dans la perméabilisation des BMDM $Nlrp3^{K373R/K373R}$ traités au LPS et à la nigéricine par rapport aux BMDM $Nlrp3^{+/+}$ (figure 5.5 B). Cependant, il est important de noter que ces expériences sont encore préliminaires et nécessitent d'être confirmées. D'autre part il aurait été intéressant de suivre la perméabilisation suite au traitement au MSU ou à la silice

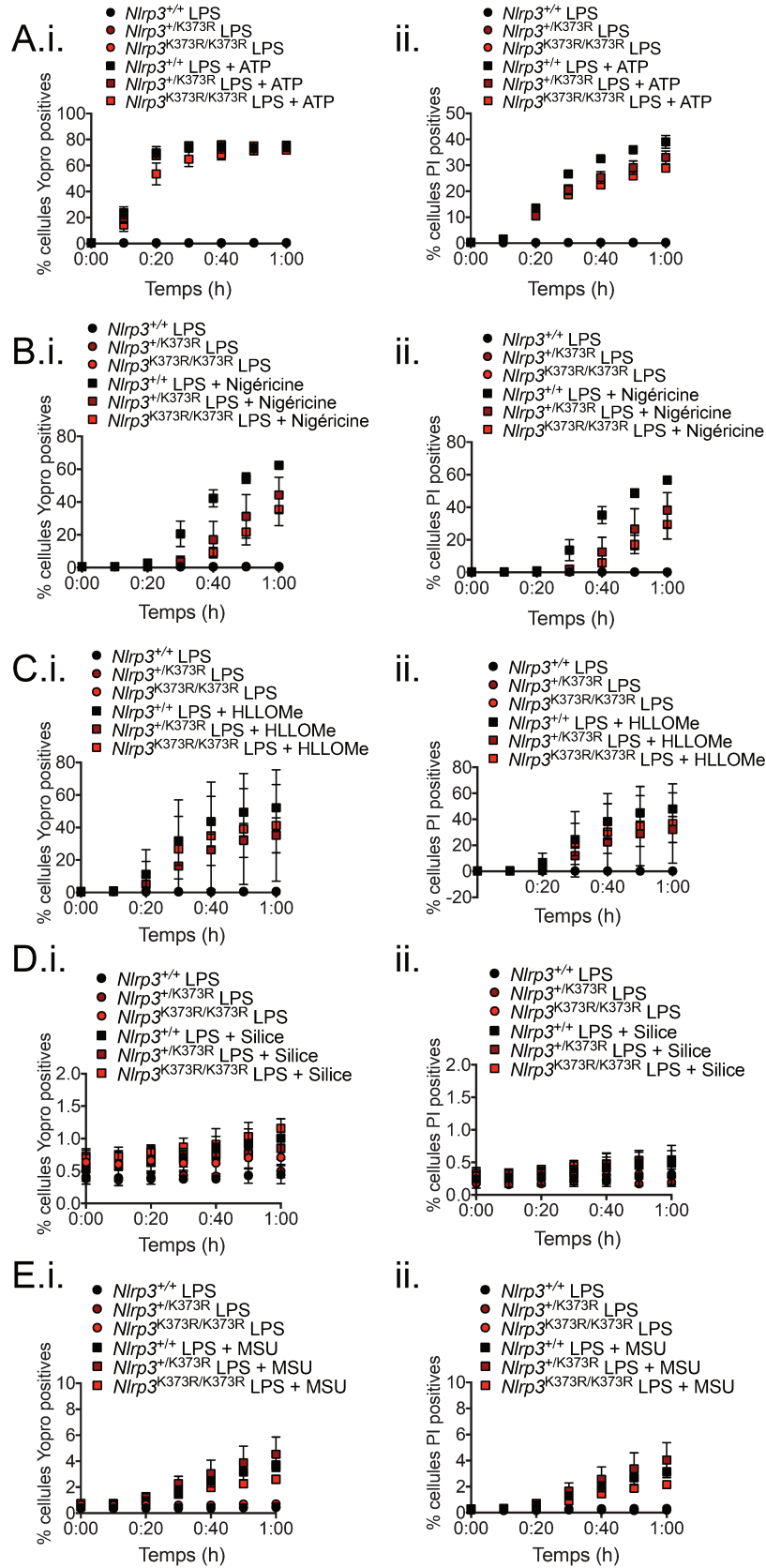


Figure 5.5 – Suivi de la perméabilisation cellulaire après activation de l'inflammasome dans les BMDM *Nlrp3*^{K373R/K373R}. Les BMDM ont été pré-activés au LPS pendant 3h, puis ils ont été incubés avec le Yopro-1 (i) ou l'iodure de propidium (ii) pendant 1h. Ils ont ensuite été traités avec les activateurs de l'inflammasome (A. ATP; B. Nigéricine; C. HLLOMe; D. Silice; E. MSU) et l'incorporation des colorants a été suivie par microscopie (le temps en abscisse indique le temps après ajout de l'activateur).

sur des temps plus longs (6h au minimum), étant donné que ces signaux mettent plus de temps à agir que la nigéricine ou l'ATP (figure 5.5 D et E).

Ces études préliminaires concernant le mutant NLRP3 K373R ont permis de révéler une légère sécrétion d'IL-1 β suite au *priming* des BMDM par le LPS. Cependant, ceci se produit sans perméabilisation de la membrane plasmique des cellules.

5.4 Etude de la liaison à l'ATP

Nous recherchons dans cette partie le mécanisme moléculaire du contrôle de l'activation de NLRP3 par l'ubiquitination du résidu K377. NLRP3 est une protéine qui possède une activité ATPase, activité qui est nécessaire au recrutement et à l'oligomérisation d'ASC et qui active la caspase-1 [75]. Cette activité ATPase est permise grâce à deux motifs structuraux localisés dans le domaine NACHT de NLRP3 : les motifs Walker A et Walker B. Le premier permet la liaison à l'ATP et le second l'hydrolyse de l'ATP. Ces motifs correspondent aux résidus d'acides aminés 226 à 233 et 296 à 310 respectivement (chez l'homme) [68, 75]. Nos collaborateurs Olivier Walker et Maggy Hologne ont modélisé la structure du domaine NACHT de NLRP3 en se basant sur la structure connue du domaine NACHT de NLRC4 (figure 5.6). Cette modélisation nous a mené à proposer l'hypothèse suivante : un encombrement stérique dû à la présence de l'ubiquitination du résidu lysine K377 empêcherait l'accès de l'ATP à son site de liaison sur NLRP3 et permettrait donc d'inhiber l'activation de NLRP3.

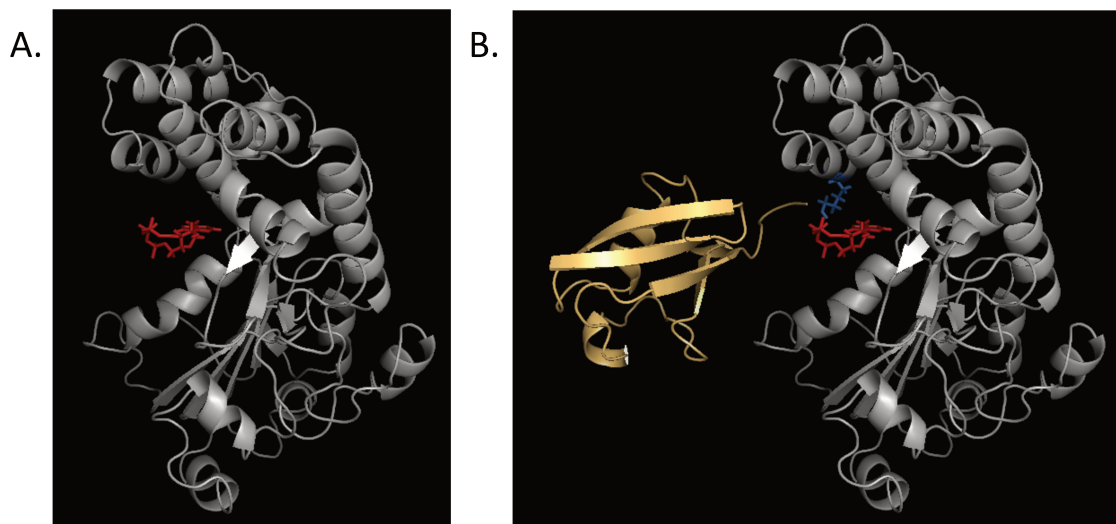


Figure 5.6 – **Modélisation de la structure du domaine NACHT.** Modèle de la structure du domaine NACHT de NLRP3, avec ou sans l'ubiquitination du résidu K373 (B et A respectivement). Le domaine NACHT est présenté en gris, la liaison isopeptidique en bleu, l'ATP en rouge et l'ubiquitine en jaune.

Afin de tester cette hypothèse, des cellules HEK293 ont été transfectées avec des vecteurs permettant l'expression de la forme humaine du domaine NACHT de NLRP3 sauvage, NLRP3 K377R ou NLRP3 K377E. Les lysats cellulaires ont ensuite été incubés avec

des billes d'agarose portant de l'ATP afin de récupérer les protéines liant l'ATP, puis les billes ont été rincées et éluées dans du tampon SB2X. De cette façon, nous avons effectivement pu confirmer la liaison de l'ATP par le domaine NACHT (figure 5.7). De plus, l'ajout d'ATP libre lors de l'incubation du lysat sur les billes montre une diminution de la quantité de NACHT récupéré par billes, confirmant la spécificité de liaison de l'ATP par le domaine NACHT (figure 5.7). Cependant, aucune différence de liaison à l'ATP n'a été constatée suite à l'utilisation des mutants NACHT K377R ou NACHT K377E par rapport à l'utilisation de NACHT WT (figure 5.7). Ces résultats semblent indiquer que l'ubiquitination du résidu K377 de NLRP3 n'empêche pas la liaison de l'ATP à NLRP3. Néanmoins, dans ces expériences, nous n'avons aucun moyen de contrôler la proportion de molécules de Flag-NACHT réellement ubiquitinée sur K377. Il est fort probable que la fraction ubiquitinée reste très faible et que cette approche ne nous permette pas d'évaluer l'impact de l'ubiquitination de K377 sur la liaison de l'ATP. Une approche alternative consisterait à mimer l'ubiquitination de NACHT sur K377 *in vitro* par *click chemistry* [322], puis de répéter cette expérience d'interaction avec l'ATP.

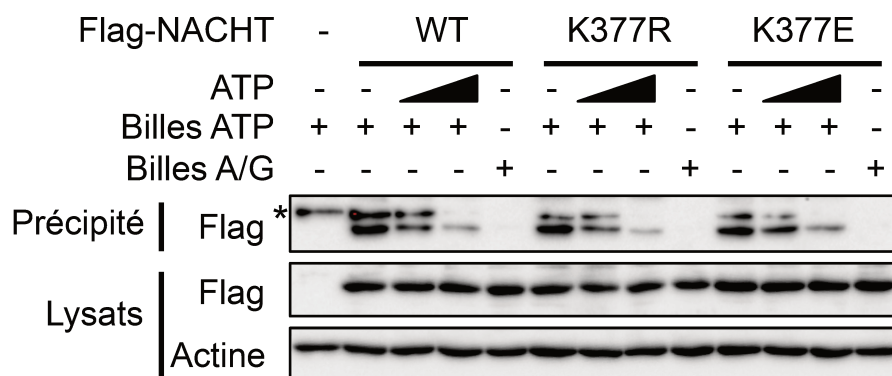


Figure 5.7 – **Ubiquitination du résidu K377 de NLRP3 ne modifie pas la liaison de l'ATP au domaine NACHT.** Les cellules 293 ont été transfectées avec un vecteur exprimant le domaine Flag-NACHT de NLRP3 (forme humaine) sauvage ou muté K377R ou K377E. Elles ont ensuite été lysées et les lysats ont été incubés soit avec des billes sur lesquelles l'ATP est fixé et auxquelles de l'ATP non lié aux billes a pu être rajouté, soit avec des billes témoins sans ATP (billes A/G). Les billes ont ensuite été rincées, puis la présence du domaine NACHT sur les billes a été révélé par western blot via l'utilisation d'un anticorps anti-Flag. En parallèle, les lysats avant incubation sur billes ont été aussi analysés par western blot. L'étoile indique une bande non spécifique.

Dans cette partie nous avons commencé à étudier le phénotype d'activation de NLRP3 K377R. Ce mutant a été utilisé pour mimer une déubiquitination constitutive du résidu K377. Après la construction de souris *knock-in*, nous avons pu mettre en évidence une légère dérégulation de l'activation de l'inflammasome associé à cette mutation. Ainsi, le signal de *priming* donné par le LPS permet aux BMDM *Nlrp3*^{K373R/K373R} de sécréter de l'IL-1 β dans de faibles proportions (environ 100 fois plus faibles que suite à l'activation de l'inflammasome par les premiers et seconds signaux) sans déclencher de perméabilisation de la membrane plasmique, donc sans pyroptose. Nous ne comprenons pas encore le mécanisme par lequel l'ubiquitination du résidu K377 permet d'empêcher l'activation de

NLRP3 suite au *priming*. Les modèles structuraux suggèrent que l'ubiquitination de K377 pourrait empêcher l'accès de l'ATP à son site de liaison sur NLRP3 mais nous n'avons pas encore réussi à vérifier cette hypothèse expérimentalement.

Chapitre 6

Discussion

Sommaire

6.1 Identification et étude des modifications post-traductionnelles de NLRP3 en lignées cellulaires	137
6.1.1 Identification des résidus modifiés post-traductionnellement sur NLRP3	137
6.1.2 Etude des lignées cellulaires exprimant NLRP3 muté	139
6.2 Etude de l'activation du mutants NLRP3 K568R dans les macrophages primaires de souris	141
6.3 Etude de l'activation du mutant NLRP3 K373R exprimé dans les macrophages primaires de souris	142
6.4 Discussion générale et conclusion	144

6.1 Identification et étude des modifications post-traductionnelles de NLRP3 en lignées cellulaires

6.1.1 Identification des résidus modifiés post-traductionnellement sur NLRP3

Les travaux menés ont permis d'identifier par spectrométrie de masse de nouveaux sites de modifications post-traductionnelles sur NLRP3 murin : six résidus lysines ont ainsi été détectés comme porteurs d'ubiquitination (K285, K373, K426, K506, K543, K568) et deux résidus sérines porteurs de phosphorylation (S157, S685). A part la lysine K543 et la sérine S685, ces résidus sont conservés entre la souris et l'homme.

Deux méthodes différentes ont été utilisées pour détecter les modifications post-traductionnelles portées par NLRP3. Une première méthode a utilisé des BMDM immortalisés *Nlrp3* KO reconstitués lentiviralement avec NLRP3-Flag. Dans ce système, NLRP3-Flag est surexprimé, ce qui permet d'obtenir de grandes quantités de protéines, essentielles pour l'analyse par spectrométrie de masse. En revanche, la présence de l'étiquette Flag, l'utilisation de cellules immortalisées et la surexpression de la protéine sont autant de biais qui pourraient induire des modifications post-traductionnelles non présentes dans des conditions physiologiques ou à l'inverse qui pourraient réduire la quantité de modifications présentes en conditions physiologiques. La deuxième méthode a également utilisé des BMDM immortalisés, ce qui maintient le biais de l'utilisation de lignées cellulaires. Néanmoins, ces cellules expriment *Nlrp3* endogène ce qui élimine les éventuels artefacts de surexpression et d'étiquetage de la protéine NLRP3.

Lors de la mise en place de cette deuxième méthode, les modifications du statut d'ubiquitination des protéines induites suite à l'activation de l'immunité cytosolique par une infection bactérienne ont été recherchées. Ainsi, l'ubiquitome des BMDM immortalisés a été analysé après infection de ces cellules par la bactérie *Francisella tularensis novicida*, de souche WT U112 ou de souche Δ FPI. La souche WT s'échappe du phagosome et entre dans le cytosol après la phagocytose. Elle peut ainsi activer l'immunité cytosolique. Au contraire, la souche Δ FPI reste dans le phagosome [296, 297]. Quatre résidus lysines de NLRP3 ont été détectés comme porteurs d'ubiquitine(s) lors de ces études. L'ubiquitination des résidus lysine K285 et K543 ne semble pas être corrélée avec l'infection par U112 ou Δ FPI. Ces résultats indiqueraient que la mise en place de la réponse immunitaire cytosolique n'implique pas un changement d'ubiquitination de ces résidus. Cependant, le fait que ces résidus lysines aient été identifiés comme étant porteur d'une ubiquitination reste un résultat intéressant, c'est pourquoi nous avons quand même cherché à étudier l'impact de la modification de ces résidus par la suite. En effet, selon la voie de signalisation utilisée pour activer l'inflammasome, des modifications post-traductionnelles différentes peuvent être impliquées. Ainsi, la modification de ces résidus pourrait être importante dans une autre voie que celle déclenchée lors d'une infection bactérienne. Le

résidu lysine K426 a été trouvé ubiquitiné dans le cas de l'infection par Δ FPI mais pas par U112. Ces résultats indiquent que l'entrée dans le cytosol de la bactérie entraîne une déubiquitination de ce résidu. Ceci appuie notre hypothèse selon laquelle l'activation de NLRP3 nécessite sa déubiquitination. A l'inverse, le résidu K506 est ubiquitiné lors de l'infection par la souche U112 mais déubiquitiné lors de l'infection par la souche Δ FPI. Ces résultats sont en apparente contradiction avec notre hypothèse. Cependant, l'activation de l'inflammasome est un phénomène complexe, qui peut certes impliquer une déubiquitination globale de la protéine [76, 118, 184, 186, 187, 192] mais une ubiquitination sur certains résidus ne peut pas être exclue.

D'autre part, *Francisella tularensis novicida* n'active pas l'inflammasome NLRP3 dans les cellules murines [309]. Or, l'analyse par spectrométrie de masse a permis de révéler des différences d'ubiquitination de NLRP3 entre une infection par la souche U112 (WT) et la souche Δ FPI (prisonnière du phagosome) dans des BMDM immortalisés, cellules murines. Ceci indique que même si l'inflammasome NLRP3 n'est pas activé par la bactérie, NLRP3 est quand même modifié. C'est donc soit un senseur potentiel de la présence de la bactérie, soit une cible collatérale de l'activation de l'immunité cytosolique.

Exceptés les résidus lysines K373 et K568, les autres sites détectés comme étant porteurs de modifications post-traductionnelles ne correspondent pas à des sites mutés chez les patients CAPS recensés actuellement (<https://infefers.umai-montpellier.fr/web/search.php?n=4>). Cependant, ceci n'implique pas que ces sites ne seraient pas importants pour la régulation de l'activation de NLRP3 ni que leur mutation n'entraînerait pas une pathologie CAPS. En effet, toutes les mutations responsables du développement de pathologie CAPS ne sont pas connues et de nouveaux variants sont régulièrement découverts. De plus, des mutations localisées sur des résidus essentiels au contrôle de l'activation de NLRP3 peuvent être létales et ne seront donc pas visibles dans la base de donnée des variants CAPS. Enfin, certaines mutations CAPS sont localisées à proximité de résidus importants pour la régulation de l'activité de NLRP3 et non directement sur ces résidus, ce qui suffit à perturber l'activation de la protéine. C'est l'hypothèse qui a été proposée pour expliquer les mécanismes de suractivation des mutants de NLRP3 D305G et M301V, mutants responsables du développement de la pathologie CAPS. Ces mutations sont situées à proximité du résidu S295. Ce résidu contrôle l'activation de NLRP3 par phosphorylation et ne fait pas partie des variants CAPS. En effet, la sérine 295 de NLRP3 est phosphorylée par la PKA suite à l'activation de l'AMPC ce qui inhibe l'activation de NLRP3 via une inhibition de son activité ATPase [195].

Pour finir, nous avons également recherché si NLRP3 était modifié par SUMOylation. Aucune SUMOylation de NLRP3 n'a pu être détectée suite au *priming* des BMDM par le LPS. Il serait intéressant de rechercher la SUMOylation de NLRP3 dans les macrophages au repos (sans traitement) ainsi que suite au signal d'activation. En effet, il est impossible de savoir ici si le traitement au LPS induit la désSUMOylation de NLRP3 ou si NLRP3 n'est en fait jamais SUMOylé ou si inversement le traitement par les signaux activateurs de

NLRP3 entraîne sa SUMOylation. Contrairement à nos observations, une publication récente a montré que l'activation de NLRP3 entraîne sa désSUMOylation [193]. Cette étude a utilisé des BMDM immortalisés (lignée cellulaire) exprimant NLRP3-Flag et des cellules HEK293T transfectées avec NLRP3-Flag alors que nous avons utilisé des iBMDM et purifié NLRP3 endogène. Ceci pourrait expliquer ces résultats contradictoires. Comme lors de l'étude de Barry et al., un anticorps détectant SUMO2 et 3 a été utilisé [193]. En effet, SUMO2 est le SUMO le plus abondant dans les cellules [299]. L'utilisation d'un anticorps détectant SUMO1 pourrait préciser ces résultats.

6.1.2 Etude des lignées cellulaires exprimant NLRP3 muté

Afin d'étudier l'impact de ces modifications post-traductionnelles sur le fonctionnement de NLRP3, des cellules *NLRP3* KO humaines et murines ont été reconstituées avec différents mutants de NLRP3 à l'aide de vecteurs lentiviraux. Les sites modifiés ont été remplacés par des résidus d'acides aminés aux propriétés proches afin de ne pas modifier la structure de la protéine. Ainsi, les lysines ont été remplacées par des arginines ce qui empêche leur ubiquitination, et les sérines ont été mutées en alanine ou en acide aspartique pour mimer respectivement une déphosphorylation ou une phosphorylation constitutive. La phosphorylation constitutive aurait aussi pu être mimée par une mutation du résidu sérine en acide glutamique. Ainsi, concernant l'ubiquitination, seul l'état déubiquitiné peut être mimé par mutagenèse. Une solution pour pouvoir étudier l'état ubiquitiné d'un résidu de protéine est d'utiliser un outil appelé « click chemistry ». Cette technique permet d'ubiquitiner *in vitro* un résidu lysine spécifique de manière irréversible [322].

L'expression de *NLRP3* dans ces cellules est sous le contrôle d'un promoteur inducible par la doxycycline. Ceci permet de contrôler les niveaux d'expression du gène et d'éviter ainsi une surexpression. En effet, la surexpression de NLRP3 permet de s'affranchir du signal de *priming* [115, 116, 289], autorisant ainsi le signal d'activation d'être suffisant pour activer l'inflammasome. Or, nous voulons ici étudier le rôle des modifications post-traductionnelles de NLRP3 dans les phases de *priming* et d'activation. La quantité de protéine NLRP3 produite dans le système utilisé est semblable à celle induite par un traitement des cellules WT au LPS ce qui confirme que nous sommes dans des conditions permettant l'étude du *priming* et de l'activation.

Les résultats obtenus en stimulant les différentes lignées cellulaires exprimant les mutants de NLRP3 avec des composés activateurs de l'inflammasome ou avec plusieurs bactéries n'ont pas permis de détecter une sécrétion d'IL-1 β significativement différente entre les cellules exprimant les mutants de NLRP3 et les cellules exprimant NLRP3 WT. Cependant, les quantités d'IL-1 β sécrétées par les lignées cellulaires, et notamment les BMDM immortalisés, sont environ dix fois plus faibles que celles sécrétées par les cellules primaires (BMDM). Ainsi, si un faible phénotype d'activation existe dans les mutants

suite au traitement au LPS seul celui-ci peut être masqué, notamment s'il est situé sous le seuil de détection du test ELISA. Les lignées cellulaires sont donc plutôt un outil permettant d'étudier des phénotypes forts, comme il a été fait dans la section 5.1 où des mutants CAPS (comme D305N par exemple) sont utilisés comme contrôles positifs, mais limitant pour l'étude de phénotypes plus modérés. Enfin, l'étude présentée a recherché un phénotype en s'intéressant uniquement à la sécrétion d'IL-1 β . Or une autre conséquence importante de l'activation de l'inflammasome est le déclenchement de la pyroptose. Bien que ces deux phénomènes soient souvent co-induits lors de l'activation de l'inflammasome, des études récentes mettent en avant leur découplage possible [147, 148, 151, 323]. Des données concernant le déclenchement de la pyroptose dans les cellules exprimant les formes mutantes de NLRP3 auraient pu enrichir l'étude phénotypique menée.

Les recherches menées à partir des lignées cellulaires permettent d'obtenir des données rapidement puisqu'un mois environ est nécessaire pour construire des lignées cellulaires mutantes. Elles permettent donc de savoir rapidement quel mutant de NLRP3 a un phénotype et si celui-ci est suffisamment prononcé avant de générer des souris *knock-in*, processus long (six mois à un an), coûteux, et éthiquement discutable. Cependant, les cellules transduites ne sont soumises à aucune pression de sélection. Ainsi, elles ont tendance à exprimer de moins en moins les gènes transduits au fur et à mesure des passages. Ceci peut s'expliquer par une perte des gènes transduits ou par une sélection au fil des passages des cellules n'ayant pas été transduites (celles-ci étant forcément présentes suite aux erreurs de tri cellulaire) si celles-ci se multiplient plus vite ou ont moins tendance à mourir que les cellules qui ont été transduites. Afin d'éliminer ce problème, il pourrait être utile de rajouter une résistance à un antibiotique (puromycine, G418...) lors de la transduction afin d'ajouter une pression de sélection. De plus, beaucoup de gènes et processus cellulaires sont dérégulés dans ces lignées. Notamment, les BMDM immortalisés produisent en permanence le virus qui a servi à les immortaliser, qui peut donc réinfecter les cellules continuellement et participer fortement à la dérive de celles-ci [324]. Tous ces phénomènes expliquent que les lignées cellulaires produites n'étaient pas très stables dans le temps (utilisation au maximum pendant 2 semaines), et que les résultats obtenus pouvaient être variables d'une expérience à une autre.

De nombreuses modifications post-traductionnelles de NLRP3 ont été mises en évidence par différentes études : ubiquitination, phosphorylation, S-nitrosylation, S-glutathionylation, ribosylation et SUMOylation [193, 293]. Cependant, la position exacte des résidus modifiés n'est souvent pas connue. Concernant l'ubiquitination, seul le résidu K689 a été identifié [187, 192]. L'ubiquitine ligase FBXL2, régulée négativement par le LPS, a été proposée comme étant à l'origine de cette ubiquitination qui aurait pour conséquence la dégradation de NLRP3 par le protéasome [187]. Cependant, le résidu K689 a aussi été décrit comme étant un site de SUMOylation de NLRP3, SUMOylation inhibant l'activation de l'inflammasome [193]. Il n'est pas impossible que ce site soit ubiquitiné ou SUMOylé selon les conditions. D'autre part, quatre résidus porteurs de phosphoryla-

tion ont été identifiés : la sérine 5, dont la phosphorylation inhibe le recrutement d'ASC [196] ; la sérine 194 dont la phosphorylation par JNK entraîne l'oligomérisation de NLRP3 [185], la sérine 291 dont la phosphorylation a des effets contradictoires [168, 194, 195] ; et la phosphorylation de la tyrosine Y861 par PTPN22 qui entraîne la dégradation de NLRP3 par autophagie [198]. La plupart des résidus identifiés par spectrométrie de masse dans notre étude comme étant ubiquitinés ou phosphorylés sont décrits pour la première fois. Seul le résidu sérine S157 a déjà été identifié comme porteur d'une phosphorylation [196]. De manière concordante avec nos résultats, l'étude menée par Stutz et al. n'a trouvé aucun phénotype aux mutants NLRP3 S157A et S157D.

6.2 Etude de l'activation du mutants NLRP3 K568R dans les macrophages primaires de souris

Une grande partie de la discussion concernant le mutant NLRP3 K568R est détaillée dans l'article scientifique (chapitre 4). Nous ne discuterons ici que les aspects non mentionnés auparavant.

L'étude des BMDM *Nlrp3*^{K568R/K568R} a révélé une sur-activation de ce mutant. En effet, ces cellules ont un taux de perméabilisation de la membrane plasmique plus élevé que les cellules WT quand elles sont traitées au LPS et avec un signal d'activation. D'autre part, il semble que certains signaux d'activation, et notamment les signaux cristallins, entraînent une sécrétion d'IL-1 β plus forte par les BMDM exprimant la forme mutée par rapport aux cellules exprimant la forme WT de NLRP3 (données non montrées et préliminaires). Si NLRP3 K568R est plus actif que NLRP3 sauvage, il serait intéressant pour la suite de notre étude de tester la sécrétion d'IL-1 β suite à l'activation des cellules par différentes doses d'activateurs d'une part et après différents temps d'activation d'autre part. En effet, les durées et les doses de traitements utilisées pour le moment ont été établies afin d'avoir une activation optimale de l'inflammasome sauvage.

Afin de faire une première étude large sur les voies de signalisations et les mécanismes moléculaires dans lesquels l'ubiquitination de la lysine K568 de NLRP3 est impliquée, différents inhibiteurs de l'inflammasome ont été testés. Leur utilisation est intéressante puisqu'ils permettent la réalisation d'études préliminaires dans la recherche d'un mécanisme moléculaire. Cependant, d'autres expériences doivent être réalisées afin de confirmer que les effets observés ne sont pas dus à des effets secondaires de ces composés, mal connus et peu contrôlés. Pour la plupart des inhibiteurs utilisés, nous avons observé une inhibition de la synthèse de pro-IL-1 β dans le cytosol, ce qui empêche de conclure sur l'inhibition du processus de maturation et sécrétion par le mutant NLRP3 K568R. Afin de contourner ce problème, la sécrétion de l'IL-18 ou d'IL-1 α comme marqueur de l'activation du mutant NLRP3 K568R pourrait être utilisée étant donné que la synthèse de ces deux cytokines n'est pas dépendante du signal de *priming*. Ce protocole est en cours

d'optimisation.

Nous avons également recherché la localisation subcellulaire du mutant NLRP3 K568R. En effet, une hypothèse pour expliquer l'activation du mutant serait une localisation subcellulaire différente de la forme sauvage, localisation importante pour l'activation de la protéine. Pour étudier cela, nous avons essayé d'optimiser la détection de NLRP3 par immunofluorescence, sans succès (données non montrées). Nous avons aussi tenté une méthode biochimique, le fractionnement cellulaire, toujours sans succès (données non montrées). L'étude de la littérature indique que l'immunofluorescence de NLRP3 dans les lignées cellulaires THP1 est réalisable. Ainsi, la localisation subcellulaire du mutant pourrait être étudiée dans des cellules THP1. D'autre part, l'hypothèse d'une oligomérisation de la forme mutante de NLRP3 suite au traitement au LPS est également une hypothèse permettant d'expliquer la suractivation de NLRP3 K568R. Ainsi, l'étude des oligomères de NLRP3 par migration sur gel non dénaturant pourrait être réalisée.

Enfin, nous avons cherché à déterminer l'implication de l'inflammasome non canonique dans l'activation du mutant NLRP3 K568R (données non montrées). Cependant, nous faisons face à deux problèmes pratiques : (i) lors de l'activation de l'inflammasome non canonique, le LPS qui ne serait pas entré dans le cytosol et qui pourrait activer TLR4; et (ii) lors de l'activation de TLR4, le LPS qui au contraire serait rentré dans le cytosol suite à l'électroporation et qui activerait la voie non canonique. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées afin de contourner ces difficultés. Le suivi de la sécrétion d'IL-1 β par des BMDM de génotype [*Casp11*^{-/-}; *Nlrp3*^{K568R/K568R}] et [*Casp11*^{-/-}; *Nlrp3*^{+/+}] traités au LPS extracellulaire permettrait de résoudre le premier problème. Inversement, le suivi de la sécrétion d'IL-1 β par des BMDM de génotype [*Tlr4*^{-/-}; *Nlrp3*^{K568R/K568R}] et [*Tlr4*^{-/-}; *Nlrp3*^{+/+}] activés par la transfection de LPS permettrait de résoudre le deuxième problème. Les souris correspondant à ces génotypes sont actuellement en reproduction.

6.3 Etude de l'activation du mutant NLRP3 K373R exprimé dans les macrophages primaires de souris

L'utilisation de la spectrométrie de masse a montré entre autres l'ubiquitination du résidu lysine K373 de NLRP3. Or, la mutation K377E (également numérotée K375E dans la base de données Infervers et correspondant au résidu K373 murin) a été identifiée chez une patiente CAPS de type FCAS [316]. Chez cette patiente, les symptômes inflammatoires ont commencé à l'âge de 9 ans, ce qui est inhabituel pour les patients CAPS chez lesquels la maladie se déclare généralement dans les premiers mois de la vie. Les symptômes de cette patiente sont des épisodes d'urticaire et des attaques d'arthralgie, accompagnés d'une légère augmentation de la concentration en protéine C réactive (CRP) et en protéine amyloïde A (SAA) ainsi que d'une neutrophilie. Le traitement de la patiente par l'Anakinra (antagoniste du récepteur à l'IL-1) a montré une diminution des symptômes

inflammatoires. Le traitement au Canakinumab (anticorps neutralisant anti-IL-1 β) a permis une disparition complète des symptômes ainsi qu'une normalisation des taux de SAA. Plusieurs arguments permettent de pencher en faveur d'un diagnostic CAPS : i) la mutation K377E ne fait pas partie des variants de NLRP3 retrouvés dans la population générale; ii) cette mutation est localisée dans le domaine NACHT de NLRP3, où se situent la plupart des mutations CAPS; iii) la patiente répond au traitement à l'Anakinra ou au Canakinumab; iv) le résidu K377 est évolutivement conservé. Cependant, il est important de noter que la mère de la patiente porte la même mutation K377E à l'état hétérozygote également mais ne présente aucun symptôme hormis un taux de SAA légèrement augmenté. Ceci montre que les CAPS sont des maladies dont le phénotype est à pénétrance incomplète et montre aussi l'interconnexion de facteurs génétiques et environnementaux dans le développement de la maladie [325].

L'étude, encore préliminaire, de l'activation de NLRP3 K373R a permis de révéler de nombreux points communs avec le phénotype d'activation du mutant NLRP3 K568R. Premièrement, le *priming* par le LPS des BMDM *Nlrp3*^{K373R/K373R} provoque une faible sécrétion d'IL-1 β . Celle-ci est similaire en terme de quantité, de cinétique et de dose de LPS utilisées pour une sécrétion optimale à celle détectée suite au *priming* des BMDM *Nlrp3*^{K568R/K568R}. Deuxièmement, une augmentation de la sécrétion d'IL-1 β par les BMDM *Nlrp3*^{K373R/K373R} par rapport aux BMDM sauvages a été observée lors de l'utilisation de certains seconds signaux, et notamment les cristaux (MSU et silice). Troisièmement, aucune perméabilisation des BMDM *Nlrp3*^{K373R/K373R} n'a été détectée suite au *priming*. Il ne nous a pas semblé nécessaire de poursuivre l'étude sur la détection de la pyroptose pour deux raisons. D'une part ce processus n'a pas lieu sans la formation des pores [89, 149, 153, 155]. D'autre part nous avons rencontré des difficultés lors de la détection de la pyroptose par le test LDH, trop peu sensible, dans l'étude du mutant NLRP3 K568R. Il est probable qu'un tel problème se pose de nouveau avec le mutant NLRP3 K373R.

Cependant, contrairement aux BMDM *Nlrp3*^{K568R/K568R}, les BMDM *Nlrp3*^{K373R/K373R} sécrètent de l'IL-1 β en quantité croissante après 8h, 24h, ou 48h de stimulation au LPS, ce qui semblerait indiquer que NLRP3 K373R ne serait pas sensible à un contrôle négatif de son activation. Il serait donc très intéressant de répéter cette expérience, d'une part pour confirmer ces résultats, mais aussi pour y inclure des temps de *priming* plus longs, allant jusqu'à 96h pour voir si la sécrétion d'IL-1 β continue encore d'augmenter, comme observé quand les macrophages sont dans un état d'hyperactivation [151].

Enfin, nous avons pu montrer que la liaison de l'ATP ne semblait pas être impactée par l'ubiquitination du résidu NLRP3 K373. Cependant, dans ces expériences, nous n'avons pas vérifié qu'une proportion significative de domaines NACHT sauvages était effectivement ubiquitinée sur la lysine K373. De plus, nous n'avons pas ici testé si l'hydrolyse de l'ATP était impactée par l'ubiquitination du résidu K377. En effet, le motif Walker B (responsable de l'hydrolyse de l'ATP) est plus proche du site K377 que le motif Walker A

(responsable de la fixation de l'ATP) et donc potentiellement plus impacté par l'ubiquitination de ce résidu. Il serait ainsi intéressant d'utiliser un test d'hydrolyse de l'ATP par exemple par suivi du relargage de PO_4 suite à l'incubation de NLRP3 avec du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP ou par un test ATP-Glo.

L'étude du mutant NLRP3 K373R sera poursuivie avec les mêmes questions que celles concernant l'activation du mutant NLRP3 K568R, tout au moins au début. Tout d'abord, il serait intéressant de confirmer que l'IL-1 β détecté dans le surnageant suite au signal de *priming* correspond effectivement à la forme clivée de la cytokine. La recherche du clivage de la caspase-1 et de la formation de *specks* d'ASC suite au *priming* est aussi à prévoir pour la suite. Afin de confirmer l'implication de l'ubiquitination du site K377 dans le phénotype observé du mutant, l'ubiquitination de NLRP3 dans les cellules devra être quantifiée par western blot. Ensuite, il serait aussi intéressant de rechercher les molécules impliquées dans la voie d'activation du mutant suite au *priming* afin d'éclaircir les mécanismes moléculaires de l'activation de l'inflammasome. Enfin, l'implication de la gasdermine-D dans la sécrétion d'IL-1 β suite au *priming* et la voie de sécrétion de l'IL-1 β empruntée seront analysées. Des études *in vivo* d'activation de l'inflammasome seront aussi réalisées sur les souris *knock-in* (survie suite au choc endotoxique, aux infections, étude de l'inflammation lors des désordres métaboliques...).

6.4 Discussion générale et conclusion

Le *priming* est un signal qui agit via une voie dépendante de la transcription mais également via une voie indépendante de la transcription, reposant sur des modifications post-traductionnelles de protéines. En effet, des études en lignées cellulaires ont permis de montrer que le signal de *priming* permettait la synthèse de NLRP3 [112, 115]. D'autre part, il a été montré que la surexpression de NLRP3 permettait l'activation de l'inflammasome seulement suite au signal d'activation, sans passer par le signal de *priming* [76, 116]. C'est pourquoi le rôle du *priming* était initialement restreint à un rôle transcriptionnel. Il serait donc pertinent de tester si l'activation des mutants par le *priming* ne serait pas due qu'à un effet transcriptionnel ou s'il reste encore un effet indépendant de la transcription. En d'autres termes, il serait intéressant de tester si la surexpression de NLRP3 K568R ou NLRP3 K373R ne serait pas suffisante pour induire la sécrétion d'IL-1 β . Nous nous attendons cependant à ce que l'effet indépendant de la transcription soit encore présent chez les mutants car NLRP3 n'est sans doute pas la seule protéine modifiée suite au *priming* et le résidu K568R n'est pas le seul résidu de NLRP3 modifié suite au *priming*. Néanmoins, nous ne pouvons pas utiliser de lignées cellulaires pour tester cette hypothèse. Une transfection ou une transduction de macrophages primaires *Nlrp3* KO avec un vecteur permettant l'expression des formes mutantes de NLRP3 serait peut-être une solution. En lien avec les problématiques de quantité de protéine, plusieurs études ont montré que, dans certains cas, la déubiquitination de NLRP3 permettait d'augmenter la stabilité de la pro-

téine [187] alors que son ubiquitination entraînait sa dégradation [191, 199]. L'augmentation de la quantité de protéine NLRP3 est ensuite responsable d'une augmentation de l'activité de l'inflammasome. Il serait ainsi informatif d'étudier la stabilité des protéines mutantes (K373R et K568R) par rapport à la protéine sauvage pour tester si l'activité observée suite au signal de *priming* pourrait être reliée à une augmentation de la quantité de protéine NLRP3.

Les deux mutants NLRP3 K373R et NLRP3 K568R, dont l'ubiquitination des résidus mutés ne peut plus être réalisée, ont un phénotype similaire : déclenchement de la sécrétion d'IL-1 β après signal de *priming* sans déclenchement de la pyroptose. Une étude plus poussée du mutant NLRP3 K373R nous permettra de préciser si les mécanismes d'activation sont communs pour les deux mutants. En attendant, ces observations peuvent nous conduire à l'hypothèse selon laquelle le degré d'ubiquitination de la protéine NLRP3, plutôt que le site précis de son ubiquitination, contrôle son activation. L'ubiquitination de NLRP3, augmentée suite au *priming*, empêche la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Cependant, le contrôle du déclenchement de la pyroptose ne semble pas être lié à l'ubiquitination de NLRP3. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions générer une nouvelle lignée de souris portant les deux mutations K373R et K568R sur NLRP3. Pour cela, la technique de CRISPR/Cas9, déjà réalisée auparavant pour construire les souris simple *knock-in Nlrp3*^{K568R/K568R}, serait de nouveau mise à contribution sur les souris *Nlrp3*^{K373R/K373R} ou inversement. En effet, les deux mutations sont trop proches pour pouvoir simplement réaliser des croisements entre les deux lignées de souris que nous avons déjà construites. Le rôle de l'ubiquitination de NLRP3 au cours des étapes de son activation dans différents types cellulaires est résumé dans la figure 6.1.

Pour finir, les études phénotypiques des mutants, et notamment du mutant NLRP3 K568R, ont été freinées par des difficultés techniques. En effet, le phénotype d'activation de mutant déclenché par le *priming* est faible (deux ordres de grandeur en dessous d'un phénotype d'activation des cellules sauvages suite à leur *priming* et leur activation). Par exemple, pour réussir à détecter le clivage de la pro-caspase-1 ou de la pro-IL-1 β par western blot il a fallu utiliser de grandes quantités de cellules (cinq à dix fois plus que pour des études plus classiques). De plus, beaucoup d'expériences ne sont pas réalisables parce que nous sommes sous le seuil de détection des kits utilisés, comme le test de détection de la pyroptose (test LDH). Il est donc difficile d'énoncer avec certitude que la non-détection d'un phénotype est effectivement due à son absence. Ainsi, si le double mutant NLRP3 K373R K568R a un phénotype plus prononcé que celui des simples mutants, les expériences effectuées auront des résultats plus nets, ce qui facilitera ces études. Cependant, des lignées cellulaires exprimant le double mutant NLRP3 K373R K568R ont été créées mais là encore l'activation de l'inflammasome dans ces cellules n'était pas significativement différent des cellules sauvages (données non montrées).

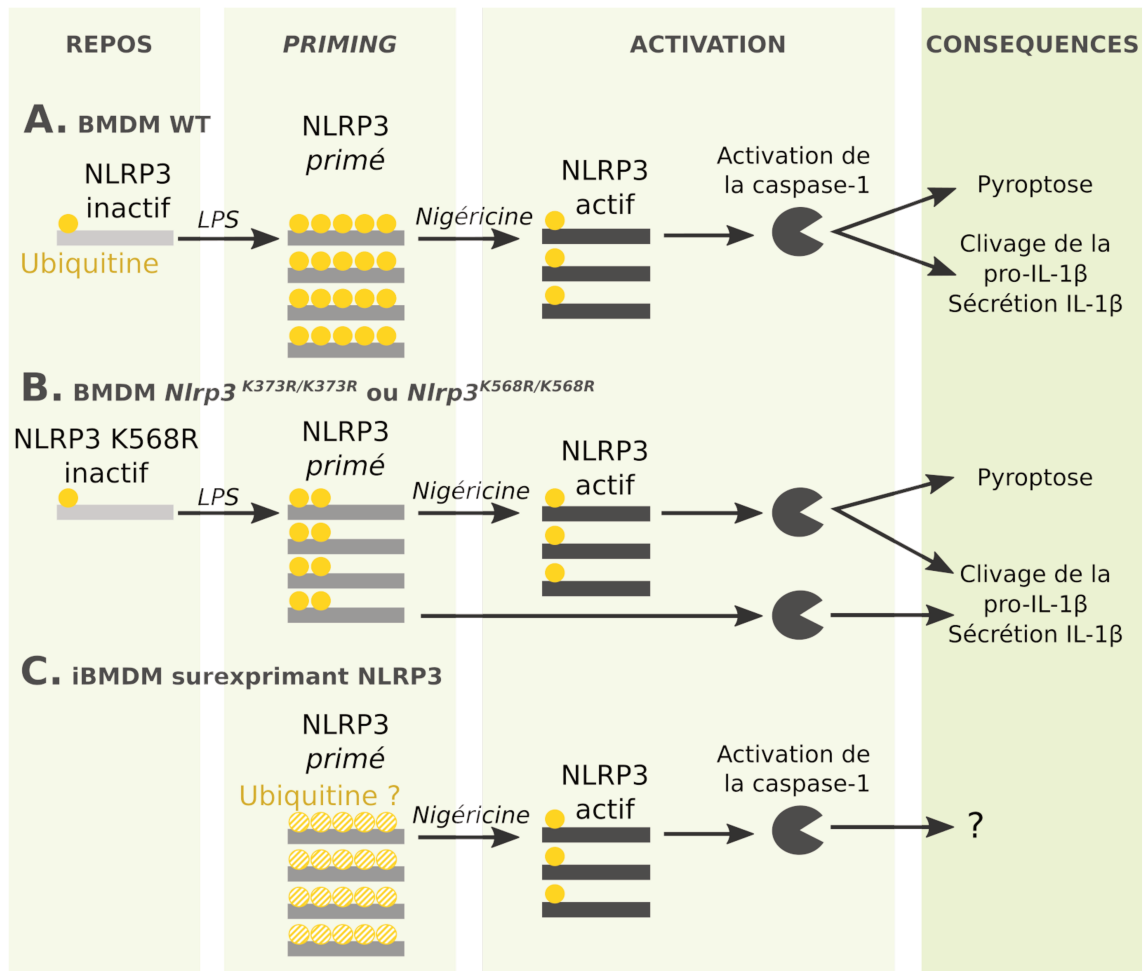


Figure 6.1 – Bilan du rôle de l'ubiquitination de NLRP3 dans l'activation de l'inflammasome. A. Les BMDM sauvages à l'état basal (colonne « repos ») expriment faiblement *Nlrp3*. De plus, cette protéine est sous forme peu ubiquitinée. Suite au signal de *priming* par le LPS (colonne « *priming* »), la synthèse et l'ubiquitination de NLRP3 augmentent, mais la protéine n'est toujours pas active. Enfin, après le signal d'activation (colonne « activation »), NLRP3 est déubiquitiné et permet l'activation de la caspase-1, puis le clivage et la sécrétion de l'IL-1 β ainsi que le déclenchement de la pyroptose. B. Dans les BMDM exprimant *Nlrp3* muté sur la lysine K568 ou K373, le signal de *priming* permet une ubiquitination plus faible de la protéine (démontré uniquement pour le mutant K568R), ce qui permet à une nouvelle voie de s'activer. Ceci conduit au clivage de la caspase-1 (démontré uniquement pour le mutant K568R) qui permet le clivage et la sécrétion de l'IL-1 β , sans entraîner le déclenchement de la pyroptose. D'autre part, la même voie que celle décrite en A est activée si le signal d'activation est donné suite au *priming*. C. Dans les lignées cellulaires surexprimant *Nlrp3*, le signal d'activation est suffisant pour permettre l'activation de la caspase-1. Cependant, ni le clivage des pro-cytokines (IL-18 ici seulement puisque le manque du signal de *priming* ne permet pas la synthèse de pro-IL-1 β), ni le déclenchement de la pyroptose n'ont été recherchés.

Chapitre 7

Références

- [1] Rocha e Silva M (1994) A brief survey of the history of inflammation. 1978. *Agents and Actions* 43(3-4) :86–90.
- [2] Kolaczowska E, Kubes P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 13(3) :159–175.
- [3] Medzhitov R, Janeway CA (1997) Innate immunity : The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91(3) :295–298.
- [4] Matzinger P (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annual Review of Immunology* 12 :991–1045.
- [5] Pradeu T, Cooper EL (2012) The danger theory : 20 years later. *Frontiers in Immunology* 3.
- [6] Medzhitov R (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449(7164) :819–826.
- [7] Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118(2) :229–241.
- [8] Kumar H, Kawai T, Akira S (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology* 30(1) :16–34.
- [9] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86(6) :973–983.
- [10] Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity : Update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* 11(5) :373–384.
- [11] Oviedo-Boyso J, Bravo-Patiño A, Baizabal-Aguirre VM (2014) Collaborative Action of Toll-Like and Nod-Like Receptors as Modulators of the Inflammatory Response to Pathogenic Bacteria. *Mediators of Inflammation* 2014.
- [12] Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140(6) :805–820.
- [13] Zhang G, Meredith TC, Kahne D (2013) On the Essentiality of Lipopolysaccharide to Gram-Negative Bacteria. *Current opinion in microbiology* 16(6) :779–785.
- [14] Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR (2002) Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection* 4(8) :837–851.

- [15] Beutler B (2000) Tlr4 : Central component of the sole mammalian LPS sensor. *Current Opinion in Immunology* 12(1) :20–26.
- [16] Kieser KJ, Kagan JC (2017) Multi-receptor detection of individual bacterial products by the innate immune system. *Nature Reviews. Immunology* 17(6) :376–390.
- [17] Ostuni R, Zanoni I, Granucci F (2010) Deciphering the complexity of Toll-like receptor signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67(24) :4109–4134.
- [18] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42(2) :145–151.
- [19] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124(4) :783–801.
- [20] Chamaillard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ (2003) Nods, Nalps and Naip : Intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cellular Microbiology* 5(9) :581–592.
- [21] Girardin SE, et al. (2003) Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science (New York, N.Y.)* 300(5625) :1584–1587.
- [22] Girardin SE, et al. (2003) Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *The Journal of Biological Chemistry* 278(11) :8869–8872.
- [23] Martinon F, Burns K, Tschopp J (2002) The inflammasome : A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular Cell* 10(2) :417–426.
- [24] Leclerc E, Fritz G, Vetter SW, Heizmann CW (2009) Binding of S100 proteins to RAGE : An update. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1793(6) :993–1007.
- [25] Hofmann MA, et al. (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis : A central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97(7) :889–901.
- [26] Yamamoto Y, et al. (2011) Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186(5) :3248–3257.
- [27] Kierdorf K, Fritz G (2013) RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *Journal of Leukocyte Biology* 94(1) :55–68.
- [28] Dinarello CA (2000) Proinflammatory Cytokines. *Chest* 118(2) :503–508.
- [29] Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A (2013) The Interleukin-1 Family : Back to the Future. *Immunity* 39(6) :1003–1018.
- [30] Di Paolo NC, Shayakhmetov DM (2016) Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nature Immunology* 17(8) :906–913.
- [31] Kim B, et al. (2013) The Interleukin-1 α Precursor is Biologically Active and is Likely a Key Alarmin in the IL-1 Family of Cytokines. *Frontiers in Immunology* 4.
- [32] Chen CJ, et al. (2007) Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nature Medicine* 13(7) :851–856.
- [33] Rider P, et al. (2011) IL-1 α and IL-1 β recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187(9) :4835–4843.

- [34] Dinarello CA (2011) Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117(14) :3720–3732.
- [35] Medzhitov R, Janeway CA (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science (New York, N.Y.)* 296(5566) :298–300.
- [36] Howard AD, et al. (1991) IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 147(9) :2964–2969.
- [37] GroßO, et al. (2012) Inflammasome Activators Induce Interleukin-1 α Secretion via Distinct Pathways with Differential Requirement for the Protease Function of Caspase-1. *Immunity* 36(3) :388–400.
- [38] Gringhuis SI, et al. (2012) Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 β via a noncanonical caspase-8 inflammasome. *Nature Immunology* 13(3) :246–254.
- [39] Maelfait J, Beyaert R (2008) Non-apoptotic functions of caspase-8. *Biochemical Pharmacology* 76(11) :1365–1373.
- [40] Miwa K, et al. (1998) Caspase 1-independent IL-1beta release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nature Medicine* 4(11) :1287–1292.
- [41] Boraschi D, Italiani P, Weil S, Martin MU (2018) The family of the interleukin-1 receptors. *Immunological Reviews* 281(1) :197–232.
- [42] Jéru I, Amselem S (2011) Inflammasome et interleukine 1. *La Revue de Médecine Interne* 32(4) :218–224.
- [43] Dinarello C, Novick D, Kim S, Kaplanski G (2013) Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein. *Frontiers in Immunology* 4.
- [44] Tseng WY, et al. (2018) TNFR signalling and its clinical implications. *Cytokine* 101 :19–25.
- [45] Gao L, Abu Kwaik Y (2000) Hijacking of apoptotic pathways by bacterial pathogens. *Microbes and Infection* 2(14) :1705–1719.
- [46] Fink SL, Cookson BT (2005) Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis : Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity* 73(4) :1907–1916.
- [47] Mocarski ES, Kaiser WJ, Livingston-Rosanoff D, Upton JW, Daley-Bauer LP (2014) True grit : Programmed necrosis in antiviral host defense, inflammation, and immunogenicity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192(5) :2019–2026.
- [48] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26(4) :239–257.
- [49] Warren HS, Smyth MJ (1999) NK cells and apoptosis. *Immunology & Cell Biology* 77(1) :64–75.
- [50] Ekert PG, Vaux DL (1997) Apoptosis and the immune system. *British Medical Bulletin* 53(3) :591–603.
- [51] Yang Y, Jiang G, Zhang P, Fan J (2015) Programmed cell death and its role in inflammation. *Military Medical Research* 2.

- [52] Murphy JM, Vince JE (2015) Post-translational control of RIPK3 and MLKL mediated necroptotic cell death. *F1000Research* 4.
- [53] Zhang DW, et al. (2009) RIP3, an Energy Metabolism Regulator That Switches TNF-Induced Cell Death from Apoptosis to Necrosis. *Science* 325(5938) :332–336.
- [54] Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P (2014) Regulated necrosis : The expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15(2) :135–147.
- [55] Broz P, Dixit VM (2016) Inflammasomes : Mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews. Immunology* 16(7) :407–420.
- [56] Lamkanfi M, Dixit VM (2014) Mechanisms and Functions of Inflammasomes. *Cell* 157(5) :1013–1022.
- [57] Man SM, Kanneganti TD (2015) Regulation of inflammasome activation. *Immunological reviews* 265(1) :6–21.
- [58] Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases : Enemies Within. *Science* 281(5381) :1312–1316.
- [59] Srinivasula SM, et al. (2002) The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *The Journal of Biological Chemistry* 277(24) :21119–21122.
- [60] Stehlik C, et al. (2003) The PAAD/PYRIN-only protein POP1/ASC2 is a modulator of ASC-mediated nuclear-factor-kappa B and pro-caspase-1 regulation. *Biochemical Journal* 373(Pt 1) :101–113.
- [61] Agostini L, et al. (2004) NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20(3) :319–325.
- [62] Bryan NB, Dorfleutner A, Rojanasakul Y, Stehlik C (2009) Activation of Inflammasomes Requires Intracellular Redistribution of the Apoptotic Speck-Like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain. *The Journal of Immunology* 182(5) :3173–3182.
- [63] Fernandes-Alnemri T, et al. (2007) The pyroptosome : A supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death and Differentiation* 14(9) :1590–1604.
- [64] Broz P, von Moltke J, Jones JW, Vance RE, Monack DM (2010) Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host & Microbe* 8(6) :471–483.
- [65] Case CL, Shin S, Roy CR (2009) Asc and Ipaf Inflammasomes Direct Distinct Pathways for Caspase-1 Activation in Response to Legionella pneumophila. *Infection and Immunity* 77(5) :1981–1991.
- [66] Mariathasan S, et al. (2004) Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430(6996) :213–218.
- [67] Guey B, Bodnar M, Manié SN, Tardivel A, Petrilli V (2014) Caspase-1 autoproteolysis is differentially required for NLRP1b and NLRP3 inflammasome function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(48) :17254–17259.
- [68] MacDonald JA, Wijekoon CP, Liao KC, Muruve DA (2013) Biochemical and structural aspects of the ATP-binding domain in inflammasome-forming human NLRP proteins. *IUBMB life* 65(10) :851–862.

- [69] Hafner-Bratkovič I, et al. (2018) NLRP3 lacking the leucine-rich repeat domain can be fully activated via the canonical inflammasome pathway. *Nature Communications* 9.
- [70] Hu Z, et al. (2013) Crystal structure of NLRC4 reveals its autoinhibition mechanism. *Science (New York, N.Y.)* 341(6142) :172–175.
- [71] Maekawa S, Ohto U, Shibata T, Miyake K, Shimizu T (2016) Crystal structure of NOD2 and its implications in human disease. *Nature Communications* 7 :11813.
- [72] Hafner-Bratkovič I, Pelegrín P (2018) Ion homeostasis and ion channels in NLRP3 inflammasome activation and regulation. *Current Opinion in Immunology* 52 :8–17.
- [73] Tanabe T, et al. (2004) Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *The EMBO journal* 23(7) :1587–1597.
- [74] Schroder K, Tschopp J (2010) The inflammasomes. *Cell* 140(6) :821–832.
- [75] Duncan JA, et al. (2007) Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(19) :8041–8046.
- [76] Juliana C, et al. (2012) Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *The Journal of Biological Chemistry* 287(43) :36617–36622.
- [77] Shim DW, et al. (2017) BOT-4-one attenuates NLRP3 inflammasome activation : NLRP3 alkylation leading to the regulation of its ATPase activity and ubiquitination. *Scientific Reports* 7(1) :15020.
- [78] Jiang H, et al. (2017) Identification of a selective and direct NLRP3 inhibitor to treat inflammatory disorders. *The Journal of Experimental Medicine* 214(11) :3219–3238.
- [79] Cocco M, et al. (2016) Design, Synthesis, and Evaluation of Acrylamide Derivatives as Direct NLRP3 Inflammasome Inhibitors. *ChemMedChem* 11(16) :1790–1803.
- [80] Compan V, et al. (2012) Cell volume regulation modulates NLRP3 inflammasome activation. *Immunity* 37(3) :487–500.
- [81] He Y, Hara H, Núñez G (2016) Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends in Biochemical Sciences* 41(12) :1012–1021.
- [82] Shi H, et al. (2016) NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nature immunology* 17(3) :250–258.
- [83] Schmid-Burgk JL, et al. (2016) A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential Component of NLRP3 Inflammasome Activation. *The Journal of Biological Chemistry* 291(1) :103–109.
- [84] Franklin BS, et al. (2014) The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. *Nature Immunology* 15(8) :727–737.
- [85] Lu A, et al. (2014) Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell* 156(6) :1193–1206.
- [86] Sborgi L, et al. (2015) Structure and assembly of the mouse ASC inflammasome by combined NMR spectroscopy and cryo-electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(43) :13237–13242.

- [87] Martinon F, Mayor A, Tschopp J (2009) The inflammasomes : Guardians of the body. *Annual Review of Immunology* 27 :229–265.
- [88] Boucher D, et al. (2018) Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *Journal of Experimental Medicine* 215(3) :827–840.
- [89] Kayagaki N, et al. (2015) Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* 526(7575) :666–671.
- [90] Shi J, et al. (2015) Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 526(7575) :660–665.
- [91] He Wt, et al. (2015) Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Research* 25(12) :1285–1298.
- [92] Monteleone M, et al. (2018) Interleukin-1 β Maturation Triggers Its Relocation to the Plasma Membrane for Gasdermin-D-Dependent and -Independent Secretion. *Cell Reports* 24(6) :1425–1433.
- [93] Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, Sitia R (1990) A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *The EMBO journal* 9(5) :1503–1510.
- [94] Man SM, et al. (2014) Inflammasome activation causes dual recruitment of NLRC4 and NLRP3 to the same macromolecular complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(20) :7403–7408.
- [95] Qu Y, Franchi L, Nunez G, Dubyak GR (2007) Nonclassical IL-1 β Secretion Stimulated by P2X7 Receptors Is Dependent on Inflammasome Activation and Correlated with Exosome Release in Murine Macrophages. *The Journal of Immunology* 179(3) :1913–1925.
- [96] Dupont N, et al. (2011) Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *The EMBO journal* 30(23) :4701–4711.
- [97] Brough D, Rothwell NJ (2007) Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. *Journal of Cell Science* 120(Pt 5) :772–781.
- [98] Liu T, et al. (2014) Single-Cell Imaging of Caspase-1 Dynamics Reveals an All-or-None Inflammasome Signaling Response. *Cell Reports* 8(4) :974–982.
- [99] Shirasaki Y, et al. (2014) Real-time single-cell imaging of protein secretion. *Scientific Reports* 4 :4736.
- [100] Tapia VS, et al. (2019) The three cytokines IL-1 β , IL-18, and IL-1 α share related but distinct secretory routes. *The Journal of Biological Chemistry*.
- [101] Chen KW, et al. (2014) The Neutrophil NLRC4 Inflammasome Selectively Promotes IL-1 β Maturation without Pyroptosis during Acute Salmonella Challenge. *Cell Reports* 8(2) :570–582.
- [102] Liu X, et al. (2016) Inflammasome - activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* 535(7610) :153–158.
- [103] Sborgi L, et al. (2016) GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *The EMBO Journal* 35(16) :1766–1778.
- [104] van Oostrum J, Priestle JP, Grütter MG, Schmitz A (1991) The structure of murine interleukin-1 beta at 2.8 Å resolution. *Journal of Structural Biology* 107(2) :189–195.

- [105] Singer II, et al. (1995) The interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE) is localized on the external cell surface membranes and in the cytoplasmic ground substance of human monocytes by immuno-electron microscopy. *The Journal of Experimental Medicine* 182(5) :1447–1459.
- [106] Hamon Y, et al. (1997) Interleukin-1beta secretion is impaired by inhibitors of the Atp binding cassette transporter, ABC1. *Blood* 90(8) :2911–2915.
- [107] Zhou X, et al. (2002) The ATP Binding Cassette Transporter A1 Contributes to the Secretion of Interleukin 1 β from Macrophages but Not from Monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291(3) :598–604.
- [108] Monteleone M, Stow JL, Schroder K (2015) Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine* 74(2) :213–218.
- [109] Dostert C, Pétrilli V (2008) Amiante et inflammation, rôle de l'inflammasome. *médecine/sciences* 24(11) :916–918.
- [110] Elliott EI, Sutterwala FS (2015) Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. *Immunological Reviews* 265(1) :35–52.
- [111] Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL (2014) Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1319 :82–95.
- [112] Franchi L, Eigenbrod T, Núñez G (2009) Cutting edge : TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *Journal of Immunology* 183(2) :792–796.
- [113] Alexiou P, Chatzopoulou M, Pegklidou K, Demopoulos VJ (2010) RAGE : A multi-ligand receptor unveiling novel insights in health and disease. *Current Medicinal Chemistry* 17(21) :2232–2252.
- [114] Triantafilou M, Hughes TR, Morgan BP, Triantafilou K (2016) Complementing the inflammasome. *Immunology* 147(2) :152–164.
- [115] Bauernfeind FG, et al. (2009) Cutting edge : NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *Journal of Immunology* 183(2) :787–791.
- [116] Bauernfeind F, et al. (2011) Cutting edge : Reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187(2) :613–617.
- [117] Fernandes-Alnemri T, et al. (2013) Cutting edge : TLR signaling licenses IRAK1 for rapid activation of the NLRP3 inflammasome. *Journal of Immunology* 191(8) :3995–3999.
- [118] Lin KM, et al. (2014) IRAK-1 bypasses priming and directly links TLRs to rapid NLRP3 inflammasome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(2) :775–780.
- [119] Schroder K, et al. (2012) Acute lipopolysaccharide priming boosts inflammasome activation independently of inflammasome sensor induction. *Immunobiology* 217(12) :1325–1329.
- [120] Gurung P, et al. (2014) FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes. *Journal of Immunology* 192(4) :1835–1846.

- [121] Allam R, et al. (2014) Mitochondrial apoptosis is dispensable for NLRP3 inflammasome activation but non-apoptotic caspase-8 is required for inflammasome priming. *EMBO Reports* 15(9) :982–990.
- [122] Hernandez-Cuellar E, et al. (2012) Cutting edge : Nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. *Journal of Immunology* 189(11) :5113–5117.
- [123] Hu Y, et al. (2010) Tripartite-motif protein 30 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation by modulating reactive oxygen species production. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185(12) :7699–7705.
- [124] Guarda G, et al. (2011) Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity* 34(2) :213–223.
- [125] Zhong Z, et al. (2016) NF- κ B Restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria. *Cell* 164(5) :896–910.
- [126] Ratsimandresy RA, Dorfleutner A, Stehlik C (2013) An Update on PYRIN Domain-Containing Pattern Recognition Receptors : From Immunity to Pathology. *Frontiers in Immunology* 4.
- [127] Mariathasan S, et al. (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440(7081) :228–232.
- [128] Pétrilli V, et al. (2007) Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death and Differentiation* 14(9) :1583–1589.
- [129] Muñoz-Planillo R, et al. (2013) K⁺ efflux is the Common Trigger of NLRP3 inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity* 38(6) :1142–1153.
- [130] Triantafyllou K, Hughes TR, Triantafyllou M, Morgan BP (2013) The complement membrane attack complex triggers intracellular Ca²⁺ fluxes leading to NLRP3 inflammasome activation. *J Cell Sci* 126(13) :2903–2913.
- [131] Groß CJ, et al. (2016) K⁺ Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. *Immunity* 45(4) :761–773.
- [132] Franchi L, Kanneganti TD, Dubyak GR, Núñez G (2007) Differential Requirement of P2X7 Receptor and Intracellular K⁺ for Caspase-1 Activation Induced by Intracellular and Extracellular Bacteria. *Journal of Biological Chemistry* 282(26) :18810–18818.
- [133] Haneklaus M, O’Neill LAJ, Coll RC (2013) Modulatory mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome in inflammation : Recent developments. *Current Opinion in Immunology* 25(1) :40–45.
- [134] Murakami T, et al. (2012) Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(28) :11282–11287.
- [135] Lee GS, et al. (2012) The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP. *Nature* 492(7427) :123–127.
- [136] Daniels MJD, et al. (2016) Fenamate NSAIDs inhibit the NLRP3 inflammasome and protect against Alzheimer’s disease in rodent models. *Nature Communications* 7 :12504.
- [137] Tang T, et al. (2017) CLICs-dependent chloride efflux is an essential and proximal upstream event for NLRP3 inflammasome activation. *Nature Communications* 8(1) :202.

- [138] Domingo-Fernández R, Coll RC, Kearney J, Breit S, O'Neill LAJ (2017) The intracellular chloride channel proteins CLIC1 and CLIC4 induce IL-1 β transcription and activate the NLRP3 inflammasome. *The Journal of Biological Chemistry* 292(29) :12077–12087.
- [139] Green JP, et al. (2018) Chloride regulates dynamic NLRP3-dependent ASC oligomerization and inflammasome priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(40) :E9371–E9380.
- [140] Meissner F, Molawi K, Zychlinsky A (2008) Superoxide dismutase 1 regulates caspase-1 and endotoxic shock. *Nature Immunology* 9(8) :866–872.
- [141] Shimada K, et al. (2012) Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome During Apoptosis. *Immunity* 36(3) :401–414.
- [142] Iyer SS, et al. (2013) Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity* 39(2) :311–323.
- [143] Elliott EI, et al. (2018) Cutting Edge : Mitochondrial Assembly of the NLRP3 Inflammasome Complex Is Initiated at Priming. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- [144] Hornung V, et al. (2008) Silica crystals and aluminum salts mediate NALP-3 inflammasome activation via phagosomal destabilization. *Nature immunology* 9(8) :847–856.
- [145] Dostert C, et al. (2009) Malarial Hemozoin Is a Nalp3 Inflammasome Activating Danger Signal. *PLoS ONE* 4(8).
- [146] Hari A, et al. (2014) Activation of NLRP3 inflammasome by crystalline structures via cell surface contact. *Scientific Reports* 4 :7281.
- [147] Zanoni I, et al. (2016) An endogenous caspase-11 ligand elicits interleukin-1 release from living dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)* 352(6290) :1232–1236.
- [148] Wolf AJ, et al. (2016) Hexokinase Is an Innate Immune Receptor for the Detection of Bacterial Peptidoglycan. *Cell* 166(3) :624–636.
- [149] Evavold CL, et al. (2017) The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity*.
- [150] Gaidt MM, et al. (2016) Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity* 44(4) :833–846.
- [151] Zanoni I, Tan Y, Di Gioia M, Springstead JR, Kagan JC (2017) By Capturing Inflammatory Lipids Released from Dying Cells, the Receptor CD14 Induces Inflammasome-Dependent Phagocyte Hyperactivation. *Immunity* 47(4) :697–709.e3.
- [152] Latz E, Xiao TS, Stutz A (2013) Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature reviews. Immunology* 13(6).
- [153] Kayagaki N, et al. (2011) Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 479(7371) :117–121.
- [154] Shi J, et al. (2014) Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* 514(7521) :187–192.
- [155] Kayagaki N, et al. (2013) Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science (New York, N.Y.)* 341(6151) :1246–1249.

- [156] Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, Ernst RK, Miao EA (2013) Cytoplasmic LPS activates caspase-11 : Implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science (New York, N.Y.)* 341(6151) :1250–1253.
- [157] Vanaja SK, et al. (2016) Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation. *Cell* 165(5) :1106–1119.
- [158] Meunier E, et al. (2014) Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature* 509(7500) :366–370.
- [159] Pilla DM, et al. (2014) Guanylate binding proteins promote caspase-11–dependent pyroptosis in response to cytoplasmic LPS. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(16) :6046–6051.
- [160] Rühl S, Broz P (2015) Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K⁺ efflux. *European Journal of Immunology* 45(10) :2927–2936.
- [161] Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469(7329) :221–225.
- [162] Misawa T, et al. (2013) Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nature Immunology* 14(5) :454–460.
- [163] Subramanian N, Natarajan K, Clatworthy MR, Wang Z, Germain RN (2013) The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. *Cell* 153(2) :348–361.
- [164] Yang CS, et al. (2015) Small heterodimer partner interacts with NLRP3 and negatively regulates activation of the NLRP3 inflammasome. *Nature Communications* 6 :6115.
- [165] Li X, et al. (2017) MARK4 regulates NLRP3 positioning and inflammasome activation through a microtubule-dependent mechanism. *Nature Communications* 8 :15986.
- [166] Wu YH, et al. (2014) Participation of c-FLIP in NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. *Cell Death and Differentiation* 21(3) :451–461.
- [167] Marini ES, et al. (2015) The endogenous caspase-8 inhibitor c-FLIP_L regulates ER morphology and crosstalk with mitochondria. *Cell Death and Differentiation* 22(7) :1131–1143.
- [168] Zhang Z, et al. (2017) Protein kinase D at the Golgi controls NLRP3 inflammasome activation. *The Journal of Experimental Medicine* 214(9) :2671–2693.
- [169] Chen J, Chen ZJ (2018) PtdIns4P on dispersed trans -Golgi network mediates NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 564(7734) :71.
- [170] He Y, Zeng MY, Yang D, Motro B, Núñez G (2016) Nek7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* 530(7590) :354–357.
- [171] Wang Y, et al. (2013) Cellular localization of NLRP3 inflammasome. *Protein & Cell* 4(6) :425–431.
- [172] Baroja-Mazo A, et al. (2014) The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nature Immunology* 15(8) :738–748.
- [173] Shi CS, et al. (2012) Activation of Autophagy by Inflammatory Signals Limits IL-1 β Production by Targeting Ubiquitinated Inflammasomes for Destruction. *Nature immunology* 13(3) :255–263.

- [174] Spalinger MR, et al. (2017) PTPN22 regulates NLRP3-mediated IL1B secretion in an autophagy dependent manner. *Autophagy* p. 0.
- [175] Hershko A, Ciechanover A (1998) The Ubiquitin System. *Annual Review of Biochemistry* 67(1) :425–479.
- [176] Aguilar RC, Wendland B (2003) Ubiquitin : Not just for proteasomes anymore. *Current Opinion in Cell Biology* 15(2) :184–190.
- [177] Li W, et al. (2008) Genome-Wide and Functional Annotation of Human E3 Ubiquitin Ligases Identifies MULAN, a Mitochondrial E3 that Regulates the Organelle's Dynamics and Signaling. *PLOS ONE* 3(1) :e1487.
- [178] Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM (2012) HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *Journal of Cell Science* 125(Pt 3) :531–537.
- [179] Turcu FER, Ventii KH, Wilkinson KD (2009) Regulation and Cellular Roles of Ubiquitin-specific Deubiquitinating Enzymes. *Annual review of biochemistry* 78 :363–397.
- [180] Malynn BA, Ma A (2010) Ubiquitin makes its mark on immune regulation. *Immunity* 33(6) :843–852.
- [181] Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G, Muzio LL (2017) The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 40(2) :271–280.
- [182] Santos AL, Lindner AB (2017) Protein Posttranslational Modifications : Roles in Aging and Age-Related Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017.
- [183] Mayor A, Martinon F, De Smedt T, Pétrilli V, Tschopp J (2007) A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nature Immunology* 8(5) :497–503.
- [184] Py BE, Kim MS, Vakifahmetoglu-Norberg H, Yuan J (2013) Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Molecular Cell* 49(2) :331–338.
- [185] Song N, et al. (2017) NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation. *Molecular Cell* 68(1) :185–187.
- [186] Humphries F, et al. (2018) The E3 ubiquitin ligase Pellino2 mediates priming of the NLRP3 inflammasome. *Nature Communications* 9.
- [187] Han S, et al. (2015) Lipopolysaccharide Primes the NALP3 Inflammasome by Inhibiting Its Ubiquitination and Degradation Mediated by the SCFFBXL2 E3 Ligase. *The Journal of Biological Chemistry* 290(29) :18124–18133.
- [188] Han S, Jerome JA, Gregory AD, Mallampalli RK (2017) Cigarette smoke destabilizes NLRP3 protein by promoting its ubiquitination. *Respiratory Research* 18(1) :2.
- [189] Guglielmo A, et al. (2017) A mechanistic insight into curcumin modulation of the IL-1 β secretion and NLRP3 S-glutathionylation induced by needle-like cationic cellulose nanocrystals in myeloid cells. *Chemico-Biological Interactions* 274 :1–12.
- [190] Kawashima A, et al. (2017) ARIH2 Ubiquitinates NLRP3 and Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 199(10) :3614–3622.

- [191] Yan Y, et al. (2015) Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell* 160(1-2) :62–73.
- [192] Wan P, et al. (2019) Cullin1 binds and promotes NLRP3 ubiquitination to repress systematic inflammasome activation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* p. fj201801681R.
- [193] Barry R, et al. (2018) SUMO-mediated regulation of NLRP3 modulates inflammasome activity. *Nature Communications* 9(1) :3001.
- [194] Guo C, et al. (2016) Bile Acids Control Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome. *Immunity* 45(4) :802–816.
- [195] Mortimer L, Moreau F, MacDonald JA, Chadee K (2016) NLRP3 inflammasome inhibition is disrupted in a group of auto-inflammatory disease CAPS mutations. *Nature Immunology* 17(10) :1176–1186.
- [196] Stutz A, et al. (2017) NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain. *The Journal of Experimental Medicine* 214(6) :1725–1736.
- [197] Luheshi NM, Giles JA, Lopez-Castejon G, Brough D (2012) Sphingosine regulates the NLRP3-inflammasome and IL-1 β release from macrophages. *European Journal of Immunology* 42(3) :716–725.
- [198] Spalinger MR, et al. (2016) NLRP3 tyrosine phosphorylation is controlled by protein tyrosine phosphatase PTPN22. *The Journal of Clinical Investigation* 126(5) :1783–1800.
- [199] Song H, et al. (2016) The E3 ubiquitin ligase TRIM31 attenuates NLRP3 inflammasome activation by promoting proteasomal degradation of NLRP3. *Nature Communications* 7.
- [200] Rodgers MA, et al. (2014) The linear ubiquitin assembly complex (LUBAC) is essential for NLRP3 inflammasome activation. *The Journal of Experimental Medicine* 211(7) :1333–1347.
- [201] Guan K, et al. (2015) MAVS Promotes Inflammasome Activation by Targeting ASC for K63-Linked Ubiquitination via the E3 Ligase TRAF3. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194(10) :4880–4890.
- [202] Lee JY, et al. (2017) The deubiquitinating enzyme, ubiquitin-specific peptidase 50, regulates inflammasome activation by targeting the ASC adaptor protein. *FEBS letters* 591(3) :479–490.
- [203] Hara H, et al. (2013) Phosphorylation of ASC acts as a molecular switch controlling the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nature immunology* 14(12) :1247–1255.
- [204] Labbé K, McIntire CR, Doiron K, Leblanc PM, Saleh M (2011) Cellular inhibitors of apoptosis proteins cIAP1 and cIAP2 are required for efficient caspase-1 activation by the inflammasome. *Immunity* 35(6) :897–907.
- [205] Duong BH, et al. (2015) A20 restricts ubiquitination of pro-interleukin-1 β protein complexes and suppresses NLRP3 inflammasome activity. *Immunity* 42(1) :55–67.
- [206] Wang Y, et al. (2019) Mitochondrial ROS promote macrophage pyroptosis by inducing GSDMD oxidation. *Journal of Molecular Cell Biology*.
- [207] Palazón-Riquelme P, et al. (2018) USP7 and USP47 deubiquitinases regulate NLRP3 inflammasome activation. *EMBO Reports* 19(10).

- [208] Kummer JA, et al. (2007) Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 55(5) :443–452.
- [209] Piccini A, et al. (2008) ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(23) :8067–8072.
- [210] Cho JS, et al. (2012) Neutrophil-derived IL-1 β is sufficient for abscess formation in immunity against *Staphylococcus aureus* in mice. *PLoS pathogens* 8(11) :e1003047.
- [211] Karmakar M, et al. (2015) Neutrophil IL-1 β Processing Induced by Pneumolysin Is Mediated by the NLRP3/ASC Inflammasome and Caspase-1 Activation and Is Dependent on K⁺ Efflux. *The Journal of Immunology* p. 1401624.
- [212] Chen KW, et al. (2016) The murine neutrophil NLRP3 inflammasome is activated by soluble but not particulate or crystalline agonists. *European Journal of Immunology* 46(4) :1004–1010.
- [213] Lei-Leston AC, Murphy AG, Maloy KJ (2017) Epithelial Cell Inflammasomes in Intestinal Immunity and Inflammation. *Frontiers in Immunology* 8.
- [214] Galon J, Aksentijevich I, McDermott MF, O’Shea JJ, Kastner DL (2000) TNFRSF1A mutations and autoinflammatory syndromes. *Current Opinion in Immunology* 12(4) :479–486.
- [215] Cuisset L, et al. (2011) Mutations in the autoinflammatory cryopyrin-associated periodic syndrome gene : Epidemiological study and lessons from eight years of genetic analysis in France. *Annals of the Rheumatic Diseases* 70(3) :495–499.
- [216] Shinkai K, McCalmont TH, Leslie KS (2008) Cryopyrin-associated periodic syndromes and autoinflammation. *Clinical and Experimental Dermatology* 33(1) :1–9.
- [217] Kuemmerle-Deschner JB, Haug I (2013) Canakinumab in patients with cryopyrin-associated periodic syndrome : An update for clinicians. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* 5(6) :315–329.
- [218] Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD (2001) Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle–Wells syndrome. *Nature genetics* 29(3) :301–305.
- [219] Kuemmerle-Deschner JB, et al. (2011) NLRP3 E311K mutation in a large family with Muckle–Wells syndrome—description of a heterogeneous phenotype and response to treatment. *Arthritis Research & Therapy* 13(6) :R196.
- [220] Tanaka N, et al. (2011) High Incidence of NLRP3 Somatic Mosaicism in Patients With Chronic Infantile Neurologic, Cutaneous, Articular Syndrome. *Arthritis and rheumatism* 63(11) :3625–3632.
- [221] Aksentijevich I, et al. (2007) The clinical continuum of cryopyrinopathies : Novel CIAS1 mutations in North American patients and a new cryopyrin model. *Arthritis and Rheumatism* 56(4) :1273–1285.
- [222] Aksentijevich I, et al. (2002) De Novo CIAS1 Mutations, Cytokine Activation, and Evidence for Genetic Heterogeneity in Patients With Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease (NOMID). *Arthritis and rheumatism* 46(12) :3340–3348.

- [223] Goldbach-Mansky R (2011) Current status of understanding the pathogenesis and management of patients with NOMID/CINCA. *Current Rheumatology Reports* 13(2) :123–131.
- [224] Conforti-Andreoni C, Ricciardi-Castagnoli P, Mortellaro A (2011) The inflammasomes in health and disease : From genetics to molecular mechanisms of autoinflammation and beyond. *Cellular and Molecular Immunology* 8(2) :135–145.
- [225] Neven B, et al. (2004) Molecular basis of the spectral expression of CIAS1 mutations associated with phagocytic cell-mediated autoinflammatory disorders CINCA/NOMID, MWS, and FCU. *Blood* 103(7) :2809–2815.
- [226] Gattorno M, et al. (2007) Pattern of interleukin-1 β secretion in response to lipopolysaccharide and ATP before and after interleukin-1 blockade in patients with CIAS1 mutations. *Arthritis & Rheumatism* 56(9) :3138–3148.
- [227] Brydges SD, et al. (2009) Animal Models of Inflammasomopathies Reveal Roles for Innate but not Adaptive Immunity. *Immunity* 30(6) :875–887.
- [228] Meng G, Zhang F, Fuss I, Kitani A, Strober W (2009) A NLRP3 Mutation Causing inflammasome Hyperactivation Potentiates Th17-Dominant Immune Responses. *Immunity* 30(6) :860–874.
- [229] Kuemmerle-Deschner JB (2015) CAPS–pathogenesis, presentation and treatment of an autoinflammatory disease. *Seminars in Immunopathology* 37(4) :377–385.
- [230] Hawkins PN, Lachmann HJ, McDermott MF (2003) Interleukin-1-receptor antagonist in the Muckle-Wells syndrome. *The New England Journal of Medicine* 348(25) :2583–2584.
- [231] Goldbach-Mansky R, et al. (2006) Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1beta inhibition. *The New England Journal of Medicine* 355(6) :581–592.
- [232] Hoffman HM, et al. (2004) Prevention of cold-associated acute inflammation in familial cold autoinflammatory syndrome by interleukin-1 receptor antagonist. *Lancet (London, England)* 364(9447) :1779–1785.
- [233] Dinarello CA, Simon A, van der Meer JWM (2012) Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature reviews. Drug discovery* 11(8) :633–652.
- [234] Sibley CH, et al. (2012) Sustained response and prevention of damage progression in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease treated with anakinra : A cohort study to determine three- and five-year outcomes. *Arthritis & Rheumatism* 64(7) :2375–2386.
- [235] Hoffman HM (2009) Riloncept for the treatment of cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS). *Expert Opinion on Biological Therapy* 9(4) :519–531.
- [236] Hoffman HM, et al. (2008) Efficacy and safety of riloncept (interleukin-1 Trap) in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes : Results from two sequential placebo-controlled studies. *Arthritis and Rheumatism* 58(8) :2443–2452.
- [237] Lachmann HJ, et al. (2009) Use of canakinumab in the cryopyrin-associated periodic syndrome. *The New England Journal of Medicine* 360(23) :2416–2425.
- [238] Lu B, et al. (2012) Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* 488(7413) :670–674.

- [239] Brydges SD, et al. (2013) Divergence of IL-1, IL-18, and cell death in NLRP3 inflammasomopathies. *The Journal of Clinical Investigation* 123(11) :4695–4705.
- [240] Nowarski R, et al. (2015) Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis. *Cell* 163(6) :1444–1456.
- [241] Moossavi M, Parsamanesh N, Bahrami A, Atkin SL, Sahebkar A (2018) Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Molecular Cancer* 17.
- [242] Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R (2012) Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481(7381) :278–286.
- [243] Guo H, Callaway JB, Ting JPY (2015) Inflammasomes : Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature Medicine* 21(7) :677–687.
- [244] Fève B, Bastard JP (2009) The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews. Endocrinology* 5(6) :305–311.
- [245] Netea MG, et al. (2006) Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance. *Nature Medicine* 12(6) :650–656.
- [246] Donath MY, Shoelson SE (2011) Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews. Immunology* 11(2) :98–107.
- [247] Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP (2008) Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9(5) :367–377.
- [248] Unger RH, Clark GO, Scherer PE, Orci L (2010) Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1801(3) :209–214.
- [249] Demarchi F, Bertoli C, Greer PA, Schneider C (2005) Ceramide triggers an NF- κ B-dependent survival pathway through calpain. *Cell Death and Differentiation* 12(5) :512–522.
- [250] Reynolds CM, et al. (2012) Dietary saturated fatty acids prime the NLRP3 inflammasome via TLR4 in dendritic cells—implications for diet-induced insulin resistance. *Molecular Nutrition & Food Research* 56(8) :1212–1222.
- [251] Robblee MM, et al. (2016) Saturated Fatty Acids Engage an IRE1 α -Dependent Pathway to Activate the NLRP3 Inflammasome in Myeloid Cells. *Cell Reports* 14(11) :2611–2623.
- [252] Patel MN, et al. (2017) Inflammasome Priming in Sterile Inflammatory Disease. *Trends in Molecular Medicine* 23(2) :165–180.
- [253] Yin Z, et al. (2014) Transcriptome analysis of human adipocytes implicates the NOD-like receptor pathway in obesity-induced adipose inflammation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 394(1-2) :80–87.
- [254] Stienstra R, et al. (2010) The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metabolism* 12(6) :593–605.
- [255] Weber C, Noels H (2011) Atherosclerosis : Current pathogenesis and therapeutic options. *Nature Medicine* 17(11) :1410–1422.
- [256] Wang H, Capell W, Yoon JH, Faubel S, Eckel RH (2014) Obesity development in caspase-1-deficient mice. *International Journal of Obesity (2005)* 38(1) :152–155.
- [257] Zheng F, Xing S, Gong Z, Xing Q (2013) NLRP3 inflammasomes show high expression in aorta of patients with atherosclerosis. *Heart, Lung & Circulation* 22(9) :746–750.

- [258] Kirii H, et al. (2003) Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23(4) :656–660.
- [259] Alexander MR, et al. (2012) Genetic inactivation of IL-1 signaling enhances atherosclerotic plaque instability and reduces outward vessel remodeling in advanced atherosclerosis in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 122(1) :70–79.
- [260] Duewell P, et al. (2010) NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464(7293) :1357–1361.
- [261] Karasawa T, Takahashi M (2017) Role of NLRP3 Inflammasomes in Atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 24(5) :443–451.
- [262] Wen H, et al. (2011) Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nature Immunology* 12(5) :408–415.
- [263] Robbins GR, Wen H, Ting JPY (2014) Inflammasomes and metabolic disorders : Old genes in modern diseases. *Molecular Cell* 54(2) :297–308.
- [264] Larsen CM, et al. (2007) Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine* 356(15) :1517–1526.
- [265] Mandrup-Poulsen T, Pickersgill L, Donath MY (2010) Blockade of interleukin 1 in type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews. Endocrinology* 6(3) :158–166.
- [266] Cavelti-Weder C, et al. (2011) Inhibition of IL-1beta improves fatigue in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 34(10) :e158.
- [267] Stienstra R, et al. (2011) Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(37) :15324–15329.
- [268] Vandanmagsar B, et al. (2011) The NALP3/NLRP3 Inflammasome Instigates Obesity-Induced Autoinflammation and Insulin Resistance. *Nature medicine* 17(2) :179–188.
- [269] Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J (2010) Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nature Immunology* 11(2) :136–140.
- [270] Stienstra R, Tack CJ, Kanneganti TD, Joosten LAB, Netea MG (2012) The inflammasome puts obesity in the danger zone. *Cell Metabolism* 15(1) :10–18.
- [271] Cooper GJ, et al. (1987) Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(23) :8628–8632.
- [272] Masters SL, et al. (2010) Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nature Immunology* 11(10) :897–904.
- [273] Yan Y, et al. (2013) Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Immunity* 38(6) :1154–1163.
- [274] Halle A, et al. (2008) The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nature Immunology* 9(8) :857–865.
- [275] Heneka MT, et al. (2013) NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 493(7434) :674–678.

- [276] Hook VYH, Kindy M, Hook G (2008) Inhibitors of cathepsin B improve memory and reduce beta-amyloid in transgenic Alzheimer disease mice expressing the wild-type, but not the Swedish mutant, beta-secretase site of the amyloid precursor protein. *The Journal of Biological Chemistry* 283(12) :7745–7753.
- [277] Shulman JM, De Jager PL, Feany MB (2011) Parkinson's disease : Genetics and pathogenesis. *Annual Review of Pathology* 6 :193–222.
- [278] Lee SJ (2008) Origins and effects of extracellular alpha-synuclein : Implications in Parkinson's disease. *Journal of molecular neuroscience : MN* 34(1) :17–22.
- [279] Béraud D, Maguire-Zeiss KA (2012) Misfolded α -synuclein and Toll-like receptors : Therapeutic targets for Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 18 Suppl 1 :S17–20.
- [280] Codolo G, et al. (2013) Triggering of Inflammasome by Aggregated α -Synuclein, an Inflammatory Response in Synucleinopathies. *PLoS ONE* 8(1).
- [281] Goverman J (2009) Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nature Reviews. Immunology* 9(6) :393–407.
- [282] Matsuki T, Nakae S, Sudo K, Horai R, Iwakura Y (2006) Abnormal T cell activation caused by the imbalance of the IL-1/IL-1R antagonist system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *International Immunology* 18(2) :399–407.
- [283] Furlan R, et al. (1999) Caspase-1 regulates the inflammatory process leading to autoimmune demyelination. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163(5) :2403–2409.
- [284] Shi FD, Takeda K, Akira S, Sarvetnick N, Ljunggren HG (2000) IL-18 directs autoreactive T cells and promotes autodestruction in the central nervous system via induction of IFN-gamma by NK cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165(6) :3099–3104.
- [285] Jha S, et al. (2010) The inflammasome sensor, NLRP3, regulates CNS inflammation and demyelination via caspase-1 and interleukin-18. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30(47) :15811–15820.
- [286] Lagrange B, et al. (2018) Human caspase-4 detects tetra-acylated LPS and cytosolic Francisella and functions differently from murine caspase-11. *Nature Communications* 9(1) :242.
- [287] Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES (2009) AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458(7237) :509–513.
- [288] Teixeira M, et al. (2018) Electroporation of mice zygotes with dual guide RNA/Cas9 complexes for simple and efficient cloning-free genome editing. *Scientific Reports* 8(1) :474.
- [289] Juliana C, et al. (2010) Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *The Journal of Biological Chemistry* 285(13) :9792–9802.
- [290] Powers JP, et al. (2006) Discovery and initial SAR of inhibitors of interleukin-1 receptor-associated kinase-4. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16(11) :2842–2845.
- [291] Coll RC, et al. (2015) A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nature Medicine* 21(3) :248–255.
- [292] Bednash JS, Mallampalli RK (2016) Regulation of inflammasomes by ubiquitination. *Cellular and Molecular Immunology* 13(6) :722–728.

- [293] Gros Lambert M, Py BF (2018) Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. *Journal of Inflammation Research* 11 :359–374.
- [294] Aleo E, Henderson CJ, Fontanini A, Solazzo B, Brancolini C (2006) Identification of New Compounds That Trigger Apoptosome-Independent Caspase Activation and Apoptosis. *Cancer Research* 66(18) :9235–9244.
- [295] Fontanini A, et al. (2009) The Isopeptidase Inhibitor G5 Triggers a Caspase-independent Necrotic Death in Cells Resistant to Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 284(13) :8369–8381.
- [296] Weiss DS, et al. (2007) In vivo negative selection screen identifies genes required for Francisella virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(14) :6037–6042.
- [297] Bröms JE, Sjöstedt A, Lavander M (2010) The Role of the Francisella Tularensis Pathogenicity Island in Type VI Secretion, Intracellular Survival, and Modulation of Host Cell Signaling. *Frontiers in Microbiology* 1.
- [298] Hickey CM, Wilson NR, Hochstrasser M (2012) Function and regulation of SUMO proteases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(12) :755–766.
- [299] Bernier-Villamor V, Sampson DA, Matunis MJ, Lima CD (2002) Structural Basis for E2-Mediated SUMO Conjugation Revealed by a Complex between Ubiquitin-Conjugating Enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* 108(3) :345–356.
- [300] Ovaa H, Vertegaal ACO (2018) Probing ubiquitin and SUMO conjugation and deconjugation. *Biochemical Society Transactions* 46(2) :423–436.
- [301] Hendriks IA, et al. (2014) Uncovering Global SUMOylation Signaling Networks in a Site-Specific Manner. *Nature structural & molecular biology* 21(10) :927–936.
- [302] Rodriguez MS, Dargemont C, Hay RT (2001) SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *The Journal of Biological Chemistry* 276(16) :12654–12659.
- [303] Hietakangas V, et al. (2006) PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(1) :45–50.
- [304] Hay RT (2013) Decoding the SUMO signal. *Biochemical Society Transactions* 41(2) :463–473.
- [305] Bruchard M, et al. (2015) The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. *Nature Immunology* 16(8) :859–870.
- [306] Petrilli V (2017) The multifaceted roles of inflammasome proteins in cancer. *Current Opinion in Oncology* 29(1) :35–40.
- [307] Zhang W, et al. (2017) Doxycycline Attenuates Leptospira-Induced IL-1 β by Suppressing NLRP3 Inflammasome Priming. *Frontiers in Immunology* 8.
- [308] Py BF, et al. (2014) Caspase-11 Controls Interleukin-1 β Release through Degradation of TRPC1. *Cell reports* 6(6) :1122–1128.
- [309] Atianand MK, et al. (2011) Francisella tularensis Reveals a Disparity between Human and Mouse NLRP3 Inflammasome Activation. *The Journal of Biological Chemistry* 286(45) :39033–39042.

- [310] Henry T, Monack DM (2007) Activation of the inflammasome upon *Francisella tularensis* infection : Interplay of innate immune pathways and virulence factors. *Cellular Microbiology* 9(11) :2543–2551.
- [311] Jones JW, Broz P, Monack DM (2011) Innate Immune Recognition of *Francisella Tularensis* : Activation of Type-I Interferons and the Inflammasome. *Frontiers in Microbiology* 2.
- [312] Shenoy AR, et al. (2012) GBP5 promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals. *Science (New York, N.Y.)* 336(6080) :481–485.
- [313] Kim BH, Shenoy AR, Kumar P, Bradfield CJ, MacMicking JD (2012) IFN-inducible GTPases in host cell defense. *Cell Host & Microbe* 12(4) :432–444.
- [314] Kopitar-Jerala N (2017) The Role of Interferons in Inflammation and Inflammasome Activation. *Frontiers in Immunology* 8.
- [315] Mishra BB, et al. (2013) Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β . *Nature Immunology* 14(1) :52–60.
- [316] Canouï E, et al. (2013) Atypical presentation of a cryopyrin-associated periodic syndrome, revealing a novel NLRP3 mutation. *Clinical Immunology* 148(2) :299–300.
- [317] Dodé C, et al. (2002) New mutations of CIAS1 that are responsible for Muckle-Wells syndrome and familial cold urticaria : A novel mutation underlies both syndromes. *American Journal of Human Genetics* 70(6) :1498–1506.
- [318] Feldmann J, et al. (2002) Chronic Infantile Neurological Cutaneous and Articular Syndrome Is Caused by Mutations in CIAS1, a Gene Highly Expressed in Polymorphonuclear Cells and Chondrocytes. *American Journal of Human Genetics* 71(1) :198–203.
- [319] Snouwaert JN, et al. (2016) An NLRP3 Mutation Causes Arthropathy and Osteoporosis in Humanized Mice. *Cell Reports* 17(11) :3077–3088.
- [320] Idziorek T, Estaquier J, De Bels F, Ameisen JC (1995) YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *Journal of Immunological Methods* 185(2) :249–258.
- [321] Bowman AM, Nesin OM, Pakhomova ON, Pakhomov AG (2010) Analysis of Plasma Membrane Integrity by Fluorescent Detection of Tl+ Uptake. *The Journal of membrane biology* 236(1) :15–26.
- [322] Rösner D, Schneider T, Schneider D, Scheffner M, Marx A (2015) Click chemistry for targeted protein ubiquitylation and ubiquitin chain formation. *Nature Protocols* 10(10) :1594–1611.
- [323] Gurung P, et al. (2015) Chronic TLR Stimulation Controls NLRP3 Inflammasome Activation through IL-10 Mediated Regulation of NLRP3 Expression and Caspase-8 Activation. *Scientific Reports* 5.
- [324] Roberson SM, Walker WS (1988) Immortalization of cloned mouse splenic macrophages with a retrovirus containing the v-raf/mil and v-myc oncogenes. *Cellular Immunology* 116(2) :341–351.
- [325] Schuh E, et al. (2015) Expanding spectrum of neurologic manifestations in patients with NLRP3 low-penetrance mutations. *Neurology® Neuroimmunology & Neuroinflammation* 2(4).

Annexe A

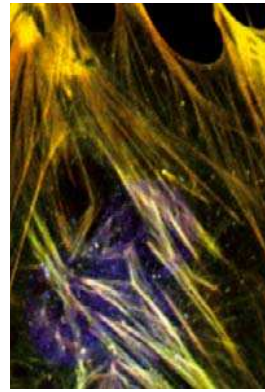
Annexes

A.1 Publications

NLRP3, un inflammasome sous contrôle

Marine Gros Lambert¹⁻⁵, Bénédicte F. Py^{1-5,*}

➤ La réponse immunitaire innée protège l'organisme par la détection rapide des agents pathogènes et des lésions *via* des récepteurs spécialisés, dont NLRP3. Celui-ci assemble un inflammasome, un complexe cytosolique de signalisation qui active la caspase-1, contrôle la libération de cytokines et de facteurs inflammatoires produits dans le cytosol comme les interleukines 1 α / β . Les pathologies inflammatoires associées à NLRP3, dont la goutte, révèlent la nécessité d'un contrôle étroit de son activité. Cette revue présente les avancées sur la signalisation du *priming* (ou amorçage) du complexe puis de son activation avec une attention particulière sur le rôle des modifications post-traductionnelles de NLRP3. ◀



¹CIRI, Centre international de recherche en infectiologie, université de Lyon, 21, avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France.
²Inserm, U1111, Lyon, France.
³École normale supérieure de Lyon, 69000 Lyon, France.
⁴Université Lyon 1, Centre international de recherche en infectiologie, 69000 Lyon, France.
⁵CNRS, UMR5308, Lyon, France.
 benedicte.py@inserm.fr

cytokines et d'autres facteurs intracellulaires pro-inflammatoires dont l'IL-1 α . La mort par pyroptose de cellules infectées permet d'éliminer en parallèle les niches de réplication des pathogènes intracellulaires. La structure des inflammasomes dits non-canoniques, associés à la caspase-11, ou 4 et 5 chez l'homme, reste mal connue. Les inflammasomes canoniques, qui sont eux, associés à la caspase-1, sont assemblés par des récepteurs cytosoliques de la famille des NLR (*nucleotide-binding domain leucine-rich repeat*) ou ALR (*Aim2-like receptors*). Ces récepteurs s'oligomérisent pour former une plateforme de nucléation pour des filaments formés par la protéine adaptatrice ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain*, aussi appelé PYCARD, CARD5, TMS1, Q9ULZ3), dont la surface permet, à son tour, la nucléation de filaments de pro-caspase-1 [4]. Ces inflammasomes forment des *specks* (ou structures ponctiformes) d'une taille de l'ordre du micron, visibles en microscopie, et qui sont uniques pour une cellule. NLRP3 (*nucleotide-binding domain leucine-rich repeat [LRR] and pyrin-containing receptor 3*, nommé également cryopyrin, CIAS1 [*cold autoinflammatory syndrome 1 protein*] ou NALP3 [*NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3*]) a été initialement décrit pour son association génétique avec des syndromes auto-inflammatoires héréditaires monogéniques dominants, nommés CAPS (*cryopyrin-associated periodic syndrome*) ou cryopyrinopathies [5]. Depuis, NLRP3 a été impliqué dans de nombreuses pathologies multifactorielles à composante inflammatoire, dont l'arthrite goutteuse, l'athérosclérose, le diabète de type 2 et la stéatose hépatique non-alcoolique [6, 7]. Il est également impliqué dans plusieurs maladies neurodégénératives, dont la sclérose en plaques et les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, ainsi que dans les pathologies associées au vieillissement [6-9]. NLRP3 est aussi important au cours des infections par différents pathogènes. Il intervient en effet dans la reconnaissance de

Les inflammasomes sont des plateformes de signalisation multiprotéiques assemblées par des récepteurs cytosoliques qui détectent les agents pathogènes, ou les dommages subis par la cellule [1] (➔).

(➔) Voir la Synthèse de Y. Jamilloux et T. Henry, *m/s* n° 11, novembre 2013, page 975

Leur formation aboutit à l'activation des caspases inflammatoires (les caspases-1 et 11 chez la souris, les caspases-1, 4 et 5 chez l'homme). Ces protéases sont à l'origine de la pyroptose, une forme de mort cellulaire pro-inflammatoire, en induisant le clivage d'une protéine cytosolique, appelée Gasdermine-D [2, 3] (➔) dont le domaine N-terminal, alors libéré, s'oligomérisent pour former des pores cytolitiques qui s'insèrent dans la membrane plasmique. La caspase-1 contrôle également la maturation, par un clivage direct, de pro-cytokines cytosoliques, dont l'IL(interleukine)-1 β et l'IL-18. Un mécanisme de sécrétion non conventionnelle contrôlé par la caspase-1, et surtout la rupture de la membrane plasmique due à la pyroptose, permettent ensuite la libération de ces

(➔) Voir la Synthèse de L. Cabon *et al.*, *m/s* n° 12, décembre 2013, page 1117

Vignette (Photo © Inserm - Elisabeth Génot).

divers pathogènes comme certaines amibes, des protozoaires, dont *Plasmodium*, des champignons, comme *Candida albicans* ou *Saccharomyces cerevisiae*, des bactéries parmi lesquelles *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*, et de divers virus tels que le virus de la grippe (*influenza*), le virus Sendai, et des adénovirus [10]. L'impact de NLRP3 dans la réponse à ces pathogènes reste partiel, en raison de la redondance des récepteurs de l'immunité innée.

NLRP3 est une protéine de 115 kDa constituée (1) d'un domaine LRR (*leucin-rich repeat*) C-terminal, dont la fonction régulatrice est mal comprise, (2) d'un domaine central d'oligomérisation (NOD, *nucleotide-binding and oligomerization domain* ou NACHT) qui présente une activité ATPase, et (3) d'un domaine N-terminal effecteur PYD (*pyrin domain*) capable de recruter l'adaptateur ASC. De nombreux motifs moléculaires (les PAMP ou les DAMP, pour *pathogen* ou *damage-associated molecular pattern*) qui sont associés aux pathogènes ou aux réponses pathologiques de la cellule, activent NLRP3. On peut citer, par exemple, l'hyperglycémie, les céramides, certains acides gras, des agrégats protéiques (amyloïde- β , IAPP [*islet amyloid polypeptide*]), des cristaux (de cholestérol, d'urate de sodium, d'amiante [11] (→), de silice, de pyrophosphate de calcium, d'alun), l'ATP extracellulaire, l'acide hyaluronique, les toxines bactériennes formant des pores, certains acides nucléiques bactériens et viraux, ou encore l'hémozoïne (pigment malarique) produit lors de l'infection par *Plasmodium* [12]. Comme le suggère la grande diversité structurale de ces activateurs, NLRP3 n'est donc pas un récepteur *stricto sensu* qui lie des PAMP ou des DAMP. Il s'agit plus d'un senseur de stress cytosolique. Dans cette revue, nous présentons les avancées récentes de la compréhension des voies de signalisation qui contrôlent l'activation de NLRP3. Une attention particulière est portée au rôle clé des modifications post-traductionnelles de NLRP3 pour l'assemblage de l'inflammasome.

(→) Voir la Nouvelle de C. Dostert et V. Pétrilli, *m/s* n° 11, novembre 2013, page 975

Les voies de signalisation qui contrôlent l'assemblage de l'inflammasome NLRP3

Dans les macrophages, l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 nécessite deux signaux, dits de *priming* (ou amorçage, signal 1) et d'activation (signal 2) (Figure 1). Les signaux de *priming* peuvent être des cytokines ou des PAMP/DAMP qui sont reconnus par des récepteurs qui initient la transcription de nombreux gènes. Les signaux d'activation correspondent, quant à eux, à différents stress cellulaires. Des conditions identiques semblent exister pour l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 dans d'autres types cellulaires, moins étudiés que les macrophages, dont les monocytes, les mastocytes ou les neutrophiles. Néanmoins, dans les monocytes humains, le signal de *priming* peut suffire à l'assemblage de l'inflammasome, dans certaines conditions [13, 14].

Le *priming* de NLRP3 se produit à la suite de l'activation par leurs ligands de récepteurs, dont les TLR (*Toll-like receptors*), NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain 2*), ou RAGE (*receptor for advanced glycation end products*), pour les PAMP/DAMP, ou, pour les cytokines,

les récepteurs du TNF (*tumor necrosis factor*), des IL-1, et les récepteurs des anaphylatoxines C3a et C5a du système du complément [15, 16]. Une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ou ROS, *reactive oxygen species*) permet également le *priming* de NLRP3. Plusieurs voies de *priming* sont successivement activées lors de l'engagement des TLR. La première à avoir été décrite est celle qui implique l'activation de la transcription induite par ces récepteurs et la synthèse protéique *de novo* qui en résulte [15]. Ce *priming*, dit transcriptionnel, est effectif plusieurs heures après l'engagement des récepteurs. Il dépend de MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*), TRIF (*TIR domain-containing adapter-inducing interferon- β*), FADD (*Fas associated protein with death domain*) et caspase-8, ainsi que des ROS, qui activent le facteur NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) [17, 18]. L'expression de NLRP3, alors fortement augmentée, suffit à se substituer au *priming*. Il a donc été suggéré que le niveau basal de NLRP3 serait insuffisant pour l'assemblage de l'inflammasome et que le *priming* reposerait alors sur l'augmentation de son expression. Ce *priming* transcriptionnel est nécessaire pour l'expression de certains substrats de l'inflammasome, dont la pro-IL-1 β . Par contre, les expressions d'ASC, de pro-caspase-1 et d'autres substrats de NLRP3, comme la pro-IL-18, sont constitutives et ne sont en revanche pas affectées par ce *priming*.

À côté du *priming* transcriptionnel, l'engagement des TLR et du récepteur des IL-1 (IL-1R), mais pas des récepteurs du TNF (TNFR), permet très précocement et transitoirement, un *priming* de NLRP3, indépendamment de la transcription et de la synthèse protéique [19]. Le niveau basal de NLRP3 suffirait donc à l'assemblage de l'inflammasome, ce qui suggère que le *priming* transcriptionnel repose sur l'expression d'autres facteurs qui restent à définir. Les mécanismes de *priming* sont donc multiples. À des étapes précoces, ils reposent uniquement sur des modifications post-traductionnelles. Ce *priming* non-transcriptionnel est opérationnel très rapidement (dès 10 à 30 min après l'engagement des TLR, par exemple) *via* la voie MyD88/IRAK1/4 (*IL-1 receptor-associated kinase 1/4*), après activation de TLR4 et de TLR2, et/ou légèrement plus tardivement (entre 30 min et 1 h), par la voie de signalisation TRIF/IRAK1/FADD/caspase-8/RIP1 (*receptor-interacting protein 1*), initiée par l'activation de TLR4 et de TLR3. Il dépend également des ROS mitochondriales qui suffisent à se substituer à l'engagement des TLR [19-21]. Dans les phases tardives (entre 12 et 24 h), l'engagement de TLR4, mais pas des TNFR ou de TLR2, produit une désensibilisation de NLRP3 vis-à-vis des signaux d'activation. Deux mécanismes de désensibilisation,

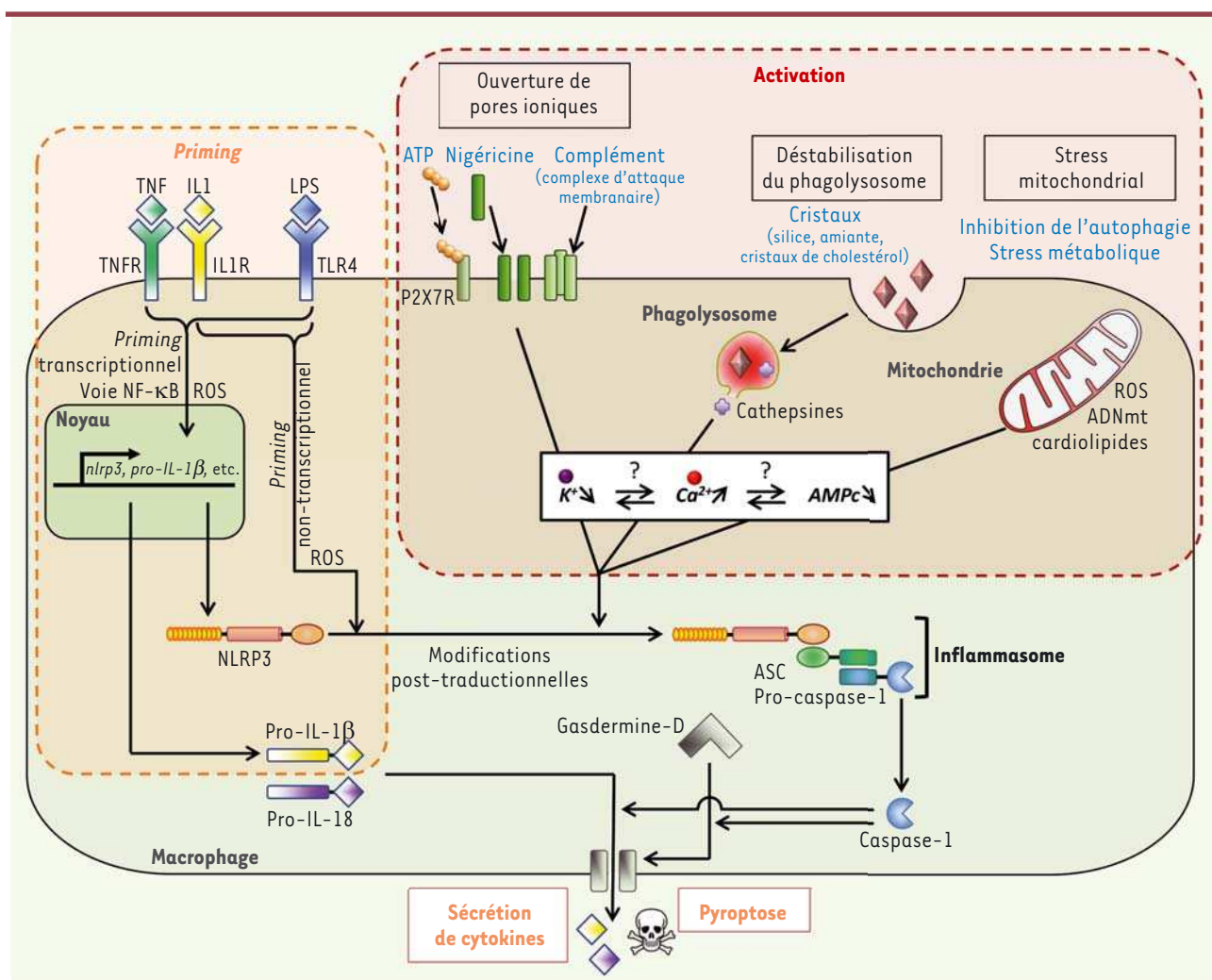


Figure 1. Voies de signalisation contrôlant l'assemblage de l'inflammasome. Le priming de NLRP3 (nucleotide-binding, LRR and PYD domains-containing protein 3) dépend de l'activation d'autres récepteurs de l'immunité innée ou de récepteurs de cytokines. Son activation est le résultat de différents stress cellulaires ciblant, entre autres, la perméabilité ionique de la membrane plasmique, les lysosomes ou les fonctions mitochondriales, qui perturbent l'homéostasie ionique du cytoplasme. Reçus de façon coordonnée, ces deux signaux conduisent à des modifications post-traductionnelles de NLRP3 permettant l'assemblage de l'inflammasome, l'activation de la caspase-1, le clivage de la Gasdermine-D et la pyroptose, ainsi que la maturation et la sécrétion de cytokines. TNF : tumor necrosis factor ; TNFR : tumor necrosis factor receptor ; IL1 : interleukin-1 ; IL1R : interleukin-1 receptor ; IL-18 : interleukin-18 ; LPS : lipopolysaccharide ; TLR : Toll-like receptor ; NF-κB : nuclear factor-kappa B ; ROS : reactive oxygen species ; ATP : adenosine triphosphate ; P2X7R : purinergic receptor P2X 7 ; AMPc : cyclic adenosine monophosphate ; ASC : apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain.

au moins, ont été documentés : l'induction de la protéine p62 (ou *sequestosome 1*) et la dégradation de NLRP3 par autophagie, et/ou la sécrétion d'IFN-1 (interféron de type I, IFN α/β) qui initie la production d'oxyde nitrique (NO) et inhibe NLRP3 [16, 22]. La combinaison de différentes voies de signalisation, en aval de TLR4, permet ainsi successivement, un priming non-transcriptionnel, puis transcriptionnel et, finalement, une désensibilisation de NLRP3. Bien que peu étudié, ce déroulé semble être différent lors de l'engagement d'autres récepteurs de priming, comme les TNFR. L'impact respectif de ces différentes voies *in vivo* en contexte infectieux ou auto-inflammatoire, reste cependant encore mal compris.

À la suite du priming, NLRP3 devient compétent pour être activé. Différents signaux d'activation, classés selon le type de stress cellulaire qu'ils induisent, ont été décrits. Les premiers provoquent l'ouverture de pores dans la membrane plasmique. C'est le cas de certaines toxines bactériennes, dont la nigéricine (produite par *Streptomyces hygroscopicus*), la forme clivée de la Gasdermine-D, qui contrôle l'activation de NLRP3 en aval de la caspase-11, ou le complexe d'attaque membranaire du complément [23]. L'ATP, libéré dans le milieu par les cellules nécrosées, permet également

l'ouverture de pores *via* le récepteur P2X7 (*purinergic receptor P2X 7*) [24]. La deuxième catégorie de signaux correspond à des structures particulières comme l'amiante, la silice, les cristaux de cholestérol, l'amyloïde- β et les liposomes qui, en s'accumulant dans les lysosomes après avoir été phagocytés, entraînent leur rupture et la libération de cathepsines et de Ca^{2+} dans le cytosol [25]. Les *specks*, qui contiennent l'inflammasome, sont également libérés dans le milieu extracellulaire par les cellules pyroptotiques ; ils sont ensuite phagocytés par les macrophages, leur ingestion provoquant l'activation de l'inflammasome, par la déstabilisation des lysosomes, et celle de la caspase-1, par un recrutement direct, ce qui amplifie la réponse des cellules [26, 27]. Les perturbateurs des fonctions mitochondriales forment une troisième catégorie de signaux. Ils comprennent les stress métaboliques et les inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale ou de la mitophagie¹ [28]. De nombreux autres signaux activateurs de NLRP3 n'entrent dans aucune de ces catégories, comme les rayons ultra-violet ou l'activation par le calcium extracellulaire de récepteurs couplés aux protéines G [29]. Ces stimulus sont à l'origine de différentes signalisations qui activent NLRP3 [12]. Bien qu'aucun élément de convergence absolu ne permette, encore, d'établir un consensus, certaines voies apparaissent communes à de nombreux activateurs comme (1) la mise en place d'un efflux de potassium, qui produit un changement conformationnel des oligomères NLRP3 ; (2) une augmentation du calcium cytosolique, *via* l'ouverture des canaux ioniques TRP (*transient receptor potential*) ou la signalisation PLC/IP3R (*phospholipase C/inositol 3 phosphate receptor*), qui favoriserait directement le recrutement d'ASC par NLRP3 et/ou qui diminuerait la production d'AMPc, inhibiteur de l'inflammasome ; (3) les dommages mitochondriaux – qui peuvent être consécutifs à l'entrée du calcium dans les mitochondries – conduisant à la production de ROS, à la libération d'ADN mitochondrial et à l'exposition de cardiolipides à la membrane externe des mitochondries [29, 30]. Ces deux derniers ont été proposés comme des activateurs interagissant directement avec NLRP3 [31, 32].

L'assemblage de l'inflammasome NLRP3 est donc finement contrôlé par la coordination des étapes de *priming* et d'activation. Les voies de signalisation et les mécanismes moléculaires impliqués sont encore mal caractérisés. Toutefois, plusieurs travaux récents révèlent l'importance des modifications post-traductionnelles de NLRP3 dans ce processus (Figure 2).

Modifications post-traductionnelles de l'inflammasome NLRP3 et contrôle de son assemblage

Le *priming* de NLRP3 est donc en partie indépendant de la transcription. Très récemment, un rôle clé a été révélé pour la phosphorylation de la sérine S198 (sérine en position 198) de NLRP3 chez l'homme (qui correspond à la sérine S194 chez la souris), par JNK1 (*c-Jun N-terminal kinase 1*). La phosphorylation de cette sérine est un événement commun au *priming* transcriptionnel et non-transcriptionnel. Elle a

pour origine les voies de signalisation impliquant MyD88 et/ou TRIF, et sa cinétique peut être reliée au *priming* de NLRP3 par ces voies [33]. Cette phosphorylation induit une déubiquitination de NLRP3, et semble favoriser son oligomérisation. Un polymorphisme de NLRP3 interférant avec le processus de phosphorylation de la sérine (S198N) a été identifié chez un patient présentant un CAPS. Néanmoins, ce patient était également porteur d'une autre mutation, bien caractérisée dans ce syndrome (Y570C), et sans doute responsable de la pathologie [34]. Ces résultats sont cohérents avec l'observation plus ancienne d'une déubiquitination de NLRP3 dépendant des ROS mitochondriales produites lors du *priming* non-transcriptionnel induit par un bref engagement de TLR4 [20]. Cependant aucune E3 ubiquitine ligase ou déubiquitinase, impliquée dans ce *priming* court, n'a été identifiée. Les chaperonnes SGT1/HSP90 (*suppressor of the G2 allele of skp1/heat shock protein 90*), qui sont associées, à l'état basal, à NLRP3 et possèdent une activité E3 ligase, pourraient participer au processus [35]. L'augmentation de la quantité de protéine NLRP3 lors du *priming* transcriptionnel, repose également en partie, sur la répression de l'E3 ligase SCF^{FBXL2} (*Skp-cullin-F box L2*) responsable de l'ubiquitination de NLRP3 sur la lysine K689 qui conduit à sa dégradation par le protéasome. L'expression de l'E3 ligase SCF^{FBXL3} est induite lors du *priming* transcriptionnel. Elle réprime SCF^{FBXL2} par ubiquitination et dégradation [36]. À noter qu'au cours du *priming* transcriptionnel, la pro-IL-1 β est également ubiquitinée sur la lysine K133 par des enzymes qui restent cependant à identifier. Cette ubiquitination semble favoriser le clivage de la cytokine par la caspase-1 [37]. Aucune modification similaire n'a été rapportée à notre connaissance pour les autres substrats de l'inflammasome, comme la pro-IL-18 ou la Gasdermine-D, et l'ubiquitination ne semble pas être un mécanisme commun d'adressage des substrats vers l'inflammasome.

L'étape d'activation de l'inflammasome repose aussi sur des modifications post-traductionnelles de NLRP3. L'assemblage de l'inflammasome nécessite en effet la déubiquitination de NLRP3 par la déubiquitinase BRCC3 (*BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 3*) en aval de tous les activateurs qui ont été testés [38]. Cette déubiquitination semble donc constituer un élément clé de l'activation de l'inflammasome. Contrairement à celle impliquée dans le *priming*, elle est indépendante des ROS mitochondriales. Elle repose donc sur des voies de signalisation différentes [20]. Les domaines NACHT et LRR peuvent être ubiquitinés, et NLRP3 présente un mélange de chaînes d'ubiquitines de type K48 et K63 [38]. BRCC3, spécifique des chaînes K63, cible le

¹ Une forme d'autophagie s'adressant spécifiquement aux mitochondries.

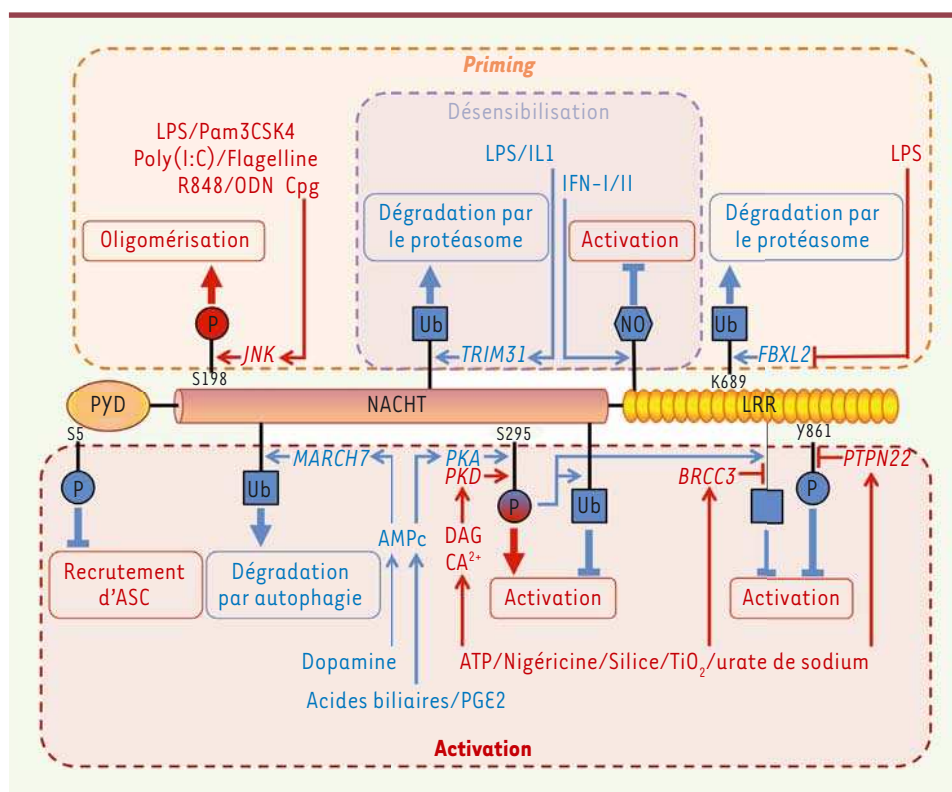


Figure 2. Modifications post-traductionnelles de NLRP3 impliquées dans la régulation de l'inflammasome. NLRP3 est composé des domaines PYD, NACHT et LRR modifiés par ubiquitination (Ub), phosphorylation (P) et nitrosylation (NO) au cours des phases de priming, d'activation et de désensibilisation de NLRP3. Les enzymes responsables de ces modifications sont représentées en italique. Les stimuli et enzymes activateurs sont indiqués en rouge. Les stimuli et modifications inhibiteurs sont indiqués en bleu. NLRP3 : NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 ; PYD : pyrin domain ; LRR : leucine-rich repeats ; LPS : lipopolysaccharide ; Pam3CSK4, synthetic triacylated lipoprotein C₈₁H₁₅₆N₁₀O₁₃S ; Poly(I:C) : polyinosinic-polycytidylic acid ;

R848 : resiquimod ; ODN CpG : oligodéoxynucléotide CpG ; IL1 : interleukine-1 ; IFN-I : interféron de type 1 ; IFN-II : interféron de type 2 ; PGE2 : prostaglandine E2 ; ATP : adenosine triphosphate ; TiO₂ : dioxyde de titane ; AMPc : cyclic adenosine monophosphate ; DAG : diacyl glycerol ; JNK : c-Jun N-terminal kinase ; TRIM31 : tripartite motif containing 31 ; FBXL2 : Skp-cullin-F box L2 ; MARCH7 : membrane-associated ring-CH-type finger 7 ; PKD : protein kinase D ; PKA : protein kinase A ; BRCC3 : BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 3 ; PTPN22 : protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22.

domaine LRR de NLRP3. Cependant, ni les lysines ubiquitinées, ni les conséquences biochimiques et structurales de cette ubiquitination ne sont connues. Dans des conditions d'inhibition de BRCC3, l'ubiquitination de NLRP3 empêche l'assemblage de l'inflammasome ; elle n'est cependant pas associée à sa dégradation. Des événements de déphosphorylation sont également impliqués dans l'activation de NLRP3. Ainsi, la phosphatase PTPN22 (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22), qui a été associée à plusieurs pathologies inflammatoires, participe à l'activation de NLRP3, en aval d'activateurs de nature variée. Elle constitue un autre élément générique du processus. PTPN22 cible la tyrosine Y861 dans le domaine LRR de NLRP3. Son recrutement nécessite ASC. Il est donc probablement consécutif à l'association préalable de NLRP3 et d'ASC [39]. Des substitutions (Y861H et Y861C) au sein du domaine LRR ont été identifiées chez certains patients présentant un CAPS, suggérant l'importance de ces résidus dans le contrôle de l'activation de NLRP3 [40]. L'assemblage de l'inflammasome nécessite également la déphosphorylation de la sérine S5 du domaine PYD, qui permet le recrutement d'ASC. Cette déphosphorylation pourrait être réalisée par PP2A (protein phosphatase 2 A) mais savoir si elle se produit lors du priming ou lors de l'activation n'est pas défini [41]. La phosphorylation de NLRP3 pourrait également réguler l'étape d'activation. Plusieurs kinases interagissent en effet avec NLRP3 et participent

à son activation, mais leurs rôles dans sa phosphorylation ne sont pas établis. En particulier NEK7 (NIMA-related protein kinase 7), qui se lie à NLRP3, est nécessaire à l'assemblage de l'inflammasome auquel elle participe, mais son activité kinase n'est pas essentielle [42]. Très récemment, il a été montré que la phosphorylation de la sérine S295 de NLRP3 par les PKD (protein kinase D) 1-3, activées en aval de la PLC et du DAG (diacylglycérol) serait nécessaire à l'assemblage de l'inflammasome [43]. Les mutants S295A et S295E, qui miment respectivement les états déphosphorylé et phosphorylé de cette sérine, sont tous deux inactifs. Ce résultat suggère qu'un cycle de déphosphorylation/phosphorylation se produirait sur ce résidu. L'analyse de la localisation des mutants suggère que la déphosphorylation de la sérine S295 permettrait le recrutement initial de NLRP3 dans les MAM (mitochondria-associated ER membranes). Sa phosphorylation par les PKD1-3 contrôlerait ensuite sa relocalisation, des MAM vers le speck cytosolique. Ce modèle est cohérent avec des études précédentes qui montrent l'inhibition de l'inflammasome par la voie dépendant de l'AMPc, qui est activée par les acides

biliaires, via le récepteur TGR5 (*Takeda G-protein-coupled receptor 5*), et par l'eicosanoïde PGE2 (*prostaglandin E2*), via son récepteur EP4 (*E prostanoïd 4*). En effet, cette inhibition repose sur la phosphorylation par la PKA de la sérine S295, ce qui conduit à l'ubiquitination de NLRP3 sans qu'il ne soit dégradé [44, 45]. Le mutant S295A avait été décrit pour être actif, mais ce résultat, contradictoire, pourrait s'expliquer par le système de surexpression utilisé par les auteurs [45]. De nombreuses mutations identifiées chez les patients présentant un CAPS intéressent des sites à proximité de la sérine 295 et rendent NLRP3 insensible à l'inhibition par l'AMPc. Elles bloquent (au moins pour l'une d'entre elles) la phosphorylation par la PKA, suggérant un rôle important de ce point de régulation [45]. La répression par l'AMPc semble reposer sur plusieurs mécanismes. Dans le contexte de l'inhibition de NLRP3 par la dopamine via son récepteur DRD1 (*dopamin receptor D1*), l'AMPc se lie à NLRP3 et induit l'ubiquitination des domaines NACHT et LRR par l'É3 ligase MARCH7 (*membrane-associated ring-CH-type finger 7*). Ces ubiquitinations conduisent à la dégradation de NLRP3 par autophagie [46].

L'assemblage de l'inflammasome pourrait être également modulé par des modifications touchant d'autres éléments qui le constituent. Notamment, la caspase-1 peut être ubiquitinée par cIAP2 (*cellular inhibitor of apoptosis 2*) dont l'expression favorise l'activation de NLRP3. ASC est également ubiquitiné par LUBAC (*linear ubiquitin chain assembly complex*) et est phosphorylé sur plusieurs sites au cours du priming et/ou de l'activation. L'impact de ces différentes modifications sur l'activation de l'inflammasome demeure cependant incertain [47-49]. L'ubiquitination d'ASC par des chaînes d'ubiquitines de type K63 pourrait également être impliquée dans la dégradation de l'inflammasome par autophagie et l'arrêt de la réponse de la cellule à la fin du processus d'activation [50].

La désensibilisation de NLRP3, après un long engagement de certains des récepteurs de priming, repose sur des modifications qui l'altèrent. Ainsi, l'É3 ligase TRIM31 (*tripartite motif containing 31*), induite par le lipopolysaccharide bactérien (LPS) et l'IL-1, induit l'ubiquitination de NLRP3 avec des chaînes K48, ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome [51]. La sécrétion autocrine/paracrine d'IFN- γ conduit à la production de NO, en activant l'iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) responsable de la S-nitrosylation de NLRP3 au niveau de son domaine LRR riche en cystéines, qui inhibe l'assemblage de l'inflammasome [22]. L'IFN- γ (un interféron de type II) inhibe aussi NLRP3, par le même mécanisme [52].

Conclusion

La dérégulation du récepteur NLRP3 est impliquée dans de nombreuses pathologies à composante inflammatoire. L'inhibition de l'inflammasome NLRP3 porte ainsi d'importants espoirs thérapeutiques. Les voies de signalisation qui contrôlent son assemblage restent cependant insuffisamment comprises. Récemment, les modifications post-traductionnelles de NLRP3 se sont néanmoins révélées être des points clés de sa régulation. L'identification de la nature de ces modifications, des résidus qui sont concernés, et, surtout, des complexes enzymatiques responsables permettront, dans l'avenir, de mieux comprendre

les mécanismes d'assemblage de l'inflammasome et, nous l'espérons, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. \diamond

SUMMARY

Regulation of the NLRP3 inflammasome

The innate immunity constitutes an efficient barrier by rapidly detecting pathogens and tissue damages through pattern recognition receptors including NLRP3. Moreover, inappropriate NLRP3 activation causes deleterious inflammation and contributes to various conditions including atherosclerosis, diabetes, gout and Alzheimer's diseases. NLRP3 assembles a multimeric inflammasome complex serving as an activation platform for caspase-1 that controls processing and release of cytosolic inflammatory factors and cytokines including IL-1 β . Inflammasome assembly is tightly controlled and requires coordinated NLRP3 priming, through cytokine or other pattern recognition receptors, followed by activation by cellular stress. Here, we describe recent advances in the understanding of the signalling pathways supporting the priming and activation of NLRP3, with a special focus on the key role of post-translational modifications of NLRP3, including phosphorylation and ubiquitination, in inflammasome regulation. \diamond

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été financés en partie par l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR-13-JSV3-0002-01) et l'European Research Council (ERC-2013-CoG_616986) (B.P). Les auteurs remercient Amaury Rey pour la relecture critique du manuscrit.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES


1. Jamilloux Y, Henry T. Les inflammasomes : plates-formes de l'immunité innée. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 975-84.
2. Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, et al. Caspase-1 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* 2015 ; 526 : 666-71.
3. Cabon L, Martinez-Torres AC, Susin SA. La mort cellulaire programmée ne manque pas de vocabulaire. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 1117-24.
4. Lu A, Magupalli VG, Ruan J, et al. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell* 2014 ; 156 : 1193-206.
5. Shinkai K, McCalmont TH, Leslie KS. Cryopyrin-associated periodic syndromes and autoinflammation. *Clin Exp Dermatol* 2008 ; 33 : 1-9.
6. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006 ; 440 : 237-41.
7. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, et al. The NALP3/NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced autoinflammation and insulin resistance. *Nat Med* 2011 ; 17 : 179-88.
8. Youm Y-H, Grant RW, McCabe LR, et al. Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low grade inflammation to functional decline in aging. *Cell Metab* 2013 ; 18 : 519-32.
9. Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol* 2014 ; 14 : 463-77.
10. Franchi L, Muñoz-Planillo R, Núñez G. Sensing and reacting to microbes via the inflammasomes. *Nat Immunol* 2012 ; 13 : 325-32.

RÉFÉRENCES

11. Dostert C, Pétrilli V. Amiante et inflammation, rôle de l'inflammasome. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 916-8.
12. Elliott EJ, Sutterwala FS. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. *Immunol Rev* 2015 ; 265 : 35-52.
13. Gaidt MM, Ebert TS, Chauhan D, et al. Human monocytes engage an alternative inflammasome pathway. *Immunity* 2016 ; 44 : 833-46.
14. Jamilloux Y, Lefeuvre L, Magnotti F, et al. Familial Mediterranean fever mutations are hypermorphic mutations that specifically decrease the activation threshold of the P2Y₆ inflammasome. *Rheumatology* 2017 ; doi: 10.1093/rheumatology/kex373.
15. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, et al. Cutting edge: NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 2009 ; 183 : 787-91.
16. Franchi L, Eigenbrod T, Núñez G. Cutting edge: TNF- α mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J Immunol* 2009 ; 183 : 792-6.
17. Gurung P, Anand PK, Malireddi RKS, et al. FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes. *J Immunol* 2014 ; 192 : 1835-46.
18. Zhang X, Fan C, Zhang H, et al. MLKL and FADD are critical for suppressing progressive lymphoproliferative disease and activating the NLRP3 inflammasome. *Cell Rep* 2016 ; 16 : 3247-59.
19. Fernandes-Alnemri T, Kang S, Anderson C, et al. Cutting edge: TLR signaling licenses IRAK1 for rapid activation of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol* 2013 ; 191 : 3995-9.
20. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, et al. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem* 2012 ; 287 : 36617-22.
21. Kang S, Fernandes-Alnemri T, Rogers C, et al. Caspase-8 scaffolding function and MLKL regulate NLRP3 inflammasome activation downstream of TLR3. *Nat Commun* 2015 ; 6 : 7515.
22. Hernandez-Cuellar E, Tsuchiya K, Hara H, et al. Cutting edge: nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. *J Immunol* 2012 ; 189 : 5113-7.
23. Rühl S, Broz P. Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K⁺ efflux. *Eur J Immunol* 2015 ; 45 : 2927-36.
24. Solle M, Labasi J, Perregaux DG, et al. Altered cytokine production in mice lacking P2X₇ receptors. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 125-32.
25. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, et al. Silica crystals and aluminum salts mediate NALP-3 inflammasome activation via phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 2008 ; 9 : 847-56.
26. Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, et al. The adaptor ASC has extracellular and prionoid activities that propagate inflammation. *Nat Immunol* 2014 ; 15 : 727-37.
27. Baroja-Mazo A, Martín-Sánchez F, Gomez AI, et al. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat Immunol* 2014 ; 15 : 738-48.
28. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2011 ; 469 : 221-5.
29. Lee GS, Subramanian N, Kim AI, et al. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP. *Nature* 2012 ; 492 : 123-7.
30. Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, et al. K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* 2013 ; 38 : 1142-53.
31. Iyer SS, He Q, Janczy JR, et al. Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity* 2013 ; 39 : 311-23.
32. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, et al. Autophagy proteins regulate innate immune response by inhibiting NALP3 inflammasome-mediated mitochondrial DNA release. *Nat Immunol* 2011 ; 12 : 222-30.
33. Song N, Liu ZS, Xue W, et al. NLRP3 Phosphorylation is an essential priming event for inflammasome activation. *Mol Cell* 2017 ; 68 : 185-7.
34. Saito M, Fujisawa A, Nishikomori R, et al. Somatic mosaicism of CIAS1 in a patient with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome. *Arthritis Rheum* 2005 ; 52 : 3579-85.
35. Mayor A, Martinon F, De Smedt T, et al. A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 497-503.
36. Han S, Lear TB, Jerome JA, et al. Lipopolysaccharide primes the NALP3 inflammasome by inhibiting its ubiquitination and degradation mediated by the SCFFBXL2 E3 ligase. *J Biol Chem* 2015 ; 290 : 18124-33.
37. Duong BH, Onizawa M, Oses-Prieto JA, et al. A20 restricts ubiquitination of pro-interleukin-1 β protein complexes and suppresses NLRP3 inflammasome activity. *Immunity* 2015 ; 42 : 55-67.
38. Py BF, Kim M-S, Vakifahmetoglu-Norberg H, et al. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Mol Cell* 2013 ; 49 : 331-8.
39. Spalinger MR, Kasper S, Gottier C, et al. NLRP3 tyrosine phosphorylation is controlled by protein tyrosine phosphatase PTPN22. *J Clin Invest* 2016 ; 126 : 1783-1800.
40. Frenkel J, Kempen MJA van, Kuis W, et al. Variant chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome due to a mutation within the leucine-rich repeat domain of CIAS1. *Arthritis Rheum* 2004 ; 50 : 2719-20.
41. Stutz A, Kolbe CC, Stahl R, et al. NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain. *J Exp Med* 2017 ; 214 : 1725-36.
42. He Y, Zeng MY, Yang D, et al. Nek7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* 2016 ; 530 : 354-7.
43. Zhang Z, Meszaros G, He WT, et al. Protein kinase D at the Golgi controls NLRP3 inflammasome activation. *J Exp Med* 2017 ; 214 : 2671-93.
44. Guo C, Xie S, Chi Z, et al. Bile acids control inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Immunity* 2016 ; 45 : 802-16.
45. Mortimer L, Moreau F, MacDonald JA, et al. NLRP3 inflammasome inhibition is disrupted in a group of auto-inflammatory disease CAPS mutations. *Nat Immunol* 2016 ; 17 : 1176-86.
46. Yan Y, Jiang W, Liu L, et al. Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell* 2015 ; 160 : 62-73.
47. Hara H, Tsuchiya K, Kawamura I, et al. Phosphorylation of ASC acts as a molecular switch controlling the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nat Immunol* 2013 ; 14 : 1247-55.
48. Labbé K, McIntire CR, Doiron K, et al. Cellular inhibitors of apoptosis proteins cIAP1 and cIAP2 are required for efficient caspase-1 activation by the inflammasome. *Immunity* 2011 ; 35 : 897-907.
49. Rodgers MA, Bowman JW, Fujita H, et al. The linear ubiquitin assembly complex (LUBAC) is essential for NLRP3 inflammasome activation. *J Exp Med* 2014 ; 211 : 1333-47.
50. Shi CS, Shenderov K, Huang NN, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol* 2012 ; 13 : 255-63.
51. Song H, Liu B, Huai W, et al. The E3 ubiquitin ligase TRIM31 attenuates NLRP3 inflammasome activation by promoting proteasomal degradation of NLRP3. *Nat Commun* 2016 ; 7 : 13727.
52. Mishra BB, Rathinam VAK, Martens GW, et al. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β . *Nat Immunol* 2013 ; 14 : 52-60.

TIRÉS À PART

B.F. Py



Tarifs d'abonnement m/s - 2018


Abonnez-vous

à médecine/sciences

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement

page 98 dans ce numéro de m/s



Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway

Marine Gros Lambert¹⁻⁵
Bénédicte F Py¹⁻⁵

¹Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), Université de Lyon, Lyon, France; ²INSERM, U1111, Lyon, France; ³Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France; ⁴Centre International de Recherche en Infectiologie, Université Lyon 1, Lyon, France; ⁵CNRS, UMR5308, Lyon, France

Abstract: Inflammation is triggered by a repertoire of receptors detecting infections and damages. Some of these receptors directly bind microbial ligands, while others recognize endogenous molecules exposed under stress conditions, including infections. Most of these receptors can be engaged by a relatively limited number of stimuli. Differently, NLRP3 acts as a broad sensor of cell homeostasis rupture and can be activated downstream of a plethora of stimuli. NLRP3 then assembles a multiprotein platform resulting in caspase-1 activation, which controls, by direct cleavage, the maturation of cytosolic pro-cytokines including pro-interleukin-1 β . In addition, caspase-1 processes cytosolic gasdermin-D and unleashes its pore-forming N-terminal domain, leading to the release of mature cytosolic cytokines and alarmins, as well as pyroptotic cell lysis. Accumulating evidences of the aggravating role of NLRP3-mediated inflammation in various highly prevalent human conditions, including diabetes, neurodegenerative and cardiovascular diseases, raises a huge clinical interest. Nevertheless, the molecular mechanism governing NLRP3 activation remains insufficiently understood. In line with the detrimental consequences of NLRP3 activation illustrated by the aforementioned pathologies, this process is tightly regulated. In this review, we address the current understanding of the control of NLRP3 activity which can be divided into two coordinated processes referred to as priming and activation. In particular, we detail the emerging role of NLRP3 post-translational modifications critical in inflammasome assembly regulation.

Keywords: inflammation, NLRP3, inflammasome, post-translational modifications

Introduction

Inflammation is usually triggered in response to infections and/or tissue damages. It constitutes a protective response, critical for the recruitment of immune cells mediating pathogen clearance and tissue repair at the affected site.¹ Pathogens and damages are sensed by tissue resident cells, including innate immune cells, through a repertoire of germline-encoded dedicated receptors known as pattern recognition receptors (PRRs). These receptors are activated by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), typically shared throughout large kindred of microbes but absent from the host organism, and by host-derived cellular stress signals, markers of tissue and cell homeostasis disruption, known as damage-associated molecular patterns (DAMPs).^{2,3}

Many inflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF), and interferon- β (IFN- β) are regulated at the transcriptional level and secreted through the endoplasmic reticulum (ER)/Golgi pathway. Others, including IL-1 β and IL-18, are produced as cytosolic precursors and their secretion is tightly controlled by

Correspondence: Bénédicte F Py
CIRI, Université de Lyon, 21 Avenue
Tony Garnier, 69007 Lyon, France
Tel +33 4 26 73 13 52
Email benedicte.py@inserm.fr



inflammatory caspases, namely caspase-1 and -11 in mice, and caspase-1, -4, and -5 in humans. These caspases are activated within cytosolic multimolecular complexes named inflammasomes (Figure 1). Canonical inflammasomes form activation platforms for caspase-1. Their assembly depends on some dedicated cytosolic PRRs from the nucleotide-binding domain leucine-rich repeat (NLR) family including NLR and pyrin domain containing receptor 1 (NLRP1), NLRP3, and NLR and caspase recruitment domain containing receptor 4 (NLRC4); the AIM2-like receptors (ALR) family including absent in melanoma 2 (AIM2); or the tripartite motif (TRIM) family including pyrin. Activation of these PRRs triggers either their oligomerization (as for NLRC4 or AIM2)^{4,5} or conformational changes of pre-formed oligomers (as for NLRP3).⁶ The PRR oligomer then recruits the adaptor protein ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain [CARD]) through pyrin domain (PYD)–PYD interactions and constitutes a nucleation platform for filaments of ASC. The surface of the filament in turn enables the

nucleation of filaments of the effector pro-caspase-1 through CARD–CARD interactions.⁷ Inflammasomes form specks, also referred to as pyroptosomes, in the micron range in size and unique per cell, that can be observed by light microscopy.⁸ Pyroptosome assembly constitutes an all-or-nothing response at the single cell level. Noteworthy, NLRC4 which possesses a CARD domain can either directly recruit pro-caspase-1 or trigger the formation of ASC filaments, serving as an amplification mechanism required for cytokine maturation but dispensable for pyroptosis.⁹ The inflammasomes that control the activation of caspase-11 in mice and caspase-4 and -5 in human in response to cytosolic lipopolysaccharide (LPS) are referred to as non-canonical. Their composition remains poorly understood, and the lipid A moiety of LPS has been proposed to directly interact with the CARD of caspase-11, -4, and -5 which then undergo oligomerization, resulting in the activation of the caspases.¹⁰ Therefore, non-canonical inflammasome assembly does not depend on dedicated PRRs, and caspase-11, -4, and -5 act as receptors themselves.

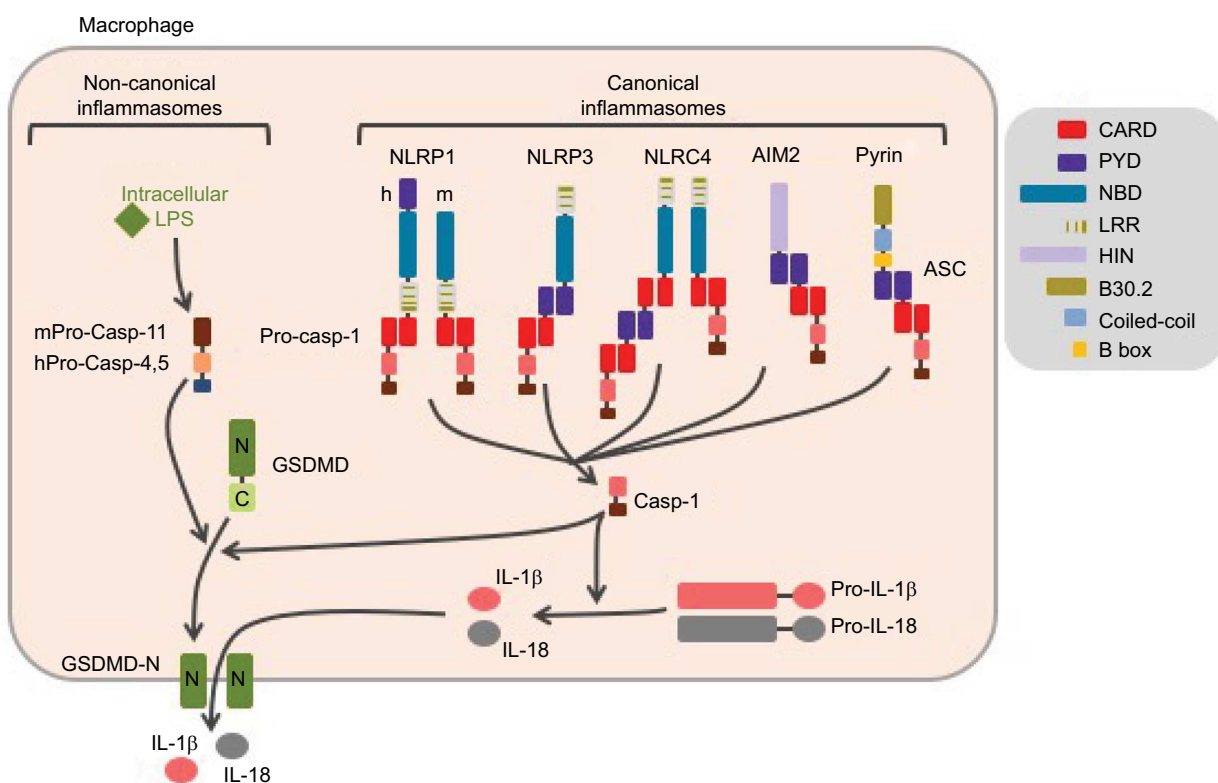


Figure 1 Canonical and non-canonical inflammasomes.

Notes: Canonical inflammasomes assemble downstream of cytosolic PRRs including NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2, and pyrin and control the activation of caspase-1. The ASC adaptor forms multimeric filaments and amplifies the response. The non-canonical inflammasomes are activated by cytosolic LPS and result in caspase-4 and -5 (homologs of mouse caspase-11) activation. All these inflammatory caspases cleave GSDMD which then forms cytolitic pores leading to pyroptosis. In addition, caspase-1 controls the maturation of cytosolic pro-cytokines.

Abbreviations: PRRs, pattern recognition receptors; ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain; LPS, lipopolysaccharide; GSDMD, gasdermin-D; h, human; m, mouse.

The caspase-1 protease controls maturation of pro-IL-1 β and pro-IL-18, produced as pro-cytokines in the cytosol by direct cleavage of the pro-forms.¹¹ In addition, all inflammatory caspases trigger a pro-inflammatory form of cell death named pyroptosis (from Greek roots *pyro*, relating to fire or fever, and *ptosis*, relating to falling). This process is mediated by the cleavage of the cytoplasmic gasdermin-D (GSDMD) protein, which leads to the release of its N-terminal domain that oligomerizes as pores in the plasma membrane.^{12–14} GSDMD pores and cell lysis mediate the release of mature IL-1 β and IL-18 together with IL-1 α and many other alarmins, as well as the ASC speck. Extracellular ASC specks enter neighbor cells by phagocytosis and propagate the inflammatory signal.^{15,16} Noteworthy, caspase-11, -4, and -5 do not directly cleave pro-IL-1 β and pro-IL-18. Non-canonical inflammasome controls cytokine maturation through sublytic plasma membrane permeabilization by GSDMD pores that activate the NLRP3 inflammasome.^{12,17}

NLRP3, also known as cryopyrin, CIAS1, or NALP3, was initially described for its genetic association with forms of hereditary autoinflammation known as familial cold autoinflammation syndrome (FCAS), Muckle–Wells syndrome (MWS), and neonatal-onset multisystem inflammatory disease/chronic infantile neurologic cutaneous articular syndrome (NOMID/CINCA), in the order of increasing severity.^{18,19} These diseases were then collectively named cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS). Since then, NLRP3-mediated inflammation has been additionally recognized to fuel a number of multifactorial diseases including gouty arthritis, atherosclerosis, type 2 diabetes, and non-alcoholic steatohepatitis, as well as several neurodegenerative diseases, including amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's and Parkinson's diseases, and other aging-related diseases.^{20–23} NLRP3 has also been involved in the response against diverse pathogens including ameba, protozoans including *Plasmodium*, fungi including *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*, bacteria including *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, and viruses including influenza, Sendai, and adenoviruses.²⁴ On contrary to the abovementioned conditions, NLRP3-dependent inflammation is mostly protective against infections, although the impact of *Nlrp3* deficiency is usually limited, probably due to some redundancies among PRRs. NLRP3 is a 115 kDa cytosolic protein composed of three domains: a C-terminal leucine-rich repeat (LRR) with poorly characterized regulatory functions, a central oligomerization domain NACHT or nucleotide binding oligomerization domain (NOD) with an ATPase activity, and a N-terminal pyrin domain (PYD) that recruits ASC.¹⁸ NLRP3 is activated by numerous and highly diverse PAMPs/DAMPs

as, for example, hyperglycemia, ceramides, fatty acids, protein aggregates (β -amyloid, islet amyloid polypeptide), crystals (cholesterol, sodium urate, asbestos, silica, calcium pyrophosphate, alum), extracellular ATP, hyaluronic acid, pore-forming bacterial toxins including nigericin, bacterial and viral nucleic acids, and hemozoin.^{25–27} The great diversity in the structures of these activators excludes the fact that NLRP3 acts as their direct receptor. Instead, it is now well accepted that NLRP3 indirectly senses cytosolic stress. In this review, we describe the recent advances in our understanding of signaling pathways controlling NLRP3 activation, with a particular focus on the newly discovered key role of NLRP3 post-translational modifications in inflammasome assembly.

Signaling pathways controlling NLRP3 inflammasome assembly

Regulation of the NLRP3 inflammasome has been most extensively investigated in macrophages. In these cells, NLRP3 inflammasome assembly results from a two-step process referred to as priming and activation (Figure 2). The priming signal usually corresponds to cytokines or DAMPs/PAMPs recognized by receptors that transcriptionally control the expression of numerous genes. The activation signal can be provided by various cellular stresses and is transcription independent.

NLRP3 inflammasome priming

Consistent with the high diversity of the conditions leading to NLRP3 inflammasome assembly, a large number of receptors, including PRRs as well as cytokine and anaphylatoxin receptors, control NLRP3 priming. Among the PRRs, Toll-like receptors (TLRs), nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2), and receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) can prime NLRP3 for further activation.^{28–32} The immune system itself can autonomously prime NLRP3 through the anaphylatoxin C3a and C5a receptors and cytokines IL-1 and TNF receptors.^{33–36} In addition, excessive reactive oxygen species (ROS) production also leads to NLRP3 priming.

Upon TLR binding by their agonists, several pathways resulting in NLRP3 priming are successively activated over time (Figure 3). The first pathway that has been described relies on transcription activation downstream of these receptors and *de novo* protein synthesis.³⁵ This pathway is referred to as transcriptional priming or late priming, since it requires several hours (>3 h) before NLRP3 is licensed for further activation. Transcriptional priming depends on myeloid differentiation primary response 88 (MyD88), TIR

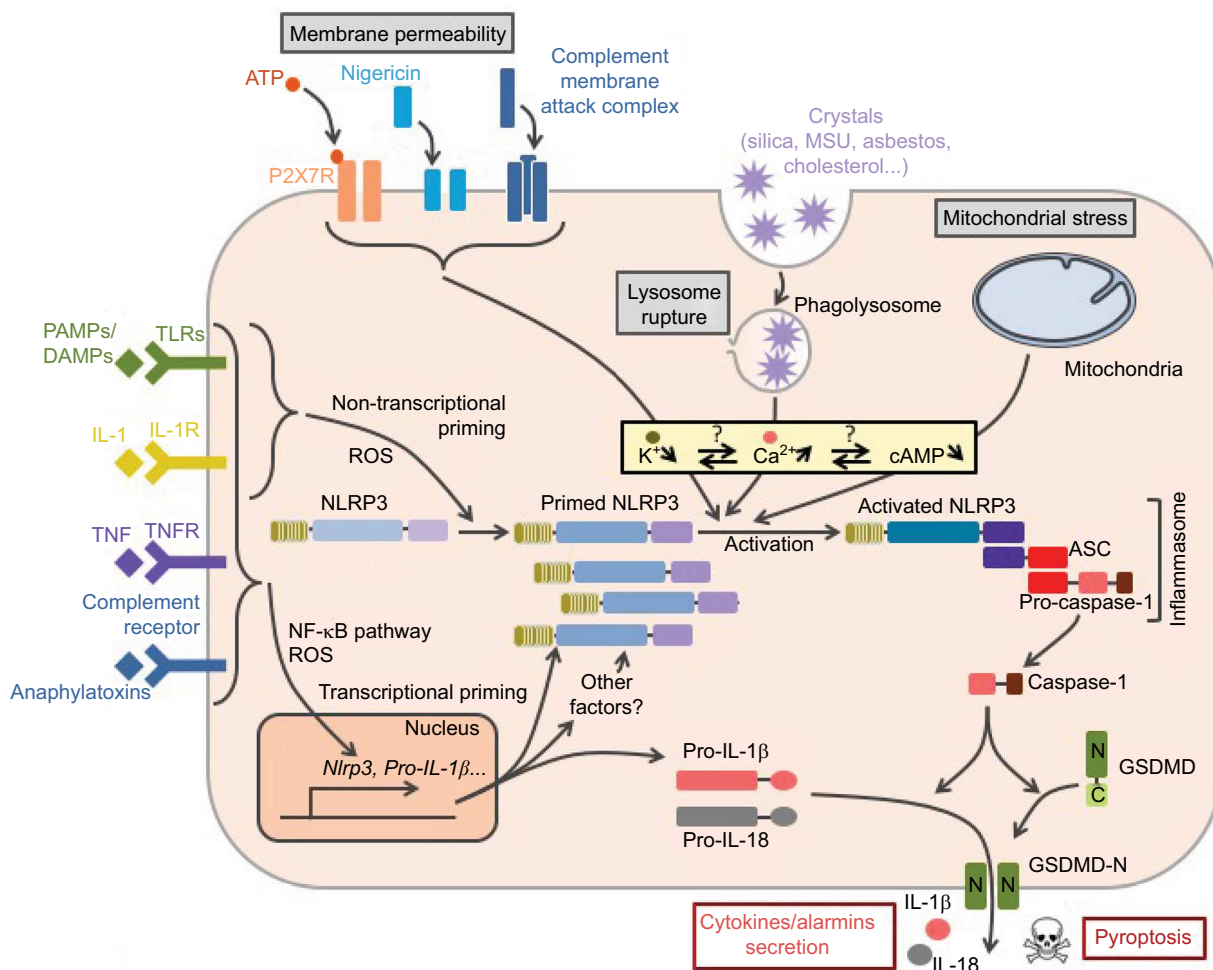


Figure 2 Control of NLRP3 inflammasome assembly.

Notes: Inflammasome formation requires coordinated NLRP3 priming and activation. PAMPs/DAMPs and cytokines prime NLRP3 through rapid post-translational modifications (non-transcriptional priming) and then NF- κ B-dependent transcriptional upregulation of NLRP3 and putative other factors (transcriptional priming). Activation signals are provided by various stress signals including change in plasma membrane permeability, lysosome rupture, and metabolic stress. Downstream signaling pathways rely on cytosolic K^+ decrease. Increase in cytosolic Ca^{2+} and decrease in cAMP are also often observed. NLRP3 activation results in inflammasome assembly and caspase-1 activation.

Abbreviations: PAMPs, pathogen-associated molecular patterns; DAMPs, damage-associated molecular patterns; TLR, Toll-like receptor; TNFR, tumor necrosis factor receptor; MSU, monosodium urate; ROS, reactive oxygen species; GSDMD, gasdermin-D; ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain.

domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF), Fas-associated protein with death domain (FADD), and caspase-8, as well as ROS, which activate nuclear factor- κ B (NF- κ B).^{37–39} Indeed, while NLRP3 expression is low and the major caspase-1 substrate pro-IL-1 β is not expressed in resting macrophages, both are highly transcriptionally upregulated downstream of TLR activation.³⁵ In addition, experimental overexpression of NLRP3 alleviates priming requirement for further NLRP3 activation, suggesting that priming mechanism may rely on this upregulation of NLRP3 expression level.^{35,39,40} Expressions of ASC, pro-caspase-1, and other substrates, including IL-18, are constitutive and are not affected upon priming in cultured macrophages.

More recently, accumulative evidence highlighted a transcriptional-independent priming mechanism. Indeed, TLR agonists, but not IL-1 β or TNF cytokines, license very quickly and transiently NLRP3 for further activation independently of protein synthesis.^{36,41–44} These reports imply that NLRP3 basal expression level may be sufficient for the inflammasome assembly and that transcriptional priming may rely on the expression of other factors that remain to be identified. In addition, these observations suggest that several priming mechanisms may exist, and that early after the activation of TLRs, priming may rely solely on post-translational modifications. This non-transcriptional priming is effective 10–30 min after TLR4 and TLR2 binding and depends on

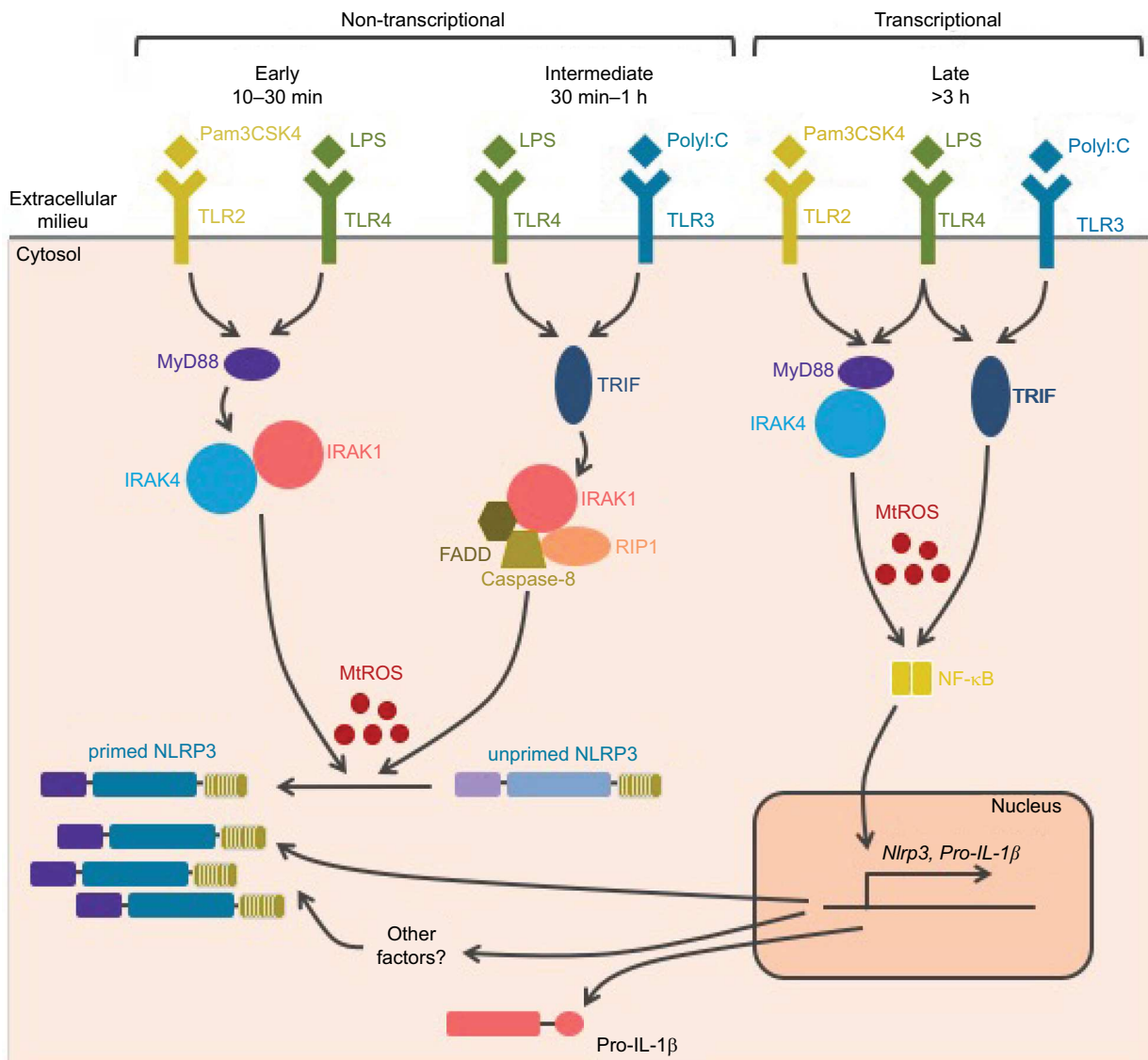


Figure 3 NLRP3 priming.

Notes: Several pathways successively control NLRP3 priming following TLR activation. The early and intermediate non-transcriptional pathways are independent of de novo protein synthesis and rely on post-translational modifications. They are, respectively, engaged by the MyD88 and the TRIF adaptors. Prolonged TLR or cytokine receptor activation prime NLRP3 through NF-κB-dependent transcriptional upregulation of NLRP3 and putative other factors. Both MyD88- and TRIF-dependent signaling drives this late transcriptional priming. All priming pathways depend on mitochondrial ROS.

Abbreviations: TLR, Toll-like receptor; ROS, reactive oxygen species; LPS, lipopolysaccharide.

the MyD88/IL-1 receptor-associated kinase 1/4 (IRAK1/4) pathway. Notably, IRAK1, which is required for this process and associates with NLRP3–ASC complexes, is degraded after 30 min providing a possible mechanism for the transient nature of this priming.⁴⁴ Non-transcriptional priming is also effective 30 min–1 h after TLR4 and TLR3 binding and then depends on the activation of the TRIF/IRAK1/FADD/caspase-8/receptor-interacting protein 1 (RIP1) pathway.^{37,42–45} These pathways are referred to as early and intermediate priming, respectively, and both rely on mitochondrial ROS

(mtROS), which can even bypass the requirement for TLR agonists.⁴² In addition, a third non-transcriptional priming pathway has been described in macrophages deficient for caspase-8 activity. This priming pathway would bypass the requirement for NLRP3 activation and rely on FADD and mixed lineage kinase domain like (MLKL) pseudokinase.³⁸ However, ongoing necroptosis in this setting is likely to provide NLRP3 activation signal.^{37,45,46}

Finally, prolonged exposure (>12 h) of macrophages to TLR4 agonists, but not TNF or TLR2/1 agonists, renders

NLRP3 refractory to further activation signals. The requirement for coordinately received priming and activation signals may physiologically limit inappropriate response, and this desensitization process may therefore protect the organism against detrimental inflammation. Several mechanisms support NLRP3 desensitization. LPS triggers IFN-I secretion which induces, in an autocrine/paracrine manner, the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and TRIM30.^{47,48} iNOS inhibits NLRP3 through the production of endogenous NO,⁴⁷ while TRIM30 inhibits NLRP3 by reducing the production of ROS.⁴⁸ In addition, IFN-I also represses the expression of the inflammasome substrates pro-IL-1 α / β through the secretion of IL-10.⁴⁹ Moreover, LPS-inducible A20 dampens pro-IL-1 β maturation by caspase-1 (detailed in the “Post-translational modifications of ASC, caspase-1, and IL-1 β in the regulation of the inflammasome” section).⁵⁰ Finally, the induction of Sequestosome 1 (SQSTM1, alternatively named p62) and degradation of damaged mitochondria that emit inflammasome-activating signals also participate in this desensitization.⁵¹ On the contrary, prolonged exposure to TNF does not make NLRP3 refractory to further activation, and may thus participate in NLRP3 priming involved in chronic inflammatory diseases, such as CAPS and Alzheimer’s disease. Indeed, β -amyloid fibrils as well as inflammation associated with aging induce the release of TNF.^{33,36,52,53}

In summary, successive signaling pathways activated downstream of PRRs, cytokine receptors, and other priming receptors control one or several of the following events: 1) the early or intermediate switch in NLRP3 by post-translational modifications to a form competent for further activation; 2) the late transcriptional upregulation of NLRP3, inflammasome substrates including pro-IL-1 β , and probably other key regulator(s); and 3) upon their prolonged activation, the inhibition of subsequent inflammasome activation by targeting NLRP3, inflammasome substrate pro-IL-1 β , or key elements in NLRP3 activation pathways such as ROS or mitochondria. The impact and the relevance of these successive signaling pathways in infectious or auto-inflammatory contexts *in vivo* remain poorly understood.

NLRP3 inflammasome activation

Priming licenses NLRP3 to subsequent activation by highly diverse agents and conditions. These activation signals can be classified according to the type of cellular stress that they cause (Figure 4). Agents leading to changes in the plasma membrane permeability to ions form the first category. It comprises, for example, pore-forming bacterial toxins including

nigericin,⁵⁴ as well as the membrane attack complex assembled upon the activation of the complement system.^{55,56} As already mentioned, permeabilization of plasma membrane by GSDMD pores is critical in NLRP3 activation downstream of non-canonical inflammasomes.^{13,17} Finally, extracellular ATP, as released by necrotic neighboring cells, activates NLRP3 through the plasma membrane P2X7 receptor and the subsequent opening of ionic pores.⁵⁷ Crystals constitute a second class of NLRP3 activation signals including asbestos, silica, cholesterol crystals, β -amyloid, and liposomes.^{58–61} They are phagocytized but resistant to degradation, and their accumulation ultimately leads to the rupture of phagolysosomes and the consequent release of cathepsins and Ca²⁺ in the cytosol, and both may account for inflammasome activation.^{58,62} Finally, as mentioned before, particulates formed by inflammasome specks released in the extracellular milieu by pyroptotic cells may play a key role in inflammation amplification.^{15,16} Their phagocytosis by neighboring macrophages leads to NLRP3 activation by lysosomal disruption similar to other particulate signals, and in addition triggers direct recruitment and activation of cellular caspase-1 by these ASC specks. In addition, extracellular ASC speck has been recently shown to recruit β -amyloid and seed aggregates, spreading β -amyloid pathology in Alzheimer’s disease.⁶³ Agents and conditions triggering mitochondrial dysfunction constitute the third class of NLRP3 activators, including metabolic stress, inhibitors of respiratory chain complexes, and blockade of mitophagy.⁶⁴ Finally, other NLRP3 activation signals cannot be included in any of these classes as, for example, ultraviolet radiations and activation of G-protein-coupled receptors by the extracellular Ca²⁺.^{62,65–67} These highly diverse activation signals seem to engage several pathways to activate NLRP3.⁶⁸

Although a unifying model for NLRP3 activation still remains controversial, common key signaling features observed downstream of several activators recently emerged including in particular changes in cytosolic ionic concentration and mitochondrial damage. A decrease in cytosolic K⁺ is observed upon exposure to extracellular ATP, pore-forming toxins, and particulates.⁶⁹ K⁺ efflux precedes mitochondrial dysfunctions, and correlates with inflammasome activation upon experimental up- or down-modulations of extracellular K⁺ concentrations, suggesting a key role of reduction in cytosolic K⁺ levels in the upstream control of NLRP3 activation. The mechanism of this control remains unknown, although it has been suggested that low cytosolic K⁺ concentration might participate directly or indirectly in the conformational changes of NLRP3 oligomers associated with inflammasome formation.⁶ Rise in cytosolic Ca²⁺ is also

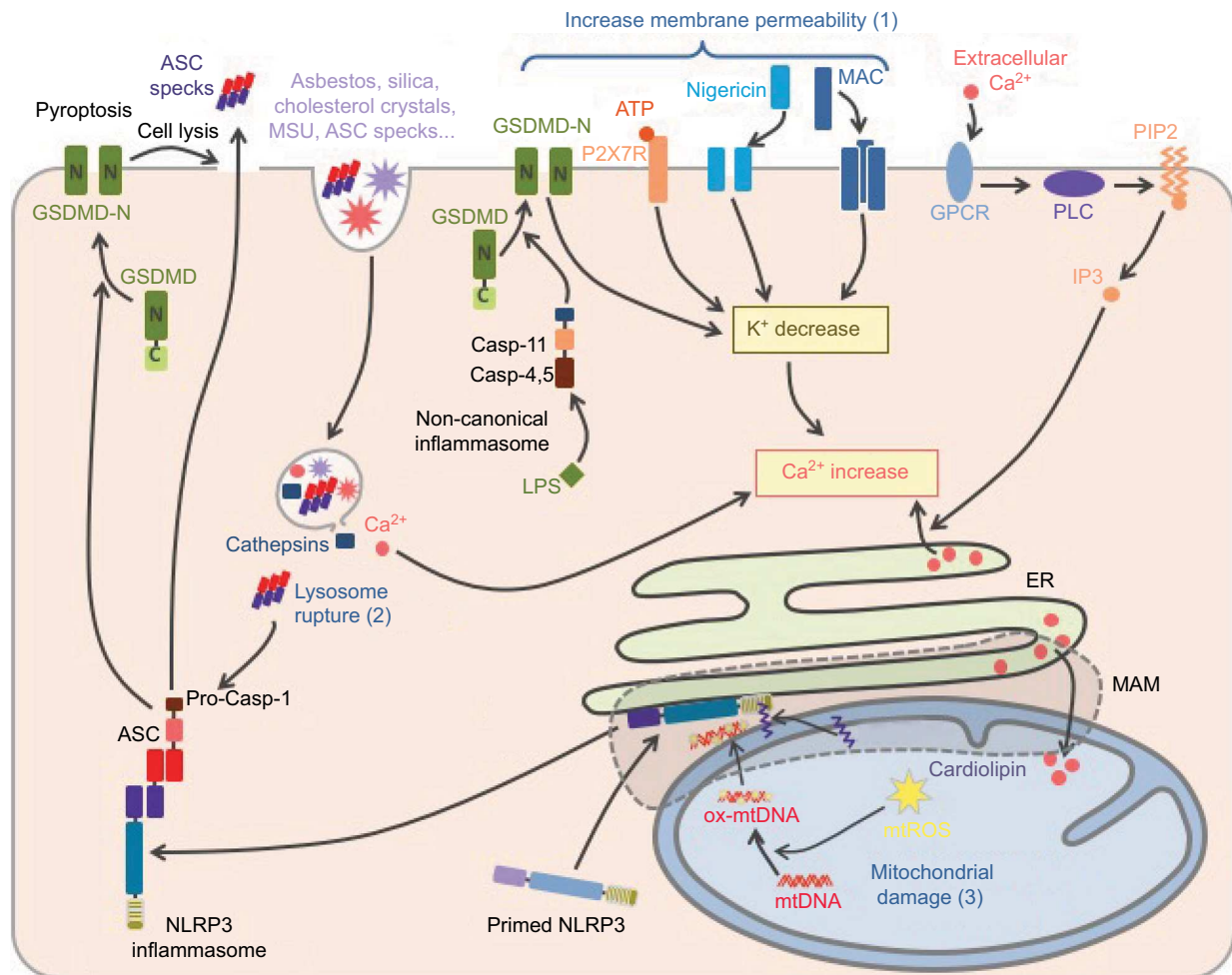


Figure 4 NLRP3 activation.

Notes: NLRP3 activation is triggered by various stress signals including: 1) increase in plasma membrane permeability caused by bacterial toxins, activation of P2X7R by ATP release from necrotic cells, complement membrane attack complex (MAC) or GSDMD pore formed downstream of the activation of the non-canonical inflammasome by cytosolic LPS, 2) lysosome rupture caused by phagocytosis of particulates including crystals (asbestos, silica, monosodium urate [MSU], cholesterol crystals, etc) as well as ASC specks released from neighboring cells, and 3) mitochondrial damages. NLRP3 activation is highly dependent on K^+ efflux. In addition, increase in membrane permeability, lysosome rupture, and activation of G-protein coupled receptor (GPCR) lead to a rise in cytosolic Ca^{2+} . Subsequent Ca^{2+} overload induces mitochondrial damage, then cardiolipin exposure and oxidized mtDNA participate in NLRP3 activation at mitochondria-associated ER membranes (MAMs), resulting in the inflammasome assembly and caspase-1 activation. In addition, exogenous ASC specks released in the cytosol following lysosome rupture can directly activate caspase-1 and therefore propagate rapidly the inflammatory signal to neighboring cells.

Abbreviations: TLR, Toll-like receptor; GSDMD, gasdermin-D; LPS, lipopolysaccharide; ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain; mtDNA, mitochondrial DNA; ER, endoplasmic reticulum.

associated with inflammasome activation following numerous stimuli.⁶² High extracellular K^+ reduces cytosolic Ca^{2+} rise, suggesting that K^+ efflux may promote Ca^{2+} influx to activate NLRP3, although its significance remains debated since the increase in cytosolic Ca^{2+} is not sufficient to trigger NLRP3 activation and its role may also be restricted to K^+ efflux counterbalancing.⁶⁹ Several ionic channels including transient receptor potential, inositol tri-phosphate receptor, and ryanodine receptor have been reported to mediate Ca^{2+} fluxes associated to NLRP3 activation depending on the inflammatory stimuli and contexts.^{6,56,61,62,65} In addition, dis-

ruption of lysosomes following particulate phagocytosis may lead to the release of lysosomal Ca^{2+} into the cytosol and may participate in the rise of cytosolic Ca^{2+} levels.⁶² Increased Ca^{2+} concentration favors ASC recruitment to NLRP3.⁶⁵ Lastly, mitochondrial damage constitutes another shared feature of NLRP3 activation pathways. This mitochondrial dysfunction can be caused after mitochondrial Ca^{2+} overload following rise in cytosolic Ca^{2+} concentration.⁶² The events following mitochondrial damage such as loss of membrane potential ($\Delta\Psi_m$), production of ROS, release of mitochondrial DNA (mtDNA) in the cytosol, and exposure of cardiolipin at the

outer membrane of mitochondria have all been proposed to mediate NLRP3 activation. In particular, mtDNA and cardiolipin could be direct ligands of NLRP3.^{70–72} Accordingly, inhibition of mitophagy promotes NLRP3 activation through the accumulation of defective mitochondria.⁷²

NLRP3 inflammasome assembly is similarly controlled in most of other innate immune cells, including murine monocytes, mast cells, and neutrophils.^{73–75} Noteworthy, in human monocytes, strong LPS priming signals have been reported to be sufficient to trigger NLRP3 inflammasome activation in some conditions, although activation signals remain necessary for potentiation of weak priming signals.^{73,76–78} These differential requirements may be due to ATP secretion by human monocytes upon priming. Released ATP may then act as an activation signal in an autocrine/paracrine manner.^{76,77} More recently, it has been proposed that in human monocytes, an alternative inflammasome pathway may be triggered without the requirement of activation signals.⁷³ This species-specific alternative pathway is independent of K⁺ efflux and leads to a low and gradual IL-1 β response without pyroptosome formation and therefore significantly differs from the all-or-nothing speck response triggered by canonical activation stimuli. This alternative pathway depends on TRIF, RIPK1, FADD, and caspase-8 signaling pathways as evidenced in BLaER1 post-mitotic monocytes transdifferentiated from immortalized B cells.

NLRP3 trafficking toward inflammasome assembly

The trafficking of NLRP3 seems to be tightly regulated upon both priming and activation processes and appears to be critical for inflammasome assembly (Figure 5). Nevertheless, the current model remains controversial due to possible artifacts of overexpression approaches, concerns on the specificity of anti-NLRP3 antibodies raising doubts on endogenous staining, and extensive use of artificial cell lines. NLRP3 is both cytosolic and associated with the ER in THP1 and resting bone marrow-derived macrophages (BMDMs).^{64,79} Upon NLRP3 activation, NLRP3 is recruited to mitochondria-associated ER membranes (MAMs).^{64,71,80} This recruitment is independent of ASC and therefore probably precedes NLRP3 interaction with its adaptor.^{80,81} Consistently, NLRP3 recruitment to the mitochondria has been recently reported to occur during priming.⁸² Consistent with the inhibition of NLRP3 pathway by colchicine or nocodazole,⁷⁹ NLRP3 co-migrates with LPS-induced microtubule-affinity regulating kinase 4 (MARK4) along microtubules to reach mitochondria, suggesting a role of microtubules in NLRP3 recruitment to the MAMs.⁸³ MARK4 kinase domain interacts with NLRP3

PYD and NACHT domains, and its expression is required for NLRP3 localization to mitochondria. Other interactors of NLRP3 have been described to be required for – or to facilitate – NLRP3 relocation and activation including cardiolipin, normally located in the inner mitochondrial membrane, that interacts with NLRP3 LRR domain,⁷¹ mitochondrial antiviral signaling (MAVS) that interacts with NLRP3 PYD,⁸⁰ cellular FLICE-inhibitory protein long form (cFLIPL) upregulated by TLR signaling and interacting with NLRP3 LRR domain.^{84,85} Noteworthy, the role of MAVS remains controversial and has been differentially shown by others to be restricted to NLRP3 control downstream of RNA virus infections, and implicated in the priming of NLRP3 and ASC stabilization.^{86,87} In addition, $\Delta\Psi$ m-dependent binding of NLRP3 with mitofusin-2 (Mfn 2) may potentiate its interaction with MAVS, upon RNA virus infections, but the role of mitofusin-2 in NLRP3 recruitment to the mitochondria has not been investigated.⁸⁸ Finally, small heterodimer partner (SHP) that co-translocates to the mitochondria upon NLRP3 activation and interacts with its PYD domain acts as a negative regulator. Interestingly, SHP deficiency abolishes NLRP3 recruitment to the mitochondria suggesting a not yet characterized role in NLRP3 trafficking.⁸¹ Other inflammasome components have also been shown to relocate upon priming or activation. While caspase-1 is cytosolic in basal condition, it is recruited to the mitochondria upon priming probably through its interaction with externalized cardiolipin.⁸² In basal condition, ASC has been reported to be mostly in the nucleus but is also found in the cytoplasm where it associates with mitochondria.^{79,89} Upon NLRP3 activation, its mitochondrial recruitment increases.⁸² In addition, mitochondria then relocate in a microtubule network-dependent manner to approach the ER at the perinuclear region where acetylated tubulin accumulates.⁷⁹ Inhibition of α -tubulin deacetylase sirtuin 2 (SIRT2) caused by mitochondrial damage and subsequent decrease in NAD⁺ may induce this process.⁷⁹ NLRP3 undergoes self-oligomerization and interacts with ASC in the MAMs before being released in the cytosol.^{81,90} Clustering of mitochondria around the Golgi and phosphorylation of NLRP3 by Golgi-associated protein kinase D (PKD, detailed hereunder) control this release.⁹⁰ NLRP3 and ASC then colocalize in one cytosolic perinuclear speck of 1–6 μ m.^{89,91} This speck has recently been described to localize at the centrosome, suggesting a role of microtubule network in speck formation and providing a mechanistic explanation for the formation of a single speck per cell.⁸³ Consistently, the centrosomal protein NIMA-related protein kinase 7 (NEK7) associates with the inflammasome complex.^{92–94} On the contrary, a previous study reported the speck to be distinct

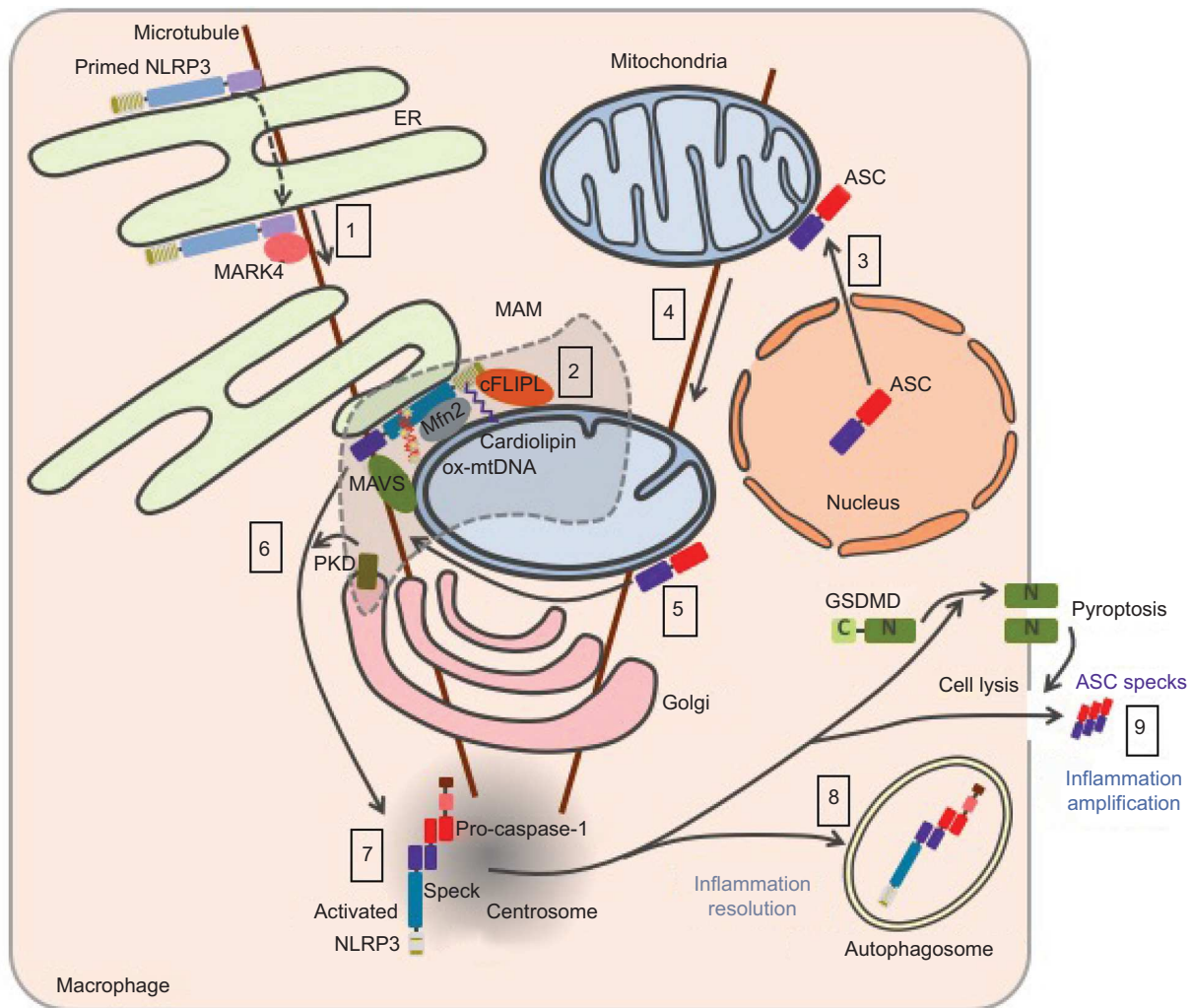


Figure 5 Current model of NLRP3 subcellular localization during its activation process.

Notes: Primed NLRP3 is both cytosolic and associated with endoplasmic reticulum (ER). Upon activation, NLRP3 is recruited to mitochondria-associated ER membranes (MAMs) by co-migration with MARK4 along microtubules (1). NLRP3 is stabilized in the MAMs through its interaction with cardiolipin, MAVS, cFLIPL, Mfn 2, and oxidized mtDNA at the surface of the mitochondria (2). Upon NLRP3 activation, ASC relocates from the nucleus to the mitochondria network (3), which approaches the ER in a microtubule-dependent manner (4). NLRP3 associates with ASC in the MAMs (5). Phosphorylation of NLRP3 by Golgi-associated PKD leads to the release of NLRP3/ASC complex from the MAMs (6) and assembly of a single speck at the centrosome (7). Autophagy dampens inflammation by targeting the inflammasome (8), while release of ASC speck from pyroptotic cells propagates the inflammatory signal to neighboring cells (9).

Abbreviations: MAVS, mitochondrial antiviral signaling; mtDNA, mitochondrial DNA; ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain; PKD, protein kinase D; mtDNA, mitochondrial DNA; GSDMD, gasdermin-D.

from the centrosome.⁹⁵ Finally, inflammasome targeting to autophagosome plays a role in the control or resolving of the response.^{96,97} If the inflammasome is not degraded by autophagosome, the abovementioned release of specks participates in the amplification of the inflammatory response.^{15,16}

To conclude, the assembly of the NLRP3 inflammasome in macrophages is a tightly controlled event that requires coordinated priming and activation signals. Signaling pathways and molecular mechanisms involved are not yet fully understood. Notably, accumulative studies recently highlight the role of NLRP3 post-translational modifications in both processes, that is, priming and activation (Figure 6; Table 1).

NLRP3 post-translational modifications as a regulation mechanism of inflammasome assembly

NLRP3 post-translational modifications in inflammasome priming

As already mentioned, NLRP3 priming can occur independently of new protein synthesis, and therefore relies primarily on post-translational modifications in addition to the extra need of transcriptional gene upregulation in some conditions.⁴² Phosphorylation of S198 (corresponding to S194 in

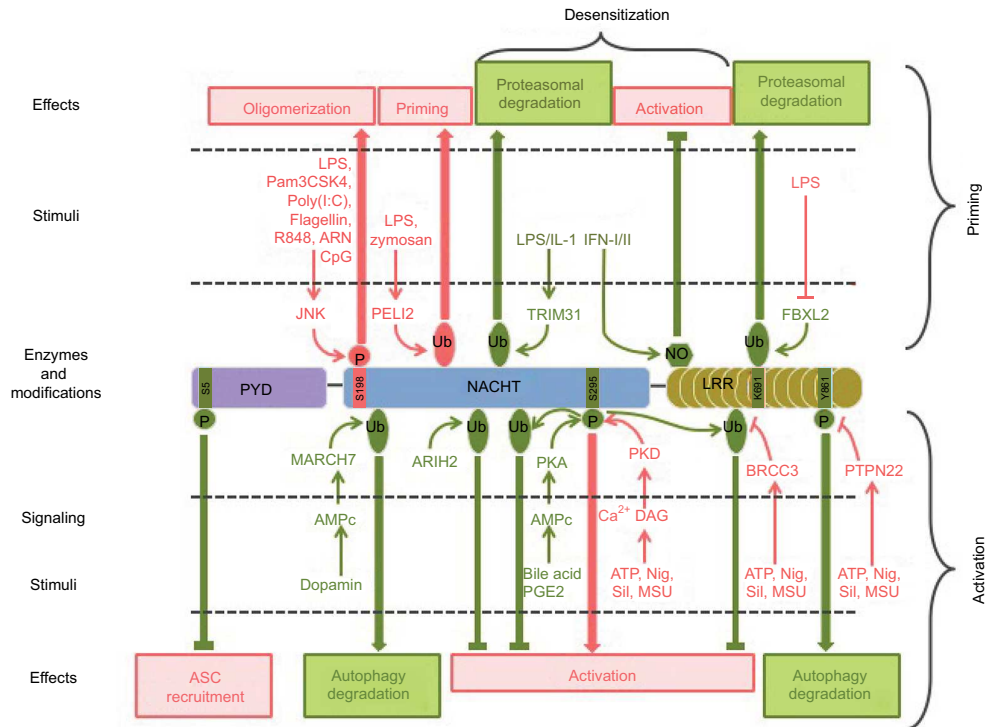


Figure 6 Post-translational modifications of NLRP3 involved in its priming, activation, and desensitization.

Notes: Stimuli, enzymes, modifications, and targeted residues that promote or inhibit inflammasome assembly are represented in pink and green, respectively.

Abbreviations: LPS, lipopolysaccharide; ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain; Nig, nigericin; Sil, silica; MSU, monosodium urate; PYD, pyrin domain.

mouse NLRP3) by JNK1 has been recently proposed as a universal feature of NLRP3 priming, required for both transcriptional-dependent and -independent priming pathways, and downstream of both MyD88 and TRIF signaling.⁹⁸ S198 phosphorylation kinetics correlates with NLRP3 priming by these different pathways. S198 phosphorylation leads to NLRP3 deubiquitination and promotes its oligomerization. S198N polymorphism has been identified in CAPS patients.⁹⁹ This observation is surprising since CAPS is typically caused by gain of function mutations in NLRP3. Nevertheless, this patient bore another well characterized CAPS mutation Y570C that was probably causing over-activation of NLRP3 without the need of S198 phosphorylation. These results are consistent with earlier findings that NLRP3 is constitutively ubiquitinated and that non-transcriptional priming induced by short LPS exposure leads to NLRP3 deubiquitination in a mtROS-dependent manner.⁴² More recently and in opposite to its constitutive ubiquitination model, NLRP3 has been reported to be very transiently ubiquitinated with K63 chains following LPS priming.¹⁰⁰ This ubiquitination depends on the E3 ligase Pellino 2, whose deficiency significantly impairs NLRP3 response in cultured BMDMs, as well as in several

mouse models. Most E3 ubiquitin ligases and deubiquitinases controlling NLRP3 priming remain to be identified. Noteworthy, chaperones such as suppressor of the G2 allele of *skp1* (SGT1) and heat shock protein 90 (HSP90), which have E3 ligase activity, associate with NLRP3 in resting conditions.¹⁰¹ In addition, the increase in NLRP3 level upon transcriptional priming may in part rely on stabilization of NLRP3 through post-translational regulation. Indeed, NLRP3 ubiquitination on K691 (K689 in mouse) by *skp*-cullin-F box L2 (SCF^{FBXL2}) E3 ligase targets NLRP3 to proteasomal degradation.^{102,103} Transcriptional priming leads to the expression of the SCF^{FBXL2} E3 ligase that destabilizes SCF^{FBXL2} via ubiquitination and degradation, resulting in increased NLRP3 half-life. Other NLRP3 modifications have been reported upon LPS priming including S-glutathionylation, but their relevance in the priming process remains to be established.¹⁰⁴

NLRP3 post-translational modifications in inflammasome activation

Accumulative studies point to the critical role of NLRP3 post-translational modifications in NLRP3 activation step. We first described that NLRP3 inflammasome assembly requires

Table 1 Post-translational modifications of NLRP3 inflammasome

Protein	Process	Effect	Modification	Domain (residue human/mouse)	Regulatory enzyme	References
NLRP3	Priming	Activatory	Phosphorylation	NACHT (S198/S194)	JNK1	Song et al ⁹⁸
		Activatory	Deubiquitination	?	?	Juliana et al ⁴²
		Activatory	Ubiquitination	?	PELI2	Humphries et al ¹⁰⁰
		Inhibitory	Ubiquitination	LRR (K691/K689)	SCF ^{FBXL2}	Han et al ¹⁰²
		?	S-glutathionylation	?	?	Guglielmo et al ¹⁰⁴
	Activation	Activatory	Deubiquitination	LRR	BRCC3	Py et al ¹⁰⁵
		Inhibitory	Ubiquitination	NACHT	ARIH2	Kawashima et al ¹⁰⁶
		Inhibitory	Ubiquitination	NACHT and LRR	MARCH7	Yan et al ¹⁰⁷
		Inhibitory	Phosphorylation	NACHT (S295/S291)	PKA	Guo et al, Mortimer et al ^{108,109}
		Activatory	Phosphorylation	NACHT (S295/S291)	PKD	Zhang et al ⁹⁰
		Activatory	Dephosphorylation	LRR (Y861/Y859)	PTPN22	Spalinger et al ¹¹²
		?	Activatory	Dephosphorylation	PYD (S5/S3)	PP2A
	Desensitization	Inhibitory	Ubiquitination	?	TRIM31	Song et al ¹¹³
Inhibitory		S-nitrosylation	LRR	?	Hernandez-Cuellar et al ⁴⁷	
?		Activatory	Ubiquitination	LRR	?	Hernandez-Cuellar et al ⁴⁷
ASC	Priming	Activatory	Ubiquitination	CARD (K174/K172)	TRAF3	Guan et al ⁸⁷
		?	Phosphorylation	PYD	?	Stehlik et al ¹¹⁸
	Activation	Activatory	Deubiquitination	?	USP50	Lee et al ¹¹⁷
		Activatory	Phosphorylation	CARD (Y146/Y144)	SYK/JNK	Hara et al ¹¹⁹
	?	Activatory	Ubiquitination	?	LUBAC	Rodgers et al ¹¹⁶
Resolving	Inhibitory	Ubiquitination	?	?	Shi et al ⁹⁶	
Caspase-1	Activation	Activatory	Ubiquitination	CARD	cIAP-2	Labbé et al ¹²⁰
	?	Inhibitory	S-glutathionylation	p10 subunit (C362 and C397)	?	Meissner et al ¹²¹
Pro-IL-1 β	Desensitization	Inhibitory	Deubiquitination	K133	A20	Duong et al ⁵⁰

Note: ? indicates unknown.

Abbreviations: ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain; LRR, leucine-rich repeat; PYD, pyrin domain; CARD, caspase recruitment domain.

NLRP3 deubiquitination by the BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 3 (BRCC3) deubiquitinase downstream of all tested activation signals.¹⁰⁵ Therefore, this deubiquitination can be considered as a key common regulatory mechanism of inflammasome activation. It does not depend on mtROS, and therefore signaling differs from deubiquitination associated with NLRP3 priming.⁴² NACHT and LRR domains of NLRP3 are independently ubiquitinated, and both K48 and K63 ubiquitin chains associate with NLRP3.¹⁰⁵ The K63-specific deubiquitinase BRCC3 specifically targets the NLRP3 LRR domain, but the precise ubiquitinated residue and the structural consequences of this deubiquitination remain unknown. BRCC3 inhibition promotes NLRP3 ubiquitination and blocks inflammasome assembly but does not target NLRP3 for degradation.¹⁰⁵ Consistently, the ARIH2 ubiquitin ligase has recently been identified in the speck.¹⁰⁶ While ARIH2 promotes NLRP3 ubiquitination with K63 and K48 chains and inhibits the inflammasome activation, it does not reduce NLRP3 stability. In addition, NLRP3 activation is also downregulated by degradative ubiquitination. The inflammasome inhibitor dopamine induces an increase in cAMP level through dopamine receptor D1 (DRD1).¹⁰⁷ cAMP then binds to NLRP3 and triggers the ubiquitination of NLRP3 NACHT and LRR domains with K48 ubiquitin

chains by the E3 ubiquitin ligase membrane associated ring-CH-type finger 7 (MARCH7), targeting NLRP3 to autophagy-mediated degradation.¹⁰⁷

Phosphorylation of NLRP3 also controls its activation process. Phosphorylation of S295 (S291 in mouse NLRP3) in the NACHT domain has recently emerged as a key regulatory point in NLRP3 activation process. Initially, bile acids binding Takeda G-protein-coupled receptor 5 (TGR5) and eicosanoid prostaglandin E2 (PGE2) binding E prostanoid 4 receptor (EP4) have been shown to inhibit NLRP3 through production of cAMP, activation of protein kinase A (PKA), phosphorylation of NLRP3 by PKA on S295 leading to its inactivation by non-degradative ubiquitination.^{108,109} On the opposite, S295 phosphorylation by PKDs has recently been reported to be required for NLRP3 activation.⁹⁰ Indeed, in response to inflammasome activators, Golgi-associated diacyl-glycerol (DAG) recruits PKDs while mitochondria cluster to the Golgi. Then PKDs phosphorylate MAM-associated NLRP3 on S295, leading to its release from the MAMs and inflammasome assembly in the cytosol. PKDs are dispensable for mitochondrial clustering to the Golgi and act downstream of mitochondrial damage. Reconciling all data, both NLRP3 phospho-null and phospho-mimetic mutants are inactive, suggesting that S295 phosphorylation needs to be

timely and locally regulated. Indeed, S295 phosphorylation initially prevents NLRP3 recruitment to MAMs necessary for its activation, while S295 phosphorylation later by PKDs allows its release from the MAMs to form cytosolic specks.⁹⁰ In addition, inflammasome assembly also requires the dephosphorylation of S5 (S3 in mouse NLRP3) in the PYD of NLRP3.¹¹⁰ Indeed, phosphorylation of S5 prevents ASC recruitment by electrostatic repulsion. Protein phosphatase 2A (PP2A) could be involved in this dephosphorylation.^{110,111} However, it remains unclear whether S5 dephosphorylation occurs during the priming or the activation step. Noteworthy, the critical role of kinase NEK7 in NLRP3 inflammasome assembly has recently been discovered by several independent studies.^{92–94} NEK7 interacts with NLRP3 LRR domain and takes part in the inflammasome complex. However, its catalytic activity is dispensable for the inflammasome activity and therefore does not regulate inflammasome assembly by direct phosphorylation of NLRP3 or other components of the complex but rather by scaffolding, subcellular relocation, or other functions that remain to be elucidated. Finally, the phosphorylation on Y861 (Y859 in mouse) in the LRR domain dampens the inflammasome activity by targeting NLRP3 to autophagosomes.^{97,112} Phosphorylated NLRP3 interacts with SQSTM1 in an ASC-dependent manner, suggesting that this downregulation may occur later in the process after inflammasome assembly.⁹⁷ Upon activation signals, protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 (PTPN22) is recruited to NLRP3 in an ASC-dependent manner and sustains IL-1 β secretion by dephosphorylating Y861.¹¹² NLRP3 dephosphorylation in a model of dextran sulfate sodium-induced colitis requires PTPN22 and correlates with caspase-1, IL-1 β , and IL-18 maturation as well as granulocyte recruitment, suggesting that NLRP3 Y861 phosphorylation may play a significant role in inflammatory diseases. Noteworthy, PTPN22 is genetically associated with several inflammatory disorders linked to inflammasome dysregulation.

NLRP3 post-translational modifications involved in its desensitization upon prolonged priming

As mentioned previously, prolonged TLR4-mediated priming in the absence of timely activation causes NLRP3 to be refractory to late activation stimuli. This desensitization probably participates in maintaining NLRP3 under tight control preventing inappropriate inflammasome-mediated inflammation and relies partly on NLRP3 post-translational modifications. Indeed, the E3 ubiquitin ligase TRIM31, which is induced after LPS and IL-1 β , prolonged priming triggers

K48 ubiquitination of NLRP3 and leads to its proteasomal degradation.¹¹³ In addition, as already mentioned, Y861 phosphorylation targets the inflammasome to autophagosomes preventing NLRP3 activation.^{97,112} Therefore, this mechanism may support desensitization upon prolonged priming. Last but not least, independent studies evidenced the key role of iNOS in this desensitization of NLRP3.^{47,114} Prolonged exposure to LPS triggers IFN-I secretion, which in turn induces iNOS expression in an autocrine/paracrine manner. iNOS inhibits NLRP3 at least in part through its direct modifications. Indeed, the subsequent production of NO leads to the S-nitrosylation of the cysteine-rich LRR domain of NLRP3, a modification that prevents ASC oligomer formation.⁴⁷ Notably, IFN- β inhibits NLRP3 through the same mechanism.¹¹⁵

Post-translational modifications of ASC, caspase-1, and IL-1 β in the regulation of the inflammasome

The NLRP3 inflammasome activity is also regulated by post-translational modifications of its other components including ASC, caspase-1, and its substrate IL-1 β . ASC linear ubiquitination by heme-oxidized IRP2 ubiquitin ligase 1L (HOIL-1L) in the linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC) is required for its recruitment to NLRP3, inflammasome assembly, and activation.¹¹⁶ However, whether ASC linear ubiquitination occurs downstream of priming or activation signaling has not yet been investigated. Besides, ubiquitination of ASC at K174 residue with K63 chains by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 (TRAF3) downstream of MAVS stabilizes ASC and supports inflammasome assembly upon RNA virus infections.⁸⁷ Interestingly, ASC is also ubiquitinated with K63 chains upon LPS priming, and later deubiquitinated by ubiquitin specific peptidase 50 (USP50) upon NLRP3 activation, suggesting a conserved regulation of speck formation by dynamic ASC K63 ubiquitination.¹¹⁷ Finally, ASC ubiquitination with K63 ubiquitin chain also participates in the resolution of the response by targeting the inflammasome to degradation through the autophagy machinery.⁹⁶ Phosphorylation of ASC also likely plays a role in inflammasome regulation. A previous report shows that ectopically expressed ASC PYD domain can be phosphorylated in response to TNF treatment.¹¹⁸ More recently, ASC has been shown to be phosphorylated upon inflammasome activation stimuli through an unknown pathway dependent on both spleen tyrosine kinase (SYK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK), which are required for ASC oligomerization and speck formation but not for ASC recruitment to NLRP3.

Among several other phosphorylated residues, Y146 in ASC CARD domain (Y144 in mouse ASC) seems to be the critical target of this pathway.¹¹⁹ The inflammasome effector caspase-1 has been reported to be ubiquitinated in its CARD domain with K63 ubiquitin chains by cellular inhibitor of apoptosis 2 (cIAP-2) upon NLRP3 activation signals.¹²⁰ Since cIAP-1/2 and TRAF2-containing complex, which associates with caspase-1, is required for IL-1 β secretion, this non-degradative ubiquitination may promote inflammasome activity but the mechanism remains unknown. In addition, caspase-1 is also unexpectedly directly inhibited by some ROS. Indeed, accumulation of intracellular superoxide, as observed in superoxide dismutase 1 (SOD-1) deficiency, leads to caspase-1 S-glutathionylation on C362 and C397 and its inhibition.¹²¹ Finally, post-translational modifications of the caspase-1 substrate pro-IL-1 β also impact inflammasome activity. Indeed, pro-IL-1 β associates with K63 ubiquitin chains on K133 and unanchored K48 chains in a complex pre-formed upon LPS transcriptional priming and containing RIPK1/3, pro-caspase-1/8, and A20.⁵⁰ While A20 reduces pro-IL-1 β K63 ubiquitination and maturation, on the contrary RIPK3 increases pro-IL-1 β association with ubiquitin chains and promotes its spontaneous NLRP3-dependent maturation upon A20 deficiency. Therefore, pro-IL-1 β ubiquitination supports its caspase-1-mediated proteolytic processing. It may be interesting in future studies to address ubiquitination of other caspase-1 substrates including pro-IL-18 and GSDMD.

Conclusion

While inflammation is important for organism protection, its dysregulation is highly detrimental as tragically exemplified by a number of inflammatory diseases. Accordingly, NLRP3 inflammasome assembly is strictly regulated by the requirement of coordinated priming and activation signals. These signals are highly diverse, and despite almost 20 years of research, our understanding of the signaling pathways and the molecular mechanisms controlling NLRP3 remains largely incomplete. Post-translational modifications of NLRP3 and other inflammasome components have recently emerged as an important mechanism in the control of its assembly. In the near future, ongoing characterization of the molecular consequences of these modifications will fill some of these gaps. In addition, identification of the enzymes and their co-factors controlling these modifications may lead to the identification of novel druggable targets for specific anti-inflammatory therapies.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants to BFP from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-13-JSV3-0002-01) and the European Research Council (ERC-2013-CoG_616986). We thank Pablo Palazon-Riquelme, Danish Patoli, and Amaury Rey for comments on the manuscript.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428–435.
2. Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. 1997;91(3):295–298.
3. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:991–1045.
4. Hu Z, Zhou Q, Zhang C, et al. Structural and biochemical basis for induced self-propagation of NLR4. *Science*. 2015;350(6259):399–404.
5. Fernandes-Alnemri T, Yu J-W, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*. 2009;458(7237):509–513.
6. Compan V, Baroja-Mazo A, López-Castejón G, et al. Cell volume regulation modulates NLRP3 inflammasome activation. *Immunity*. 2012;37(3):487–500.
7. Lu A, Magupalli VG, Ruan J, et al. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell*. 2014;156(6):1193–1206.
8. Masumoto J, Taniguchi S, Ayukawa K, et al. ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem*. 1999;274(48):33835–33838.
9. Dick MS, Sborgi L, Rühl S, Hiller S, Broz P. ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes. *Nat Commun*. 2016;7:11929.
10. Shi J, Zhao Y, Wang Y, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*. 2014;514(7521):187–192.
11. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010;140(6):821–832.
12. Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*. 2015;526(7575):666–671.
13. Aglietti RA, Estevez A, Gupta A, et al. GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(28):7858–7863.
14. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(2):99–109.
15. Baroja-Mazo A, Martín-Sánchez F, Gomez AI, et al. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat Immunol*. 2014;15(8):738–748.
16. Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, et al. The adaptor ASC has extracellular and “prionoid” activities that propagate inflammation. *Nat Immunol*. 2014;15(8):727–737.
17. Rühl S, Broz P. Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K⁺ efflux. *Eur J Immunol*. 2015;45(10):2927–2936.
18. Hoffman DHM. Familial cold autoinflammatory syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(4):615–620.
19. Shinkai K, Mccalmont TH, Leslie KS. Cryopyrin-associated periodic syndromes and autoinflammation. *Clin Exp Dermatol*. 2008;33(1):1–9.
20. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006;440(7081):237–241.

21. Vandanmagsar B, Youm Y-H, Ravussin A, et al. The NALP3/NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced autoinflammation and insulin resistance. *Nat Med*. 2011;17(2):179–188.
22. Youm Y-H, Grant RW, McCabe LR, et al. Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low grade inflammation to functional decline in aging. *Cell Metab*. 2013;18(4):519–532.
23. Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(7):463–477.
24. Franchi L, Muñoz-Planillo R, Núñez G. Sensing and reacting to microbes via the inflammasomes. *Nat Immunol*. 2012;13(4):325–332.
25. Jo E-K, Kim JK, Shin D-M, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol*. 2016;13(2):148–159.
26. Ratsimandresy RA, Dorfleutner A, Stehlik C. An update on PYRIN domain-containing pattern recognition receptors: from immunity to pathology. *Front Immunol*. 2013;4:440.
27. Elliott EI, Sutterwala FS. Monocytes take their own path to IL-1 β . *Immunity*. 2016;44(4):713–715.
28. Alexiou P, Chatzopoulou M, Pegklidou K, Demopoulos VJ. RAGE: a multi-ligand receptor unveiling novel insights in health and disease. *Curr Med Chem*. 2010;17(21):2232–2252.
29. Xiang M, Shi X, Li Y, et al. Hemorrhagic shock activation of NLRP3 inflammasome in lung endothelial cells. *J Immunol*. 2011;187(9):4809–4817.
30. Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol*. 2006;7(12):1250–1257.
31. Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*. 2006;442(7098):39–44.
32. Mitchell JA, Paul-Clark MJ, Clarke GW, McMaster SK, Cartwright N. Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. *J Endocrinol*. 2007;193(3):323–330.
33. Franchi L, Eigenbrod T, Núñez G. Cutting edge: TNF- α mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J Immunol*. 2009;183(2):792–796.
34. Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann NY Acad Sci*. 2014;1319:82–95.
35. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, et al. Cutting edge: NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*. 2009;183(2):787–791.
36. Bauernfeind F, Niepmann S, Knolle PA, Hornung V. Aging-associated TNF production primes inflammasome activation and NLRP3-related metabolic disturbances. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2016;197(7):2900–2908.
37. Gurung P, Anand PK, Malireddi RKS, et al. FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes. *J Immunol*. 2014;192(4):1835–1846.
38. Zhang X, Fan C, Zhang H, et al. MLKL and FADD are critical for suppressing progressive lymphoproliferative disease and activating the NLRP3 inflammasome. *Cell Rep*. 2016;16(12):3247–3259.
39. Bauernfeind F, Bartok E, Rieger A, Franchi L, Núñez G, Hornung V. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011;187(2):613–617.
40. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Wu J, et al. Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *J Biol Chem*. 2010;285(13):9792–9802.
41. Schroder K, Sagulenko V, Zamoshnikova A, et al. Acute lipopolysaccharide priming boosts inflammasome activation independently of inflammasome sensor induction. *Immunobiology*. 2012;217(12):1325–1329.
42. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, Farias A, Qin F, Alnemri ES. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem*. 2012;287(43):36617–36622.
43. Fernandes-Alnemri T, Kang S, Anderson C, Sagara J, Fitzgerald KA, Alnemri ES. Cutting edge: TLR signaling licenses IRAK1 for rapid activation of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol*. 2013;191(8):3995–3999.
44. Lin K-M, Hu W, Troutman TD, et al. IRAK-1 bypasses priming and directly links TLRs to rapid NLRP3 inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(2):775–780.
45. Kang S, Fernandes-Alnemri T, Rogers C, et al. Caspase-8 scaffolding function and MLKL regulate NLRP3 inflammasome activation downstream of TLR3. *Nat Commun*. 2015;6:7515.
46. Kang T-B, Yang S-H, Toth B, Kovalenko A, Wallach D. Caspase-8 blocks kinase RIPK3-mediated activation of the NLRP3 inflammasome. *Immunity*. 2013;38(1):27–40.
47. Hernandez-Cuellar E, Tsuchiya K, Hara H, et al. Cutting edge: nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. *J Immunol*. 2012;189(11):5113–5117.
48. Hu Y, Mao K, Zeng Y, et al. Tripartite-motif protein 30 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation by modulating reactive oxygen species production. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010;185(12):7699–7705.
49. Guarda G, Braun M, Staehli F, et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity*. 2011;34(2):213–223.
50. Duong BH, Onizawa M, Oses-Prieto JA, et al. A20 restricts ubiquitination of pro-interleukin-1 β protein complexes and suppresses NLRP3 inflammasome activity. *Immunity*. 2015;42(1):55–67.
51. Zhong Z, Umemura A, Sanchez-Lopez E, et al. NF- κ B restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria. *Cell*. 2016;164(5):896–910.
52. McGeough MD, Wree A, Inzaugarat ME, et al. TNF regulates transcription of NLRP3 inflammasome components and inflammatory molecules in cryopyrinopathies. *J Clin Invest*. 2017;127(12):4488–4497.
53. Casal C, Serratos J, Tusell JM. Relationship between beta-AP peptide aggregation and microglial activation. *Brain Res*. 2002;928(1–2):76–84.
54. Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol*. 2001;9(3):113–114.
55. Laudisi F, Spreafico R, Evrard M, et al. Cutting edge: the NLRP3 inflammasome links complement-mediated inflammation and IL-1 β release. *J Immunol*. 2013;191(3):1006–1010.
56. Triantafilou K, Hughes TR, Triantafilou M, Morgan BP. The complement membrane attack complex triggers intracellular Ca²⁺ fluxes leading to NLRP3 inflammasome activation. *J Cell Sci*. 2013;126(13):2903–2913.
57. Solle M, Labasi J, Perregaux DG, et al. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem*. 2001;276(1):125–132.
58. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, et al. Silica crystals and aluminum salts mediate NALP-3 inflammasome activation via phagosomal destabilization. *Nat Immunol*. 2008;9(8):847–856.
59. DUEWELL P, KONO H, RAYNER KJ, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464(7293):1357–1361.
60. Halle A, Hornung V, Petzold GC, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nat Immunol*. 2008;9(8):857–865.
61. Zhong Z, Zhai Y, Liang S, et al. TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun*. 2013;4:1611.
62. Murakami T, Ockinger J, Yu J, et al. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(28):11282–11287.
63. Venegas C, Kumar S, Franklin BS, et al. Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature*. 2017;552(7685):355–361.
64. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2011;469(7329):221–225.

65. Lee G-S, Subramanian N, Kim AI, et al. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP. *Nature*. 2012;492(7427):123–127.
66. Rossol M, Pierer M, Raulien N, et al. Extracellular Ca²⁺ is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors. *Nat Commun*. 2012;3:1329.
67. Sollberger G, Strittmatter GE, Kistowska M, French LE, Beer H-D. Caspase-4 is required for activation of inflammasomes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012;188(4):1992–2000.
68. Elliott EI, Sutterwala FS. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. *Immunol Rev*. 2015;265(1):35–52.
69. Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G. K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*. 2013;38(6):1142–1153.
70. Shimada K, Crother TR, Karlin J, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity*. 2012;36(3):401–414.
71. Iyer SS, He Q, Janczy JR, et al. Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity*. 2013;39(2):311–323.
72. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, et al. Autophagy proteins regulate innate immune response by inhibiting NALP3 inflammasome-mediated mitochondrial DNA release. *Nat Immunol*. 2011;12(3):222–230.
73. Gaidt MM, Ebert TS, Chauhan D, et al. Human monocytes engage an alternative inflammasome pathway. *Immunity*. 2016;44(4):833–846.
74. Nakamura Y, Kambe N, Saito M, et al. Mast cells mediate neutrophil recruitment and vascular leakage through the NLRP3 inflammasome in histamine-independent urticaria. *J Exp Med*. 2009;206(5):1037–1046.
75. Mankan AK, Dau T, Jenne D, Hornung V. The NLRP3/ASC/Caspase-1 axis regulates IL-1 β processing in neutrophils. *Eur J Immunol*. 2012;42(3):710–715.
76. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood*. 2009;113(10):2324–2335.
77. Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglié D, Fossati G, Rubartelli A. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(23):8067–8072.
78. Jamilloux Y, Lefeuvre L, Magnotti F, et al. Familial Mediterranean fever mutations are hypermorphic mutations that specifically decrease the activation threshold of the Pylrin inflammasome. *Rheumatology*. 2018;57(1):100–111.
79. Misawa T, Takahama M, Kozaki T, et al. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol*. 2013;14(5):454–460.
80. Subramanian N, Natarajan K, Clatworthy MR, Wang Z, Germain RN. The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. *Cell*. 2013;153(2):348–361.
81. Yang C-S, Kim J-J, Kim TS, et al. Small heterodimer partner interacts with NLRP3 and negatively regulates activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Commun*. 2015;6:6115.
82. Elliott EI, Miller AN, Banoth B, et al. Cutting edge: mitochondrial assembly of the NLRP3 inflammasome complex is initiated at priming. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2018;200(9):3047–3052.
83. Li X, Thome S, Ma X, et al. MARK4 regulates NLRP3 positioning and inflammasome activation through a microtubule-dependent mechanism. *Nat Commun*. 2017;8:15986.
84. Wu Y-H, Kuo W-C, Wu Y-J, et al. Participation of c-FLIP in NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. *Cell Death Differ*. 2014;21(3):451–461.
85. Marini ES, Giampietri C, Petruogaro S, et al. The endogenous caspase-8 inhibitor c-FLIP_L regulates ER morphology and crosstalk with mitochondria. *Cell Death Differ*. 2015;22(7):1131–1143.
86. Park S, Juliana C, Hong S, et al. The mitochondrial antiviral protein MAVS associates with NLRP3 and regulates its inflammasome activity. *J Immunol*. 2013;191(8):4358–4366.
87. Guan K, Wei C, Zheng Z, et al. MAVS promotes inflammasome activation by targeting ASC for K63-linked ubiquitination via the E3 ligase TRAF3. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015;194(10):4880–4890.
88. Ichinohe T, Yamazaki T, Koshiba T, Yanagi Y. Mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(44):17963–17968.
89. Bryan NB, Dorfleutner A, Rojanasakul Y, Stehlik C. Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain. *J Immunol*. 2009;182(5):3173–3182.
90. Zhang Z, Meszaros G, He W-T, et al. Protein kinase D at the Golgi controls NLRP3 inflammasome activation. *J Exp Med*. 2017;214(9):2671–2693.
91. Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu J-W, et al. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ*. 2007;14(9):1590–1604.
92. He Y, Zeng MY, Yang D, Motro B, Núñez G. Nek7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature*. 2016;530(7590):354–357.
93. Schmid-Burgk JL, Chauhan D, Schmidt T, et al. A genome-wide CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) screen identifies NEK7 as an essential component of NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem*. 2016;291(1):103–109.
94. Shi H, Wang Y, Li X, et al. NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nat Immunol*. 2016;17(3):250–258.
95. Wang Y, Yang C, Mao K, Chen S, Meng G, Sun B. Cellular localization of NLRP3 inflammasome. *Protein Cell*. 2013;4(6):425–431.
96. Shi C-S, Shenderov K, Huang N-N, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol*. 2012;13(3):255–263.
97. Spalinger MR, Lang S, Gottier C, et al. PTPN22 regulates NLRP3-mediated IL1 β secretion in an autophagy dependent manner. *Autophagy*. Epub 2017 Aug 8.
98. Song N, Liu Z-S, Xue W, et al. NLRP3 phosphorylation is an essential priming event for inflammasome activation. *Mol Cell*. 2017;68(1):185–187.
99. Saito M, Fujisawa A, Nishikomori R, et al. Somatic mosaicism of CIAS1 in a patient with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome. *Arthritis Rheum*. 2005;52(11):3579–3585.
100. Humphries F, Bergin R, Jackson R, et al. The E3 ubiquitin ligase Pellino2 mediates priming of the NLRP3 inflammasome. *Nat Commun*. 2018;9(1):1560.
101. Mayor A, Martinon F, De Smedt T, Pétrilli V, Tschopp J. A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nat Immunol*. 2007;8(5):497–503.
102. Han S, Lear TB, Jerome JA, et al. Lipopolysaccharide primes the NALP3 inflammasome by inhibiting its ubiquitination and degradation mediated by the SCFFBXL2 E3 ligase. *J Biol Chem*. 2015;290(29):18124–18133.
103. Han S, Jerome JA, Gregory AD, Mallampalli RK. Cigarette smoke destabilizes NLRP3 protein by promoting its ubiquitination. *Respir Res*. 2017;18(1):2.
104. Guglielmo A, Sabra A, Elbery M, et al. A mechanistic insight into curcumin modulation of the IL-1 β secretion and NLRP3 S-glutathionylation induced by needle-like cationic cellulose nanocrystals in myeloid cells. *Chem Biol Interact*. 2017;274:1–12.
105. Py BF, Kim M-S, Vakifahmetoglu-Norberg H, Yuan J. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Mol Cell*. 2013;49(2):331–338.
106. Kawashima A, Karasawa T, Tago K, et al. ARIH2 ubiquitinates NLRP3 and negatively regulates NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2017;199(10):3614–3622.
107. Yan Y, Jiang W, Liu L, et al. Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell*. 2015;160(1–2):62–73.

108. Guo C, Xie S, Chi Z, et al. Bile acids control inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Immunity*. 2016;45(4):802–816.
109. Mortimer L, Moreau F, MacDonald JA, Chadee K. NLRP3 inflammasome inhibition is disrupted in a group of auto-inflammatory disease CAPS mutations. *Nat Immunol*. 2016;17(10):1176–1186.
110. Stutz A, Kolbe C-C, Stahl R, et al. NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain. *J Exp Med*. 2017;214(6):1725–1736.
111. Luheshi NM, Giles JA, Lopez-Castejon G, Brough D. Sphingosine regulates the NLRP3-inflammasome and IL-1 β release from macrophages. *Eur J Immunol*. 2012;42(3):716–725.
112. Spalinger MR, Kasper S, Gottier C, et al. NLRP3 tyrosine phosphorylation is controlled by protein tyrosine phosphatase PTPN22. *J Clin Invest*. 2016;126(5):1783–1800.
113. Song H, Liu B, Huai W, et al. The E3 ubiquitin ligase TRIM31 attenuates NLRP3 inflammasome activation by promoting proteasomal degradation of NLRP3. *Nat Commun*. 2016;7:13727.
114. Mao K, Chen S, Chen M, et al. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell Res*. 2013;23(2):201–212.
115. Mishra BB, Rathinam VAK, Martens GW, et al. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β . *Nat Immunol*. 2013;14(1):52–60.
116. Rodgers MA, Bowman JW, Fujita H, et al. The linear ubiquitin assembly complex (LUBAC) is essential for NLRP3 inflammasome activation. *J Exp Med*. 2014;211(7):1333–1347.
117. Lee JY, Seo D, You J, et al. The deubiquitinating enzyme, ubiquitin-specific peptidase 50, regulates inflammasome activation by targeting the ASC adaptor protein. *FEBS Lett*. 2017;591(3):479–490.
118. Stehlik C, Krajewska M, Welsh K, Krajewski S, Godzik A, Reed JC. The PAAD/PYRIN-only protein POP1/ASC2 is a modulator of ASC-mediated nuclear-factor-kappa B and pro-caspase-1 regulation. *Biochem J*. 2003;373(Pt 1):101–113.
119. Hara H, Tsuchiya K, Kawamura I, et al. Phosphorylation of ASC acts as a molecular switch controlling the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nat Immunol*. 2013;14(12):1247–1255.
120. Labbé K, McIntire CR, Doiron K, Leblanc PM, Saleh M. Cellular inhibitors of apoptosis proteins cIAP1 and cIAP2 are required for efficient caspase-1 activation by the inflammasome. *Immunity*. 2011;35(6):897–907.
121. Meissner F, Molawi K, Zychlinsky A. Superoxide dismutase 1 regulates caspase-1 and endotoxic shock. *Nat Immunol*. 2008;9(8):866–872.

Journal of Inflammation Research

Publish your work in this journal

The Journal of Inflammation Research is an international, peer-reviewed open access journal that welcomes laboratory and clinical findings on the molecular basis, cell biology and pharmacology of inflammation including original research, reviews, symposium reports, hypothesis formation and commentaries on: acute/chronic inflammation; mediators of

inflammation; cellular processes; molecular mechanisms; pharmacology and novel anti-inflammatory drugs; clinical conditions involving inflammation. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/journal-of-inflammation-research-journal>

Dovepress

A.2 Tableaux annexes

A.2.1 Amorces

Tableau A.1 – **Amorces pour mutagenèse dirigée.** La table résume les noms et les séquences des différentes amorces utilisées afin de réaliser la mutagenèse dirigée dans NLRP3.

Mutation <i>KI</i> dans NLRP3	Amorce sens (5' - 3')	Amorce anti-sens (5' - 3')
R258W	mNLRP3_R258W_F CTATTTGTTCTTTATCCACT- GCTGGGAGGTGAGCCTCAGGAC	mNLRP3_R258W_R GTCCTGAGGCTCACCTCCCA- GCAGTGGATAAAGAACAAATAG
K285R	mNLRP3_K285R_F CCCACCAGTGTGCAGGATCC- TGCGCAAGCC	mNLRP3_K285R_R GGCTTGCACAGGATCCTGC- ACACTGGTGGG
K289R	hNLRP3_K289R_F CCCACCCATCCACAGGATC- GTGAGAAAACCC	hNLRP3_K289R_R GGGTTTTCTCACGATCCTGT- GGATGGGTGGG
D303N	hNLRP3_D303N_F CCTCATGGACGGCTTCAATG- AGCTGCAAGGTGC	hNLRP3_D303N_R GCACCTTGACGCTCATTGAA- GCCGTCCATGAGG
A350V	mNLRP3_A350V_F ATAACGACGAGGCCGGTAGT- CTTGAGAAACTGCAGCAT	mNLRP3_A350V_R ATGCTGCAGTTTCTCCAAGA- CTACCGGCCTCGTCGTAT
L351P	mNLRP3_L351P_F ACGACGAGGCCGGTAGCCCC- GGAGAAACTGCAGCATCTC	mNLRP3_L351P_R GGAGATGCTGCAGTTTCTCC- GGGGCTACCGGCCTCGTCGT
K373E	mNLRP3_K373E_F GGTTTCTCTGAGGCCGAAAG- GAAGGAGTATTTTC	mNLRP3_K373E_R GAAATACTCCTTCCTTTCGG- CCTCAGAGAAACC
K373R	mNLRP3_K373R_F GGTTTCTCTGAGGCCAGAAG- GAAGGAGTATTTTC	mNLRP3_K373R_R GAAATACTCCTTCCTTCTGG- CCTCAGAGAAACC
K375E	hNLRP3_K375E_F GGGTTTCTCCGAGGCCGAAA- GGAAAGAGTACTTC	hNLRP3_K375E_R GAAGTACTCTTTCCTTTCGG- CCTCGGAGAAACCC
K375R	hNLRP3_K375R_F GGTTTCTCCGAGGCCAGAAG- GAAAGAGTACTTC	hNLRP3_K375R_R GAAGTACTCTTTCCTTCTGG- CCTCGGAGAAACC
K426R	mNLRP3_K426R_F CAGATGGAGACCGGGAGGAG- CCTGGCCCAGACC	mNLRP3_K426R_R GGTCTGGGCCAGGCTCCTCC- CGGTCTCCATCTG

Tableau A.1 – **Amorces pour mutagenèse dirigée.** La table résume les noms et les séquences des différentes amorces utilisées afin de réaliser la mutagenèse dirigée dans NLRP3.

Mutation KI dans NLRP3	Amorce sens (5' - 3')	Amorce anti-sens (5' - 3')
K430R	hNLRP3_K430R_F GATGGAGAGTGGCAGGAGCC- TTGCCCAGAC	hNLRP3_K430R_R GTCTGGGCAAGGCTCCTGCC- ACTCTCCATC
K506R	mNLRP3_K506R_F GAACGTGTTCCAGAGGGAAG- TGGACTGCG	mNLRP3_K506R_R CGCAGTCCACTTCCCTCTGG- AACACGTTC
K510R	hNLRP3_K510R_F GAACCTGTTCCAAAGGGAAGT- GGACTGCGAG	hNLRP3_K510R_R CTCGCAGTCCACTTCCCTTT- GGAACAGGTTC
K543R	mNLRP3_K543R_F GGAGACCGTGAGGAGAGGAC- CAGGAGGTTG	mNLRP3_K543R_R CAACCTCCTGGTCCTCTCCT- CACGGTCTCC
K568N	hNLRP3_K568N_F GGCAAATTCGAAAACGGGTA- TTTGATTTTTGTTGTACGTTTCC	hNLRP3_K568N_R GGAAACGTACAACAAAAATC- AAATACCCGTTTTTCGAATTTGCC
K568R	hNLRP3_K568R_F GGCAAATTCGAAAGGGGGTA- TTTGATTTTTGTTGTACGTTTCC	hNLRP3_K568R_R GGAAACGTACAACAAAAATC- AAATACCCCTTTTCGAATTTGCC
K568R	mNLRP3_K568R_F GAAAATTACGGCAAGTTTGA- AAGAGGCTATCTGATTTTTGTTGTTG	mNLRP3_K568R_R CAACAACAAAAATCAGATAG- CCTCTTTCAAACCTTGCCGTAATTTTC

Tableau A.2 – **Amorces PCR.** Nom et séquence des différentes amorces utilisées en PCR.

Nom de l'amorce	Séquence (5' - 3')
mNLRP3K568R_F	AAGACTGACGTCTCCGCTTTC
mNLRP3K568R_R	TTGGCCTTGGCTTTCACCTCA
mNLRP3K568Rwti_R	CGGACAACAAAAATCAGATAGCCTT
mNLRP3K568Rki_R	CGGACAACAAAAATCAGATATCCTC
mNLRP3_4F_Not1	ACCTACCTAGCGGCCGCGACGAGTGTCCGTTGCAAG
mNLRP3_3103R_BamHI	TGCCACCCGGGATCCCTACCAGGAAATCTCGAA

A.2.2 siARN

Tableau A.3 – siARN. La table résume les références commerciales et les séquences des siARN murins utilisés.

Gène	GENE ID	Pool Catalog Nb	Duplex Catalog Nb	Séquence
Arih2	23807	M-059154-01	D-059154-01	GGAAGAAGCUGUUUGAAUA
			D-059154-02	GCAGUACACCUAUCCAUAU
			D-059154-03	UCUAAAAGGUAUCUCAUUC
			D-059154-04	GAAUGCUGCCAAGCUCUUA
Caspase-1	12362	M-048913-01	D-048913-01	GAGGAUUUCUUAACGGAUG
			D-048913-02	GCACGGGACCUAUGUGAUC
			D-048913-03	GGUAUACCGUGAAAGUGAA
			D-048913-04	GUACACGUCUUGCCCUCAU
Caspase-4	12363	M-042432-01	D-042432-01	GUGCAACAAUCAUUGAAA
			D-042432-02	GCUAAUGUCUCAUGGCACA
			D-042432-03	GAUGUGCUACAGUAUGAUA
			D-042432-04	CGAAAGGCUCUUAUCAUAU
Caspase-7	12369	M-057362-01	D-057362-01	CCACUUAUCUGUACCGCAU
			D-057362-02	GGGUAUUUGCAUCAUCAUA
			D-057362-03	CGACAAAGCGACAGGUAUG
			D-057362-04	CAACGACAUUGACGCUAAU
Caspase-8	12370	M-043044-01	D-043044-01	AAUGUAAGCUGGAAGAUGA
			D-043044-02	GAACUGCGUUUCCUACCGA
			D-043044-03	GAAGUGAGCGAGUUGGAAU
			D-043044-04	AGAGUUGUCUUAUUGCUAU
Cblb	208650	M-051830-01	D-051830-01	GAGCAUACUUCGAGAAUUU
			D-051830-02	CCUGUUCGGUCUUGUGAUA
			D-051830-03	GUACUGGUCCAUAUAGCAA
			D-051830-04	GCUAUAACCCUGAUUUAAAC
Fadd	14082	M-040488-01	D-040488-01	GGUAAGGGAGAGUCUGAAA
			D-040488-02	UGAGCAAGAGUGAGAAUAU
			D-040488-03	GGCCAAGAUGGAUGGGGAUU
			D-040488-04	CCGGCAGCCUGUCGGGCAA
Fbxl2	72179	M-057776-01	D-057776-01	GAGCUCCUCUUGAGAAUAU
			D-057776-02	GAAGAAUGUGUCCUGAUUA
			D-057776-03	GUAACUCUAUGCCGAUGUG
			D-057776-04	CUCAAUGGCUGCACGAAAA
Gsdmd	69146	M-046650-01	D-046650-01	CAGCAGAGGCGAUCUCAUU
			D-046650-02	GGUAUCCUUCUCGUCUCA
			D-046650-03	GAACUGGAGAGCUUGGAAA
			D-046650-04	GGAUUGAUGAGGAGGAAUU

Tableau A.3 – **siARN**. La table résume les références commerciales et les séquences des siARN murins utilisés.

Gène	GENE ID	Pool Catalog Nb	Duplex Catalog Nb	Séquence
Irak1	16179	M-040116-01	D-040116-01	GAACAGCUAUCAAGGUUUC
			D-040116-02	GCGCGUAGCUGACCUCGUU
			D-040116-03	CUAACGUGCUUCUGGAUGA
			D-040116-04	GACCUAGAGUGGACUAUUGG
Irak4	266632	M-061264-01	D-061264-01	GCAAAUAUCUACUAGACA
			D-061264-02	AAACAGACGGCCAGACAUU
			D-061264-03	GAGAUUCGAAGCCUACUU
			D-061264-04	CAAACAACUUCGACGAGCA
Kcnk6	52150	M-058227-01	D-058227-01	GGUCUUCGCCUACCUUGAA
			D-058227-02	GCAAAGCCUUCUCCAUCGU
			D-058227-03	GGGCGUGCCUAUCACCAUG
			D-058227-04	CAGACUUUCCGCCGUGUUU
Mapk8	26419	M-040128-01	D-040128-01	GGAAAGAACUGAUAUACAA
			D-040128-02	GGAGUUAGAUAUGAAAGA
			D-040128-03	GAUUGGAGAUUCUACAUUC
			D-040128-04	GAAACUACAACCAACAGUA
March7	57438	M-050230-01	D-050230-01	GGACUUAUGUAGAAUUUGU
			D-050230-02	GCACUCGUGUCCGAUUUAU
			D-050230-03	GGAGUGGGUUAUUACAGU
			D-050230-04	CUACCUAGUUGUCUACUG
Mark4	232944	M-054377-00	D-054377-01	ACACGGAGCUCAAAGAAGA
			D-054377-02	GGAAUACGCUAGCGCAGGA
			D-054377-03	GCCGGGAGGUCGCUAUUAA
			D-054377-04	AGAGAAGUCCGAAUUAUGA
Mkl	74568	M-061420-01	D-061420-01	GGAAUACCGUUCAGAUUGU
			D-061420-02	GGCCGAAAGUGUUGGAAUA
			D-061420-03	CGGAAACACUCCACAGAAA
			D-061420-04	GAGAUCCAGUUCAACGAUA
Myd88	17874	M-063057-00	D-063057-01	GCCUAUCGCUGUUCUUGAA
			D-063057-02	CGACUGAUUCCUAUUAAAU
			D-063057-03	GUUAGACCGUGAGGAUUA
			D-063057-04	GAUGAUCCGGCAACUAGAA
Nek7	59125	M-063266-02	D-063266-01	GAUAUGGGCUAUAUACUU
			D-063266-02	UACGACAGCUAGUUAUUAU
			D-063266-03	UGAGAGAACCGUUUGGAAA
			D-063266-04	UGGAGUGCCGGUAGCGUUA

Tableau A.3 – **siARN**. La table résume les références commerciales et les séquences des siARN murins utilisés.

Gène	GENE ID	Pool Catalog Nb	Duplex Catalog Nb	Séquence
Peli2	93834	M-047246-01	D-047246-01	ACAAGGAGCCGGUGAAAUA
			D-047246-02	GGAGUACACACACGAUAAA
			D-047246-03	CAGCAUAUCGUACACGUUG
			D-047246-04	GCCAAGUACUGGUCGCAGA
Prkd1	18760	M-048415-01	D-048415-01	GAAGAGAUGUAGCUAUUAA
			D-048415-02	GAAAGAGUGUUUGUUGUUA
			D-048415-03	CAUAAGAGAUGUGCAUUA
			D-048415-04	CAGCGAAUGUAGUGUAUUA
Prkd2	101540	M-040693-01	D-040693-01	GGACAUCAAUGACCAGAU
			D-040693-02	GAACCGGUUUGGAGAAUUG
			D-040693-03	GAAACCAGAGAAUGUGUUA
			D-040693-04	CCACACACCUUCCUUAUAC
Prkd3	75292	M-040692-00	D-040692-01	GAAGGGAUGUGGCUAUUA
			D-040692-02	CAAAGUCCUCACACAUUU
			D-040692-03	GCAAUUGACUUGAUAAACA
			D-040692-04	GGAGAUUUGGAAAUGA
Pycard	66824	M-051439-01	D-051439-01	AUACAUCCCUACUUGGUGA
			D-051439-02	GCUUAGAGACAUGGGCUUA
			D-051439-03	GCAACUGCGAGAAGGCUAU
			D-051439-04	CUGCAAACGACUAAAGAAG
Ripk1	19766	M-040150-00	D-040150-01	GAAUGAGGCUUACAACAGA
			D-040150-02	GAAAGAGUAUCCAGAUCAA
			D-040150-03	GAGAUUGGACUGAAAGAGAA
			D-040150-04	GGAGCAAACUGACUAAGGA
Ripk3	56532	M-049919-01	D-049919-02	CAAGUUCGGCCAAGUAUGA
			D-049919-03	ACACGGCACUCCUUGGUAU
			D-049919-04	UAAAGCGAGUGAUGUCUAC
			D-049919-17	GUAGACAAGACUUCACUAA
Sarm1	237868	M-041633-00	D-041633-01	CAGAUGUCUUUAUCAGUUA
			D-041633-02	GAUCCUCGCUUCCGCCAGU
			D-041633-03	GGUCGAGCAUUCUGGCACA
			D-041633-04	CGUCAUAGCGGCUCGCAAU
Stub1	56424	M-063143-01	D-063143-01	GCAGCGAGCCUAUAGUUUG
			D-063143-02	GAGCAGCGACUCAACUUUG
			D-063143-03	CAAGCACGAUAAUACAUG
			D-063143-04	GGGAUGAUUUCUAGUGC

Tableau A.3 – **siARN**. La table résume les références commerciales et les séquences des siARN murins utilisés.

Gène	GENE ID	Pool Catalog Nb	Duplex Catalog Nb	Séquence
Ticam1	106759	M-055987-01	D-055987-01	GGAAAGCAGUGGCCUUAUUA
			D-055987-02	GAGAUAAAGCUGGCCUCCA
			D-055987-03	GGACAUACGUUACACUCCA
			D-055987-04	GAUCGGUGCAGUUCAGAU
Tlr4	21898	M-047487-01	D-047487-01	GCAUAGAGGUAGUUCUAA
			D-047487-02	GGAAUUGUAUCGCCUUCU
			D-047487-03	CUUGACAUCUCUUAUACUA
			D-047487-04	CCUAUUGGACAGCUUAUAA
Tnfaip3	21929	M-058907-00	D-058907-01	GGGUAGGUUUGAAGACUUA
			D-058907-02	GCACCUAAGCCAACGAGUA
			D-058907-03	UGAAAGUGGGUGGGAUUUA
			D-058907-04	CUUUGAAUGUGCAGCAUAA
Trim31	224762	M-052044-01	D-052044-01	CCAAUAAGCUGCUGGCCUAG
			D-052044-02	CAGAGAAGAUCCAAAGUAU
			D-052044-03	GUAAGGAAUUCAGUUUCU
			D-052044-04	GAGCUACUAAAGGACAUUA
Ubr5	70790	M-048858-01	D-048858-01	CGAGAAGACUGAAAUACUA
			D-048858-02	GGGUGUACAUUCUUAUAUA
			D-048858-03	GAAGCUCAAUACGUUAUG
			D-048858-04	AGACAAAUCUCGGACUUGA
Usp7	252870	M-052244-01	D-052244-01	GGAGCAACGUGUUACAUGA
			D-052244-02	GAUAUCCAGCUAAGUAUAA
			D-052244-03	GGCCUGCAAUGUUAGAUAA
			D-052244-04	CGAAGGUACUUAAGAGAU

A.2.3 Anticorps

Tableau A.4 – **Anticorps primaires.** La table présente la cible des anticorps, les espèces dans lesquels ils ont été produits, les dilutions utilisées, les tampons de dilution, l'ECL ainsi que les références commerciales.

Cible de l'anticorps	Espèce utilisée pour la production	Dilution	Tampon de dilution	Type d'ECL utilisé	Référence
Actine (c4)	Souris	$\frac{1}{10000}$	TBS-T Lait 5 %	Maison	Millipore MAB1501
ASC	Lapin	$\frac{1}{500}$ (0,4 µg/mL)	TBS-T Lait 5 %	Maison	Santa Cruz Biotechnology sc-22514-R
Calreticuline	Souris	$\frac{1}{250}$ (0,4 µg/mL)	TBS-T Lait 5 %	Maison	BD Biosciences 612136
Caspase-1	Rat	$\frac{1}{4}$	TBS-T Lait 5 %	Prime	Fait maison (Laboratoire de Junying Yuan)
Caspase-11	Rat	$\frac{1}{250}$ (2 µg/mL)	TBS-T Lait 5 %	Prime	Biologend, 647201
EEA1	Souris	$\frac{1}{500}$ (0,5 µg/mL)	TBS-T Lait 5 %	Maison	BD Biosciences 610456
Flag (Flag-M2)	Souris	$\frac{1}{500}$	TBS-T Lait 5 %	Maison	Sigma-Aldrich F3165-1MG
Gasdermin-D	Lapin	$\frac{1}{1000}$ (0,588 µg/mL)	TBS-T Lait 5 %	Prime	Abcam ab209845
GLUT-1	Lapin	$\frac{1}{1000}$	TBS-T Lait 5 %	Maison	Millipore 07-1401
IL-1β	Rat	$\frac{1}{500}$	TBS-T Lait 5 %	Prime	R&D Systems MAB4011
Kinectine-1	Souris	$\frac{1}{100}$ (2 µg/mL)	TBS-T Lait 5 %	Maison	Santa Cruz Biotechnology sc-136534
Lamine B (M20)	Chèvre	$\frac{1}{200}$ (1 µg/mL)	TBS-T Lait 5 %	Maison	Santa Cruz Biotechnology sc-6217
Lamine B1 (B-10)	Souris	$\frac{1}{2000}$ (0,02 µg/mL)	TBS-T Lait 5 %	Maison	Santa Cruz Biotechnology sc-374015
cMyc (9E10)	Souris	$\frac{1}{5000}$ (0,1 µg/mL)	TBS-T Lait 5 %	Maison	Invitrogen, 13-2500

Tableau A.4 – **Anticorps primaires.** La table présente la cible des anticorps, les espèces dans lesquels ils ont été produits, les dilutions utilisées, les tampons de dilution, l'ECL ainsi que les références commerciales.

Cible de l'anticorps	Espèce utilisée pour la production	Dilution	Tampon de dilution	Type d'ECL utilisé	Référence
NEK7	Lapin	$\frac{1}{1000}$ (0,1 µg/mL)	TBS-T Lait 5 %	Maison	Abcam, ab133514
NLRP3 (cryo2)	Souris	$\frac{1}{500}$ (2 µg/mL)	TBS-T Lait 5 %	Maison	Adipogen, AG-20B-0014
SUMO2/3	Lapin	$\frac{1}{1000}$	TBS-T Lait 5 %	Maison	ENZO PW9465
Syntaxine-6	Lapin	$\frac{1}{500}$	TBS-T Lait 5 %	Maison	Cell Signaling 2869
Ubiquitine	Lapin	$\frac{1}{200}$ (3,8 µg/mL)	TBS-T Gelatine 5 %	Prime	Dako Z0458
Ubiquitine	Lapin	$\frac{1}{1000}$	TBS-T BSA 5 %	Prime	Cell Signaling Technology 3933
VDAC	Lapin	$\frac{1}{5000}$	TBS-T Lait 5 %	Maison	Millipore AB10527

Tableau A.5 – **Anticorps secondaires.** La table présente la cible des anticorps, les dilutions utilisées, les tampons de dilution, ainsi que les références commerciales.

Cible de l'anticorps	Dilution	Référence
IgG Chèvre	$\frac{1}{3000}$	SouthernBiotech 6425-05
IgG Lapin	$\frac{1}{10000}$ (0,1 µg/mL)	Promega W401B
IgG Souris	$\frac{1}{10000}$ (0,1 µg/mL)	Promega W402B
IgG Rat	$\frac{1}{3000}$	SouthernBiotech 3010-05

A.3 Abréviations

Abbréviation	Nom complet
AIM2	<i>absent in melanoma 2</i>
AMPC	<i>AMP cyclique</i>
AP-1	<i>activator protein 1</i>
ARIH2	<i>ariadne homolog 2</i>
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing CARD</i>
BMDM	<i>bone marrow derived macrophages</i>
BRCC3	<i>BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 3</i>
BRET	<i>bioluminescence resonance energy transfer</i>
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cellules NK	<i>cellules natural killer</i>
cFLIP	<i>cellular FLICE-like inhibitory protein</i>
CLIC	<i>chloride intracellulaire ion channel</i>
DAMP	<i>danger-associated molecular pattern</i>
DMEM	<i>Dulbecco modified eagle medium</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
DUB	<i>déubiquitinases</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EP4	<i>prostaglandin E receptor 4</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FBXL2	<i>F-box/LRR repeat protein 2</i>
FBXO3	<i>F-box protein 3</i>
FPI	<i>Francisella pathogenicity island</i>
GBP	<i>guanylate binding protein</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GSDM-D	<i>gasdermine D</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HMGB1	<i>high-mobility group box protein B1</i>
HOIL-1L	<i>heme-oxidized IRP2 ubiquitin ligase 1L</i>
HSP90	<i>heat shock protein 90</i>
iBMDM	<i>immortalized bone marrow derived macrophages</i>
ICE	<i>interleukin-converting enzyme</i>
IFI16	<i>IFN-γ inducible protein 16</i>
IFN	<i>interferon</i>
IL	<i>interleukin</i>
IL-1R	<i>IL-1 receptor</i>
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
IRAK	<i>IL-1 receptor-associated kinase</i>

IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
JNK1	<i>c-Jun N terminal kinase</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LBP	<i>LPS-binding protein</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
lymphocytes TH	<i>lymphocytes T helper</i>
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MAM	<i>mitochondrial associated membrane</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPL	<i>mitochondrial-anchored protein ligase</i>
MARCH7	<i>membrane Associated RING-CH 7</i>
MARK	<i>microtubule affinity regulating kinase</i>
MAVS	<i>mitochondrial antiviral signaling</i>
MD-2	<i>myeloid differentiation factor 2</i>
MLKL	<i>mixed lineage kinase domain-like</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MSU	<i>monosodium urate</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
NACHT	<i>nucleotide binding and oligomerisation</i>
NAIP	<i>NLR family apoptosis inhibitory protein</i>
NEK7	<i>NIMA-related kinase</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor-κB</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NLRC	<i>nucleotide-binding and oligomerization leucine rich repeat and CARD domain containing 4</i>
NLRP	<i>nucleotide binding and oligomerization leucine rich repeat pyrin domain containing 3</i>
NO	<i>nitric oxide</i>
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
P2X7R	<i>P2X7 receptor</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PIP2	<i>phosphatidyl inositol diphosphate</i>
PKD	<i>protein kinase D</i>
PMA	<i>phorbol myristate acetate</i>
PP2A	<i>protein phosphatase 2</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PTPN22	<i>protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22</i>
PYCARD	<i>pyrin and CARD domain containing</i>
PYD	<i>pyrin domain</i>
RAGE	<i>receptor for advanced glycation endproducts</i>

RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene I</i>
RIPK	<i>receptor interacting protein kinase</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell park memorial institute</i>
SB2X	<i>sample buffer 2X</i>
SENP	<i>sentrin/SUMO-specific protease</i>
SGT1	<i>suppressor of G2 allele of SKP1</i>
SIRT2	<i>silencing information regulator two 2</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
SVF	<i>serum de veau foetal</i>
TAK1	<i>transforming growth factor-β-activated kinase 1</i>
TGR5	<i>transmembrane G protein- coupled receptor-5</i>
TIR	<i>Toll-interleukin-1 receptor</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adapter inducing interferon-β</i>
TRIM	<i>tripartite motif</i>
TXSS	<i>Type X secretion system</i>