



HAL
open science

Développement d'outils pour étudier l'interleukine-1 beta dans le système nerveux central en condition non inflammatoire

Vincent Seube

► **To cite this version:**

Vincent Seube. Développement d'outils pour étudier l'interleukine-1 beta dans le système nerveux central en condition non inflammatoire. Neurosciences. Université de Montpellier, 2022. Français. NNT: 2022UMONT041 . tel-04069094

HAL Id: tel-04069094

<https://theses.hal.science/tel-04069094>

Submitted on 14 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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé, spécialité Neurosciences

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche : Institut de Génomique Fonctionnelle

Développement d'outils pour étudier l'interleukine 1 beta dans le système nerveux central en condition non- inflammatoire

Présentée par Vincent Seube

Le 21 octobre 2022

Sous la direction du Dr. François RASSENDREN
et du Dr. Vincent COMPAN

Devant le jury composé de

Dr. Laetitia MONY, CR, IBENS, Paris

Dr. Laurent BEZIN, DR, CRNL, Lyon

Dr. Nadine LAGUETTE, DR, IGH, Montpellier

Dr. Yann PERCHERANCIER, DR, IMS, Bordeaux

Dr. François RASSENDREN, DR, IGF, Montpellier

Dr. Vincent COMPAN, CR, IGF, Montpellier

Rapportrice

Rapporteur

Présidente du jury

Examineur

Directeur de thèse

Co-encadrant



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

J'aimerais commencer par grandement remercier les membres de mon jury de thèse, Nadine Laguette, Laurent Bezin, Laetitia Mony et Yann Percherancier pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer mes travaux de thèse.

Ensuite je tiens à remercier mon équipe et notamment François et Vincent pour m'avoir permis de réaliser cette thèse. Merci à vous deux de m'avoir accordé votre confiance dès le stage de Master 2, vous m'avez beaucoup appris. Merci François pour tes conseils, ton savoir scientifique et tes trucs et astuces, tant en matière de PCR screening que pour ton traiteur italien. Vincent, tu as renforcé ma rigueur et mon pointillisme (ce mot existe vraiment, il décrit un mouvement artistique de peinture mais je l'ai volontairement détourné) dans la manière d'aborder la science. C'est vraiment un plaisir de travailler avec toi au quotidien. Garde ce côté humain et cette pédagogie qui t'animent, c'est une force incroyable qui m'a permis de me motiver quand c'était difficile. Lauriane, je pense que je n'aurais pas eu le concours sans ton aide. Merci beaucoup pour le temps que tu as consacré pour nous donner toutes les chances de réussir. Nathalie, désolé, je n'ai pas pu faire le livre « les astuces de Nana ». J'aurais bien aimé car tu es vraiment plein de ressources et de créativité. Merci aussi pour ces cellulesensemencées dans leurs plaques joliment décorées (ça va manquer). Hélène, merci pour ces discussions qui m'ont permis de comprendre (enfin !) comment fonctionne (en partie) les statistiques. Sandra, tu es partie avant moi, je pensais que tu partirais après moi. Merci pour la bonne humeur au quotidien et nos karaokés endiablés pendant les expériences de bio-mol, à en faire hurler les voisins. Paola, I can no longer be your Junior translator. Thanks a lot for helping me during the FELASA accreditation courses. Maybe I helped you to understand what they said, but you helped me a lot during practical works with mice. Don't forget that spiders are not as far as you think. Damien, co-thésard mais un ami avant tout. On se connaît depuis le master mais merci pour ces moments passés ensemble, ces discussions, tant scientifiques que non-scientifiques et surtout, merci pour ce merveilleux mariage, et je te souhaite beaucoup de bonheur avec Estelle. Valentin, merci pour ta folie quotidienne qui transmet la joie. Tu as peut-être été ballotté d'une équipe à l'autre, mais tu appartiens aux Rassendren, quoiqu'on puisse en dire. Negar (aka ... non je ne vais pas l'écrire), tu es peut-être arrivée plus tard mais ce fut un plaisir de te rencontrer. Tu n'aurais pas pu trouver meilleure équipe. Maria, puedes que no seas un miembro oficial del equipo, pero eres igual. Gracias por tu buen humor diario y por esas pequeñas sesiones de miedo en tu escritorio cuando no me oyes llegar. Matthieu et Athénaïs, vous êtes tombés au bon endroit. Votre bonne humeur me manquera mais vous allez pouvoir vous éclater dans l'équipe.

De manière générale pour l'équipe, gardez cette bonne humeur et cette cohésion qui font qu'on a envie de se lever le matin pour venir au labo. C'est une force incroyable qu'on ne trouve pas partout et qui pourtant est vraiment essentielle.

Un grand merci aussi aux membres de mes comités de suivi de thèse, Laurent Bezin, Cédric Raoul et Thierry Vincent, d'avoir suivi l'avancée de mes travaux et pour m'avoir aiguillé dans la poursuite de mes expériences.

Je remercie aussi l'ensemble des services communs de l'IGF qui font fonctionner cet institut, ainsi que les différentes plateformes qui m'ont permis d'avancer au cours de mes travaux de recherches. Merci au service laverie avec une mention spéciale pour Céline et nos discussions sur les contrées catalanes. Merci au service technique et notamment pour le jour où nous nous sommes retrouvés bloqué dans l'ascenseur IGF Nord à l'étage 0,25. Merci au magasin et au service administratif qui nous permettent d'avoir le matériel nécessaire pour travailler. Merci à la plateforme iExplore avec une mention spéciale pour Manon et Mahéva, pour leur disponibilité et les arrangements à la dernière minute pour que je puisse lancer des cultures malgré mes oublis pour faire les demandes de sortie. Merci à la plateforme ARPEGE pour leurs conseils et leurs disponibilités quand les appareils ne veulent pas travailler. Et encore désolé pour les sursauts de bon matin quand je devais claquer la porte du micro-onde pour préparer un gel d'électrophorèse. Merci à MRI pour leur disponibilité face aux caprices des microscopes et pour l'obtention de belles images.

Merci à vous aussi, mes amis, mes collègues, de l'institut ou d'ailleurs. Merci à Enora et à Julie de m'avoir fait découvrir le monde merveilleux du BRET. Merci Yan pour tes disponibilités et ton aide face à un microscope capricieux. Merci à l'équipe du café de 8h (p'tite Pola, Juri, Angéline, Clémentine, les irréductibles présents très tôt), moment essentiel pour avoir les discussions scientifiques les plus enrichissantes aux idées novatrices ou pour retrouver ses esprits après une soirée virulente. Un grand merci à toi Clémentine (et Sylvain aussi), pour ces merveilleux interactomes, cette joie de vivre débordante, ces brunchs (pour cette partie, je dois aussi inclure Candice et Solal), mais aussi ces discussions scientifiques très pertinentes. A cela je rajouterai un grand merci pour m'avoir invité à ton mariage, le premier de mon existence où j'ai pu venir déguiser ! Un grand moment. Merci à des amis de plus longue date (Cassandra, Florent, Maxime, Laetitia, Margaux et Alexis) pour tous ces bons moments partagés, avant et pendant la thèse (et après bien évidemment), qui m'ont permis de bien décompresser ainsi que pour vos conseils extérieurs vis-à-vis de mes travaux de thèse. Merci à Fanny de l'IGF Nord qui a laissé (et qui a subi) mes élans de créativité atteindre son bureau. Sache que j'ai toujours

des confettis qui se promènent dans le clavier de mon ordinateur. Dans cette catégorie, j'ajouterai aussi Clémentine et Candice qui ont retrouvé mes plus belles sculptures à base de canettes, stylos et paquets de mouchoirs sur leur bureau. Je pense que le paysage hivernal composé de chips de polystyrène, d'essuie-tout et d'emballages restera ma plus belle œuvre. Il faut quand même noter que chacune de mes œuvres d'art n'a jamais impacté les objets précieux pour le travail, ce qui rend la tâche plus difficile.

Enfin, je tiens à remercier grandement (et ce paragraphe ne sera pas suffisant, il faudrait un livre complet pour sûrement tout décrire) ma famille, et surtout mes parents pour leur soutien indéfectible, tant moral que financier. Merci à vous de m'avoir aidé à arriver à ce stade, d'avoir cru en mon parcours, mes projets. Merci pour les relectures et les corrections orthographiques (ça doit être difficile de lire quelque chose que vous ne comprenez pas forcément). Sans vous, ce chemin aurait été moins facile (voir impossible).

Je finirai par remercier toutes les personnes que j'ai oublié. C'est évident qu'il manque du monde dans ces remerciements, et même si je ne parviens pas à vous retrouver au moment même où j'écris ce paragraphe, je vous remercie. Vous appartenez sûrement à ces personnes transitoires qui vous apportent, un sourire, une idée, une notion à réfléchir, ou un simple bonus dans la vie. Ces petites choses ou attentions qui font toujours plaisir ou qui égayent une journée. Merci à vous.

Table des matières

<i>Remerciements</i>	1
<i>Table des matières</i>	5
<i>Table des Illustrations</i>	11
<i>Table des abréviations</i>	14
<i>Préface</i>	19
Introduction	21
1. Les cytokines : messagers de l'inflammation	23
1.1. De la fièvre aux interleukines	23
1.2. La superfamille de l'interleukine-1	24
1.2.1. Sous-famille de l'interleukine-1	25
1.2.1.1. Interleukine-1 α (IL-1 α)	25
1.2.1.2. Interleukine-1 β (IL-1 β)	27
1.2.1.3. Antagoniste naturel au récepteur à l'IL-1 (IL-1Ra)	29
2. IL-1β : acteur majeur de l'initiation de l'inflammation	31
2.1. Régulation de l'activité de l'IL-1 β à 3 niveaux dans le système périphérique	31
2.1.1. Types cellulaires synthétisant l'IL-1 β	31
2.1.2. Contrôle de la synthèse	32
2.1.2.1. La voie de synthèse par les Toll-like receptors (TLR)	32
2.1.2.1.1. Structure des TLR	32
2.1.2.1.2. Signalisation intracellulaire et synthèse de pro-IL-1 β par les TLRs	34
2.1.3. Les récepteurs à l'interleukine-1	36
2.1.3.1. Le récepteur 1 à l'interleukine-1	37
2.1.3.2. Chaîne accessoire et formation du complexe récepteur à l'interleukine-1	37
2.1.3.3. Le récepteur 2 à l'interleukine-1	39
2.1.4. Contrôle de la maturation	39
2.1.4.1. L'inflammasome : principale plateforme moléculaire impliquée dans la maturation de l'IL-1 β	40
2.1.4.1.1. Architecture de l'inflammasome : les protéines sensibles	40
2.1.4.1.2. Architecture de l'inflammasome : les protéines adaptatrices	42
2.1.4.1.3. Architecture de l'inflammasome : les protéines effectrices (caspases)	42
2.1.4.2. Maturation de l'IL-1 β dépendante de l'inflammasome NLRP3	43
2.1.4.2.1. Voie canonique de l'inflammasome NLRP3 : activation de la caspase 1	44

2.1.4.2.2. Voie non-canonique de l'inflammasome : activation des caspases 4 et 5 (Homme) et de la caspase 11 (souris).....	47
2.1.4.2.3. Régulations des voies canoniques et non-canoniques.....	49
2.1.4.3. Maturation de l'IL-1 β indépendante de l'inflammasome	50
2.1.5. Mécanismes de la libération de l'IL-1 β	51
2.2. Rôles de l'IL-1 β en condition inflammatoire dans les cellules cibles.....	54
3. L'IL-1β dans le système nerveux central	58
3.1. Neuro-inflammation et cellules gliales.....	58
3.2. La signalisation IL-1 β , dans les cellules gliales, en condition inflammatoire.....	59
3.2.1. Cellules gliales et IL-1 β	59
3.2.1.1. La microglie : le macrophage résidant du SNC	59
3.2.1.2. Astrocyte	61
3.2.1.3. Oligodendrocytes	62
3.2.2. Mécanismes de libération.....	62
3.2.3. Rôles de l'IL-1 β dans les pathologies du SNC.....	63
3.2.3.1. Les traumatismes crâniens	63
3.2.3.2. La maladie d'Alzheimer.....	63
3.2.3.3. Les épilepsies	64
3.3. La signalisation interleukine-1 au niveau des neurones	66
3.3.1. Les acteurs de la voie canonique de la production d'IL-1 β	66
3.3.1.1. Les récepteurs TLRs	66
3.3.1.2. Les inflammasomes	67
3.3.1.3. Quid de l'IL-1 β neuronale ?.....	67
3.3.2. Effets de la signalisation induite par l'IL-1 β sur le SNC pendant le développement	68
3.3.3. Effets de la signalisation IL-1 β sur le SNC mature.....	70
3.3.3.1. Hippocampe, mémoire et plasticité synaptique	70
3.3.3.1.1. Organisation anatomique et cellulaire de l'hippocampe.....	70
3.3.3.1.2. Organisation fonctionnelle de la mémoire : plasticité synaptique et récepteur NMDA	71
3.3.3.2. Impact de l'IL-1 β sur l'apprentissage et la mémoire	75
4. Contexte de l'étude	78
4.1. Limites technologiques pour l'étude spatio-temporelle de l'IL-1 β	78
4.2. Développement de nouveaux outils pour l'analyse spatio-temporelle de l'IL-1 β	78

4.3. Hypothèses de travail.....	84
Matériel et méthodes	85
5. Procédures expérimentales	87
5.1. RNAscope.....	87
5.2. Biologie moléculaire.....	87
5.2.1. Construction du biosenseur IL-1 β -APEX2	87
5.2.2. Construction du rapporteur IL-1 β promoteur-mNeongreen.....	88
5.2.3. Production de lentivirus	88
5.2.4. Production d'Adeno-Associated virus (AAV)	89
5.3. Cultures primaires et transductions	90
5.3.1. Culture primaire post-natale de neurones et transduction.....	90
5.3.2. Culture et transduction de tranches organotypiques d'hippocampe.....	92
5.4. Cultures et transductions de lignées cellulaires	92
5.4.1. Culture des cellules HEK293T & HEK-Blue™ IL-1R.....	92
5.4.2. Culture et création de la lignée stable de THP-1 exprimant le biosenseur de BRET de l'IL-1 β murin.....	92
5.4.3. Culture et création de la lignée stable de neuroblastome SH-SY5Y exprimant le biosenseur de BRET de l'IL-1 β	93
5.4.4. Différenciation des SH-SY5Y	93
5.4.5. Culture et création de la lignée neuronale HT-22 exprimant le biosenseur de BRET de l'IL-1 β	94
5.4.6. Différenciation des HT-22	95
5.5. Biochimie.....	95
5.5.1. Western Blot.....	95
5.5.2. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)	96
5.5.3. Mesure indirecte de la bioactivité de l'IL-1 β par dosage spectrophotométrique de la SEAP produite par des HEK-Blue™ IL-1R	98
5.5.4. Purification du biosenseur de BRET de l'IL-1 β	99
5.6. Immunofluorescence et analyse.....	100
5.6.1. Cellules en cultures	100
5.6.2. Tranches organotypiques d'hippocampe.....	100
5.6.3. Analyse de la localisation subcellulaire de l'IL-1 β	101
5.7. Enregistrement et analyses des signaux de BRET et des signaux fluorescents.....	102
5.7.1. BRET en lecteur de plaques	102

5.7.2.	BRET en vidéo-microscopie	103
5.7.3.	Mesure du potentiel membranaire avec une sonde de voltage génétiquement encodée (GEVI)	104
5.7.4.	Mesure de la variation de calcium intracellulaire avec une sonde calcique génétiquement encodée	104
5.7.5.	Mesure de la fluorescence émise par la dégradation du Mca-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys (Dnp)-OH par THOP1	105
5.8.	Préparation des échantillons pour l'analyse par spectrométrie de masse	105
5.8.1.	Biotinylation des échantillons	105
5.8.2.	Précipitation des protéines biotinylées	105
Résultats	107
6. Principaux modèles cellulaires utilisés dans cette étude	109
7. Caractérisation du biosenseur de BRET de l'IL-1β dans une lignée de THP-1	110
7.1.	Expression et maturation du biosenseur par les THP-1.....	110
7.2.	Libération du biosenseur par les macrophages : dosage ELISA et Western-Blot...	111
7.3.	Bioactivité de la forme mature du biosenseur BRET de l'IL-1 β : dosage indirect par HEK-Blue	114
8. Synthèse, maturation et libération d'IL-1β par les neurones	117
8.1.	Etude de la synthèse neuronale d'IL-1 β endogène.....	117
8.1.1.	ARN messenger et RNAscope	117
8.1.2.	Synthèse d'ARNm d'IL-1 β neuronal	119
8.2.	Données préliminaires : caractérisation de la régulation transcriptionnelle de l'IL-1 β à l'aide d'un rapporteur fluorescent.....	122
8.2.1.	Visualisation de l'activité du promoteur de l'IL-1 β à l'aide d'un reporteur fluorescent : la GFP	122
8.2.1.1.	Validation de la construction promoteur-IL-1 β -GFP	122
8.2.1.2.	Activité du promoteur de l'IL-1 β dans des neurones d'hippocampe.....	124
8.2.2.	Visualisation de l'activité du promoteur de l'IL-1 β à l'aide d'un reporteur fluorescent : la mNeogreen	126
8.3.	Caractérisation de l'expression et de la maturation de l'IL-1 β dans les neurones à l'aide du biosenseur BRET de l'IL-1 β	128
8.3.1.	Validation de la spécificité d'expression cellulaire du biosenseur en fonction du promoteur utilisé	128

8.3.2.	Maturation de l'IL-1 β dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe	130
8.3.2.1.	Maturation de l'IL-1 β dépendante des NMDARs	130
8.3.2.2.	Caractérisation des sous-unités des NMDARs impliquées dans la maturation	132
8.3.2.3.	Localisation subcellulaire du biosenseur dans les neurones	134
8.3.2.4.	Maturation de L'IL-1 β dans les différents compartiments neuronaux en BRET en vidéo-microscopie	136
8.3.2.5.	Maturation indépendante de la voie canonique	139
8.4.	Etude de la libération d'IL-1 β neuronale	140
8.4.1.	Détection de l'IL-1 β libérée par ELISA	140
8.4.2.	Détection par le dosage HEK-Blue	143
9.	Mécanismes impliqués dans la production de l'IL-1β neuronale	145
9.1.	Caractérisation de la maturation de l'IL-1 β dans des lignées « neuronales »	145
9.1.1.	Lignée SH-SY5Y	145
9.1.2.	Lignée HT-22	148
9.2.	Décryptage de la voie de signalisation neuronale de l'IL-1 β	151
9.2.1.	Expression de l'IL-1 β -APEX2 dans des cultures primaires de neurones et spectrométrie de masse	151
9.2.1.1.	Technologie APEX et fusion IL-1 β -APEX2	151
9.2.1.2.	Spectrométrie de masse et génération de l'interactome	153
9.2.2.	Analyse moléculaire de l'interactome de l'IL-1 β	155
9.2.2.1.	Interactome de l'IL-1 β neuronale en condition basale et après stimulation neuronale	155
9.2.2.1.1.	Les enrichissements GO de fonction moléculaire (GO:MF)	164
9.2.2.1.2.	Les enrichissements GO de processus biologiques (GO:BP)	166
9.2.2.1.3.	Les enrichissements GO de localisation cellulaire (GO:CC)	170
9.2.2.1.4.	Les enrichissements GO de voies KEGG (GO:KEGG)	173
9.3.	Candidat potentiellement impliqué dans la maturation de l'IL-1 β neuronale : la métalloprotéase Thimet Oligopeptidase 1	174
9.3.1.	Invalidation de l'expression de THOP1 par des shRNA	175
9.3.2.	Etude du clivage <i>in vitro</i> de l'IL-1 β par THOP1	176
9.3.2.1.	Clivage dans des cultures primaires de neurones	176
9.3.2.2.	Clivage <i>in vitro</i> de protéines recombinantes	178

Discussion et Perspectives	181
10. L'interleukine 1 beta : une cytokine aux multiples fonctions	183
11. L'IL-1β est synthétisée par les neurones excitateurs de l'hippocampe	184
12. Les neurones excitateurs de l'hippocampe maturent l'IL-1β	186
12.1. Le biosenseur de BRET de l'IL-1 β : avancée majeure dans la localisation spatio-temporelle cellulaire de la maturation de la cytokine.....	186
12.2. Maturation de l'IL-1 β neuronale et inflammasome	187
12.3. Maturation de l'IL-1 β neuronale et récepteurs NMDA	188
12.4. La métalloprotéase THOP1.....	189
13. L'IL-1β est libérée par les neurones excitateurs de l'hippocampe dans le milieu extracellulaire	190
14. Perspectives : développement d'outils pour étudier la maturation du biosenseur de BRET de l'IL-1β dans un modèle plus intégré : tranches organotypiques d'hippocampe	193
15. Perspectives : Etude de la production d'IL-1β neuronale dans un modèle murin KI exprimant le biosenseur de BRET de l'IL-1β	196
15.1. Mutagénèse et conception du modèle	196
15.2. Avantages du modèle KI.....	196
15.3. Données préliminaires : caractérisation de la production d'IL-1 β dans les macrophages	198
15.3.1. Expression de l'IL-1 β endogène et du biosenseur de BRET	198
15.3.2. Maturation et libération de l'IL-1 β par les macrophages.....	200
15.4. Perspectives du modèle KI dans l'étude de l'IL-1 β neuronale	202
16. Conclusion générale	204
Bibliographie	205
<i>Résumé</i>	237
<i>Abstract</i>	238

Table des Illustrations

Figures

Figure 1 : Représentation schématique de l'IL-1 α	26
Figure 2 : Maturation et fonctions biologiques de l'IL-1 α (d'après Afonina et al., 2015)	27
Figure 3 : Représentation schématique de la structure de l'IL-1 β	28
Figure 4 : Représentation schématique de la protéine IL-1Ra (Schreuder et al., 1995) .	30
Figure 5 : Représentation schématique de la structure des TLR (ici, l'hétérodimère TLR1-TLR2)	33
Figure 6 : Schéma des voies de signalisation du récepteur TLR4 conduisant à la synthèse de la pro-IL-1 β	35
Figure 7 : Représentation schématique d'un récepteur à l'interleukine-1.....	37
Figure 8 : Représentation schématique de la formation du complexe récepteur hétérodimérique à l'interleukine-1	38
Figure 9 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les différentes sous-familles des protéines NLR chez l'Homme (majuscule) et la souris (minuscule) (Adapté de Schroder et al., 2010).....	40
Figure 10 : Schéma de différentes protéines NLR, composant de l'inflammasome	41
Figure 11 : Classification fonctionnelle et architecturale des caspases murines et humaines (Extrait de Van Opdenbosch et al., 2019)	43
Figure 12 : Modélisation de l'activation de NLRP3 et de son interaction avec NEK7 (adapté de Sharif et al., 2019).....	45
Figure 13 : Schéma de la voie canonique de l'inflammasome.....	46
Figure 14 : Aperçu des stimuli et des modèles d'activations de certains inflammasomes (adapté de Lamkanfi et al., 2012).....	47
Figure 15 : Schéma de la voie non-canonique de l'inflammasome	48
Figure 16 : Schéma de l'IL-1 β détaillant les différents sites de clivages par les enzymes responsables de la maturation de la protéine (adapté d'Afonina et al., 2015).....	50
Figure 17 : Architecture du pore formé par l'assemblage de la GSDMD (adapté de Xia et al., 2021)	53
Figure 18 : Schéma de la voie Wnt5a induite par l'IL-1 β dans les neurones au cours du développement du SNC (adapté de Park et al., 2018).....	69
Figure 19 : Représentation schématique de la cytoarchitecture de l'hippocampe (adapté de Ramon y Cajal, 1911).....	70
Figure 20 : Schéma de la neurotransmission au sein d'une synapse (adapté de Shin et al., 2019).....	72
Figure 21 : Schéma des changements morphologiques lors d'une LTP au niveau des synapses	73
Figure 22 : Biosenseur de BRET de l'IL-1 β et étude de la maturation de l'IL-1 β (adapté de Compan et al., 2012).....	81
Figure 23 : Modification du biosenseur de BRET de l'IL-1 β	83

Figure 24 : Vue d'ensemble du protocole de culture hippocampique de souris post-natales (adapté de Moutin et al., 2020)	91
Figure 25 : Chronologie du protocole de différenciation des SH-SY5Y (adapté de Shipley et al., 2016)	94
Figure 26 : Maturation du biosenseur de BRET de l'IL-1β dans les THP-1	111
Figure 27 : Analyse de la maturation et de la libération d'IL-1β-YPet par ELISA et Western-Blot induite chez les THP-1 après activation de l'inflammasome par la nigéricine	113
Figure 28 : Détermination de la bio activité du biosenseur de BRET de l'IL-1β après maturation et libération par les THP-1	115
Figure 29 : Validation des sondes reconnaissant l'ARNm de l'IL-1β par RNAscope ...	118
Figure 30 : RNAscope et immunohistochimie sur tranches aigues d'hippocampe de souris Thy1-GFP	120
Figure 31 : Quantification de l'ARNm de l'IL-1β dans les neurones pyramidaux de l'aire CA1	121
Figure 32 : Expression et validation de la construction promoteur-IL-1β-GFP dans des macrophages	123
Figure 33 : Activité transcriptionnelle de la construction promoteur-IL-1β-GFP dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe	125
Figure 34 : Visualisation de l'activité transcriptionnelle du promoteur de l'IL-1β à l'aide d'un reporteur fluorescent la mNeongreen	127
Figure 35 : Expression spécifique du biosenseur de BRET de l'IL-1β dans des astrocytes ou des neurones sur culture primaire de neurones hippocampiques	129
Figure 36 : Une stimulation des récepteurs NMDA conduit au clivage du biosenseur de BRET de l'IL-1β	131
Figure 37 : Relation dose-effet de l'inhibition des sous-unités GluN2A et GluN2B du récepteur NMDA sur le clivage du biosenseur de BRET de l'IL-1β	133
Figure 38 : Localisation subcellulaire du biosenseur de BRET de l'IL-1β dans les neurones excitateurs de l'hippocampe en culture	135
Figure 39 : Visualisation en vidéo-microscopie de la maturation du biosenseur de BRET de l'IL-1β lors d'une forte dépolarisation neuronale	138
Figure 40 : Maturation neuronale du biosenseur de BRET de l'IL-1β indépendante de la voie canonique	140
Figure 41 : Visualisation de l'activité neuronale à l'aide d'une sonde GEVI	141
Figure 42 : Détection et quantification de l'IL-1β-YPet libérée par les neurones	143
Figure 43 : Détermination de la bio activité de l'IL-1β-Ypet de la fraction libérée par les neurones, par dosage indirect avec les HEK-Blue	144
Figure 44 : Maturation du biosenseur de BRET de l'IL-1β dans la lignée cellulaire SH-SY5Y	147
Figure 45 : Maturation du biosenseur de BRET de l'IL-1β dans la lignée cellulaire HT-22	150
Figure 46 : Expression et fonctionnalité de l'IL-1β-APEX2 dans les cultures primaires de neurones corticaux	153

Figure 47 : Protocole de préparation des échantillons pour l'analyse par spectrométrie de masse.....	154
Figure 48 : Identification et caractérisation des interactomes de l'IL-1β-APEX2.....	157
Figure 49 : Invalidation de l'expression de THOP1 dans des cultures primaires de neurones	175
Figure 50 : Maturation du biosenseur de BRET de l'IL-1β dans des cultures primaires de neurones invalidées pour la protéine THOP1 par l'approche des shRNAs.....	177
Figure 51 : Expression du biosenseur de BRET de l'IL-1β dans les lysats cellulaires pendant l'immunoprécipitation	178
Figure 52 : Maturation du biosenseur de BRET de l'IL-1β in vitro	180
Figure 53 : Eléments des interactomes identifiant les protéines liées au transport vésiculaire.....	192
Figure 54 : Suivi de l'architecture cellulaire des tranches organotypiques d'hippocampe de la mise en culture jusqu'à 15 jours in vitro.....	194
Figure 55 : Représentation schématique de la construction génétique du modèle murin KI exprimant le biosenseur de BRET de l'IL-1β	196
Figure 56 : Expression de l'IL-1β endogène ou du biosenseur de BRET de macrophages provenant des lignées WT, hétérozygote KI/WT et homozygote KI/KI	199
Figure 57 : Maturation du biosenseur de BRET de l'IL-1β exprimé dans le modèle KI hétérozygote et homozygote.....	201

Tableaux

Tableau 1 : La superfamille de l'interleukine-1	24
Tableau 2 : Comparaison entre IL-1α et IL-1β de la structure protéique, des cellules productrices, des processus de maturations et des fonctions biologiques associées (adapté de Galozzi et al., 2021)	29
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des phénotypes observés dans des modèles murins invalidés pour différents gènes.....	55
Tableau 4 : Récapitulatif non-exhaustif des pathologies dans lesquelles l'IL-1β est impliquée.....	56
Tableau 5 : Récapitulatif des effets médiés par l'IL-1β sur les mécanismes d'apprentissage et de mémoire dans le système nerveux central en fonction de sa concentration.....	77
Tableau 6 : Avantages et inconvénients des techniques RET	80
Tableau 7 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expériences de Western-Blot.....	96
Tableau 8 : Traitements pharmacologiques appliqués aux cultures primaires de neurones pour doser la libération d'IL-1β par ELISA.....	97
Tableau 9 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expériences d'immunofluorescence	101
Tableau 10 : Liste des protéines co-immunoprécipitées avec l'IL-1β-APEX2	164
Tableau 11 : Liste des enrichissements GO : MF de l'IP IL-1β-APEX2	165
Tableau 12 : Liste des enrichissements GO : BP de l'IP IL-1β-APEX2	170
Tableau 13 : Liste des enrichissements GO : CC de l'IP IL-1β-APEX2.....	172
Tableau 14 : Liste des enrichissements GO : KEGG de l'IP IL-1β-APEX2.....	173

Table des abréviations

4-AP	: 4-aminopyridine
A.U	: Arbitrary unit
AAV	: Adeno-associated virus
ACSF	: Artificial cerebrospinal fluid
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNc	: Acide désoxyribonucléique codant
AIM2	: Absent in melanoma 2
AMPA	: 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl propanoic acid
AP-1	: Associated protein 1
APEX	: Ascorbate peroxidase
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
ASC	: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATP	: Adénosine tri-phosphate
AVC	: Accident vasculaire cerebral
BDNF	: Brain derived neurotrophic factor
BHE	: Barrière hématoencéphalique
BIR	: Baculovirus inhibitor of apoptosis protein
BMDM	: Bone Marrow Derived Macrophages
BP	: Biological process
BRET	: Bioluminescence resonance energy transfert
BSA	: Bovine serum albumin
CA	: Corne d'Ammon
CaMKII	: Calmodulin kinase II
cAMP	: dibutyryl-cyclic adenosine mono phosphate
CARD	: Caspase-activation and recruitment domain
CC	: Cellular component
CDL	: CARD domain linker
CHAPS	: 3-cholamidopropyl dimethylammonio 1-propanesulfonate
COP	: CARD-only protein
COPII	: Coat protein complex II
COX-2	: Cyclooxygénase-2
cpEGFP	: Circulated permutated GFP

DAMP : Damage-associated molecular pattern
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
DED : Death effector domain
DG : Dentate Gyrus
DIV : Day in vitro
DMEM : Dulbecco's modified eagle medium
DTT : Dithiotreitol
EDTA : Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
FIIND : Domain with function to find
FRET : Förster resonance energy transfert
GABA : Gamma-aminobutyric acid
GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GECI : Genetically encoded calcium indicator
GEVI : Genetically encoded voltage indicator
GFAP : Glial fibrillary acidic protein
GFP : Green fluorescent protein
GO : Ontologie génique
GSDMD : Gasdermin-D
HBSS : Hank's Balanced Salt Solution
HRP : Horseradish peroxydase
ICE : Interleukin-1 Converting Enzyme
ICV : Injection intra-cérébro-ventriculaire
IFN I : Interféron de type I
IFN- β : Interféron beta
IKK ϵ : Inhibitor of κ B kinase epsilon
IL-1 : Interleukine-1
IL-1R3AcP : Interleukin-1 receptor accessory protein
IL-1Ra : Antagoniste naturel au récepteur à l'IL-1
IL-1 α : Interleukine-1 alpha
IL-1 β : Interleukine-1 beta
INCA : Inhibitory CARD
IPAF : ICE protease-activating factor
IRAK : IL-1 receptor-associated kinase

IRF3 : Interferon regulatory factor 3
JNK : JUN N-terminal kinase
KA : Kaïnate
kDa : Kilo Dalton
KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome
KI : Knock in
KO : Knock-out
LDS : Lithium dodecyl sulfate
LPC : Lysophosphatidylcholine
LPS : Lipopolysaccharide
LRR : Leucine rich repeats
LTD : Long-term depression
LTP : Long-term potentialisation
MAL : MyD88 adaptator like protein
MAP : Mitogen associated protein
MAP2 : Microtubule associated protein 2
MC- : Milieu de culture –
MC+ : Milieu de culture +
MES : 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MF : Molecular function
MOPS : 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MyD88 : Myeloid differentiation primary response gene 88
NACHT : NAIP, CIITA, HET-E, TP1
NBD : Nucleotide-binding domain
NEK7 : Never in mitosis gene-A related kinase 7
NF- κ B : Nuclear factor-kappa b
NGF : Nerve growth factor
NGF- β : Nerve growth factor beta
NLR : Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing receptor
NLRC4 : NLR family CARD domain containing protein 4
NLRP : Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing receptor
NLuc : NanoLuciferase
NLS : Nuclear Localization Sequence

NMDA : N-methyl-D-aspartic acid
NOD : Nucleotide oligomerization domain receptor
NOS : Nitric oxygen species
NRDP-1 : Neuregulin receptor degradation protein-1
P/S : Pénicilline – Streptomycine
PAMP : Pathogen associated molecular pattern
PBS : Phosphate buffer saline
PBS-T : phosphate buffer saline + tween 20
PDBu : Phorbol 12, 13-dibutyrate
PFA : Paraformaldehyde
PKC : Protéine kinase C
PRR : Pattern recognition receptor
PSD95 : Postsynaptic density protein 95
PTZ : Pentylénetétrazole
PYD : Pyrin domain
RA : retinoic acid
RE : Réticulum endoplasmique
RET : Resonance energy transfert
RIP : Receptor-interacting protein
RIPA : Radioimmunoprecipitation assay buffer
RLuc8 : Renilla Luciferase 8
ROS : Reactive oxygen species
RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium
RT : Room temperature
SARM : Sterile alpha and HEAT-Armadillo motifs-containing protein
SDS : Sodium dodecyl sulfate
SEAP : Secreted embryonic alkaline phosphatase
SEM : Standard error of the mean
shRNA : Small herpin ribonucleic acid
siRNA : Small interferent ribonucleic acid
SNC : Système nerveux central
SVF : Sérum de voeu foetal
TAK : Transforming growth factor β activated kinase
TBK : TANK-binding kinase

TC : Traumatisme crânien

TCN201 : 4-[[[(3-Chloro-4-fluorophenyl)sulfonyl]amino]methyl]benzoic acid 2-benzoylhydrazide

THOP1 : Thimet Oligopeptidase 1

TIR : Toll/interleukin-1 receptor

TIRAP : TIR domain-containing adaptor protein

TLR : Toll-like receptor

TN : Tris-NaCl

TNF α : Tumor necrosis factor alpha

TRAF : TNF receptor-associated factor

TRAM : TRIF-related adaptor molecule

TR-FRET : Time resolving Förster resonance energy transfert

TRIF : TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β

TTX : Tetrodotoxine

VARNAM : Voltage activated red neuronal activity monitor

VGLUT1 : Vesicular glutamate transporter 1

WT : Wild type

YFP3 : Yellow fluorescent protein 3

YPet : Yellow fluorescent protein for energy transfert

Préface

L'interleukine-1 beta (IL-1 β) est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans l'initiation de l'inflammation. Dans les cellules immunitaires, cette cytokine est synthétisée sous la forme d'un précurseur immature et nécessite un clivage enzymatique pour devenir biologiquement active. Pendant des décennies, il était admis que le rôle de l'IL-1 β se limitait à la régulation des processus inflammatoires. Cependant, un nombre croissant d'évidences supporte l'idée, qu'en condition homéostatique, des cellules non-immunitaires du système nerveux central (SNC) peuvent exprimer et/ou être réactives à l'IL-1 β . Entre autres, cette cytokine est capable de moduler l'activité synaptique et la plasticité des réseaux à la suite d'une activité neuronale soutenue en condition non-inflammatoire.

L'ensemble de cette étude consiste à étudier l'IL-1 β dans un système non-inflammatoire. Cependant, au travers de l'introduction notamment, vous découvrirez majoritairement les mécanismes et les rôles de cette cytokine en condition inflammatoire au niveau du système périphérique. Ceci est dû au fait que pendant des décennies, l'IL-1 β a été étudiée dans ce contexte car elle a été découverte après induction d'un statut inflammatoire et qu'elle est massivement produite durant ce phénomène. De plus, 1/ le dogme établi classait l'IL-1 β parmi les molécules « pro-inflammatoire », 2/ il était admis qu'elle ne pouvait pas être produite en condition physiologique et 3/ les technologies ne permettaient pas une étude fine de cette cytokine pour de très faibles concentrations. Pour ces raisons, les données des actions de l'IL-1 β en condition homéostatique sont limitées, en particulier dans le SNC, un système possédant ses propres particularités par comparaison avec le système périphérique. Enfin, les mécanismes de production d'IL-1 β , maintenant bien caractérisés en condition inflammatoire, ne semblent pas s'appliquer en condition physiologique, expliquant le peu d'informations à ce sujet.

Ainsi, dans cette étude, vous trouverez un état de l'art des mécanismes de production et des rôles associés de l'IL-1 β dans le système périphérique, puis dans le SNC, en condition inflammatoire. Ensuite, vous serez guidés vers l'état actuel de la littérature vis-à-vis des rôles de cette cytokine en condition physiologique, rôles focalisés sur les actions de l'IL-1 β au niveau du SNC, en particulier sur les neurones, puisque l'ensemble de ces travaux sont axés sur ce type cellulaire. Cependant, il est important de noter que l'IL-1 β possède aussi des rôles modulateurs en condition non-inflammatoire dans le système périphérique, mais ces derniers ne seront pas décrits dans cette étude. Bonne lecture.

INTRODUCTION

1. Les cytokines : messagers de l'inflammation

1.1. De la fièvre aux interleukines

Les organismes pluricellulaires ont, depuis leur apparition, constamment dû s'adapter à leur environnement. Cette adaptation inclut un mécanisme de défense vis-à-vis des agressions extérieures, qu'elles soient physiques, chimiques ou organiques. En effet, les végétaux comme les animaux, vivent en symbiose avec les organismes unicellulaires, tels que les bactéries. Néanmoins, ce fragile équilibre peut-être déstabilisé par de nombreux facteurs extrinsèques ou intrinsèques à l'organisme. De même, certains pathogènes, tels que les virus ou les parasites ont besoin d'un hôte pour se reproduire et survivre. Ainsi, chaque organisme possède un système immunitaire, disposé à maintenir l'intégrité biologique et homéostatique d'un individu face aux diverses menaces. Les stratagèmes et mécanismes de défenses du système immunitaire sont divers et variés, adaptés à la plupart des pathogènes. Parmi ces derniers, un mécanisme particulier est retrouvé, dont le premier objectif est de limiter la prolifération des pathogènes dans l'organisme : la fièvre.

La fièvre fut, au départ, considérée comme conséquence surnaturelle liée à des pratiques occultes relevant d'une action magique ou liée à l'intervention de divinités religieuses (Gensini *et al.*, 2004). Entre le V^e et le IV^e siècle av. J.C, Hippocrate se pencha sur des observations cliniques de personnes malades et développa la « théorie des humeurs » en décrivant plusieurs types de fièvres. Au XVI^e siècle, Gerolamo Fracastoro fournit la première explication plausible reliant fièvre et infection en expliquant que celle-ci serait causée par le passage de petits corps d'un individu à un autre, ouvrant alors l'idée de contagion (Gensini *et al.*, 2004). Ce n'est qu'à partir du XIX^e siècle que les théories sur la fièvre s'ajustent notamment avec les explications de Claude Bernard puis Louis Pasteur.

A partir des années 1940, des études pionnières sur des lapins tentent de comprendre ce qui induit la fièvre. En 1943, Menkin isola une globuline pyrogénique, appelée pyrexine, responsable de l'induction d'une fièvre. A l'époque, les recherches identifièrent des propriétés biologiques similaires entre la pyrexine et les endotoxines bactériennes (C. A. Dinarello, 2015 ; Elevation, 1960). Durant les années 60-70, avec l'avancée des recherches, notamment sur les lapins, le terme pyrexine devient « facteur pyrogénique endogène » (Rutz & Ouyang, 2016). C'est en 1979 que Rosenwasser, Dinarello et Rosenthal identifièrent le « facteur d'activation lymphocytaire » qui deviendra la même année « l'interleukine-1 » (ou IL-1) (Rosenwasser *et*

al., 1979). C'est cette même année qu'on commencera à parler d'immunité innée. L'année 1984 marque à son tour une avancée majeure car l'ADN codant (ADNc) pour l'IL-1 est cloné (Auron *et al.*, 1984). En 1985, on distingue interleukine-1 alpha (IL-1 α) et interleukine-1 bêta (IL-1 β). De nos jours, de nombreuses cytokines ont été identifiées et classées par superfamille. Concernant les deux précurseurs (IL-1 α et l'IL-1 β), ils appartiennent à la superfamille de l'interleukine-1.

1.2. La superfamille de l'interleukine-1

Aujourd'hui, la superfamille de l'interleukine-1 (IL-1) compte 11 membres, déclinée en 3 sous-familles : IL-1, IL-18 et IL-36 (C. A. Dinarello, 2018). Parmi ces cytokines, certaines ont une activité pro-inflammatoire et d'autres, anti-inflammatoire (**tableau 1**). Lors de leur découverte et pour faciliter leur classement, les interleukines possédaient l'appellation IL-1F suivi d'un numéro (ex : IL-1F1 = IL-1 α). Néanmoins, pour des raisons pratiques, la nomenclature a été changée, prenant en compte leur fonction (C. Dinarello *et al.*, 2010). Dans ce chapitre, seule la sous-famille IL-1 sera détaillée, à l'exception de l'IL-33, et l'IL-1 β sera plus longuement étudiée dans le deuxième chapitre.

Nomenclature actuelle	Nomenclature précédente	Fonction
Sous-famille IL-1		
IL-1 α	IL-1F1	Pro-inflammatoire
IL-1 β	IL-1F2	Pro-inflammatoire
IL-33	IL-1F11	Pro & anti-inflammatoire
IL-1RA	IL-1F3	Anti-inflammatoire
Sous-famille IL-18		
IL-18	IL-1F4	Pro-inflammatoire
IL-37	IL-1F7	Anti-inflammatoire
Sous-famille IL-36		
IL-36 α	IL-1F6	Pro-inflammatoire
IL-36 β	IL-1F8	Pro-inflammatoire
IL-36 γ	IL-1F9	Pro-inflammatoire
IL-36Ra	IL-1F5	Anti-inflammatoire
IL-38	IL-1F10	Anti-inflammatoire

Tableau 1 : La superfamille de l'interleukine-1

1.2.1. Sous-famille de l'interleukine-1

L'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-1Ra sont codées respectivement par les gènes de l'*Il-1 α* , l'*Il-1 β* et l'*IL1RN* présents sur le long bras du chromosome 2 humain (2q14-q21) (McMahan *et al.*, 1991 ; Steinkasserer *et al.*, 1992). L'IL-1 α et l'IL-1 β possèdent 45% d'homologie au niveau de leur séquence d'ADN (Galozzi *et al.*, 2021) et 23% d'homologie au niveau de leur séquence peptidique (Priestle *et al.*, 1988).

1.2.1.1. Interleukine-1 α (IL-1 α)

L'interleukine-1 α est une protéine de 31 kDa synthétisée sous la forme d'un précurseur (pro-IL-1 α) de 271 acides aminés possédant un signal de localisation nucléaire (Wessendorf *et al.*, 1993). Elle est constitutivement exprimée à faible concentration en condition physiologique mais son expression augmente en présence de signaux inflammatoires ou de stress cellulaire (Voronov *et al.*, 2018). Au niveau structural, elle se distingue de l'IL-1 β en subissant une myristoylation et une acétylation sur la Lys 82 (Stevenson *et al.*, 1993) ainsi qu'une phosphorylation sur la Ser 90 (Beuscher *et al.*, 1988). Elle est constituée de 12 feuillets β antiparallèles plus un feuillet β supplémentaire en position N-terminal (**figure 1**) (Graves *et al.*, 1990). Enfin, à la différence de l'IL-1 β , l'IL-1 α est active sous sa forme pro-IL-1 α . Toutefois, le précurseur peut être clivé par différentes enzymes, telles que la neutrophil elastase, le granzyme B, des calpaines ou encore la chymase (Afonina *et al.*, 2015) pour donner une forme mature aussi bioactive, dont les fonctions biologiques diffèrent de celles du précurseur.

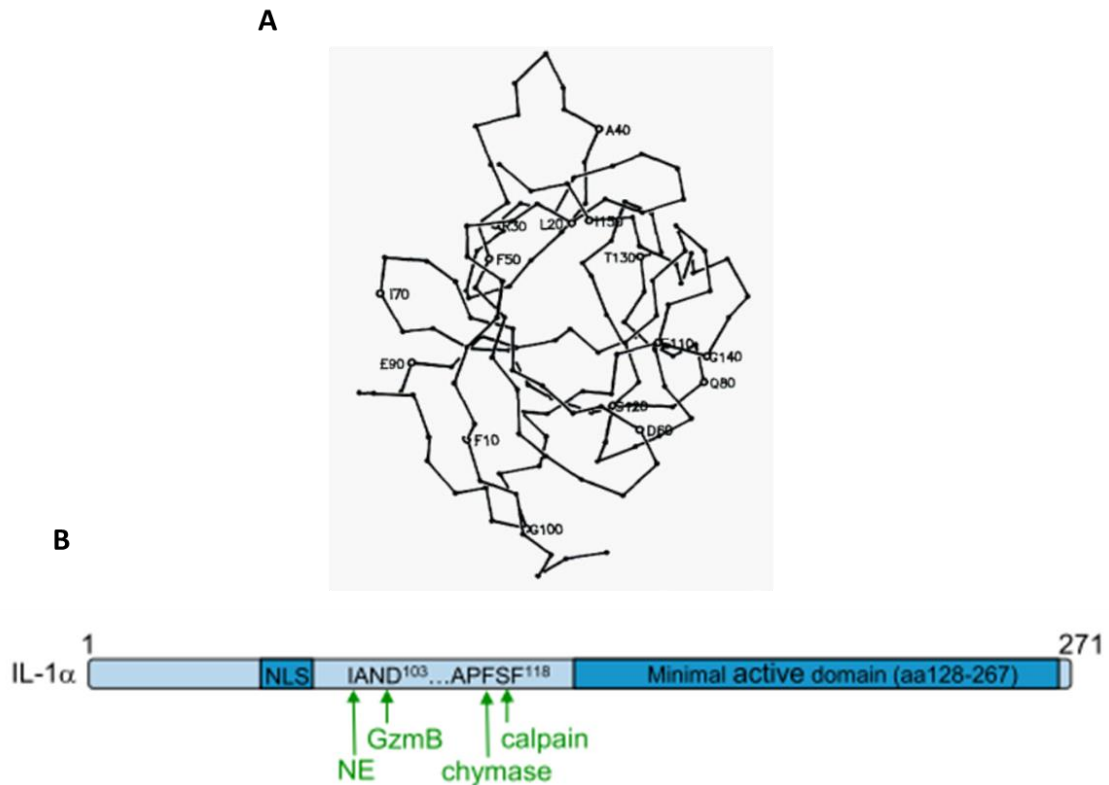


Figure 1 : Représentation schématique de l'IL-1 α

A : Représentation du squelette carboné du précurseur de l'IL-1 α (adapté de Graves *et al.*, 1990) **B** : Schéma de l'IL-1 α décrivant le signal de localisation nucléaire, les différents sites de maturation par les enzymes ainsi que la séquence active une fois clivée (adapté de Afonina *et al.*, 2015). NE : Neutrophil elastase ; GzmB : Granzyme B.

L'IL-1 α possède des rôles à différents niveaux. Au niveau nucléaire, la pro-IL-1 α , grâce au signal de localisation nucléaire, se lie à la chromatine pour inhiber les mécanismes d'inflammation durant l'apoptose et joue aussi le rôle de facteur de transcription pour stimuler la sécrétion de chimiokines (Galozzi *et al.*, 2021 ; Werman *et al.*, 2004). Ce même précurseur peut être ancré à la surface de la membrane plasmique et interagir avec d'autres cellules pour promouvoir la prolifération des lymphocytes T (Brody & Durum, 1989). Dans le milieu extracellulaire, seule la forme clivée est retrouvée. L'IL-1 α est considérée comme une alarmine qui va initier la réponse inflammatoire stérile en présence de signaux de nécrose (**figure 2**). Cette cytokine est impliquée dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires, tumorales, épithéliales et infections microbiennes.

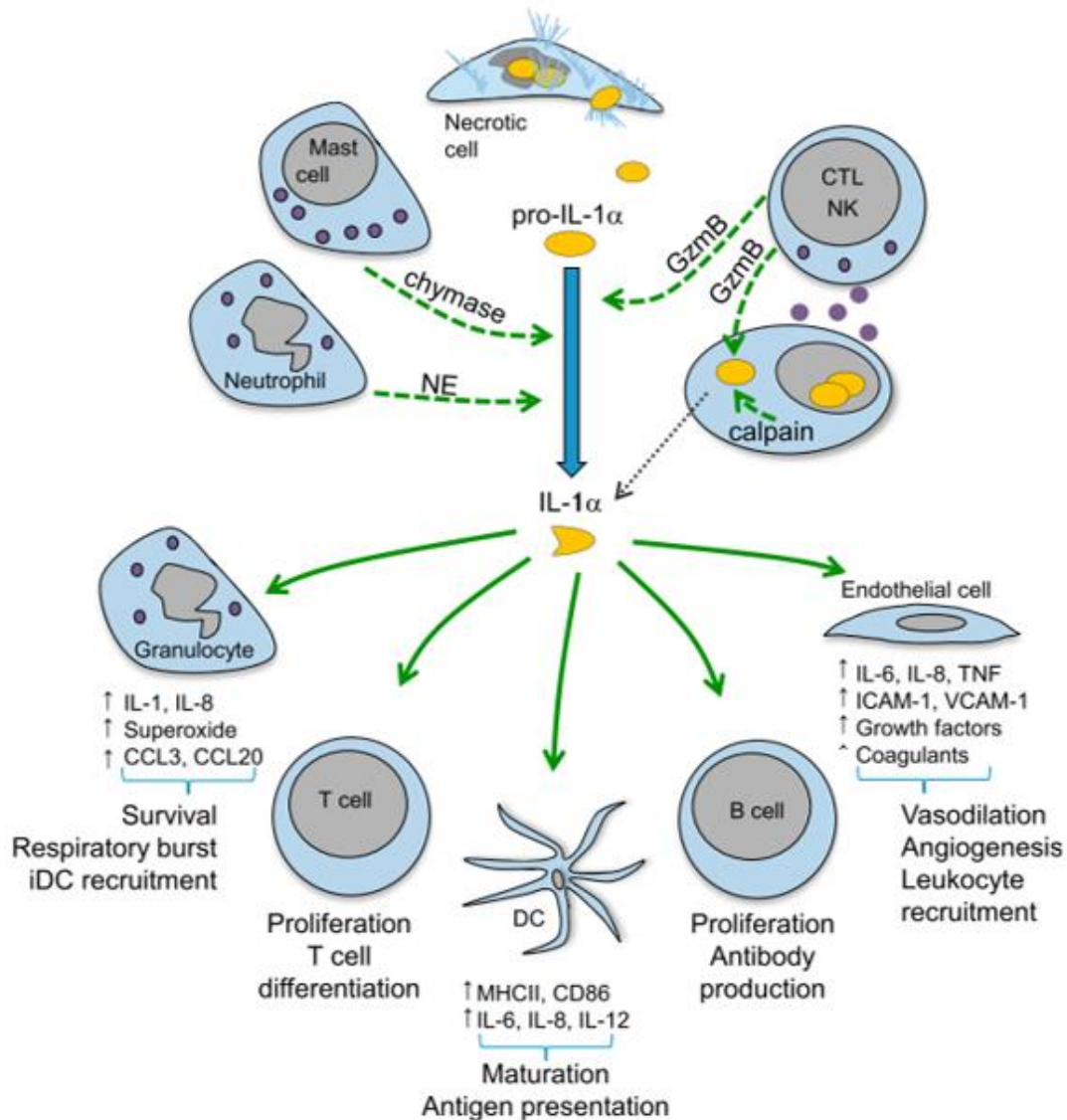


Figure 2 : Maturation et fonctions biologiques de l'IL-1 α (d'après Afonina *et al.*, 2015)

La maturation de l'IL-1 α intervient grâce à la chymase, la neutrophil elastase ou le granzyme B après un signal de nécrose. Cette cytokine va déclencher une réponse inflammatoire en agissant sur différents types cellulaires.

1.2.1.2. Interleukine-1 β (IL-1 β)

L'IL-1 β est produite sous la forme d'un précurseur de 31 kDa (pro-IL-1 β) de 269 acides aminés. Elle est synthétisée par les macrophages et les cellules dérivées de la lignée myéloïde. A la différence de son homologue l'IL-1 α , l'IL-1 β ne possède pas de signal de localisation nucléaire et ne subit aucune modification post-traductionnelle. Cette cytokine est composée de 12 feuillets β antiparallèles repliés en 3 motifs symétriques qui forment la structure secondaire (**figure 3**) (Priestle *et al.*, 1988). A la différence de l'IL-1 α , l'IL-1 β doit être clivée pour être bioactive. La principale enzyme responsable de ce clivage est la caspase-1 qui coupe au niveau

de l'Asp26 et de l'Asp116. L'IL-1 β peut aussi être clivée par la neutrophil elastase, la cathepsin G, la chymase, la protéinase 3 et la caspase 8 (Afonina *et al.*, 2015). Les conditions de maturation de l'IL-1 β passent par différentes voies qui seront détaillées dans la deuxième section.

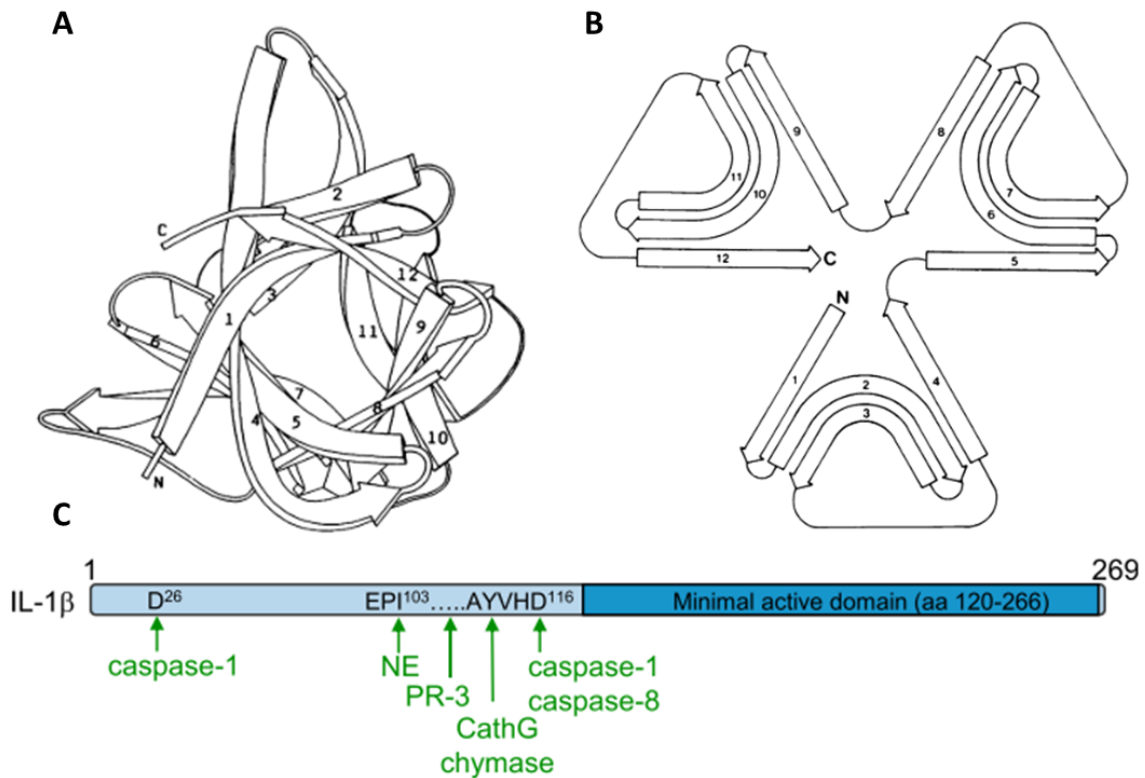


Figure 3 : Représentation schématique de la structure de l'IL-1 β

A : Représentation de la structure quaternaire de la cytokine, les flèches étant les feuillettes β . **B** : Schéma de la conformation de l'IL-1 β montrant les motifs symétriques formés par l'orientation antiparallèle des feuillettes β . Adapté de Priestle, Schär and Grütter, 1988. **C** : Schéma de l'IL-1 β détaillant les différents sites de clivages par les enzymes responsables de la maturation de la protéine. Adapté d'Afonina *et al.*, 2015. La séquence en bleu foncé représente la séquence bioactive. NE : Neutrophil Elastase ; PR-3 : Protéinase-3 ; CathG : Cathepsin G.

L'IL-1 β est une cytokine impliquée dans l'initiation de l'inflammation et, est donc retrouvée dans de très nombreuses pathologies. Découverte suite à des expériences d'induction de fièvre chez le lapin, puis clonée et purifiée (Auron *et al.*, 1984), l'implication de cette cytokine dans les processus inflammatoires a été très détaillée. Parmi les plus notables, l'IL-1 β est impliquée dans la genèse de la fièvre, l'augmentation de l'expression de cytokines (IL-6, IL-37, IL-1Ra) mais aussi de facteurs inflammatoires tels que les espèces réactives oxygénées (ROS) ou encore l'oxyde nitrique synthase (NOS) et la cyclooxygénase-2 (COX-2) (C. A. Dinarello, 2015). Bien évidemment, cette liste est non exhaustive, mais les fonctions et effets de l'IL-1 β seront plus

amplement détaillés dans le chapitre deux. Un récapitulatif des différences entre les deux cytokines IL-1 α et IL-1 β est présenté **tableau 2**.

	IL-1 α	IL-1 β
Protein	pro-IL-1 α - 271aa - NLS - Myristoylation and acetylation on Lys 82 and phosphorylation at Ser 90 - Conserved AXD aa - Additional β -strand at N-terminus IL-1 α - 158aa - 13 β -strands in a 3-fold symmetric pattern	pro-IL-1 β - 269aa - No NLS - No post-translational modifications - Conserved AXD aa IL-1 β - 152aa - 12 β -strands in a 3-fold symmetric pattern
Producing cells	Epithelial, endothelial and stromal cells Hematopoietic and non-hematopoietic cells	Resident macrophages Myeloid-derived cells
Localization	Primary local, rarely in the circulation pro-IL1 α Cytoplasm, nucleus, membrane, extracellular IL-1 α Extracellular	In the circulation pro-IL1 β Cytoplasm IL-1 β Extracellular
Activation	- Active as precursor form - Cleaved and activated by calpain, granzyme B, chymase, neutrophil elastase, trombin	Cleavage by caspase-1 (mainly), proteinase-3, cathepsinG, neutrophil elastases, granzyme A, chymases, chymotrypsins and meprin A subunit- α and subunit- β
Secretion	Inflammasome/caspase-1 dependent or independent mechanisms for releasing both pro- and IL-1 α	Released active IL-1 β via ER/golgi independent pathway (secretory lysosomes, exosomes or gasdermin D channel)
Function at nuclear level	- Bind tightly to chromatin and suppress inflammation during apoptosis - Transcription factor	nd
Function at membrane	- Interact with other cells to promote T cell proliferation and chemokine secretion	nd
Extracellular function	- Alarmin, starting sterile inflammation responses in case of necrotic signals - Carcinogenesis	- Acute and chronic inflammation - Link between innate and adaptive immunity - Enhance expression of extracellular matrix enzymes - Host defense against infections - Carcinogenesis

Tableau 2 : Comparaison entre IL-1 α et IL-1 β de la structure protéique, des cellules productrices, des processus de maturations et des fonctions biologiques associées (adapté de Galozzi *et al.*, 2021)

1.2.1.3. Antagoniste naturel au récepteur à l'IL-1 (IL-1Ra)

L'IL-1Ra est un antagoniste naturel du récepteur à l'IL-1. C'est un membre de la sous-famille de l'IL-1. Il a été isolé pour la première fois en 1987, à partir d'échantillons d'urine, par l'équipe de H.R. MacDonald qui a ensuite montré que cet antagoniste inhibait la liaison de l'IL-1 à son récepteur (Seckinger *et al.*, 1987). Purifié en 1990, « l'IL-1 inhibiteur » verra son ADNc identifié la même année et son nom changer pour IL-1Ra après cette découverte (Eisenberg *et al.*, 1990 ; Hannum *et al.*, 1990). La synthèse de l'IL-1Ra intervient lorsque les cellules entrent en contact avec des agents moléculaires tels que des cytokines, des interférons, des signaux d'infections ou encore des produits viraux (Arend *et al.*, 1998). L'antagoniste est synthétisé sous forme d'une protéine soluble de 177 acides aminés. Sa structure protéique est similaire à celle de l'IL-1 β avec 12 feuillets β antiparallèles repliés en 3 motifs symétriques (**figure 4**), malgré seulement 26% d'homologie génomique avec l'IL-1 β (H. A. Schreuder *et al.*, 1995). La sécrétion de l'IL-1Ra intervient après clivage du peptide signal présent en N-terminal (Arend *et al.*, 1998).

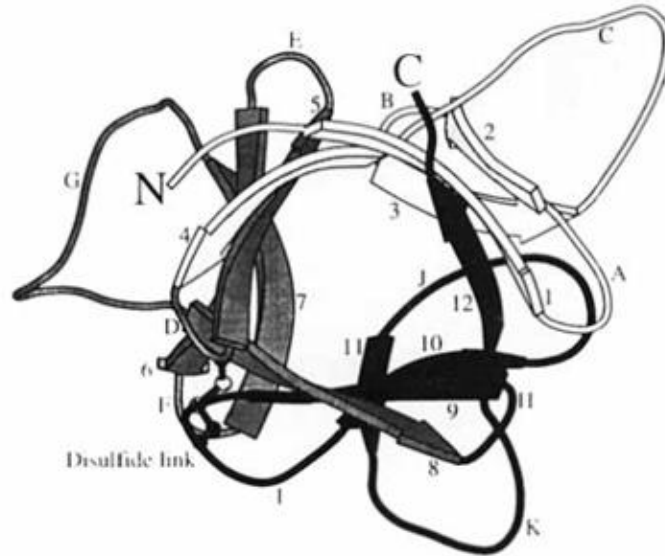


Figure 4 : Représentation schématique de la protéine IL-1Ra (Schreuder *et al.*, 1995)

La fonction première de l'IL-1Ra est anti-inflammatoire, puisqu'elle inhibe la liaison de l'IL-1 β à son récepteur. La protéine recombinante IL-1RA est utilisée comme médicament connu sous le nom d'Anakinra pour traiter de nombreuses pathologies telles que les inflammations articulaires, musculaires et osseuses (ex : polyarthrite rhumatoïde), les pathologies systémiques inflammatoires héréditaires (ex : le syndrome auto-inflammatoire NLRP12), les pathologies inflammatoires systémiques et locales (maladie de Kawasaki) ainsi que d'autres pathologies (diabète, AVC...), pour revue (C. Dinarello & van der Meer, 2013). L'utilisation de cette molécule en clinique démontre bien l'importance de la sous-famille IL-1 dans la réponse inflammatoire.

2. IL-1 β : acteur majeur de l'initiation de l'inflammation

L'inflammation est un ensemble d'évènements non spécifiques innés, liés entre eux et déclenchés par un pathogène, un dommage tissulaire ou les deux. L'objectif de l'inflammation est de faciliter l'acheminement d'acteurs protéiques et cellulaires capables d'isoler, dégrader ou inactiver les pathogènes, de nettoyer les débris cellulaires et finalement de favoriser la réparation et la cicatrisation. Ce phénomène est initié par la libération de cytokines et chimiokines par les cellules adjacentes au lieu lésé et/ou infecté. Ces messagers chimiques stimulent et coordonnent les différents acteurs des phases de l'inflammation mentionnés ci-dessus (Sherwood, 2015). Parmi les cytokines libérées, l'IL-1 β joue un rôle particulièrement important.

L'IL-1 β est l'un des acteurs impliqués dans l'initiation de l'inflammation. La production de cette cytokine par les macrophages est finement régulée au niveau de la synthèse (régulation transcriptionnelle) et de la maturation (régulation post-traductionnelle). Ces régulations intracellulaires font parties de l'ensemble des mécanismes qui contrôlent l'inflammation induite par cette cytokine. Dans cette section, nous traiterons des mécanismes de synthèse, maturation et libération de l'IL-1 β ainsi que des mécanismes de régulation associés. Puis, nous aborderons les conséquences d'une altération de la production d'IL-1 β (surexpression ou délétion) sur l'organisme.

2.1. Régulation de l'activité de l'IL-1 β à 3 niveaux dans le système périphérique

2.1.1. Types cellulaires synthétisant l'IL-1 β

Dans le système périphérique, l'IL-1 β est majoritairement produite et sécrétée par les monocytes, les macrophages et la plupart des cellules myéloïdes. D'autres types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les kératinocytes, les cellules musculaires lisses, les cellules rénales mésangiales et les hépatocytes peuvent aussi produire et sécréter cette cytokine (C. A. Dinarello, 1989). Les mécanismes de synthèse, maturation et libération de l'IL-1 β ont pu être caractérisés, notamment dans les macrophages. Dans les paragraphes suivants nous nous focaliserons sur les données obtenues dans ce type cellulaire.

2.1.2. Contrôle de la synthèse

La découverte de l'IL-1 β en 1984 a généré de nombreuses études pour comprendre comment les cellules la synthétisent. Parmi les études pionnières, l'équipe d'Auron P.E a établi que la transcription de l'ARNm de l'IL-1 β était détectable seulement 15 min après la stimulation des monocytes THP-1 avec du LPS (Fenton *et al.*, 1987, 1988). Le pic de transcription est atteint entre 3 et 4h post-stimulation avant d'observer une diminution de la quantité d'ARNm (Libby, Ordovas, Auger, *et al.*, 1986 ; Libby, Ordovas, Birinyi, *et al.*, 1986).

2.1.2.1. La voie de synthèse par les Toll-like receptors (TLR)

La synthèse d'IL-1 β dans les cellules immunitaires a lieu lorsque ces dernières reconnaissent des signaux de dangers provenant d'agents pathogènes infectieux ou de composés chimiques nocifs. Ces signaux sont classés en deux catégories. Les PAMPs (pathogen-associated molecular pattern) désignent des motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes tels que par exemple le lipopolysaccharide (LPS), les flagellines et les diacyl/triacyl lipopeptides (Akira, 2003). Les DAMPs (damage-associated molecular pattern) représentent les motifs moléculaires associés au danger ou aux dégâts cellulaires et libérés dans le milieu extracellulaire tels que l'adénosine tri-phosphate (ATP), l'acide urique, le sulfate d'héparine ou encore l'ADN / l'ARN (Kawasaki & Kawai, 2014). L'ensemble de ces signaux sont reconnus par les cellules immunitaires via une famille de récepteurs appelée les PRRs (pattern recognition receptors). Parmi les PRRs sont retrouvés les Toll-like Receptors (TLR) impliqués dans l'initiation de la réponse immunitaire innée et surtout dans la synthèse de l'IL-1 β (Kawasaki & Kawai, 2014).

2.1.2.1.1. Structure des TLR

La famille des récepteurs TLR comprend 10 membres chez l'Homme et 12 membres chez la souris. Ils sont principalement exprimés par les cellules dendritiques et les macrophages, mais aussi par d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes ou les cellules épithéliales. Les TLRs sont localisés à la fois à la surface des cellules, mais aussi sur certains compartiments intracellulaires tels que les lysosomes, les endosomes et le réticulum endoplasmique (RE). Chaque TLR est composé d'un domaine extracellulaire en forme de fer à cheval qui contient des répétitions riches en leucines, responsables de la reconnaissance des PAMPs. Ils possèdent aussi un domaine transmembranaire et une partie intracellulaire formée d'un domaine TIR (Toll/Interleukin-1 receptor), initiateur de la cascade de signalisation intracellulaire (**figure 5**) (Botos *et al.*, 2011 ; W. Gao *et al.*, 2017 ; Kawasaki & Kawai, 2014).

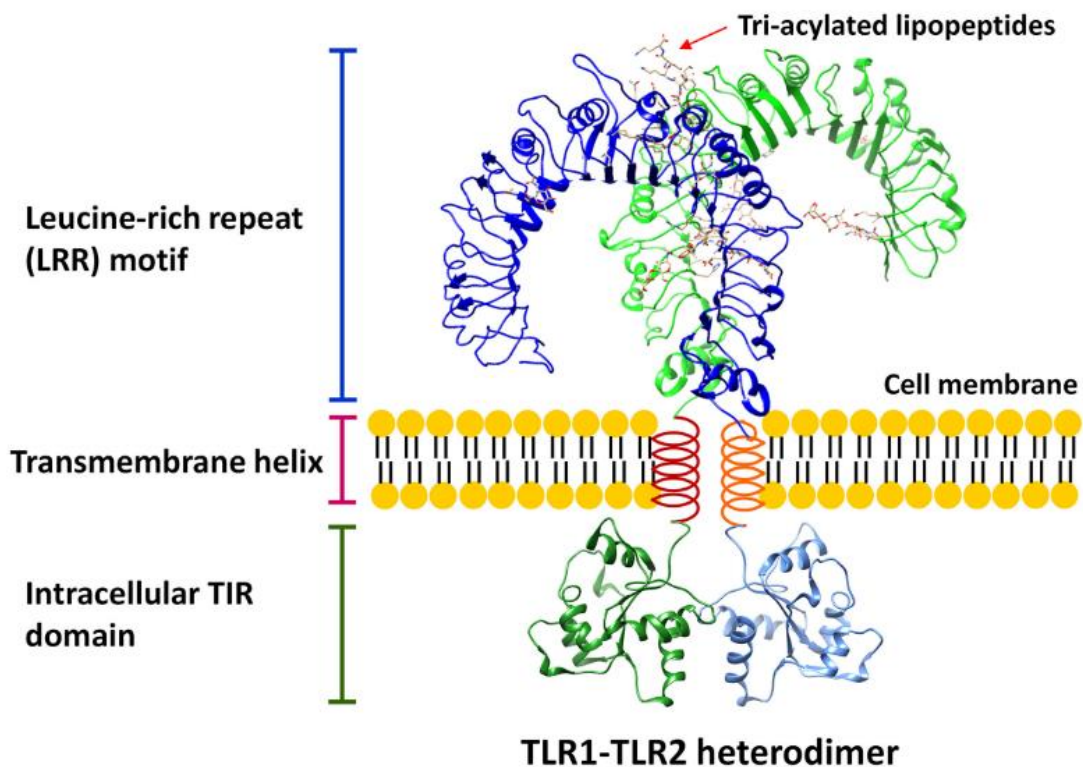


Figure 5 : Représentation schématique de la structure des TLR (ici, l'hétérodimère TLR1-TLR2)

Les caractéristiques structurales conservées parmi tous les TLRs sont représentées à savoir : un motif riche en répétition de leucine en forme de fer à cheval qui reconnaît les PAMPs. L'exemple montré ici est la liaison avec la lipoprotéine tri-acétylée. On retrouve ensuite un domaine transmembranaire et un domaine TIR intracellulaire. (Extrait de Gao *et al.*, 2017).

Les TLRs membranaires sont capables de reconnaître un grand nombre de PAMPs tels que le LPS, le peptidoglycane, le zymosan, mais aussi certains ligands de *Listeria*. Les TLRs intracellulaires reconnaissent généralement l'ADN / l'ARN provenant de virus et bactéries. Lorsque le ligand se lie au récepteur, les TLRs s'associent en homo- ou hétérodimères (Ozinsky *et al.*, 2000), entraînant la formation d'un échafaudage TIR-TIR qui déclenche une signalisation intracellulaire pro-inflammatoire (Akira *et al.*, 2006).

2.1.2.1.2. Signalisation intracellulaire et synthèse de pro-IL-1 β par les TLRs

La signalisation cellulaire induite par l'échafaudage TIR-TIR peut être catégorisée en deux voies activées simultanément, chacune étant finement régulée.

La première cascade de signalisation est la voie dépendante de MyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88). Elle est activée par les TLR2, 4, 5, 7, 8 et 9 qui recrutent via leur domaine TIR la protéine adaptatrice MyD88. Ce recrutement est soit direct, soit précédé de la liaison avec la protéine TIRAP (TIR domain-containing adaptor protein) aussi connue sous le nom de MAL (MyD88 adaptor like protein), requise pour la signalisation induite par les TLR2 et 4. MyD88 recrute et active à son tour une kinase possédant un domaine de mort IRAK-4 (IL-1 receptor-associated-kinase-4). IRAK-4 forme un complexe avec IRAK-1, TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) et TAK1 (transforming growth factor- β -activated kinase 1). Ce complexe permet l'activation des voies MAP kinases et p38/JNK (JUN N-terminal kinase). Cette cascade provoque l'activation des facteurs de transcriptions NF- κ B et AP1 qui se lient alors à l'ADN et déclenchent la synthèse de divers facteurs pro-inflammatoires dont la pro-IL-1 β (**figure 6**) (Factor *et al.*, 1998 ; Kawai & Adachi, 1999 ; Medzhitov *et al.*, 1998 ; Neill & Bowie, 2007 ; Takeuchi *et al.*, 2000).

La deuxième cascade de signalisation est la voie indépendante de MyD88. C'est la voie de signalisation par excellence pour les récepteurs TLR3 endo-lysosomaux, mais elle est aussi induite par les TLR4. Cette voie, appelée signalisation alternative, conduit non seulement à la synthèse du précurseur de l'IL-1 β mais également à celle de l'interféron. Après dimérisation du TLR, la protéine adaptatrice TRAM (TRIF-related adaptor molecule) interagit avec les domaines TIR permettant le recrutement de TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β). Cette dernière recrute alors TRAF6 et TRAF3. TRAF6 recrute la kinase RIP1 (receptor-interacting protein 1) qui active à son tour TAK1, protéine retrouvée dans la voie MyD88 dépendante. TRAF3 de son côté recrute le complexe IKK ϵ /TBK1 pour phosphoryler IRF3, un facteur de transcription de l'interféron de type I (IFN I) (Akira *et al.*, 2006 ; Kawai & Akira, 2010 ; Y. C. Lu *et al.*, 2008). Un schéma récapitulatif des 2 voies est proposé en **figure 6** prenant pour exemple les récepteurs TLR4.

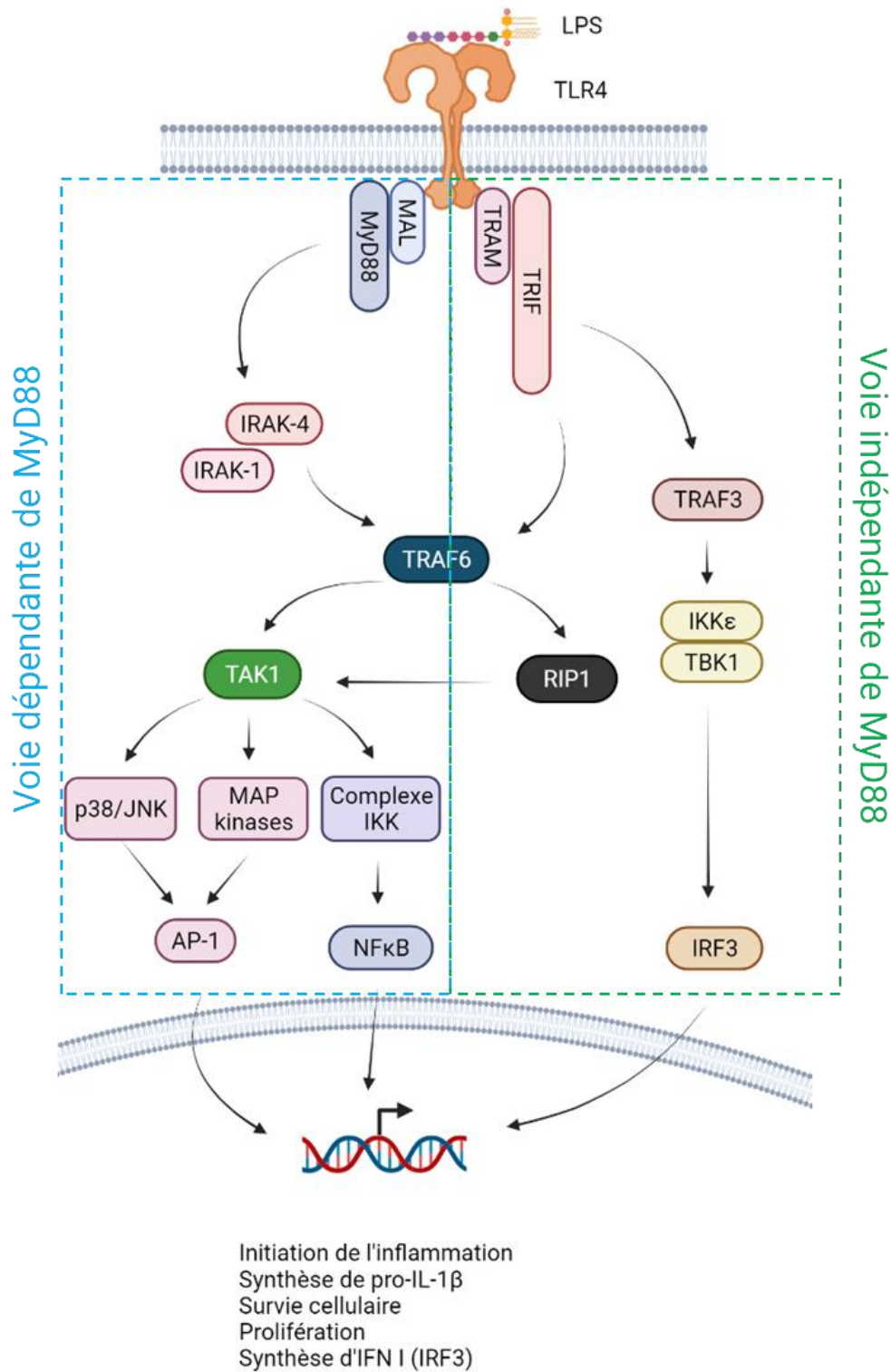


Figure 6 : Schéma des voies de signalisation du récepteur TLR4 conduisant à la synthèse de la pro-IL-1β

La signalisation encadrée en bleu cyan (cadre de gauche) représente la voie dépendante de MyD88 et celle encadrée en vert (cadre de droite) représente la voie indépendante de MyD88. Les deux voies entraînent l'activation des facteurs de transcriptions NF-κB et AP-1 grâce au recrutement d'une part de la protéine TRAF6, présente dans les 2 voies, et d'autre part de la protéines RIP1 qui active la protéine TAK1, présente dans la voie dépendante de MyD88.

L'équilibre entre ces 2 voies est médié par de nombreux facteurs. Il a été montré que TRAF-3 joue un rôle dans l'inhibition de la voie MyD88 dépendante. De même, la protéine NRDP-1, une ubiquitine E3 ligase, initie la dégradation de MyD88 et de TBK1, atténuant la production de cytokines pro-inflammatoires au profit de la production de l'IFN I (C. Wang *et al.*, 2009). A l'inverse, la protéine adaptatrice SARM (sterile α and HEAT-Armadillo motifs-containing protein) inhibe l'activation de facteurs de transcription dépendants de TRIF sans affecter la voie dépendante de MyD88 (Stack *et al.*, 2006).

2.1.3. Les récepteurs à l'interleukine-1

La première caractérisation du récepteur à l'IL-1 (IL-1R) a eu lieu en 1985 par l'équipe de D.L. Urdal, qui a identifié un complexe de 80 kDa (Dower *et al.*, 1985). En 1988, le récepteur à l'IL-1 murin est cloné et en 1989, c'est au tour du récepteur à l'IL-1 humain (Khoury *et al.*, 1988 ; Sims *et al.*, 1989). Depuis, d'autres récepteurs aux interleukines ont pu être identifiés et un classement a été proposé, contenant deux grandes catégories de récepteurs : les récepteurs aux interleukines de type I et de type II. La différence entre les deux types provient d'un motif Trp-Leu-X-Trp-Leu uniquement présent sur les IL-1Rs de type I (Boraschi *et al.*, 2018 ; Stanifer *et al.*, 2019). Les IL-1Rs de type II ne lient que les membres de la famille des interleukines 10 et les interférons de type I à III. Ce complexe est impliqué dans la défense face aux infections virales et non dans la production d'IL-1 β (Krey *et al.*, 2020). Pour ces raisons, les IL-1Rs de type II ne seront pas traités ici.

La famille des récepteurs à l'interleukine-1 est composée de 10 membres, classés de l'IL-1R1 à l'IL-1R10 et répartis en sous famille, parmi lesquelles sont retrouvées la sous-famille de liaison au ligand (IL-1R1, 4, 5, 6), la sous-famille des protéines accessoires (IL-1R3Acp, AcPb et IL-1R7), la sous-famille des membres ayant des fonctions de régulations négatives (IL-1R2, IL-1R8) et la sous-famille des récepteurs analogues à l'IL-1R aux fonctions encore inconnues (IL-1R9, 10) (Boraschi *et al.*, 2018). La plupart de ces récepteurs ont une architecture protéique similaire. Ils possèdent une partie N-terminale extracellulaire composée de 3 domaines immunoglobuline-like (Ig-like, dénommés D1, D2 et D3), responsables de la liaison avec les cytokines. Le domaine extracellulaire est relié à un domaine transmembranaire unique et à une queue C-terminale intracellulaire comportant un domaine TIR (Toll/Interleukin-1 Receptor protein), initiateur de la cascade de signalisation intracellulaire (Boraschi *et al.*, 2018 ; Boraschi & Tagliabue, 2006 ; Mantovani *et al.*, 2019) (**figure 7**).

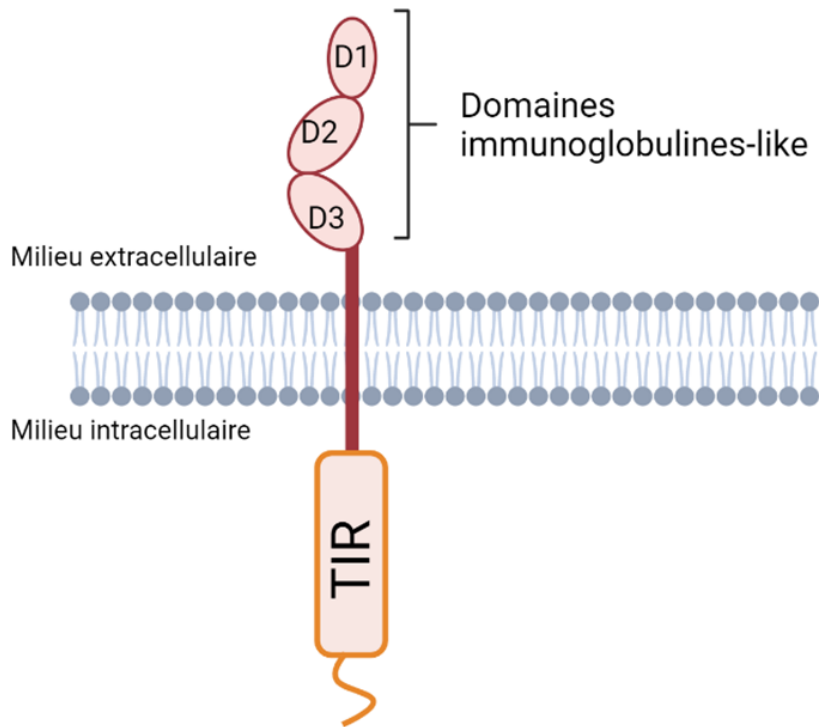


Figure 7 : Représentation schématique d'un récepteur à l'interleukine-1

Le récepteur est composé de 3 domaines immunoglobulines-like (D1, D2 et D3) extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une partie C-terminale intracytoplasmique contenant un domaine TIR.

2.1.3.1. Le récepteur 1 à l'interleukine-1

Le récepteur 1 à l'interleukine-1 (IL-1R1) est la structure protéique qui lie l'IL-1 α et l'IL-1 β . L'IL-1R1 murin (mIL-1R1) est codé par le gène *Il-1r1* présent sur le chromosome 1 tandis que l'IL-1R1 humain (hIL-1R1) est codé par le gène *Il-1r1* présent sur le chromosome 2, à proximité des gènes codants pour l'IL-1 α et β (Copeland *et al.*, 1991). La partie N-terminale de l'IL-1R1 possède 3 domaines Ig-like qui forment 2 sites de liaisons A et B. Les domaines D1 et D2 sont étroitement juxtaposés avec un pont disulfure entre les cystéines 104 et 147, formant le site de liaison A. D1/D2 et D3 sont séparés par une séquence de 6 acides aminés et D3 forme à lui seul, le site de liaison B (G. P. A. Vigers *et al.*, 1997).

2.1.3.2. Chaîne accessoire et formation du complexe récepteur à l'interleukine-1

L'IL-1R3, aussi appelé protéine accessoire du récepteur à l'interleukine-1 (IL-1RAcP), est un homologue de l'IL-1R1, codé par le gène *ILRAP*, présent chez l'Homme sur le chromosome 3 (M. Dale *et al.*, 1998). Alors qu'un seul isoforme s'exprime dans le système périphérique (IL-

1R3AcP), deux isoformes sont co-exprimés dans le système nerveux central (IL-1R3AcP et IL-1R3AcPb). Malgré une affinité pour l'IL-1 β différente, l'IL-1R3AcPb a une affinité plus élevée pour l'IL-1 β que l'autre isoforme, les deux chaînes accessoires fonctionnant de la même manière. Les récepteurs à l'IL-1 fonctionnent sous la forme d'un complexe hétérodimérique. La liaison de l'IL-1 β avec les sites A et B de la chaîne IL-1R1 induit une hétéro-dimérisation du récepteur en recrutant l'IL-1R3AcP qui interagit à l'opposé du lieu de liaison entre l'IL-1 β et l'IL-1R1 (Fields *et al.*, 2019). L'ensemble IL-1 β /IL-1R1/IL-1R3AcP forme le complexe récepteur à l'interleukine-1 (Boraschi *et al.*, 2018 ; Greenfederu *et al.*, 1995 ; Huang *et al.*, 2011). Ce complexe, par interaction homotypique des domaines TIR, déclenche la cascade de signalisation IL-1 dépendante, impliquant la voie MyD88 détaillée dans la partie des TLR. Cette cascade induit l'activation de voies telles que les MAP kinases, p38/JNK et le complexe IKK, conduisant entre autres à la synthèse de la pro-IL-1 β (**figure 8**).

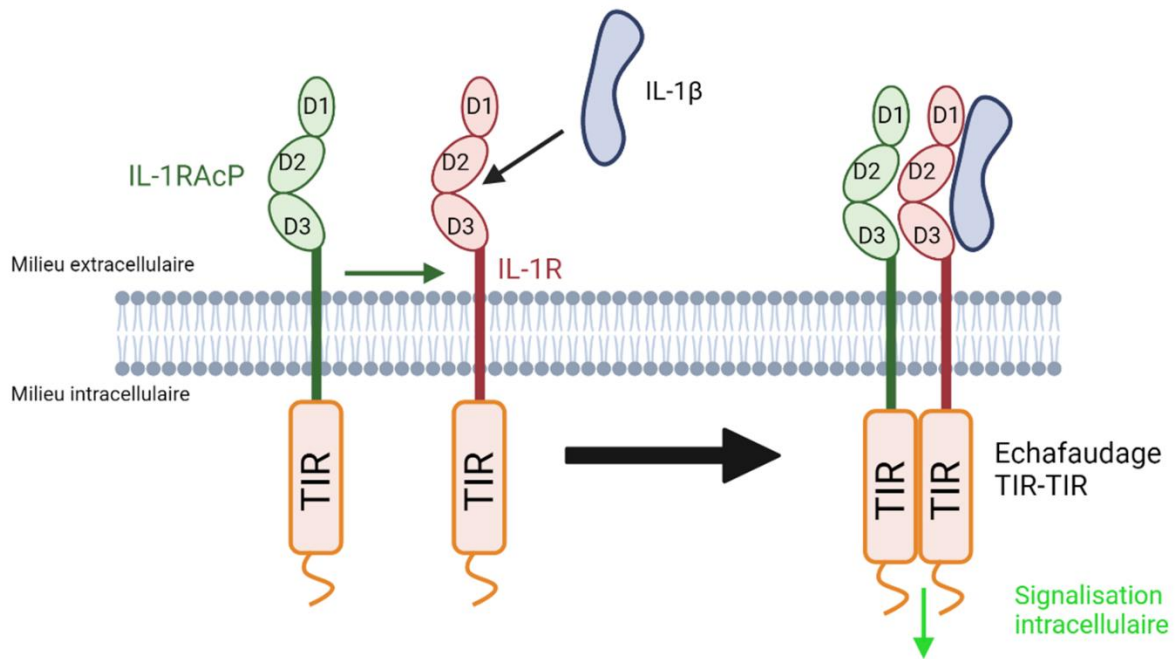


Figure 8 : Représentation schématique de la formation du complexe récepteur hétérodimérique à l'interleukine-1

Lorsque l'IL-1 β (en bleu) se lie sur les 3 domaines Ig-like de l'IL-1R1 (en rouge), cela entraîne le recrutement de la chaîne accessoire IL-1R3AcP (en vert) pour former le complexe récepteur hétérodimérique. Au niveau intracellulaire s'assemble alors l'échafaudage TIR-TIR qui peut ensuite induire la cascade de signalisation.

Comme mentionné dans la section 1, l'IL-1Ra est un antagoniste de l'IL-1R1. Disposant d'une haute affinité avec ce récepteur, il entre en compétition avec l'IL-1 β (H. Schreuder *et al.*, 1997). Cependant, compte tenu de sa conformation et de l'absence de la boucle peptidique entre le 5^e et le 6^e feuillet β , l'IL-1Ra ne se fixe que sur le site de liaison A du récepteur. Ceci a pour conséquence de bloquer le complexe récepteur sous forme monomérique, d'inhiber le changement conformationnel du récepteur, d'empêcher le recrutement de l'IL-1R3AcP et *in fine*, d'inhiber la synthèse de la pro-IL-1 β (G. P. Vigers *et al.*, 1994).

2.1.3.3. Le récepteur 2 à l'interleukine-1

L'IL-1R1 n'est pas le seul récepteur capable d'interagir avec l'IL-1 β . En effet, l'équipe de J. McMahan a pu mettre en évidence une deuxième structure appelée « récepteur 2 à l'interleukine-1 (IL-1R2) », codée par le gène humain *IL-1R2* sur le long bras du chromosome 2 (McMahan *et al.*, 1991). Ce récepteur possède une architecture similaire à l'IL-1R1 à savoir une portion extracellulaire avec 3 domaines Ig-like et un domaine transmembranaire mais une queue cytoplasmique beaucoup plus courte que celle de l'IL-1R1 (29 résidus vs 215, respectivement), dépourvue du domaine TIR (McMahan *et al.*, 1991). Cette différence notable lui a valu le nom de « récepteur leurre », décrit comme régulateur puisqu'il entre en compétition avec l'IL-1R1 pour lier l'IL-1 β (Colotta *et al.*, 1992). L'IL-1R2 possède une forte affinité pour l'IL-1 β , une affinité plus faible pour l'IL-1Ra et, est presque incapable de lier l'IL-1 α (Symons *et al.*, 1995). Il peut également inhiber les effets médiés par l'IL-1 en recrutant l'IL-1R3AcP après liaison avec la cytokine, formant ainsi un complexe récepteur inactif (Lang *et al.*, 1998). Ceci montre un mécanisme de régulation de l'activité de l'IL-1 β par double séquestration du ligand et de son corécepteur.

2.1.4. Contrôle de la maturation

A la différence de la pro-IL-1 α , la pro-IL-1 β est un précurseur inactif. Une fois synthétisée, la pro-IL-1 β est stockée dans le cytoplasme en attente de sa maturation. Cette dernière intervient seulement si la cellule reçoit un deuxième signal de danger. Ce signal initie la formation et l'activation d'une plateforme moléculaire appelée « inflammasome », qui *in fine* provoquera le clivage de la pro-IL-1 β en sa forme mature.

2.1.4.1. L'inflammasome : principale plateforme moléculaire impliquée dans la maturation de l'IL-1 β

Le terme « inflammasome » est apparu en 2002, donné par l'équipe de Tschopp, qui décrit un complexe de haut poids moléculaire présent dans le cytosol des cellules immunitaires stimulées et responsable de l'activation de caspases (Martinon *et al.*, 2002). Depuis cette étude, plusieurs inflammasomes ont été identifiés ainsi que les 3 grands types de protéines qui les composent à savoir : les protéines sensibles, les protéines adaptatrices et les protéines effectrices.

2.1.4.1.1. Architecture de l'inflammasome : les protéines sensibles

La famille des protéines NLR (Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat containing Receptor) appartient aux PRRs. Elle regroupe 3 sous-familles de protéines : NOD, IPAF et NLRP (**figure 9**) (Schroder & Tschopp, 2010).

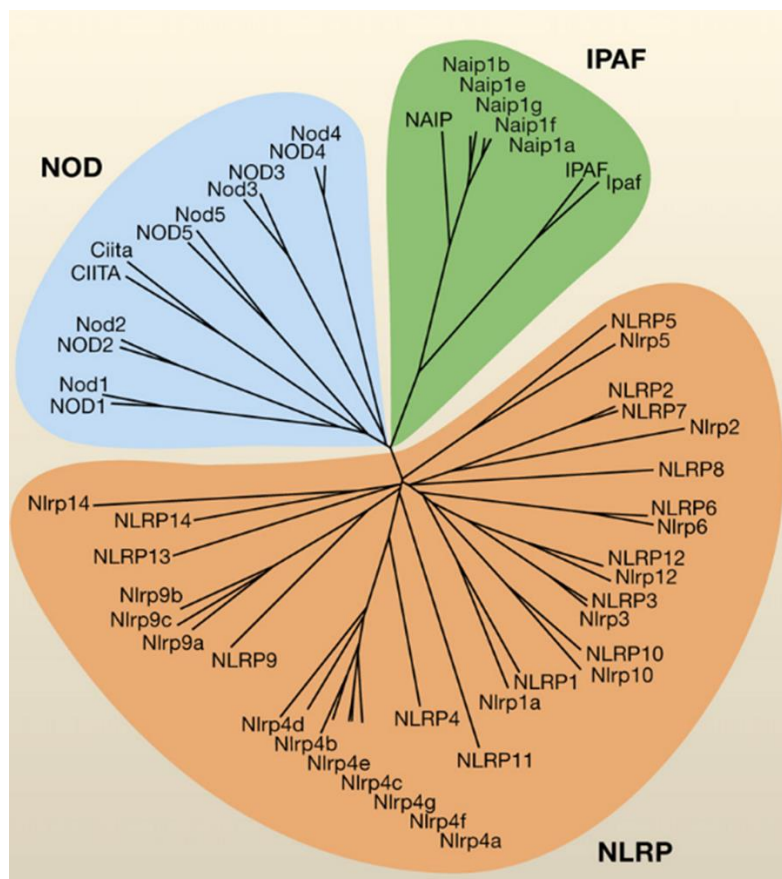


Figure 9 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les différentes sous-familles des protéines NLR chez l'Homme (majuscule) et la souris (minuscule) (Adapté de Schroder *et al.*, 2010)

Cet arbre a été établi en se basant sur le domaine NACHT de ces protéines, domaine conservé dans beaucoup d'espèces.

Les protéines NLRs ont une architecture tripartite (Broz & Dixit, 2016 ; Harton *et al.*, 2002 ; Inohara & Nuñez, 2001 ; Lamkanfi & Dixit, 2014) (**figure 10**).

- Une partie N-terminale composée soit d'un domaine CARD (Caspase-activation and recruitment domain), soit d'un domaine BIR (baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat), soit d'un domaine PYD (Pyrin domain). Cette partie est impliquée dans l'interaction protéine-protéine homotypique pour déclencher la signalisation en aval.
- Une partie centrale composée d'un domaine NBD (nucleotide-binding domain), aussi appelé NACHT (acronyme de NAIP, CIITA, HET-E et TP1), impliqué dans l'oligomérisation induite par l'ATP.
- Une partie C-terminale composée d'une série de LRRs (leucine-rich repeats), responsable de l'autorégulation du système, et selon les protéines NLR, d'un domaine FIIND et d'un domaine CARD.

Parmi l'ensemble des protéines NLRs existantes, le génome humain code pour 23 d'entre elles. Sur ces 23, pour le moment, seules les protéines NLRP1, 3, 6, 7, 9, 12 et NLRC4 ont été identifiées comme capables de former un inflammasome pour activer la caspase-1 (Abderrazak *et al.*, 2015 ; Bauer & Rauch, 2020 ; Chavarría-Smith & Vance, 2015 ; Elinav *et al.*, 2011 ; Khare *et al.*, 2012 ; Vladimer *et al.*, 2012). Malgré une structure du domaine NACHT similaire, ces protéines sont activées par différents stimuli (Davis *et al.*, 2011 ; Schroder & Tschopp, 2010).

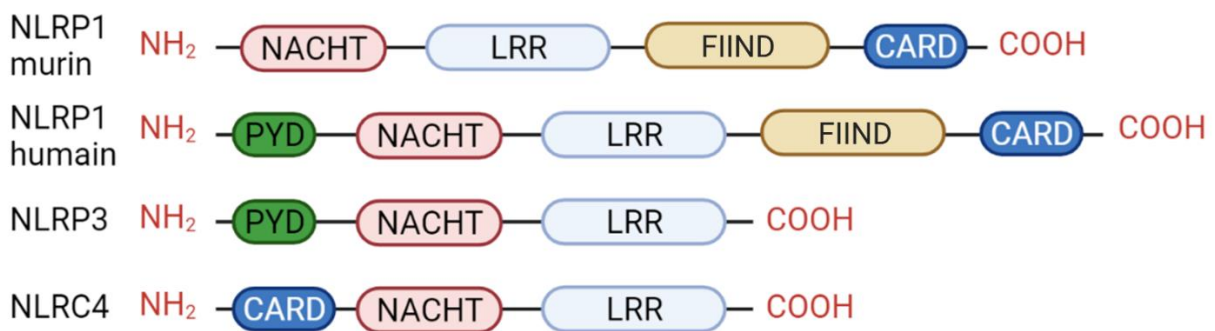


Figure 10 : Schéma de différentes protéines NLR, composant de l'inflammasome

Les protéines NLRs disposent d'une architecture commune, comprenant un domaine NACHT et LRR. L'évolution a permis l'apparition de nouveaux domaines pour une réponse adaptée selon les signaux rencontrés.

2.1.4.1.2. Architecture de l'inflammasome : les protéines adaptatrices

Les protéines ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD) sont composées d'un domaine PYD et d'un domaine CARD. Elles sont recrutées suite à l'oligomérisation des protéines NLRs, par interaction homotypique des domaines PYD (Heilig & Broz, 2018 ; Pawlowski *et al.*, 2001). Leur rôle est de créer un pont entre les protéines NLRs et la troisième structure composant l'inflammasome, à savoir les protéines effectrices. Cependant, il est aussi décrit que la protéine ASC peut s'assembler en agrégats, indépendamment de l'inflammasome (Faustin *et al.*, 2007 ; Poyet *et al.*, 2001).

2.1.4.1.3. Architecture de l'inflammasome : les protéines effectrices (caspases)

Les caspases sont une famille d'endoprotéases dépendantes des cystéines conservées au cours de l'évolution. Elles sont constituées d'un domaine N-terminal de taille variable suivi par un domaine catalytique composé de deux sous-domaines : un domaine long et un domaine court (Lamkanfi, 2002). Ces protéases sont principalement impliquées dans l'inflammation, l'apoptose, mais aussi dans le cycle et la différenciation cellulaires (**figure 11**) (Van Opendenbosch & Lamkanfi, 2019). Au niveau de l'inflammasome, l'enzyme directement impliquée dans la maturation de l'IL-1 β est la caspase-1. Cette caspase (précédemment connue sous le nom de ICE pour Interleukin-1 β -converting enzyme) est une enzyme appartenant à la famille des cystéines protéases spécifique de l'aspartate (Black *et al.*, 1989 ; Nuñez *et al.*, 1998 ; Ruddiman *et al.*, 1992). Elle est exprimée sous la forme d'un précurseur inactif de 404 acides aminés, appelé pro-caspase-1, constitué d'un pro-peptide CARD, d'un domaine CDL (CARD domain linker) et d'un domaine catalytique composé de deux sous-unités p20 et p10 (Elliott *et al.*, 2009). Le domaine CARD interagit avec le domaine ASC^{CARD} de l'inflammasome, conduisant à une auto-protéolyse du domaine CDL qui permet de libérer la forme active de cette protéase (Elliott *et al.*, 2009 ; Walker *et al.*, 1994 ; Wilson *et al.*, 1994 ; Yang *et al.*, 1998). Des études cristallographiques ont montré que la forme active de la caspase-1 est constituée d'un tétramère de deux hétérodimères p20/p10 (Gu *et al.*, 1995 ; Wilson *et al.*, 1994). La caspase-1 active, est responsable de la maturation de différents précurseurs protéiques tels que la pro-IL-1 β , la pro-IL-18 et la pro-gasdermin D (GSDMD) en leur forme bioactive (Dinarello, 2009 ; Martinon *et al.*, 2002).

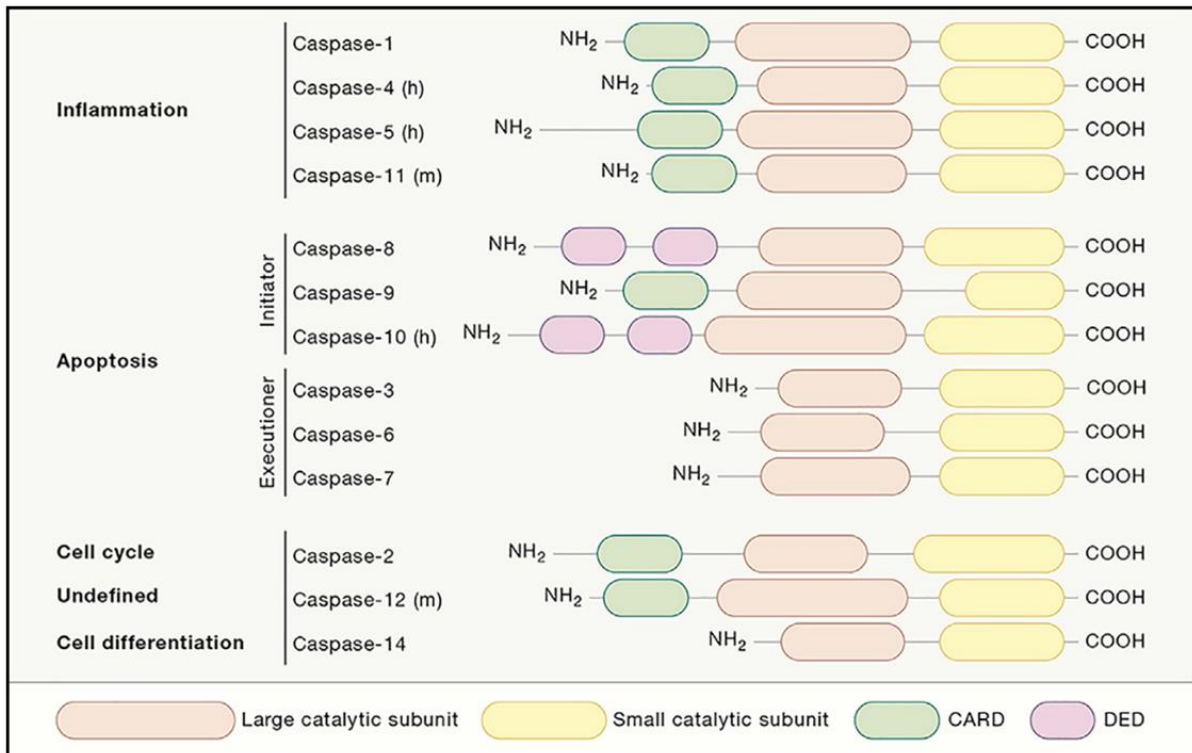


Figure 11 : Classification fonctionnelle et architecturale des caspases murines et humaines (Extrait de Van Opdenbosch *et al.*, 2019)

Les caspases sont classées selon leur implication dans l'inflammation, l'apoptose, le cycle cellulaire et la différenciation cellulaire. Les caspases 8 et 10 se différencient des autres par la présence de domaines DED (Death Effector Domain) au lieu du domaine CARD. Ces domaines sont notamment impliqués dans les mécanismes d'apoptose.

2.1.4.2. Maturation de l'IL-1 β dépendante de l'inflammasome NLRP3

Il existe deux voies d'activations de l'inflammasome permettant la maturation de l'IL-1 β . La voie canonique implique l'inflammasome NLRP3 conduisant à l'activation de la caspase 1. La voie non canonique implique un inflammasome conduisant à l'activation des caspases 4 et 5 chez l'Homme, et de la caspase 11 chez la souris (abrégé ensuite caspase 4/5/11 car les effets observés sont similaires chez ces deux espèces). Pour le détail de la voie canonique, nous prendrons l'exemple de l'inflammasome NLRP3, structure la plus documentée à ce jour mais également car cet inflammasome a été au cœur de mes travaux de recherche.

2.1.4.2.1. Voie canonique de l'inflammasome NLRP3 : activation de la caspase 1

Dans les monocytes et macrophages, cette voie médiée par l'inflammasome NLRP3, se déroule en deux phases. La première, ou « priming », passe comme décrite précédemment, par l'activation de la voie TLR et du facteur de transcription NF- κ B nécessaire à la synthèse de la pro-IL-1 β , mais aussi de certains composants de l'inflammasome, tels que la protéine NLRP3 ou de la pro-caspase-1 (Bauernfeind *et al.*, 2022). La deuxième phase est quant à elle nécessaire pour déclencher la formation de l'inflammasome. Sans cette dernière, les protéines composantes de cette plateforme moléculaire subissent diverses modifications post-traductionnelles afin de les maintenir dans un état inactif (Ghonime *et al.*, 2022 ; Juliana *et al.*, 2012 ; Py *et al.*, 2013).

L'inflammasome NLRP3 est activé par différents DAMPs tels que des pathogènes bactériens, viraux et fongiques, les toxines formant des pores, différents types de microcristaux et l'ATP (Lamkanfi & Dixit, 2012). Les mécanismes cellulaires conduisant à la formation de cette plateforme moléculaire ne sont pas connus en détails mais font intervenir un efflux potassique, une production de ROS par la mitochondrie ou une libération d'ADN mitochondrial (Nakahira *et al.*, 2011 ; Shimada *et al.*, 2012 ; Smith *et al.*, 2013). Ces DAMPs lèvent l'inhibition induite par des modifications post-traductionnelles (phosphorylations et ubiquitinylation) présentes sur la protéine NLRP3 en condition non-inflammatoire. Le retrait de ces modifications entraîne un changement conformationnel de la protéine, permettant le recrutement de la protéine NEK7 (NIMA (Never In Mitosis gene-A) -related kinase 7), responsable de la régulation et de l'activation de NLRP3. En effet, il a été montré que NEK7 interagit physiquement avec les domaines NACHT et LRR de NLRP3 pour former le complexe NLRP3-NEK7 (**figure 12**) (Sharif *et al.*, 2019).

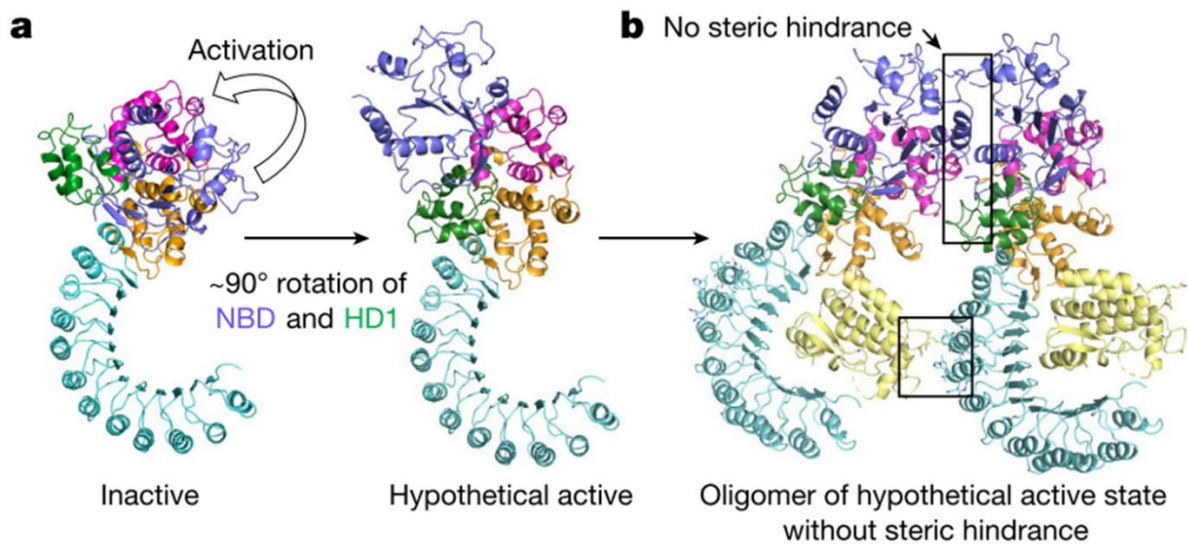


Figure 12 : Modélisation de l'activation de NLRP3 et de son interaction avec NEK7 (adapté de Sharif *et al.*, 2019)

a : Modélisation de l'activation de NLRP3 par rotation à 90° du module NBD et HD1 (NACHT). **b** : Modèle de la formation d'un dimère NLRP3 avec l'interaction NLRP3-NEK7 (NEK7 en jaune). Les liaisons entre les deux protéines sont représentées par les encadrés noirs.

Ce complexe va se lier à la protéine ASC via une interaction homotypique entre les domaines PYD des deux protéines NLRP3 et ASC. Par la suite, par interaction entre les domaines CARD, ASC s'associe à la pro-caspase 1 et permet son activation par auto-protéolyse. Enfin, la caspase-1 entraîne la maturation de diverses protéines inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-18 et la GSDMD (**figure 13**) (Broz & Dixit, 2016 ; Chan & Schroder, 2019 ; M. Sharma & De Alba, 2021).

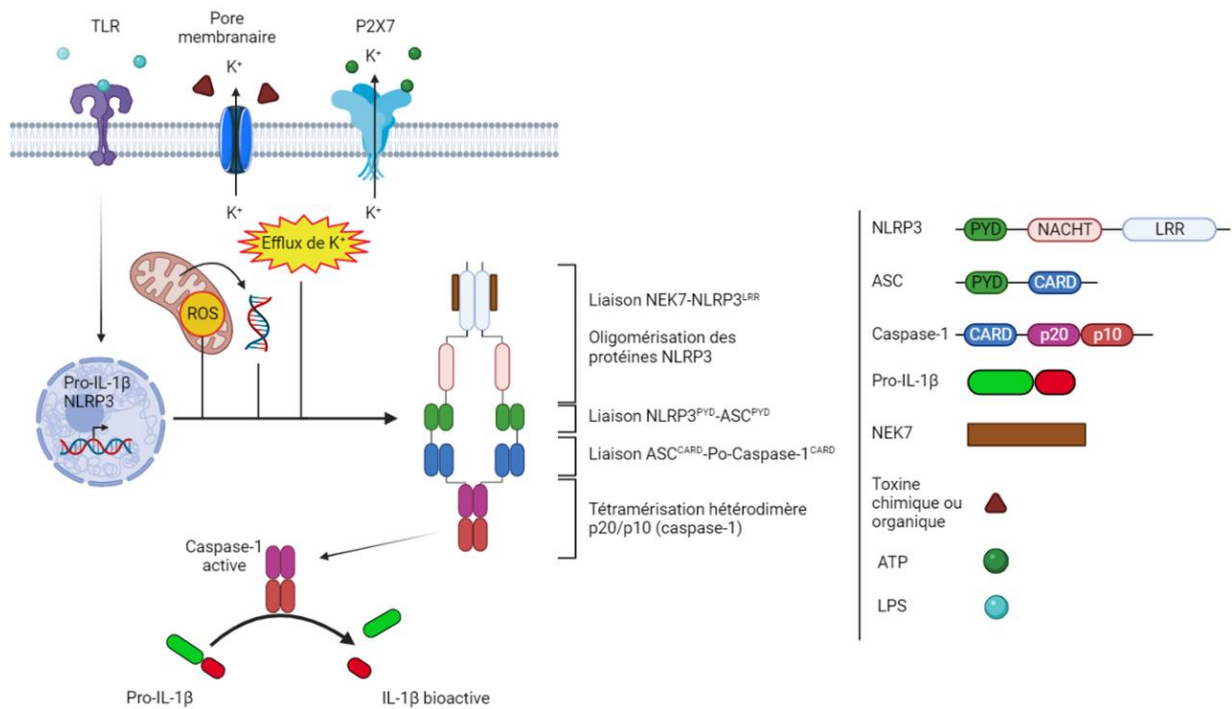


Figure 13 : Schéma de la voie canonique de l'inflammasome

La détection de LPS active la voie TLR entraînant la synthèse de la pro-IL-1β et de la protéine NLRP3. Le second signal de danger est représenté par la présence de toxine créant des pores membranaires ou d'ATP, activateur de P2X7, un efflux potassique va se créer au sein de la cellule mais aussi par la production de ROS ou la libération d'ADN mitochondrial. Ces DAMPs entraînent la formation de l'inflammasome par oligomérisation des protéines NEK7-NLRP3-ASC-Pro-caspase-1. La tétramérisation des hétérodimère p20/p10 de la pro-caspase-1 conduit à son auto-protéolyse et son activation. La caspase-1 active clive alors la pro-IL-1β en IL-1β bioactive.

La description établie précédemment concerne uniquement l'inflammasome NLRP3, le mieux caractérisé aujourd'hui. Cependant, il existe d'autres inflammasomes qui vont réagir à d'autres stimuli, déclenchant la voie canonique pour conduire à l'activation de la caspase 1. Des exemples sont proposés dans la **figure 14**.

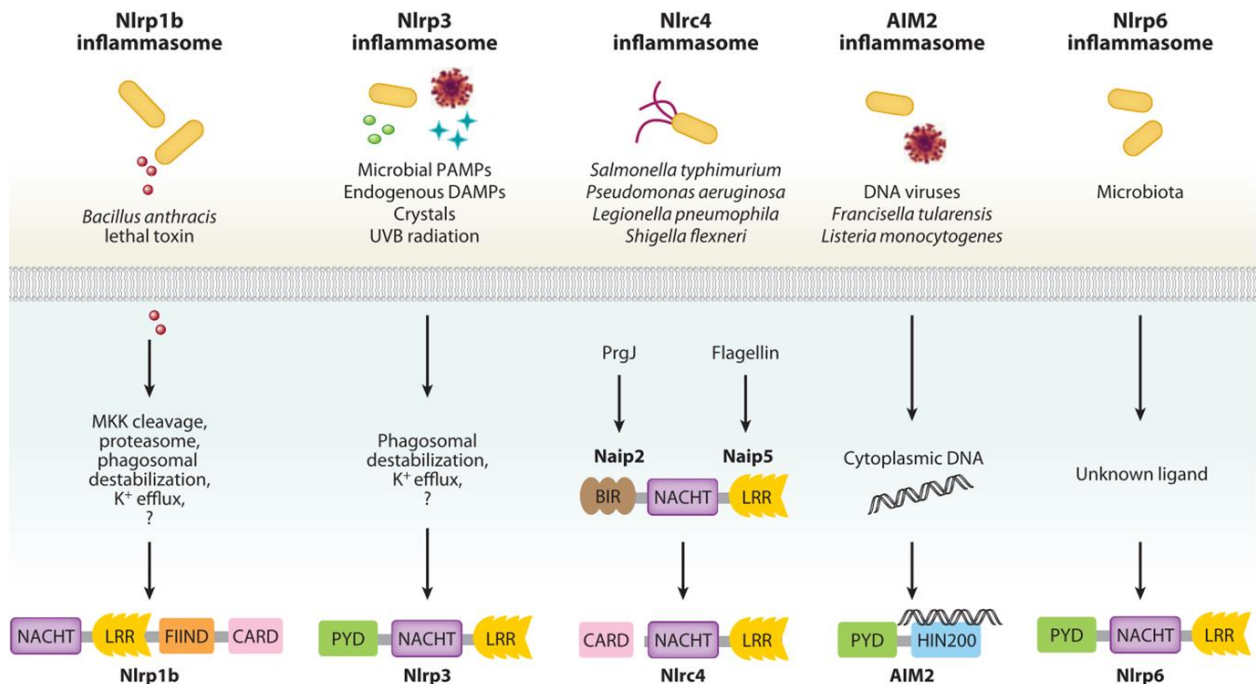


Figure 14 : Aperçu des stimuli et des modèles d'activations de certains inflammasomes (adapté de Lamkanfi *et al.*, 2012)

Les protéines NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2 et NLRP6 sont représentées ainsi que le mécanisme d'assemblage stimuli spécifique. Les PAMPs et DAMPs sont reconnus par la cellule soit au moyen de récepteurs, soit au niveau intracellulaire pour la protéine AIM2. En fonction de la molécule, différents événements intracellulaires vont induire la formation de l'inflammasome pour déclencher la réponse inflammatoire médiée par la caspase-1.

2.1.4.2.2. Voie non-canonique de l'inflammasome : activation des caspases 4 et 5 (Homme) et de la caspase 11 (souris)

La voie non canonique joue un rôle important dans le déclenchement de la réponse immunitaire à la suite d'une infection par une bactérie Gram négative comme *E. coli*, *Citrobacter rodentium*, *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila* et *Salmonella typhimurium* (Rathinam *et al.*, 2019). La fraction lipidique A du LPS libérée par ces micro-organismes interagit directement avec le domaine CARD des caspases 4/5/11, entraînant un changement conformationnel des enzymes. Par interaction homotypique des domaines CARD, les caspases s'oligomérisent et s'activent par auto-protéolyse. Les protéases activées clivent la GSDMD qui à son tour, génère des pores membranaires (Hagar *et al.*, 2013 ; Kayagaki *et al.*, 2013 ; C. Ross *et al.*, 2018 ; J. Shi *et al.*, 2014). L'ensemble de ces événements mène à une mort cellulaire pro-inflammatoire, entraînant la lyse des cellules et la libération de DAMPs dans le milieu extracellulaire, appelée pyroptose (Jorgensen & Miao, 2015).

Actuellement, aucune étude a mis en évidence la capacité des caspases 4/5/11 à cliver l'IL-1 β . Si la caspase 5 a la capacité de maturer l'IL-1 β , son efficacité est trop faible pour permettre sa libération massive (Bibo-verdugo *et al.*, 2020). Néanmoins, l'activation de la voie non-canonique peut conduire à une sécrétion d'IL-1 β à des taux comparables à la voie canonique (Kayagaki *et al.*, 2011). En effet, il existe une communication croisée entre les voies canoniques et non-canoniques. La GSDMD clivée par la caspase-11 crée des pores membranaires responsables d'une variation dans le gradient ionique intracellulaire et génère un efflux potassique (Sebastian & Broz, 2015). Cet efflux constitue un signal de danger provoquant l'assemblage de l'inflammasome NLRP3, la maturation de la caspase-1 et le clivage de la pro-IL-1 β en sa forme mature (**figure 15**).

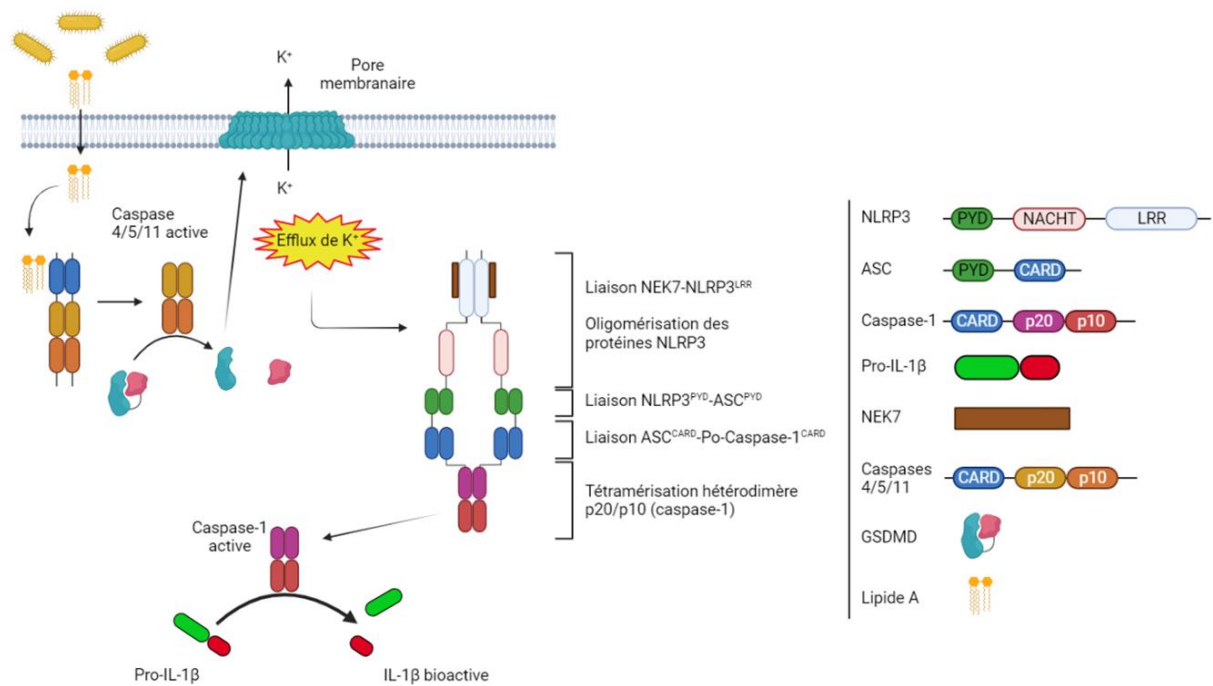


Figure 15 : Schéma de la voie non-canonique de l'inflammasome

Le lipide A libéré par des bactéries Gram négative va traverser la membrane cellulaire et interagir avec le domaine CARD des caspases 4/5/11. Les caspases vont se lier entre elles par interaction homotypique CARD-CARD ce qui va entraîner la tétramérisation de l'hétérodimère p20/p10 et l'auto-protéolyse des domaines CDL. Les caspases 4/5/11 actives vont cliver la GSDMD. Cette protéine forme alors un pore membranaire par oligomérisation. Ce pore, responsable d'un efflux potassique, génère alors un signal de danger qui va déclencher le processus de formation de l'inflammasome et la maturation de l'IL-1 β .

2.1.4.2.3. Régulations des voies canoniques et non-canoniques

Pour éviter une réponse inflammatoire incontrôlée, des mécanismes de régulations sont présents, notamment pour l'assemblage de la plateforme moléculaire. Comme mentionné dans la partie 2.1.4.2.1, les protéines NLRP3 subissent des modifications post-traductionnelles. Parmi ces modifications, la phosphorylation du domaine PYD en N-terminal régule l'interaction entre NLRP3 et ASC (Stutz *et al.*, 2017). De même, la phosphorylation du domaine NACHT atténue l'auto-oligomérisation de la protéine NLRP3 (Song & Li, 2018), ou encore celle du domaine LRR qui inhibe l'interaction NLRP3-NEK7 par encombrement stérique (Spalinger *et al.*, 2016). Un deuxième système de régulation par ubiquitinylation est aussi présent. L'ubiquitinylation consiste en l'ajout d'une ubiquitine sur des résidus lysine de la protéine cible afin que celle-ci soit dégradée par le protéasome. Ce mécanisme implique une série de réactions enzymatiques via les enzymes E1 (ubiquitin-activating enzyme), E2 (ubiquitin-conjugating enzyme), E3 (ubiquitin ligase) et DUB (deubiquitinating enzyme) (Py *et al.*, 2013). Lorsque la protéine NLRP3 est produite, celle-ci est ubiquitinylée afin d'être maintenue en état inactif et d'en réguler la quantité présente dans le cytoplasme. Cependant, si la cellule détecte les signaux de dangers nécessitant l'activation d'une réponse inflammatoire, la protéine NLRP3 sera déubiquitinylée afin de former l'inflammasome (Humphries *et al.*, 2018 ; Suzuki *et al.*, 2014).

Tout comme NLRP3, la protéine ASC est aussi sujette à des mécanismes de régulations. Parmi les systèmes identifiés, nous retrouvons des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et l'ubiquitinylation qui vont inhiber ou activer l'interaction NLRP3-ASC (Guan *et al.*, 2022 ; Mambwe *et al.*, 2019). Cependant, un autre système de régulation, propre à la protéine adaptatrice a aussi été décrit. En effet, le génome code pour des protéines de 10-13 kDa ne possédant qu'un seul domaine PYD appelées POPs (PYD-only proteins) ou encore ASC2, partageant 63% d'identité au niveau de la séquence protéique avec le domaine PYD d'ASC. Cette dernière, par interaction homotypique entre les domaines PYD, se lie à la protéine ASC pour inhiber l'assemblage de l'inflammasome (Liepinsh *et al.*, 2003 ; Srimathi *et al.*, 2008 ; Stehlik *et al.*, 2003). Enfin, à l'instar de POPs, il existe aussi les protéines COPs (CARD-only proteins), protéines de régulation négative de la caspase-1 via son domaine CARD. Parmi elles, INCA (Inhibitory CARD) partage 81% d'identité au niveau de la séquence protéique avec le domaine CARD de caspase-1, et inhibe l'association des domaines CARD de la caspase 1 avec l'inflammasome, même en présence d'ASC actif (Lamkanfi *et al.*, 2004 ; A. Lu *et al.*, 2016).

2.1.4.3. Maturation de l'IL-1 β indépendante de l'inflammasome

L'inflammasome est l'élément central et majeur intervenant dans la maturation de l'IL-1 β dans les monocytes et macrophages. Cependant, cette plateforme moléculaire n'est pas le seul mécanisme dont dispose l'organisme pour contrôler la maturation de cette cytokine.

La caspase-8 est une protéase traditionnellement classée parmi les caspases initiatrices de l'apoptose. Néanmoins, cette enzyme est aussi capable de cliver l'IL-1 β et participe à la régulation de l'inflammasome. En effet, un stress cellulaire induit par la détection d'agents bactériens, fongiques ou chimio-thérapeutiques peut déclencher une réponse TLR3 et une voie impliquant la protéine TRIF (Blander, 2014) qui *in fine*, active la caspase-8. Cette dernière clive l'IL-1 β sur le même site que la caspase-1 (Asp116) (Maelfait *et al.*, 2008). La caspase-8 participe aussi à la formation de l'inflammasome en induisant le priming et l'activation des voies canonique et non-canonique dans les macrophages (Walle *et al.*, 2022). Néanmoins, la caspase-8 entraîne la maturation de l'IL-1 β même en l'absence de caspase-1 (Antonopoulos *et al.*, 2015).

Les monocytes et macrophages ne sont pas les seules cellules immunitaires qui possèdent un système de maturation de l'IL-1 β indépendant de la caspase-1. En effet, il a été montré que les polynucléaires neutrophiles et les mastocytes exprimaient des enzymes impliquées dans la maturation de la cytokine. Sont notamment retrouvées la neutrophile élastase, la cathepsin G et la protéinase-3 chez les neutrophiles ainsi que la chymase chez les mastocytes (**figure 16**). Bien que l'ensemble de ces enzymes maturent l'IL-1 β quelques acides aminés avant le site de protéolyse de la caspase-1, rendant la cytokine bioactive, il a été démontré que cette bioactivité était bien plus faible comparée à un clivage par la caspase-1 (Black *et al.*, 1988 ; Hazuda & Simon, 1990 ; P. Li *et al.*, 1995 ; Roona *et al.*, 1999).

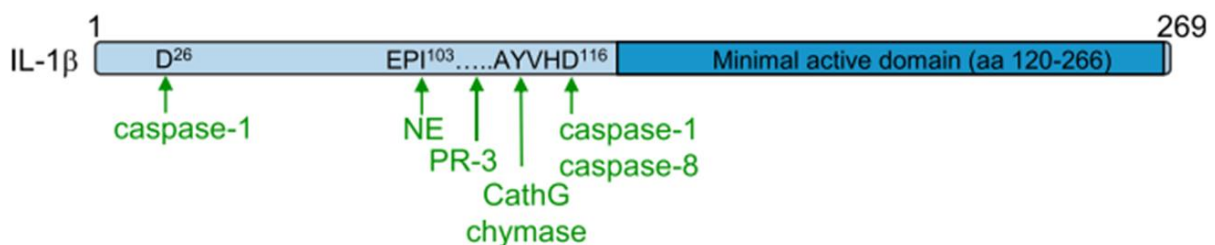


Figure 16 : Schéma de l'IL-1 β détaillant les différents sites de clivages par les enzymes responsables de la maturation de la protéine (adapté d'Afonina *et al.*, 2015)

La séquence en bleu foncé représente la séquence bioactive. NE : Neutrophil Elastase ; PR-3 : Protéinase-3 ; CathG : Cathepsin G

2.1.5. Mécanismes de la libération de l'IL-1 β

Nous avons vu jusqu'à présent les mécanismes permettant la synthèse et la maturation de l'IL-1 β dans les cellules immunitaires. Néanmoins, afin de pouvoir initier la réponse inflammatoire, cette cytokine doit être libérée dans le milieu extracellulaire. Le mécanisme le plus connu utilisé par la cellule pour sécréter des molécules est appelé « sécrétion conventionnelle ». Les protéines transloquent via la membrane du RE grâce à un peptide signal reconnu par le SR (signal recognition particle receptor). Une fois dans la lumière du RE, le peptide signal est clivé et la protéine est acheminée jusqu'à l'appareil de Golgi par des vésicules à COPII (coat protein complex II). Dans le Golgi, la protéine subit des modifications post-traductionnelles puis est expulsée de la cellule par exocytose (Bonifacino & Glick, 2004 ; Dancourt & Barlowe, 2010 ; Schwartz, 2007).

En 1990, l'équipe de Rubartelli a mis en évidence l'absence de peptide signal sur l'IL-1 β . L'ajout de Brefeldine A, inhibiteur indirect du transport protéique du RE vers le Golgi (Misumi *et al.*, 1986 ; Tartakoff, 1983), sur des monocytes pré-stimulés au LPS a démontré que, contrairement à la sécrétion d'IL-6 et de TNF α qui furent inhibées, celle de l'IL-1 β ne fut pas impactée (Rubartelli *et al.*, 1990). Cette équipe fut la première à mettre en évidence que l'IL-1 β suit un mécanisme de sécrétion non-conventionnel. Depuis cette étude, de nombreuses équipes ont cherché à comprendre le ou les mécanismes sous-jacents à la libération de cette cytokine. De nos jours, ces derniers sont encore largement débattus. Nous allons détailler ici les différentes hypothèses concernant les mécanismes de sécrétion de l'IL-1 β .

Après les résultats de l'étude pionnière de 1990, l'équipe de Rubartelli a émis l'hypothèse qu'une proportion de pro-caspase-1 et de pro-IL-1 β était contenue dans des vésicules endolysosomales, des microvésicules ou des vésicules de sécrétions lysosomales (Andrei *et al.*, 1999, 2004 ; MacKenzie *et al.*, 2001 ; Pizzirani *et al.*, 2007). L'idée était que la caspase-1 mature la cytokine directement dans la vésicule avant d'être sécrétée dans le milieu après stimulation. Plusieurs études ont remis cette hypothèse en question. Premièrement, l'équipe de Brough a démontré que l'IL-1 β ne co-localise pas avec la cathepsine D, un marqueur des lysosomes de sécrétion (Brough & Rothwell, 2007). Deuxièmement, le calcium extracellulaire est nécessaire à l'exocytose des microvésicules et des vésicules lysosomales, mais il ne l'est pas lors de la libération de l'IL-1 β (Brough *et al.*, 2003 ; Qu *et al.*, 2007).

Une autre hypothèse a vu le jour en 2007 par l'équipe de Dubyak, proposant que la maturation et la sécrétion d'IL-1 β soient liées aux exosomes et aux corps multi-vésiculaires (Qu *et al.*,

2007). Seulement, cette même équipe a démontré que la sécrétion d'exosomes n'impliquait pas la caspase-1, enzyme indispensable à la maturation de la cytokine (Qu *et al.*, 2009). De plus, des expériences de microscopie électronique ont permis de localiser la caspase-1 dans le cytoplasme des cellules, lieu de clivage de l'IL-1 β (Singer *et al.*, 1995). Enfin, une équipe ayant exposé des cellules à de la digitonine (composé entraînant la perméabilisation des membranes plasmiques) a démontré une diminution rapide de la (pro)-IL-1 β intracellulaire tandis que les vésicules restaient intactes (Brough & Rothwell, 2007). Malgré ce, le modèle de la sécrétion par exosome reste encore discuté.

Dans les macrophages, la caspase-1 active déclenche la mort cellulaire par pyroptose. Ce mécanisme induit une perte des gradients ioniques intracellulaires, un gonflement des cellules ainsi qu'une lyse osmotique. A partir de ces observations, une hypothèse de libération passive d'IL-1 β par lyse cellulaire a été établie. Cependant, il a été montré que l'activation de l'inflammasome dans les neutrophiles entraîne une libération d'IL-1 β mature, dépendante de la caspase-1 en absence de lyse cellulaire ou de libération passive de protéines (K. W. Chen *et al.*, 2014). De plus, l'utilisation de la glycine, un osmoprotecteur, inhibe la lyse osmotique, donc la libération passive de protéines dans les macrophages, sans affecter la cinétique de sécrétion de l'IL-1 β (Fink & Cookson, 2006 ; Pelegrin *et al.*, 2008 ; Verhoef *et al.*, 2005).

La dernière hypothèse, plus récente et toujours en cours d'investigation, concerne la protéine GSDMD. Constituée d'un fragment N-terminal fonctionnel et d'un fragment C-terminal auto-inhibiteur, la GSDMD est clivée par la caspase-1 à la suite de l'activation de l'inflammasome. Cette dernière s'assemble alors à la membrane plasmique pour former des pré-pores puis des pores ayant un diamètre extérieur de 310 Å et intérieur de 215 Å (**figure 17**) (Xia *et al.*, 2021).

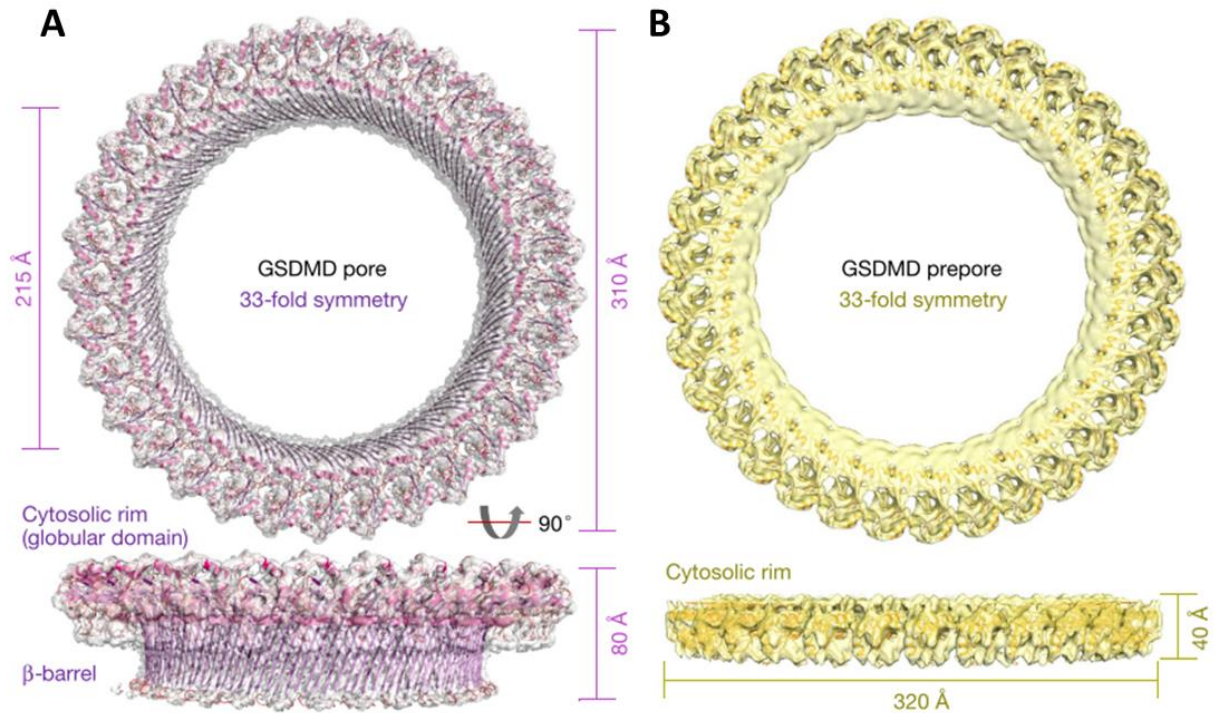


Figure 17 : Architecture du pore formé par l'assemblage de la GSDMD (adapté de Xia *et al.*, 2021)

Diagrammes de Ribbon et dimensions du pore formé par 33 sous-unités de la GSDMD humaine (A) et du pré-pore (B).

Les équipes de Kagan et Broz ont démontré l'implication de la GSDMD dans la sécrétion d'IL-1 β , dans des macrophages stimulés avec des activateurs de l'inflammasome, suivant un mécanisme indépendant de la lyse cellulaire (Evavold *et al.*, 2018 ; Heilig *et al.*, 2018). Grâce à l'analyse des surnageants par ELISA et Western-Blot, ils ont montré que les pores membranaires formés par la GSDMD entraînaient une libération de la cytokine. De manière opposée, l'inactivation de la GSDMD dans des macrophages inhibe la libération d'IL-1 β (Evavold *et al.*, 2018). Ces résultats ont été confirmés récemment (2021) par l'équipe de Wu, accentuant l'implication de cette protéine dans la sécrétion d'IL-1 β (Xia *et al.*, 2021). Malgré ces études récentes, le mécanisme précis contrôlant la libération de l'IL-1 β par la GSDMD n'est pas encore déterminé et reste débattu.

2.2. Rôles de l'IL-1 β en condition inflammatoire dans les cellules cibles

La réponse inflammatoire est un mécanisme de défense de l'organisme envers les agressions du monde extérieur, qu'elles soient physiques, chimiques ou organiques. Une inflammation est communément caractérisée par 4 grands symptômes : gonflement, rougeur, chaleur et douleur. De nos jours, on distingue 2 types d'inflammations : aiguë et chronique. L'inflammation aiguë apparaît lors d'une blessure ou d'une infection. Elle dure de quelques jours à quelques semaines, durée nécessaire à l'organisme pour combattre efficacement la menace et favoriser la cicatrisation. C'est donc un mécanisme de défense bénéfique, de courte durée, afin de pallier à l'agression extérieure sans dommages collatéraux. Cependant, si l'organisme ne parvient pas à réduire la cause initiale ayant entraîné une réponse inflammatoire, celle-ci devient chronique. Cette inflammation est souvent associée à une pathologie chronique ou de longue durée (ex : polyarthrite rhumatoïde). Ce type d'inflammation n'a plus vocation de défense et va entraîner des dommages collatéraux, affectant les tissus sains (Montero-Melendez, 2018).

L'IL-1 β étant une cytokine initiatrice de la réponse inflammatoire, elle est impliquée dans la genèse de l'inflammation aiguë mais aussi dans le maintien de la chronicité inflammatoire. Afin de mieux comprendre l'implication de la signalisation IL-1 au sein de l'organisme et compte tenu de son expression dans de nombreux types cellulaires, des modèles murins invalidés pour les gènes (KO) des protéines IL-1 α / IL-1 β / IL-1Ra / IL-1R1 ont été générés. Le **tableau 3** récapitule les phénotypes observés sur ces différentes lignées dans des conditions d'études précises. La signalisation IL-1 faisant partie intégrante de la réponse inflammatoire, de nombreuses études ont aussi cherché à comprendre son implication dans la genèse et/ou la progression des pathologies inflammatoires. Le **tableau 4** récapitule de façon non exhaustive les pathologies dans lesquelles l'IL-1 β est impliquée (pour revue, C. Dinarello & van der Meer, 2013) et démontre bien l'ampleur de l'implication de la signalisation IL-1.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des phénotypes observés dans des modèles murins invalidés pour différents gènes

Les modèles murins sont invalidés pour les gènes codant pour l'IL-1Ra, l'IL-1R1, l'IL-1 α ou l'IL-1 β . A cela s'ajoute l'invalidation du gène de l'IL-1Ra humain, responsable de pathologies auto-immunes.

Modification génétique	Phénotypes observés	Références
<i>Il1rn</i> KO (IL-1Ra souris)	Arthrite spontanée Eruption cutanée type psoriasis Augmentation de la sensibilité au LPS Augmentation du risque de développer des cancers	(Horai <i>et al.</i> , 2000 ; Krelin <i>et al.</i> , 2007 ; Nicklin <i>et al.</i> , 2000)
<i>IL1RN</i> KO (IL-1Ra humain)	Sévère inflammation locale et systémique Eruption cutanée purulente Vasculite Lésions ostéolytiques Ostéomyélite stérile	(Aksentijevich <i>et al.</i> , 2009 ; Reddy <i>et al.</i> , 2009)
<i>Il1a</i> KO (souris)	Augmentation de la sensibilité au LPS Déficience de l'immuno-édition dans la carcinogénèse Diminution de l'inflammation induite par la nécrose et la colite Diminution de l'athérosclérose	(C. J. Chen <i>et al.</i> , 2007 ; Krelin <i>et al.</i> , 2007)
<i>Il1b</i> KO (souris)	Diminution de la réponse immunitaire innée Diminution ou absence de fièvre Diminution du risque de développer des cancers Diminution de l'inflammation provoquée par une péritonite induite au zymosan	(Fantuzzi <i>et al.</i> , 1997 ; Krelin <i>et al.</i> , 2007 ; Zheng <i>et al.</i> , 1995)
<i>Il1r1</i> KO (souris)	Diminution de la sensibilité aux encéphalomyélites auto-immunes expérimentales Diminution de la réponse inflammatoire à la suite de dommages tissulaires Perturbation de l'immunité adaptative vis-à-vis des tumeurs et infections	(Ben-Sasson <i>et al.</i> , 2013 ; C. J. Chen <i>et al.</i> , 2007 ; Joeckel <i>et al.</i> , 2012 ; Sutton <i>et al.</i> , 2006)

Tableau 4 : Récapitulatif non-exhaustif des pathologies dans lesquelles l'IL-1 β est impliquée

Pathologies osseuses, musculaires et articulaires	Polyarthrite rhumatoïde
	Arthrite psoriasique
	Ostéoarthrite
	Ostéoarthrite érosive de la main
	Arthrofibrose du genou
	Lésion du ligament croisé antérieur du genou
	Polychondrite récidivante
	Ostéomyélite multifocale chronique
	Spondylite ankylosante
	Goutte
	Arthrite pyrophosphate de calcium
	Syndrome anti-synthétase
	Myopathies inflammatoires idiopathiques
	Arthrite liée à l'hémochromatose de la main
	Pathologies héréditaires systémiques inflammatoires
Urticaire familiale au froid (FCAS)	
Syndrome de Muckle-Wells	
Syndrome auto-inflammatoire NLRP12	
Maladie inflammatoire multi systémique néonatale (NOMID)	
Syndrome de fièvre récurrente lié au récepteur 1 du facteur de nécrose tumorale (TRAPS)	
Syndrome hyper-IgD (HIDS)	
Arthrite pyogène pyodermite gangréneuse (PAPA)	
Pyodermite gangréneuse, acné et hidradénite (PASH)	
Syndrome de déficience de l'antagoniste du récepteur de l'interleukine 1 (DIRA)	
Syndrome de Blau	
Déficience en mévalonate kinase	
Syndrome de Majeed	
Syndrome de Schnitzler	
Maladie de Behçet	

Maladies inflammatoires systémiques et locales	Amyloïdose secondaire
	Purpura de Henoch-Schonlein
	Péricardite idiopathique récurrente
	Arthrite idiopathique juvénile systémique
	Maladie de Still chez l'adulte
	Syndrome d'activation des macrophages
	Syndrome de Sweet
	Panniculite neutrophilique
	Histiocytoses
	Syndrome de SAPHO (Synovite, Acné, Pustulose, Hyperostose, Ostéite)
	Syndrome de fièvre périodique, stomatite aphteuse, pharyngite et adénite cervicale (PFAPA)
	Maladie multicentrique de Castleman
	Maladie de Jessner-Kanof
	Syndrome de fatigue primaire Sjogren
	Maladie de Kawasaki
Colite dans la maladie granulomateuse chronique	
Autres pathologies	Remodelage cardiaque post-infarctus du myocarde
	Insuffisance cardiaque systolique
	Insuffisance cardiaque diastolique
	Myélome indolent
	Accident cérébrovasculaire
	Hidradénite suppurative
	Diabète de type 1
	Diabète de type 2
	Syndrome métabolique
	Artérite à cellules géantes
Maladie de l'œil sec	

3. L'IL-1 β dans le système nerveux central

3.1. Neuro-inflammation et cellules gliales

Pendant longtemps, le système nerveux central (SNC) était considéré comme immuno-privilegié, ce dernier disposant de plusieurs protections contre le milieu extérieur : les os et la barrière hématoencéphalique (BHE). Alors que la boîte crânienne et la colonne vertébrale protègent le SNC des chocs physiques, la BHE forme une structure quasiment imperméable aux cellules et molécules du système périphérique. Malgré ces défenses, le paradigme d'immuno-privilege est tombé il y a maintenant quelques décennies, et la réaction inflammatoire présente au sein du SNC porte le nom de neuro-inflammation (Renaud *et al.*, 2015).

La neuro-inflammation est un terme utilisé pour décrire une grande variété de processus biologiques, impliqués dans la réponse immunitaire au niveau du SNC. Les procédés mis en place diffèrent de quelques façons par rapport à l'inflammation périphérique. La différence la plus notable réside sur les principales cellules intervenant dans la neuro-inflammation, appelées cellules gliales. Ce terme englobe l'ensemble des cellules non-neuronales du SNC. Parmi les cellules gliales, la microglie (les macrophages résidant du SNC) est l'acteur majoritaire dans la réponse neuro-inflammatoire. Cependant, de manière non-négligeable, les astrocytes et les oligodendrocytes participent également à l'inflammation du SNC.

Les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents à la neuro-inflammation sont divers et variés. A l'instar du système périphérique, les cytokines et les chimiokines sont impliquées dans ce phénomène. Parmi les cytokines, la signalisation par les interleukines-1, et notamment à l'IL-1 β d'origine microgliale, joue un rôle primordial dans la réponse neuro-inflammatoire (Marcand-Sauvant, 2010). Dans cette section, nous allons premièrement aborder la production d'IL-1 β et sa signalisation associée dans les cellules gliales mais aussi dans les pathologies du SNC. Dans un deuxième temps, nous détaillerons la signalisation à l'IL-1 au niveau neuronal et l'impact de cette dernière sur la mise en place et la régulation de la neuro-excitabilité.

3.2. La signalisation IL-1 β , dans les cellules gliales, en condition inflammatoire

L'étude de l'IL-1 β dans le SNC a débuté suite à sa découverte en périphérie. De nombreux travaux ont cherché à élucider les mécanismes de synthèse, de maturation et de libération de cette cytokine ainsi que le type cellulaire responsable parmi les cellules gliales.

3.2.1. Cellules gliales et IL-1 β

3.2.1.1. La microglie : le macrophage résidant du SNC

Dans le SNC, le type cellulaire « rattaché » au système immunitaire est la microglie. Découverte en 1919 par Pio Del Rio-Hortega (Pio Del Rio-hortega & Oxf, 1939), les microglies sont considérées comme les macrophages résidants du cerveau. A la différence des cellules immunitaires du système périphérique qui proviennent de la lignée érythromyéloïde, les microglies sont originaires du sac vitellin et représentent 5 à 10% de la totalité des cellules gliales de l'encéphale, réparties dans l'ensemble du SNC (Hugh Perry, 1998 ; Lawson *et al.*, 1990). La microglie est capable de détecter les variations de son environnement grâce à son sensome (Hickman *et al.*, 2013). Le sensome représente l'ensemble des récepteurs et protéines utilisés par la microglie pour détecter toute variation de son microenvironnement local telles que la présence de PAMPs, de DAMPs ou encore une altération du milieu (changement de pH, changement dans la composition d'électrolytes ou encore variation de la matrice extracellulaire) (Hickman *et al.*, 2013). Elle participe aussi au développement du système vasculaire et au développement des neurones notamment par l'établissement des connexions synaptiques et l'élimination des neurones immatures. Enfin, en tant que cellule immunitaire, la microglie contribue à la protection du SNC contre les agressions physiques, chimiques et organiques (Graeber, 2010 ; Hughes, 2012 ; Miyamoto *et al.*, 2016 ; Mosser *et al.*, 2017 ; Reemst *et al.*, 2016 ; Tremblay *et al.*, 2011 ; Wake *et al.*, 2009).

En condition homéostatique, la microglie se présente sous forme ramifiée, étendant de longs prolongements qui vont sonder le microenvironnement local à la recherche de la moindre perturbation. Un stimulus considéré par la microglie comme anormal va entraîner un changement graduel du comportement et de la morphologie de ces cellules. Elles passent alors d'un stade homéostatique à un stade réactif et acquièrent un statut similaire à celui des macrophages, afin d'enclencher le processus inflammatoire au sein du SNC (Glass *et al.*, 2010 ; Luo & Chen, 2012). La détection de ces stimuli est assurée grâce à l'expression d'un large

panel de récepteurs, incluant l'ensemble des membres de la famille TLR qui sont capables de reconnaître les PAMPs et les DAMPs (Bsibsi *et al.*, 2002 ; Ebert *et al.*, 2007 ; Gurley *et al.*, 2008).

La reconnaissance de PAMPs par les TLR active la signalisation intracellulaire dépendante et indépendante de MyD88 qui recrute les facteurs de transcriptions AP-1 et NF- κ B, responsables de la synthèse de la pro-IL-1 β et de NLRP3 (Alexopoulou *et al.*, 2001 ; Jack *et al.*, 2005). Sous l'effet des DAMPs, l'inflammasome NLRP3 microglial s'assemble, conduisant à l'activation de la caspase-1 et à la maturation de l'IL-1 β , suivant un mécanisme similaire à celui des macrophages périphériques. Cet inflammasome est non seulement activé par les DAMPs générés par un pathogène ayant réussi à traverser la BHE, mais aussi par les signaux endogènes produits lors d'une inflammation stérile. Le terme d'inflammation stérile est utilisé pour désigner toute réaction inflammatoire induite en l'absence d'agents pathogènes tels que, par exemple, les bactéries et les virus. Dans le SNC, l'inflammation stérile est associée à de nombreuses pathologies aiguës ou chroniques. Les conséquences d'inflammations stériles induites par des pathologies seront développées en section 3.2.3.

Pendant des années, il était admis que la caspase 1 était exclusivement activée par l'inflammasome NLRP3 dans la microglie (Walsh, Muruve, *et al.*, 2014). Récemment, un nouvel inflammasome a été identifié dans ce type cellulaire : l'inflammasome NLRC4 (Freeman *et al.*, 2017 ; Jamilloux *et al.*, 2013 ; Lammerding *et al.*, 2016). L'équipe de Eder a démontré que la caspase-1 était activée à la fois par l'inflammasome NLRP3, mais aussi NLRC4 dans des cultures de microglie co-stimulées avec un PAMP, le LPS, et un DAMP, le lysophosphatidylcholine (ou LPC ; composé libéré dans une grande variété de pathologies neurologiques) (Scholz & Eder, 2017). Le LPC génère un influx sodique et calcique en même temps qu'un efflux potassique. Ce composé pourrait donc activer parallèlement, deux voies de signalisations conduisant à la formation indépendante des inflammasomes NLRP3 et NLRC4 (Scholz & Eder, 2017). De même, des études ont documenté une expression des inflammasomes NLRP1 et NLRP2 dans les microglies humaines (Burm *et al.*, 2015 ; Walsh, Reinke, *et al.*, 2014). Etant donné que chaque inflammasome réagit à certains types de stimuli, ceci montre bien la complexité des mécanismes de la genèse de l'inflammation microgliale. Enfin, la contribution des microglies dans la réponse inflammatoire est bidirectionnelle. Ces cellules peuvent soit amplifier l'inflammation soit l'atténuer.

3.2.1.2. Astrocyte

Les astrocytes sont des cellules gliales dérivées des cellules progénitrices neurales, constituant le type cellulaire le plus abondant du cerveau et réparties dans l'ensemble de ce dernier (Ge *et al.*, 2012 ; Molofsky & Deneen, 2015). Véritables garants de l'homéostasie, ils interagissent avec la plupart des types cellulaires du cerveau, ainsi qu'avec les capillaires sanguins. (Sofroniew & Vinters, 2010). En condition physiologique, les astrocytes maintiennent l'homéostasie ionique des fluides extracellulaires, régulent la neurotransmission, fournissent du lactate et des métabolites aux neurones, modulent localement le flux sanguin et aident à réguler le drainage du fluide glymphatique. Ils jouent un rôle essentiel dans le développement synaptique et la plasticité et présentent une activité dynamique cruciale pour le fonctionnement de la circuiterie neuronale (Allen & Eroglu, 2017 ; Macvicar & Newman, 2015 ; Magistretti & Allaman, 2018 ; Plog & Nedergaard, 2018 ; Verkhratsky & Nedergaard, 2018).

A l'instar de la microglie, les astrocytes participent aussi à la réponse inflammatoire via un phénomène appelé astrogliose. L'astrogliose correspond aux changements moléculaires, cellulaires et fonctionnels des astrocytes qui se produisent en réponse aux dommages subis par le SNC, dans un contexte inflammatoire stérile ou non (Sofroniew, 2015). La contribution des astrocytes dans la réponse inflammatoire est bidirectionnelle. Ces cellules peuvent soit amplifier l'inflammation soit l'atténuer. La contribution pro- ou anti-inflammatoire sera déterminée par les différents messagers présents dans le micro-environnement local de l'astrocyte (Colombo & Farina, 2016 ; Cordiglieri & Farina, 2010).

Longtemps associés aux cellules immunitaires, les astrocytes expriment des récepteurs TLRs (TLR2, 3, 4 et 9) et majoritairement des TLR3 chez l'Homme et le rongeur (El-Hage *et al.*, 2011). La détection de PAMPs via les TLRs déclenche les voies de signalisations dépendantes et indépendantes de MyD88, conduisant au recrutement des facteurs de transcriptions AP-1 et NF- κ B et à la synthèse de la pro-IL-1 β (Okun *et al.*, 2009 ; Rodrigues & Ballesteros, 2007). Les astrocytes exprimant aussi le récepteur à l'IL-1, la synthèse de la cytokine peut donc aussi être déclenchée par action paracrine de l'IL-1 β libérée de la microglie activée (Qian *et al.*, 2007). En plus des TLRs, ces cellules expriment les protéines NLRP2, NLRP3 et NLRC4 (Burm *et al.*, 2015 ; Liu & Chan, 2014a ; Minkiewicz *et al.*, 2013). En condition inflammatoire, la détection de DAMPs mobilise l'inflammasome NLRP2 qui semble interagir avec le récepteur purinergique P2X7 ainsi que le canal ionique pannexin-1 pour pouvoir être fonctionnel et entraîner la maturation de l'IL-1 β (Minkiewicz *et al.*, 2013 ; Silverman *et al.*, 2009). Toutefois, la présence du récepteur P2X7 dans ce type cellulaire reste controversée. De même, tout comme

dans la microglie, les astrocytes provenant de souris invalidées pour les gènes *NLRC4* ou *NLRP3* et stimulés au LPC voient leur sécrétion d'IL-1 β diminuée. Ceci suggère une implication de ces deux autres inflammasomes dans l'activation de la caspase-1 et la maturation de l'IL-1 β (Freeman *et al.*, 2017).

3.2.1.3. Oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont des cellules gliales dérivées des précurseurs oligodendrocytaires, représentant 5 à 10% du nombre total de cellules dans le cerveau (Dawson *et al.*, 2003 ; Fernandez-Castaneda & Gaultier, 2016). Ces cellules assurent la myélinisation des axones, la gaine de myéline étant une membrane présentant un enrichissement exceptionnel en lipides : 70-85% contre 30-40% pour une membrane plasmique (O'Brien & Sampson, 1965). Cette gaine forme des segments entraînant une augmentation de la vitesse de conduction de l'influx nerveux par genèse de la conduction saltatoire.

Très peu d'études ont été réalisées afin de savoir si les oligodendrocytes expriment des composants de l'inflammation capables d'entraîner la production d'IL-1 β . L'équipe de Baron est parvenue à mettre en évidence la présence des TLR2 et TLR3 dans des cultures d'oligodendrocytes chez le rat. Ils démontrent l'effet protecteur des TLR2 en induisant la survie, la différenciation et la formation de myéline des oligodendrocytes, mais aussi l'effet délétère des TLR3 qui entraîne l'apoptose de ces cellules (Bsibsi *et al.*, 2012). De plus, certaines études pointent l'existence de la protéine NLRP1 dans les oligodendrocytes (Yap *et al.*, 2019), mais l'expression de ce composant de l'inflammasome est encore fortement débattue. En l'état actuel des connaissances, il n'y a aucune évidence qui démontre la capacité des oligodendrocytes à synthétiser et maturer l'IL-1 β .

3.2.2. Mécanismes de libération

Les mécanismes de libération de l'IL-1 β dans le SNC sont essentiellement inconnus. Les microglies maturent l'IL-1 β de la même façon que les macrophages périphériques. De récents travaux démontrent qu'un efflux potassique ainsi qu'une stimulation ATP dépendante sont nécessaires à la microglie pour sécréter l'IL-1 β (Facci *et al.*, 2018 ; Madry *et al.*, 2018). Néanmoins, aucune étude actuelle n'a pu déterminer le mécanisme de sécrétion de cette cytokine dans la microglie. Aussi, les hypothèses soulevées dans la section 2.1.5, sont potentiellement d'actualité concernant ce type cellulaire. Le constat est identique pour les astrocytes : aucune étude n'a pu élucider le mécanisme de sécrétion de l'IL-1 β .

3.2.3. Rôles de l'IL-1 β dans les pathologies du SNC

Dans cette section, nous allons détailler l'implication de l'IL-1 β dans diverses pathologies cérébrales qui figurent parmi les plus étudiées. Bien évidemment, les exemples traités ne sont pas représentatifs de l'ensemble des affections existantes et il est démontré de nos jours, que cette cytokine intervient dans un grand nombre pathologies du système nerveux.

3.2.3.1. Les traumatismes crâniens

Un traumatisme crânien (TC) survient lorsque le tissu cérébral est détruit ou ne fonctionne plus de manière adéquate suite à un choc entre le cerveau et la boîte crânienne, une fracture ouverte ou encore un objet pénétrant. Dans la majorité des cas, un TC génère une neuro-inflammation, parfois stérile, localisée sur le lieu du choc. Toutefois, la période suivant un traumatisme crânien est considérée à « risque ». En effet, un syndrome d'immunodéficience est souvent observé après un TC. L'affaiblissement du système immunitaire peut entraîner la prolifération de pathogènes opportunistes, générant ainsi un risque, non négligeable, d'infections systémiques. De plus, si la BHE apparaît lésée à cause du choc, l'infection peut se propager dans le cerveau et générer une inflammation non stérile (R. Sharma *et al.*, 2019).

Les patients atteints de cette affection sans comorbidités présentent des niveaux élevés des marqueurs de l'inflammasome tels que NLRP3, NLRP1, caspase-1 et IL-1 β (S. Adamczak *et al.*, 2012 ; Wallisch *et al.*, 2017). L'inhibition pharmacologique de NLRP3 et/ou les souris invalidées pour le gène *NLRP3* améliorent le rétablissement clinique post-TC (Irrera *et al.*, 2017). De même, un traitement avec des anticorps qui neutralisent l'élévation importante de l'IL-1 β induit une amélioration des fonctions cognitives post-TC (Clausen *et al.*, 2009) mettant en évidence un effet neuronal de cette cytokine dans cette pathologie.

3.2.3.2. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative caractérisée par une perte de mémoire progressive et des déficits cognitifs. Au niveau cellulaire, cette affection présente un dépôt de plaques amyloïdes A β et une agrégation de la protéine tau phosphorylée (Sala Frigerio & De Strooper, 2016). La protéine A β est reconnue par les cellules comme un signal de danger. L'analyse de l'expression génique sur des cultures de microglie provenant de patient Alzheimer a révélé une forte expression de NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 β , NLRC4 et NLRP1 (Kaushal *et al.*, 2015 ; Liu & Chan, 2014b ; Saresella *et al.*, 2016). Une concentration élevée d'IL-1 β est retrouvée dans les microglies entourant les plaques et l'équipe de Halle a montré que la protéine

A β entraîne la libération de cette cytokine via l'inflammasome NLRP3 (Griffin *et al.*, 1989 ; Halle *et al.*, 2008). Dans un modèle murin d'Alzheimer (souris APP/PS1), une déficience de NLRP3 ou caspase-1 induit une amélioration des symptômes cognitifs, une diminution du volume des plaques et du dépôt d'A β , une diminution du niveau de cytokines pro-inflammatoires et une amélioration de la capacité phagocytaire microgliale (Heneka *et al.*, 2013). Ces résultats sont retrouvés lors de l'inhibition pharmacologique de NLRP3 dans le modèle murin APP/PS1 (Dempsey *et al.*, 2017). Concernant l'inflammasome NLRP1, une délétion du gène *NLRP1* dans le modèle APP/PS1 induit une forte diminution de la pyroptose neuronale et permet de remédier aux déficiences cognitives (M. S. Tan *et al.*, 2014).

Dans le même temps, des expériences sur un modèle murin invalidé pour l'IL-1Ra montrent une plus grande vulnérabilité aux injections intra-cérébro-ventriculaires (ICV) de la forme oligomérique humaine A β (Craft *et al.*, 2005). Cependant, il apparaît qu'une surexpression d'IL-1 β dans l'hippocampe entraîne une diminution des plaques, pouvant être expliquée par l'augmentation de l'activité phagocytaire microgliale (Shaftel *et al.*, 2007). Malgré l'implication prouvée de l'inflammasome et de l'IL-1 β dans cette pathologie, l'effet observée sur l'hippocampe traduit la complexité de la signalisation IL-1 en condition inflammatoire.

3.2.3.3. Les épilepsies

Les épilepsies sont une famille de troubles neurologiques conduisant à la genèse de « crises épileptiques » caractérisées par une hyperactivité et une hyper-synchronicité du réseau neuronal. Ces crises peuvent se manifester dans une région du cerveau (épilepsie partielle) ou dans l'entièreté de ce dernier (épilepsie généralisée). Les épilepsies sont multiples et souvent secondaires à d'autres pathologies : mutations génétiques, lésions cérébrales aiguës (AVC, traumatismes crâniens), gliomes, infections du SNC, pathologies auto-immunes et troubles métaboliques (Scheffer *et al.*, 2017). De nombreuses études ont démontré l'implication de l'IL-1 β et des composants de l'inflammasome dans ces pathologies.

Un polymorphisme présent sur le gène codant pour l'IL-1 β et entraînant une diminution de la production de cytokines par les leucocytes (Wen *et al.*, 2006), a été associé comme facteur de susceptibilité à développer des épilepsies (Kauffman *et al.*, 2008). De même, d'autres études ont suggéré que cette cytokine posséderait aussi des propriétés anti-convulsivantes (Claycomb *et al.*, 2012 ; Miller *et al.*, 1991). Cependant la majorité des travaux montrent que la signalisation par l'IL-1 β a des effets délétères dans l'épilepsie. En effet, une administration exogène d'IL-1 β chez les souris a des effets pro-convulsivants (Dubé *et al.*, 2005 ; Vezzani *et*

al., 1999). Dans un modèle d'épilepsie induit par la bicuculline, la surexpression d'IL-1Ra dans les astrocytes ou l'injection intracérébrale de ce composé produit aussi des effets anti-convulsivants (Vezzani *et al.*, 2000). Concernant les composants de l'inflammasome, l'équipe de Meng a apporté la preuve d'une augmentation d'expression de l'inflammasome NLRP3 chez le rat post status epilepticus (crise ou salve de crises épileptiques durant plus de 30 min, sans temps de récupération). Ils ont également démontré que l'invalidation de NLRP3 ou de caspase-1 par injection d'ARN interférant (siRNA) a un effet protecteur, par inhibition de la neuro-inflammation et de la mort neuronale dans ce même modèle (Meng *et al.*, 2014). De même, dans le modèle d'induction d'épilepsie au pentylénetétrazole (PTZ), des travaux ont montré que l'inhibition pharmacologique ou l'invalidation de NLRP3 induit une diminution de la mort neuronale, de la neuro-inflammation et de la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire générées par une crise épileptique (Shen *et al.*, 2018, 2021). En parallèle, l'injection de PTZ entraîne une augmentation de l'expression des composants de l'inflammasome NLRP1, de la caspase-1 et des niveaux de cytokines, dont l'IL-1 β (B. Gao *et al.*, 2018). Des résultats similaires sont observés chez des patients atteints d'une sclérose de l'hippocampe, induite par une épilepsie du lobe temporal (Cristina de Brito Toscano *et al.*, 2021). L'invalidation de NLRP1 et de la caspase-1 par siRNA conduit à une diminution significative de la pyroptose neuronale (C. C. Tan *et al.*, 2015). Par ailleurs, un inhibiteur de la caspase-1 est actuellement en essai clinique de phase 2 afin d'évaluer son efficacité à traiter les épilepsies. L'ensemble de ces résultats démontre la forte contribution des composants de l'inflammasome et de la signalisation à l'IL-1 dans ce type de pathologie.

3.3. La signalisation interleukine-1 au niveau des neurones

Jusqu'à présent, nous avons discuté des effets et conséquences de l'IL-1 β dans le SNC en condition inflammatoire. Cependant, la signalisation IL-1 n'est pas seulement restreinte aux cellules gliales, et de nombreuses études indiquent que l'IL-1 β agit directement sur les neurones et module l'activité des réseaux.

3.3.1. Les acteurs de la voie canonique de la production d'IL-1 β

3.3.1.1. Les récepteurs TLRs

Les neurones exprimant une large variété de récepteurs TLRs (TLR2, 3, 4, 6, 7, 8 et 9) qui sont impliqués dans des processus inflammatoires.

Dans le SNC les TLRs exprimés par les neurones sont impliqués dans la neuro-inflammation. L'activation des TLR3 par une infection virale dans ces cellules entraîne la production d'interféron- β (IFN- β), même en l'absence de microglie (Cameron *et al.*, 2007 ; Delhayé *et al.*, 2006 ; Préhaud *et al.*, 2005). Les récepteurs TLR4 stimulés par des PAMPs induisent la voie de signalisation intracellulaire JNK, conduisant à l'activation de la caspase-3 qui mène les neurones vers l'apoptose (Pauff & Miller, 2012 ; Wadachi & Hargreaves, 2006). De la même manière, l'activation des TLR7 dans des cultures de neurones corticaux entraîne l'apoptose de ces cellules (Lehmann, Krüger, *et al.*, 2012 ; Lehmann, Rosenberger, *et al.*, 2012). La stimulation combinée des TLR7 et TLR9 active l'apoptose médiée par la caspase-3 (Mukherjee *et al.*, 2015). A l'inverse, les TLR9 seuls exercent des effets neuroprotecteurs en présence de stimuli nocifs tels que l'hypoxie ou encore les DAMPs libérés par la lyse de cellules adjacentes (Shintani *et al.*, 2013).

En parallèle et en condition homéostatique, les TLRs jouent divers rôles dans les processus non-inflammatoires. Pendant le développement, la signalisation médiée par les TLR2 et TLR3 inhibe la prolifération des progéniteurs neuronaux (Lathia *et al.*, 2008 ; Okun, Griffioen, Gen Son, *et al.*, 2010). Chez l'adulte, les TLR3 suppriment également la neurogenèse tandis que la signalisation TLR2 et TLR4 produit les effets opposés (Okun, Griffioen, Barak, *et al.*, 2010). L'activation pharmacologique des TLR1 et TLR2, durant la période post-natale, altère la mémoire spatiale et amplifie la contextualisation à la peur chez la souris adulte (Madar *et al.*, 2015). Un modèle murin invalidé pour le récepteur TLR3 présente une amélioration de la mémoire de travail dépendante de l'hippocampe ainsi qu'une atténuation du comportement anxieux ; atténuation également retrouvée par invalidation des TLR7 (Hung *et al.*, 2018 ; Okun,

Griffioen, Barak, *et al.*, 2010). De la même manière, l'invalidation des TLR4 entraîne une amélioration de la mémoire spatiale, mais paradoxalement, l'inhibition pharmacologique de ces récepteurs n'induit aucune modulation positive ou négative sur ce type de mémoire (Okun *et al.*, 2012). Ceci soutient l'idée d'une implication des TLR4 dans la mise en place de la mémoire spatiale pendant le développement. L'ensemble de ces résultats illustre les divers rôles exercés par les récepteurs TLRs tant en condition inflammatoire que physiologique. Si les voies de signalisations de ces récepteurs sont bien documentées durant la neuro-inflammation dans les cellules gliales, celles qui sont impliquées dans la modulation de la neurogenèse et de la mémoire chez l'adulte restent inconnues.

3.3.1.2. Les inflammasomes

Nous avons vu précédemment que les neurones expriment une batterie de récepteurs TLRs. Aussi surprenant que cela puisse paraître, et bien que ce soit encore débattu, ces cellules expriment aussi les protéines de l'inflammasome NLRP1 (S. E. Adamczak *et al.*, 2014 ; Kaushal *et al.*, 2015 ; M. S. Tan *et al.*, 2014). Il a été montré que les dépôts d'amyloïde A β entraînent une augmentation de l'expression de NLRP1 dans des cultures de neurones. De la même manière, cette augmentation d'expression est observée dans un modèle murin présentant une épilepsie du lobe temporal. L'activation de cet inflammasome induit la pyroptose neuronale et la dégénérescence des axones (Kaushal *et al.*, 2015). De manière opposée, l'invalidation de NLRP1 dans un modèle murin pour la maladie d'Alzheimer diminue la pyroptose neuronale et restaure les altérations de la mémoire spatiale induite par la pathologie (M. S. Tan *et al.*, 2014). De même, cette invalidation diminue aussi la susceptibilité des crises épileptiques dans un modèle d'épilepsie du lobe temporal (C. C. Tan *et al.*, 2015). Ces données démontrent un rôle de l'inflammasome NLRP1 dans les neurones pendant une inflammation. Cependant, en l'état actuel des connaissances, aucune de ces études ne fait mention d'une maturation et d'une libération d'IL-1 β neuronale par cet inflammasome dans ce type cellulaire.

3.3.1.3. Quid de l'IL-1 β neuronale ?

Les neurones expriment les récepteurs TLRs ainsi que l'inflammasome NLRP1. Ces acteurs moléculaires participent à la production d'IL-1 β dans les cellules immunitaires. Néanmoins, aucune étude n'est parvenue à confirmer la production, par les récepteurs TLR et l'inflammasome NLRP1, de l'IL-1 β au sein des neurones. Ce type cellulaire est-il au moins capable de synthétiser cette cytokine, même par une voie différente des TLRs ? Plusieurs équipes ont pu mettre en évidence la présence d'IL-1 β dans les neurones magnocellulaires de

l'hypothalamus chez le rat, par marquage histologique et ce, peu après la découverte de la cytokine elle-même (Breder *et al.*, 1988 ; Lechan *et al.*, 1990 ; Watt & Hobbs, 2000). Ces résultats font sens avec le rôle premier de cette cytokine qui est l'induction de la fièvre, puisque le centre thermorégulateur de l'organisme est localisé dans l'hypothalamus. Cependant, depuis ces travaux, la possibilité de synthèse d'IL-1 β par les neurones n'a jamais été réellement démontrée. En effet, aucun anticorps spécifique ou aucune technique expérimentale n'ont pu confirmer la synthèse de cette cytokine par les neurones. De même, il n'existe aucun modèle génétiquement modifié qui aurait pu permettre de répondre à cette question.

3.3.2. Effets de la signalisation induite par l'IL-1 β sur le SNC pendant le développement

S'il y a peu d'évidences expérimentales pour une expression neuronale d'IL-1 β , différentes études ont démontré des effets neuronaux de cette cytokine, pourtant pro-inflammatoire, en condition homéostatique, et ce tant au niveau des réseaux que sur la cellule en elle-même. La signalisation IL-1 est présente dans l'encéphale dès les stades embryonnaires et jusqu'à la fin de vie de l'organisme. En effet, il a été montré que cette cytokine est fortement exprimée durant le développement prénatal et postnatal, avant de décliner pour atteindre sa concentration basale de 0.01 pg/mL (soit 6.10⁻¹⁶ M), mesurée dans le fluide cérébrospinal humain à l'âge adulte (Alexander *et al.*, 2005 ; Dziegielewska *et al.*, 2000 ; Giulian *et al.*, 1988).

Il est clairement établi que l'IL-1 β est impliquée dans le développement neuronal. L'équipe de Jiang a mis en évidence le rôle chimio-attractant de l'IL-1 β en guidant la croissance axonale des neurones corticaux. Ils ont montré que ce guidage est dépendant de la concentration d'IL-1 β dans le milieu et passe par la voie classique de la signalisation IL-1, puisque ce phénomène est inhibé en présence d'IL-1Ra (Ma *et al.*, 2014). Mais le rôle de cette cytokine ne s'arrête pas là. Quelques années plus tard, l'équipe de Han a mis en évidence que l'IL-1 β : 1/ permet la différenciation des progéniteurs neuronaux en neurones corticaux et, 2/ est impliquée dans la croissance des neurites. Ils ont démontré que cette cytokine active la voie NF- κ B, qui à son tour, active la voie Wnt5a par transcription et traduction de la protéine portant le même nom (**figure 18**) (Park *et al.*, 2018). La voie Wnt5a est connue comme étant l'une des voies responsables de la différenciation et spécialisation cellulaires (Kumawat & Gosens, 2016). De plus, elle est décrite à la périphérie comme la voie induite par l'IL-1 β , jouant un rôle sur les cellules endothéliales de la cornée (J. G. Lee & Heur, 2014) et sur les chondrocytes (S. Shi *et al.*, 2016). En revanche, si une inflammation survient pendant le développement, entraînant une

surexpression de l'IL-1 β , celle-ci peut avoir des effets délétères conduisant par exemple à des troubles neurodéveloppementaux comme la dysplasie corticale (malformations cérébrales caractérisées par des modifications de morphologie cellulaire) (Dubovický, 2010).

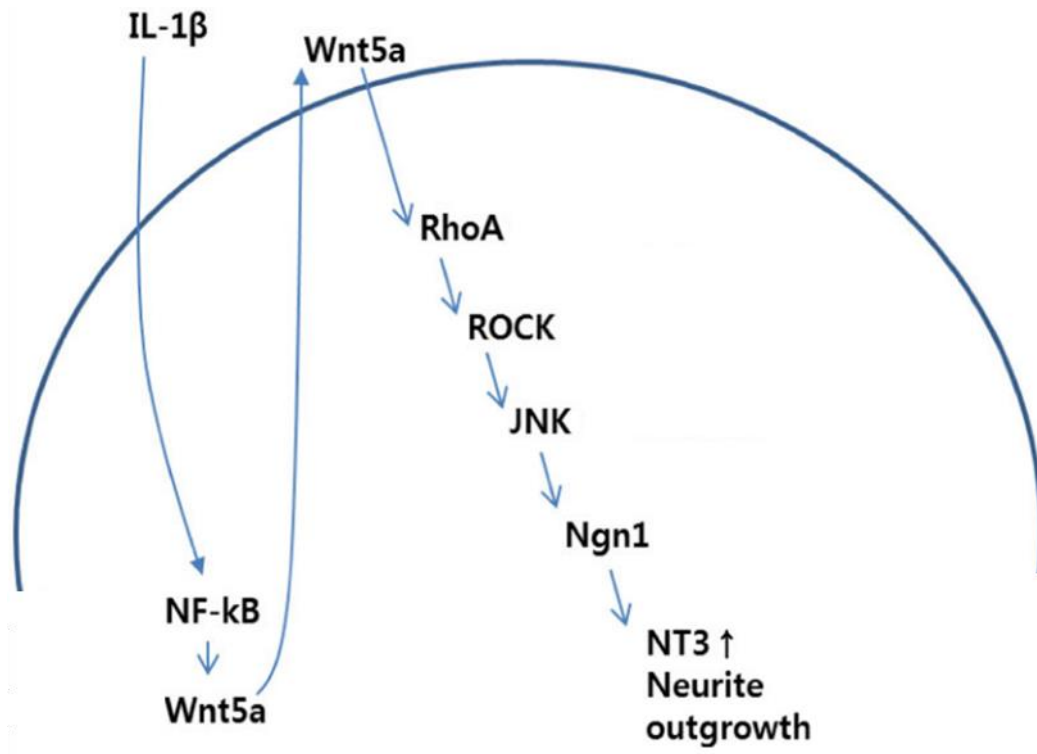


Figure 18 : Schéma de la voie Wnt5a induite par l'IL-1 β dans les neurones au cours du développement du SNC (adapté de Park *et al.*, 2018)

Ainsi, il apparaît que l'IL-1 β , cytokine « pro-inflammatoire », mais plutôt multifonction, joue un rôle important dans la mise en place du réseau neuronal cortical lors du développement cérébral, en agissant directement sur les neurones. Mais ce n'est pas la seule implication physiologique qui lui a été décrite car l'IL-1 β joue aussi un rôle important dans les mécanismes de mémoire.

3.3.3. Effets de la signalisation IL-1 β sur le SNC mature

3.3.3.1. Hippocampe, mémoire et plasticité synaptique

3.3.3.1.1. Organisation anatomique et cellulaire de l'hippocampe

La mémoire, du latin memoria, est définie dans le dictionnaire comme « l'activité biologique et psychique qui permet d'emmagasiner, de conserver et de restituer des informations » (Larousse). Au niveau du cerveau, elle est principalement encodée par l'hippocampe. L'hippocampe est une structure allongée et incurvée présente chez tous les mammifères. Comme dans la plupart des régions du cerveau, il est composé de deux types principaux de neurones : les cellules principales excitatrices utilisant le glutamate comme neurotransmetteur et les interneurons inhibiteurs, libérant du GABA (Gamma-aminobutyric acid) (Rivera *et al.*, 1999). L'hippocampe est subdivisé en plusieurs aires : le gyrus denté (DG) et la Corne d'Ammon (CA), elle-même découpée en aires CA1, CA2 et CA3. Ces aires sont également subdivisées en « stratum », qui correspondent aux différents compartiments subcellulaires des cellules excitatrices et qui ont permis de mieux appréhender l'histologie de cette structure cérébrale (**figure 19**) (Robert, 2018 ; Schultz & Engelhardt, 2014 ; Strange *et al.*, 2014).

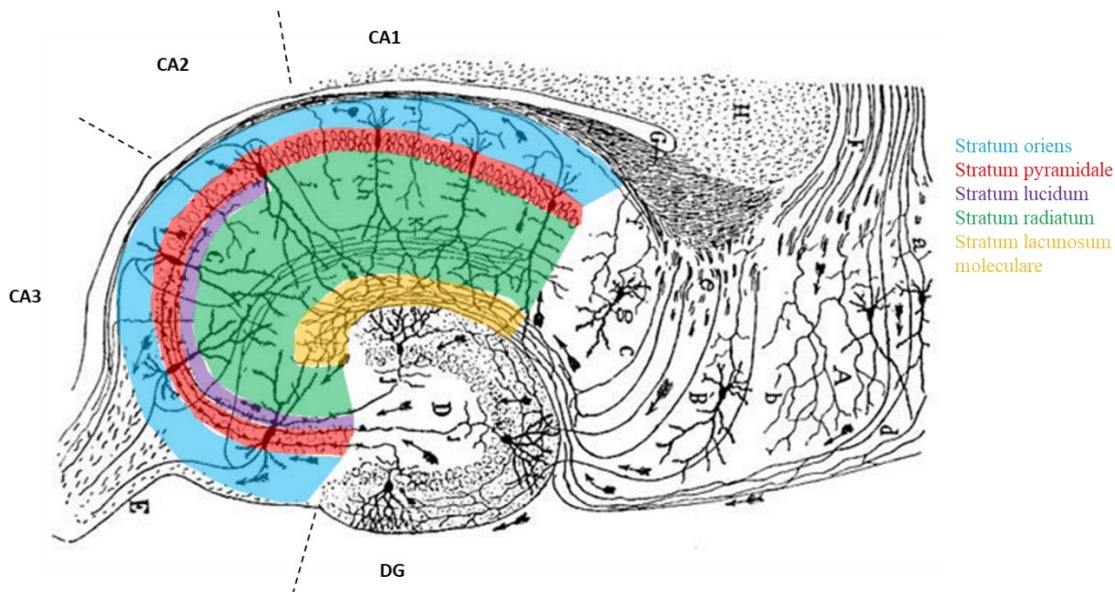


Figure 19 : Représentation schématique de la cytoarchitecture de l'hippocampe (adapté de Ramon y Cajal, 1911)

Dessin d'une coloration de Golgi illustrant la cytoarchitecture de l'hippocampe (adapté de Camon y Rajal, 1911). Les différentes strates de l'hippocampe sont colorées. DG, dentate gyrus ; CA, cornu ammonis.

Les afférences extrinsèques à l'hippocampe proviennent de diverses structures cérébrales telles que les régions corticales, le complexe amygdalien, le thalamus ou encore le tronc cérébral via le cortex entorhinal qui va, à son tour, conduire l'information au niveau du DG. Les neurones du DG (appelés cellules granulaires) font ensuite synapses avec les dendrites des neurones pyramidaux de l'aire CA3 (Freund & Buzsaki, 1996). Les neurones de CA3 transmettent l'influx, soit à d'autres pyramidaux de CA3 via des collatérales, soit directement à l'aire CA1 par les collatérales de Schaffer (Ishizuka *et al.*, 1990 ; Rosene & Van Hoesen, 1977). A leur tour, les neurones de CA1 projettent leurs axones vers le subiculum et enfin, le subiculum transmet l'influx nerveux vers les autres structures cérébrales (Beckstead, 1978 ; Finch *et al.*, 1983 ; Rosene & Van Hoesen, 1977). Cette voie, appelée boucle tri-synaptique, est la voie majoritaire de conduction de l'influx nerveux au sein de l'hippocampe.

3.3.3.1.2. Organisation fonctionnelle de la mémoire : plasticité synaptique et récepteur NMDA

La transmission d'information entre les neurones passe par un élément central appelé la synapse, qui est une jonction intercellulaire asymétrique composée d'une terminaison pré-synaptique (axone, transmission) et post-synaptique (dendrite, réception) (Südhof, 2021). Cette transmission est assurée par la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique, qui se lie sur leurs récepteurs présents en post-synapse, entraînant la propagation de potentiels d'action (**figure 20**) (Eroglu & Barres, 2010 ; Shin *et al.*, 2019).

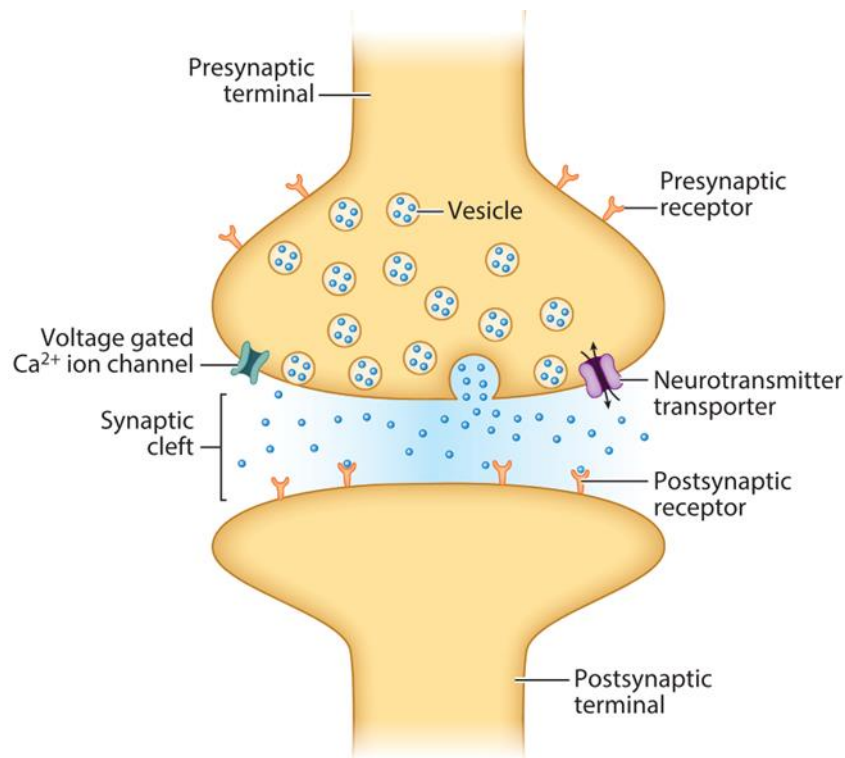


Figure 20 : Schéma de la neurotransmission au sein d'une synapse (adapté de Shin *et al.*, 2019)

Les neurotransmetteurs contenus dans des vésicules vont être libérés dans la fente synaptique par exocytose. Ces molécules sont captées par des récepteurs présents en post-synapse et génèrent un influx nerveux responsable de la transmission d'information.

La transmission synaptique excitatrice est sujette aux modifications morpho-fonctionnelles appelées potentialisation à long-terme (LTP) ou dépression à long-terme (LTD). La LTP est un processus impliquant un renforcement persistant des synapses qui entraîne une augmentation durable de la transmission des signaux entre les neurones (Bliss & Gardner-Medwin, 1973). La LTD est l'exact opposé de la LTP, induisant une diminution de la force synaptique. Alors que la LTP est générée par des stimulations de hautes fréquences de type tétanique, l'induction de la LTD passe par une stimulation répétée de basse fréquence et de longue durée (Dudek & Bear, 1992, 1993). Ces deux événements remodelent le cytosquelette des neurones, entraînant une modification de la synapse, tant au niveau morphologique qu'au niveau des récepteurs à la membrane (Bosch *et al.*, 2014 ; Herring & Nicoll, 2016 ; Lisman *et al.*, 2012 ; Patterson & Yasuda, 2011). La modification de la transmission synaptique est en partie due à la présence d'un récepteur ionotropique du glutamate, le récepteur AMPA (2-amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoxazol-4-yl propanoic acid). La LTP entraîne une augmentation de la densité postsynaptique des AMPARs (**figure 21**) tandis que la LTD induit l'exact opposé (Beattie *et al.*,

2000 ; Benke *et al.*, 1998 ; Carroll *et al.*, 1999 ; Herring & Nicoll, 2016 ; Heynen *et al.*, 2000 ; Huganir & Nicoll, 2013 ; Man *et al.*, 2000 ; Poncer *et al.*, 2002). Cependant, ces phénomènes ne seraient pas possibles sans un deuxième récepteur ionotropique du glutamate : le récepteur NMDA (N-methyl-D-aspartic acid) (Traynelis *et al.*, 2010 ; Vyklicky *et al.*, 2014).

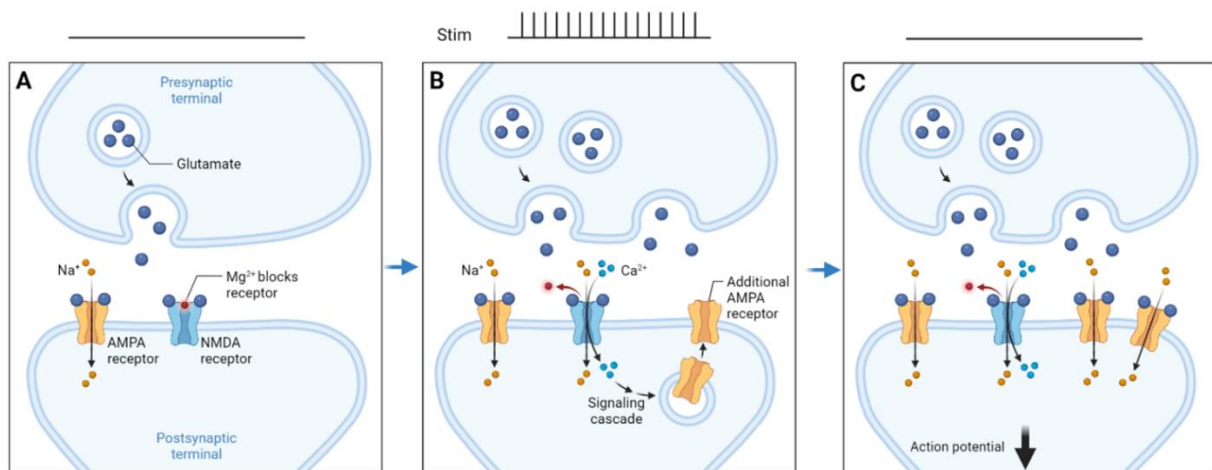


Figure 21 : Schéma des changements morphologiques lors d'une LTP au niveau des synapses

A : Transmission synaptique normale. Les neurotransmetteurs vont lier leurs récepteurs en post-synapse (AMPA et NMDA). Si toutes les conditions sont réunies, cela va générer un potentiel d'action en post-synapse. **B** : Lorsqu'un train de stimulation de type téτανique est appliqué (stim), l'influx calcique du récepteur NMDA active une cascade de signalisation intracellulaire impliquant la CaMKII qui va conduire à un adressage à la membrane de nouveaux AMPARs et renforcer le signal (LTP). **C** : La synapse est renforcée par la présence d'un nombre plus important de AMPARs ce qui renforce la transmission synaptique.

Les récepteurs NMDA (NMDAR) sont des hétérotétramères qui s'assemblent en hétérodimères, composés d'une combinaison de deux sous-unités obligatoires GluN1A avec deux autres sous-unités GluN2 ou GluN3 identiques (Monyer *et al.*, 1992 ; Ulbrich & Isacoff, 2008). Il existe quatre sous-unités GluN2 (A-D) dont les propriétés biophysiques sont différentes. Plus récemment, des récepteurs NMDA hétérotrimériques, composés des deux sous-unités obligatoires GluN1 et de deux sous-unités GluN2 / GluN3 différentes l'une de l'autre, ont été identifiés. Ils sont présents dans un grand nombre de régions cérébrales. Au niveau de l'hippocampe, les récepteurs NMDA hétérotrimériques sont particulièrement abondants avec une estimation de 15 à 50% de la population totale des récepteurs NMDA, dont une majorité de récepteurs composés des sous-unités GluN1/GluN2A/GluN2B (Al-Hallaq *et al.*, 2007 ; Paoletti *et al.*, 2013 ; Rauner & Köhr, 2011). Le récepteur NMDA est un canal voltage-dépendant conduisant peu de courant aux potentiels membranaires de repos. Ceci est

dû à une inhibition par du magnésium extracellulaire qui bouche physiquement le canal (Mayer *et al.*, 1984 ; Nowak *et al.*, 1984). Perméables aux cations et notamment au calcium, ils sont obligatoirement activés par deux agonistes : la glycine et le glutamate. Une dépolarisation membranaire généralement provoquée par l'activation des récepteurs AMPA lève l'inhibition induite par le magnésium et la liaison des agonistes ouvre le canal, induisant un influx cationique qui, *in fine*, dépolarise le neurone (Benveniste *et al.*, 1990 ; Clements & Westbrook, 1991 ; Kleckner & Dingledine, 1988). La conformation en di- / tri-hétéromère influence directement les propriétés du récepteur. Par exemple, un récepteur NMDA hétérodimérique contenant les sous unités GluN2A ou GluN2B présente une haute conductance ainsi qu'une forte sensibilité au blocage magnésium et à la perméabilité au calcium. L'inverse est observé pour les récepteurs composés des sous unités GluN2C ou GluN2D (Paoletti *et al.*, 2013). De manière surprenante, les récepteurs NMDA hétérodimériques composés des sous-unités GluN1/GluN3 sont exclusivement activés par la glycine, un neurotransmetteur considéré jusqu'à présent comme inhibiteur (Otsu *et al.*, 2019). Pour les récepteurs NMDA hétérotrimériques, il apparaît que les propriétés fonctionnelles sont dépendantes des sous-unités exprimées. Les récepteurs composés de GluN1/GluN2A/GluN2B présentent une sensibilité plus faible aux inhibiteurs GluN2A (TCN201, zinc) et GluN2B (ifenprodil, CP-101.606) comparé aux hétérodimères avec les mêmes sous-unités. De plus, il semble que GluN2A soit dominant dans ce type de récepteur hétérotrimérique car elle influence la sensibilité au glutamate du récepteur mais aussi sa cinétique de désactivation (Cheriyian *et al.*, 2016 ; Hansen *et al.*, 2014 ; Stroebel *et al.*, 2014). De manière opposée, le récepteur NMDA composé des sous-unités GluN1/GluN2A/GluN2C présente une dominance de la sous-unité GluN2C vis-à-vis de la probabilité d'ouverture du canal comparé aux hétérodimères GluN2A ou GluN2C (Bhattacharya & Traynelis, 2018). En revanche, les propriétés fonctionnelles des récepteurs NMDA hétérotrimériques contenant une sous-unité GluN3 restent encore mal caractérisées. L'ensemble de ces acteurs contribuent à former et à entretenir les processus d'apprentissage et de mémoire.

3.3.3.2. Impact de l'IL-1 β sur l'apprentissage et la mémoire

Au sein du SNC mature, l'IL-1 β est impliquée dans différents mécanismes cellulaires, en absence d'inflammation. Cette cytokine a des effets opposés sur la plasticité synaptique, et ce de manière concentration-dépendante (F. M. Ross *et al.*, 2003). L'IL-1 β agit par le biais du récepteur à l'IL-1 qui est enrichi au niveau des densités post-synaptiques (Gardoni *et al.*, 2011). Comme mentionné dans la section 1, les neurones expriment deux isoformes de la chaîne accessoire IL-1R3 : IL-1R3AcP et IL-1R3AcPb. De faibles concentrations d'IL-1 β favorisent la phosphorylation de Src, par interaction avec la chaîne IL-1R3AcPb plus affine pour la cytokine, tandis que de plus fortes concentrations recrutent p38 et non Src, via l'IL-1R3AcP (Huang *et al.*, 2011). De plus, au niveau des post-synapses, il a été montré sur culture primaire de neurones d'hippocampe, que l'activation de Src par l'IL-1 β déclenche la phosphorylation de la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA, induisant une augmentation de l'influx calcique (Gardoni *et al.*, 2011 ; Viviani *et al.*, 2003). Etant donné l'implication du récepteur NMDA dans la transmission synaptique, dans les processus mnésiques et dans la LTP / LTD, l'hypothèse d'une contribution de l'IL-1 β aux processus de plasticité synaptique a été émise.

En condition physiologique, le niveau d'expression de l'IL-1 β se situe en dessous du seuil de détection établi pour des techniques de dosage courant telle que l'ELISA. En effet, une série d'études est parvenue à démontrer qu'une concentration de 10 aM d'IL-1 β (équivalent à 10^{-17} M) était suffisante pour moduler la transmission synaptique (Luk *et al.*, 1999) et une étude de 2021 est arrivée au même résultat avec seulement 1 aM (10^{-18} M) d'IL-1 β (Stemkowski *et al.*, 2021). Au niveau de la plasticité synaptique, plusieurs travaux ont montré une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-1 β , dans les cellules gliales et les neurones, induite par la mise en place d'une LTP sur des tranches aigües d'hippocampe ou encore suivant des tests comportementaux de conditionnement à la peur ou de mémoire spatiale (Depino *et al.*, 2004 ; Goshen *et al.*, 2007 ; Labrousse *et al.*, 2009 ; Schneider *et al.*, 1998). Les souris invalidées pour l'IL-1R endogène présentent des altérations de la mémoire spatiale, de l'induction et du maintien de la LTP, mais aussi une absence d'augmentation d'expression d'ARNm de l'IL-1 β (Avital *et al.*, 2003 ; Goshen *et al.*, 2007 ; Takemiya *et al.*, 2017). Des résultats similaires sur la LTP et la mémoire spatiale sont observés lorsque les IL-1Rs sont inhibés pharmacologiquement par injection d'IL-1Ra (Goshen *et al.*, 2007 ; F. M. Ross *et al.*, 2003 ; Schneider *et al.*, 1998). L'injection ICV de faibles concentrations d'IL-1 β chez le rat conduit à une amélioration de la mémoire lors des tests d'évitements passifs (Brennan *et al.*, 2003). Les mêmes résultats sont observés chez la souris et l'équipe de Goshen précise que cet effet possède

une composante temporelle car l'amélioration sur la mémoire lors des tests d'évitements passifs n'est observée que 5 jours post-injection (Yirmiya *et al.*, 2002). L'IL-1 β facilite aussi la plasticité en stimulant la production de NGF (nerve growth factor), qui augmente l'activité de l'acétylcholinestérase et facilite l'induction de la LTP (Conner *et al.*, 2009). De même, cette cytokine stimule la production de BDNF (brain-derived neurotrophic factor), facteur impliqué dans la plasticité synaptique et la mémoire par activation de multiples voies de signalisations qui conduisent notamment à la libération de neurotransmetteurs, la potentialisation des NMDARs et l'augmentation de l'adressage des AMPARs à la membrane (Cunha *et al.*, 2010).

De manière opposée, à forte concentration, un rôle délétère de l'IL-1 β sur les processus mnésiques a été décrit, particulièrement en condition inflammatoire. En effet, l'injection d'IL-1 β dans les ventricules latéraux inhibe la production de NGF et diminue la libération d'acétylcholinestérase, ce qui génère des troubles de la mémoire (Taepavarapruk & Song, 2010). De même, l'expression chronique de cette cytokine dans l'hippocampe dorsal de rat, par approche lentivirale, induit une altération morphologique du développement des neurones ainsi que des troubles de la mémoire de reconnaissance (Hueston *et al.*, 2018). L'utilisation d'un modèle murin de surexpression chronique d'IL-1 β dans les cellules gliales de l'hippocampe a révélé un niveau élevé de cytokines pro-inflammatoires, une glie réactive, ainsi qu'une altération de la mémoire spatiale et de la mémoire contextuelle de la peur à long-terme, tandis que les processus mnésiques à court terme indépendant de l'hippocampe n'étaient pas affectés (Hein *et al.*, 2010 ; Moore *et al.*, 2009). Le **tableau 5** récapitule l'ensemble des données de cette section.

Tableau 5 : Récapitulatif des effets médiés par l'IL-1 β sur les mécanismes d'apprentissage et de mémoire dans le système nerveux central en fonction de sa concentration

Effets de l'IL-1 β sur les neurones dans le SNC	
Condition physiologique : Faible concentration d'IL-1 β	Condition inflammatoire : Forte concentration d'IL-1 β
Modulation de la transmission synaptique Amélioration de la mémoire lors de tests d'évitements passif Augmentation de l'expression d'ARNm de l'IL-1 β après induction d'une LTP ou tests comportementaux Induction de la production de NGF et de BDNF Facilitation de l'induction de la LTP Amélioration de la mémoire spatiale Augmentation de l'influx calcique NMDA dépendant	Inhibition de la production de NGF Diminution de la libération d'acétylcholinestérase Altération du développement des neurones Altération de la mémoire spatiale Altération de la mémoire de reconnaissance Altération de la mémoire contextuelle de la peur à long-terme

L'ensemble de ces données suggèrent que l'IL-1 β affecte différemment les processus de mémoire et d'apprentissage en fonction de l'état homéostatique du cerveau. En condition physiologique, une faible production d'IL-1 β faciliterait la plasticité synaptique, alors qu'en condition inflammatoire une production soutenue aurait des effets délétères. Néanmoins, en condition homéostatique l'origine de l'IL-1 β reste une question en suspens.

4. Contexte de l'étude

4.1. Limites technologiques pour l'étude spatio-temporelle de l'IL-1 β

L'IL-1 β , cytokine « pro-inflammatoire », joue aussi un rôle en condition physiologique dans le SNC. Des études princeps ont mis en évidence l'expression de cette cytokine dans les neurones magnocellulaires de l'hypothalamus chez le rat (Breder *et al.*, 1988 ; Lechan *et al.*, 1990 ; Watt & Hobbs, 2000). En outre, cette cytokine est impliquée dans le contrôle bidirectionnel de la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe. Ces études ouvrent un nouveau champ d'investigation quant aux fonctions non-inflammatoires de l'IL-1 β dans le SNC. Cependant, les approches expérimentales employées pour étudier l'IL-1 β sont restreintes à l'utilisation d'anticorps (Western blot, ELISA, immunohistochimie) dont la spécificité n'est pas démontrée et qui surtout manquent cruellement de résolution cellulaire, spatiale et temporelle. La pauvreté de ces outils limite donc considérablement les travaux permettant d'identifier les cellules synthétisant l'IL-1 β mais aussi les mécanismes cellulaires nécessaires à sa maturation et à sa libération, particulièrement au sein du système nerveux.

4.2. Développement de nouveaux outils pour l'analyse spatio-temporelle de l'IL-1 β

Pour visualiser la dynamique spatio-temporelle de l'interaction protéine-protéine, il existe plusieurs stratégies de haute résolution basées sur des mesures de fluorescence. Celles-ci peuvent être directes, par exemple une fusion entre la protéine d'intérêt et une protéine fluorescente permet de suivre son expression cellulaire ou subcellulaire. D'autres stratégies permettent de suivre l'activité de la protéine, on les appelle les biosenseurs. Ceux-ci peuvent être basés sur une modulation de l'émission de fluorescence en fonction de l'activité de la protéine ou sur le principe du transfert d'énergie par résonance (RET pour Resonance Energy Transfert). Les plus connues sont le FRET (Förster RET), le TR-FRET (Time Resolving-FRET) et le BRET (Bioluminescence RET). Les approches de RET sont plus utilisées pour étudier les interactions protéine-protéine ou leur maturation. Un des avantages de ces différentes stratégies est qu'elles reposent sur des protéines génétiquement modifiées permettant l'utilisation d'approche virale ou transgénique pour cibler leur expression au sein des tissus.

Afin d'étudier la dynamique de l'IL-1 β , un biosenseur de BRET codé génétiquement a été créé, permettant de visualiser en temps réel sa maturation dans n'importe quel type cellulaire. La version initiale de ce biosenseur est constituée par la fusion, sur le précurseur pro-IL-1 β , de la

RLuc8 (un variant de la *Renilla luciferase*) en position N-terminale et de Venus (un variant d'une protéine fluorescente jaune) en position C-terminale (Compan, Baroja-Mazo, Bragg, *et al.*, 2012). Le principe du BRET, comme toute technique de RET, est basé sur un transfert d'énergie non radiatif. La spécificité du BRET réside dans le fait que l'énergie provient d'une enzyme bioluminescente (dans le cas présent, une luciférase issue d'un organisme marin *Renilla reniformis*). L'énergie générée par dégradation d'un substrat, la coelenterazine, est transférée à une molécule fluorescente qui, ainsi excitée, va émettre une quantité mesurable de fluorescence (Hwang *et al.*, 2019). De manière courante, l'enzyme produisant la bioluminescence est appelée « donneur d'énergie », et le fluorophore « accepteur d'énergie ». Le signal de BRET est obtenu par ratio de la fluorescence de l'accepteur sur la bioluminescence du donneur. Étant donné que le transfert d'énergie peut seulement avoir lieu uniquement si le donneur et l'accepteur sont à une distance inférieure ou égale à 20 nm, la technique de BRET est une technologie très sensible et fiable pour étudier l'interaction ou la maturation de protéines.

Le choix d'utilisation du BRET par rapport aux autres techniques RET a été fait en vertu de ses avantages (**tableau 6**). Par comparaison avec le FRET, le BRET ne présente pas d'auto-fluorescence et ne nécessite aucune excitation lumineuse directe du donneur ce qui exclut les problèmes de photoblanchiments, de photo-réponses, de phototoxicités et de dommages tissulaires potentiels induits par la source lumineuse. De plus, l'absence de stimulation lumineuse entraîne une diminution du bruit de fond. En revanche, la luminescence du BRET étant très faible, elle ne peut pas être accentuée par une excitation lumineuse externe (laser) et requiert un équipement adapté (chambre noire) ainsi qu'une caméra capable de capter le peu de photons émis par la construction (Xie *et al.*, 2011). Ces inconvénients réduisent la résolution spatiale au profit d'une meilleure survie des cellules. Un autre inconvénient du BRET est la nécessité d'utiliser un substrat enzymatique de la luciférase ce qui limite considérablement l'utilisation de cette technique *in-* ou *ex-vivo*. Par comparaison, le TR-FRET utilise les lanthanides, comme le terbium ou l'euporium, pour émettre de la luminescence. Bien que cette technique possède un meilleur ratio signal/bruit ainsi qu'une demi-vie de la fluorescence de l'ordre de la milliseconde contre quelques nanosecondes pour un fluorophore classique, l'utilisation des lanthanides reste l'inconvénient majeur. Ces composés chimiques ne sont pas capables de traverser la membrane plasmique, bien qu'il existe des stratégies pour les faire pénétrer dans la cellule (Cottet *et al.*, 2012). Le TR-FRET reste, cependant, une technique de choix pour visualiser des interactions de protéines membranaires.

Tableau 6 : Avantages et inconvénients des techniques RET

	Avantages	Inconvénients
BRET	Absence d'auto-fluorescence Pas d'excitation lumineuse directe Pas de photoblanchiment Pas de photo-réponse Pas de phototoxicité Faible bruit de fond	Faible luminescence Equipement en chambre noire nécessaire Caméra sensible obligatoire Faible résolution spatiale
FRET	Forte luminescence Meilleure résolution spatiale Peut être réalisé dans un environnement faiblement lumineux	Bruit de fond important Photoblanchiment Phototoxicité Dommages tissulaires par la source lumineuse (laser) Auto-fluorescence
TR-FRET	Meilleur ratio/bruit par rapport aux autres techniques RET Demi-vie de la fluorescence plus importante	Pas de pénétration intracellulaire des lanthanides

Dans sa configuration, le biosenseur de BRET de l'IL-1 β génère un fort signal lorsque la cytokine est sous sa forme précurseur. Ce signal diminue lorsque la pro-IL-1 β est clivée lors de sa maturation, du fait de la séparation physique du donneur et de l'accepteur (**figure 22A**). Dans l'objectif de vérifier que l'ajout du donneur et de l'accepteur n'entrave pas le clivage et permet bien la maturation de l'IL-1 β , les auteurs ont exprimé ce biosenseur dans des lignées de macrophages sauvages (WT), ou invalidés pour les protéines ASC ou NLRP3. En présence de nigéricine, un activateur de l'inflammasome, une diminution du signal de BRET dans la lignée WT est observée alors que dans les lignées mutantes, le BRET reste stable (**figure 22B**). Afin de confirmer la maturation du senseur par la caspase-1, les auteurs ont généré un biosenseur muté au niveau des sites de clivages de l'enzyme. Ils ont ensuite analysé la maturation en exposant les biosenseurs sauvages et mutés à des concentrations croissantes de caspase-1. Dans ces conditions, une diminution du signal du BRET est observée uniquement pour le senseur

sauvage (**figure 22C**) (Compan, Baroja-Mazo, Bragg, *et al.*, 2012). Ces données démontrent que le senseur IL-1 β subit la même maturation dépendante de la caspase-1 que l'IL-1 β sauvage.

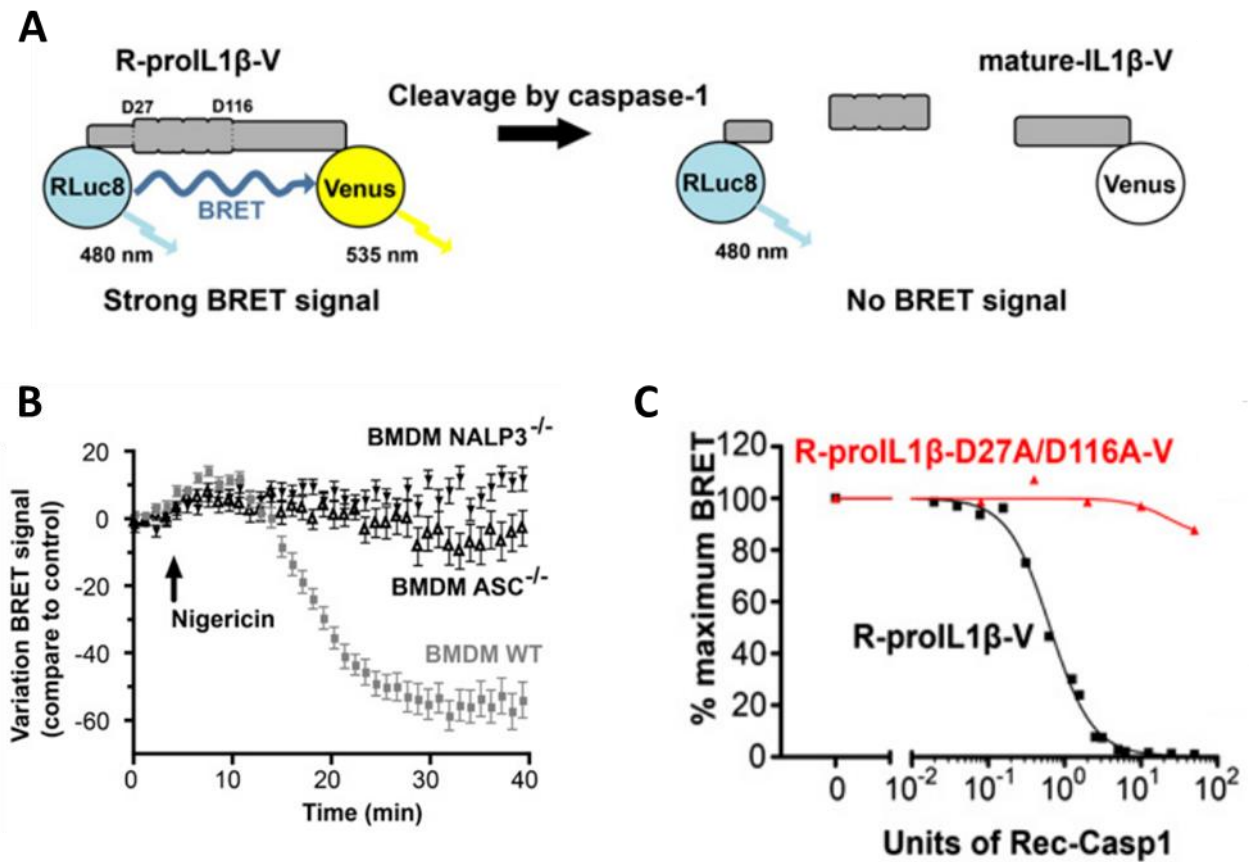


Figure 22 : Biosenseur de BRET de l'IL-1 β et étude de la maturation de l'IL-1 β (adapté de Compan *et al.*, 2012)

A : Représentation schématique du biosenseur de BRET. La RLuc8 fusionnée en N-terminale dégrade son substrat pour produire de la bioluminescence. L'énergie est transférée à l'accepteur Venus, fusionnée en C-terminale, qui va émettre une quantité mesurable de fluorescence. Cette conformation produit un fort signal de BRET. Après clivage par la caspase 1 sur les sites D27 et D116, l'éloignement du donneur et de l'accepteur diminue le signal de BRET. **B :** Etude de la variation du signal de BRET au cours du signal dans des macrophages WT, NLRP3 $^{-/-}$ et ASC $^{-/-}$ exprimant le biosenseur de BRET de l'IL-1 β . L'ajout de nigéricine, activateur de l'inflammasome entraîne une diminution du signal de BRET dans la lignée WT et non dans les deux autres lignées. **C :** Dose réponse du signal de BRET maximal en fonction de la concentration en caspase-1 pour le biosenseur WT et le biosenseur muté pour les sites de clivages de la caspase-1. L'addition croissante de caspase-1 induit un clivage de l'IL-1 β , donc une diminution du signal de BRET. Cette diminution est absente pour le biosenseur muté.

Avant de débiter mes travaux de recherche, l'équipe, qui avait créé le biosenseur de BRET, a décidé d'y apporter certaines améliorations. La RLuc8 a été changée pour la NanoLuciférase (NLuc), une petite enzyme de 19 kDa dérivée de la luciférase présente dans la crevette marine *Oplophorus gracilirostris* (Hall *et al.*, 2012). La NLuc présente un signal bioluminescent plus intense et plus stable dans le temps (la demi-vie du signal est d'environ 2h) comparé aux autres luciférases (England *et al.*, 2016 ; Goyet *et al.*, 2016 ; Hall *et al.*, 2012). En parallèle, le substrat dégradé pour produire la luminescence a été modifié afin d'obtenir un composé chimique plus stable avec une autoluminescence plus faible. Alors que la RLuc8 dégrade la coelenterazine, un analogue de cet imidazopyrazinone a été développé pour la NLuc : la furimazine. Ce substrat est exclusif à la NLuc et ne peut être dégradé par les autres luciférases (Hall *et al.*, 2012).

De la même manière, les auteurs ont souhaité améliorer l'accepteur. La protéine Venus, initialement utilisée dans le premier biosenseur de BRET de l'IL-1 β est a été remplacée par la YPet (Yellow fluorescent Protein for energy transfert), une protéine de 27 kDa provenant d'une combinaison de mutations entre Venus et YFP3 (yellow fluorescent protein 3) (Nguyen & Daugherty, 2005). Comparée à Venus, la YPet présente une plus forte luminescence, une meilleure photo-stabilité et une plus faible sensibilité aux variations de pH (J. Lee *et al.*, 2020). Théoriquement, l'amélioration des performances du donneur et de l'accepteur d'énergie devrait conduire à un meilleur signal de BRET, avec une plus grande stabilité.

Ceci a été validé expérimentalement. Dans une première étape, la RLuc8 a été remplacée par la NLuc. La mesure de la luminescence produite par la NLuc en présence de furimazine (environ 1U de luminescence (A.U.)) est 10 fois plus importante que celle de la RLuc, en présence de coelenterazine, qui est d'environ 0.1U de luminescence (A.U.) (**figure 23A**). Par la suite, Venus a été remplacée par YPet. La **figure 23B** présente le signal de BRET obtenu par la modification de l'accepteur d'énergie du biosenseur de BRET de l'IL-1 β . La combinaison NLuc-YPet génère un signal de BRET significativement plus élevé (250 mBU) que la combinaison NLuc-Venus (environ 200 mBU). L'ensemble de ces données, en accord avec la littérature, dénote une amélioration du biosenseur de BRET de l'IL-1 β , dont un schéma est présenté en **figure 23C**.

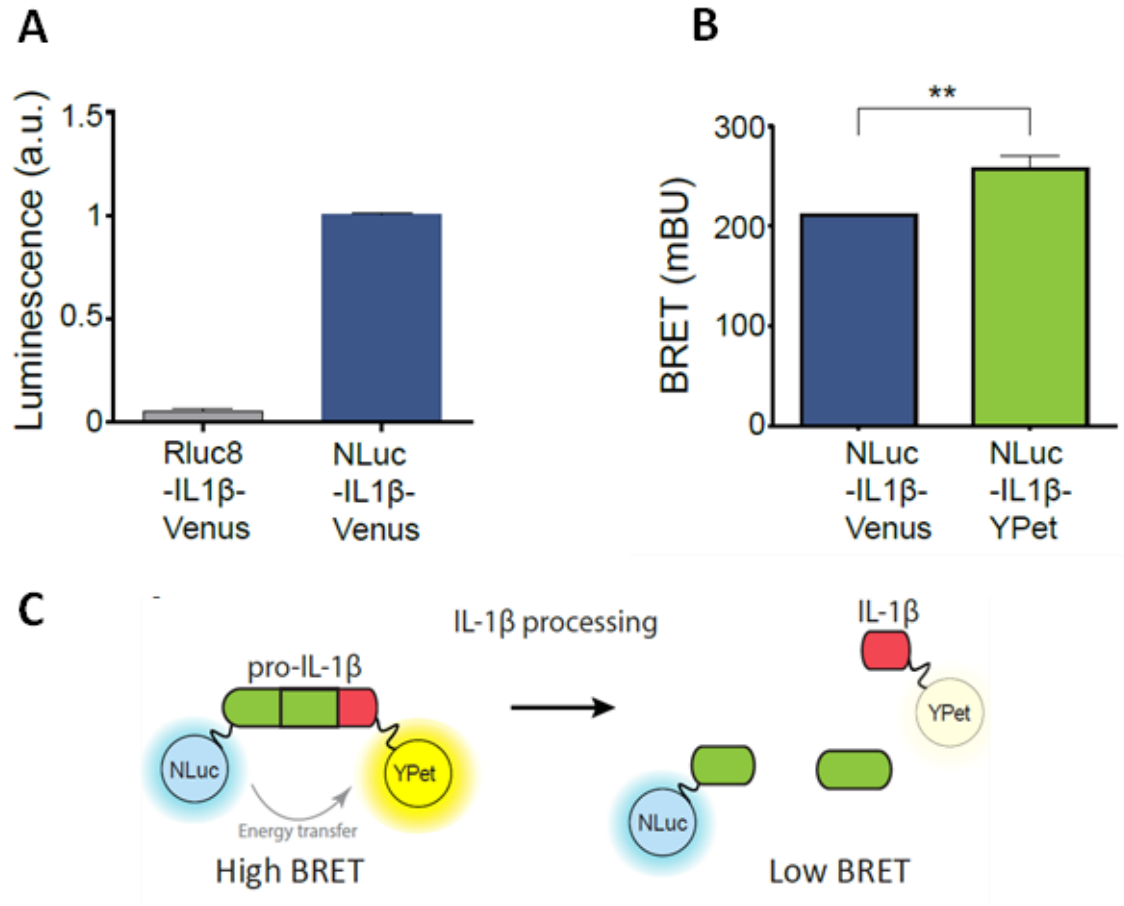


Figure 23 : Modification du biosenseur de BRET de l'IL-1β

A : Mesure de la bioluminescence produite par Rluc8-IL-1β-Venus et Nluc-IL-1β-Venus en présence de coelenterazine. **B** : Signal de BRET (en unités de milli-BRET – mBU) obtenu dans des cellules exprimant soit le biosenseur Nluc-IL-1β-Venus soit le biosenseur Nluc-IL-1β-YPet. **C** : Schéma du nouveau biosenseur de BRET de l'IL-1β.

4.3. Hypothèses de travail

Comme mentionné précédemment, l'IL-1 β est impliquée dans la modulation de la plasticité synaptique, en condition homéostasique. Cependant, en l'état actuel des connaissances, l'origine cellulaire de cette cytokine produite en condition physiologique reste inconnue. Le premier objectif de ce travail est donc d'identifier les types cellulaires au sein du SNC capables de synthétiser, maturer et libérer de l'IL-1 β en condition physiologique. Le second objectif de cette étude est de décrypter les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la production d'IL-1 β en condition homéostatique. En effet, bien que les différentes populations cellulaires du cerveau expriment les protéines indispensables à la synthèse d'IL-1 β (TLR, composants de l'inflammasome, facteurs de transcriptions...), ces voies de synthèse sont réprimées. Il est ainsi nécessaire de développer de nouveaux outils permettant de comprendre comment la synthèse d'IL-1 β peut être régulée, particulièrement au niveau neuronal.

La première partie de cette étude présentera la caractérisation du biosenseur de BRET de l'IL-1 β dont le donneur et l'accepteur d'énergie ont été améliorés. Nous détaillerons la maturation et la libération par les macrophages avant de déterminer si la présence de l'accepteur affecte ou non la bio-activité de l'IL-1 β mature. Dans une deuxième partie, nous aborderons la synthèse, la maturation et la libération de l'IL-1 β par les neurones hippocampiques. Enfin, dans une troisième partie, nous étudierons les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la production d'IL-1 β neuronale.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

5. Procédures expérimentales

5.1. RNAscope

Des tranches aigües d'hippocampe de souris Thy1-GFP de 16 μm d'épaisseur sont fixées avec 4% de PFA (Electron Microscopy Sciences, 15714) pendant 60 min puis sont perméabilisées avec un prétraitement séquentiel à l'éthanol 50% puis 70% puis 100%, pendant 5 min suivi d'un traitement au peroxyde d'hydrogène pendant 10 min puis une submersion de 5 min dans la solution RNAscope Target Retrieval, préalablement chauffée à 100°C. Enfin, la perméabilisation est achevée par ajout de 120 μL / tranche de RNAscope Protease III suivi d'une incubation de 30 min à 40°C et de trois lavages à l'eau distillée. L'hybridation des sondes RNAscope est effectuée par addition de 120 μL de sonde sur chaque tranche, suivi d'une incubation de 2h à 40°C. Les coupes sont lavées trois fois avec du tampon de lavage puis incubées 30 min à 40°C avec 120 μL de molécules d'amplification du signal conjuguée à un fluorophore ou une enzyme de type peroxydase de Raifort. Ces étapes sont répétées pour chaque sonde à amplifier sur la tranche. Un contre marquage des noyaux avec du DAPI, dilué au 1/5000^e, est réalisé suivi d'un protocole d'immunohistochimie pour amplifier la GFP exprimée de manière aléatoire dans les neurones pyramidaux des souris Thy1-GFP (cf. section immunofluorescence). Les tranches sont imagées à l'aide d'un microscope à épifluorescence muni d'un apotome.

5.2. Biologie moléculaire

5.2.1. Construction du biosenseur IL-1 β -APEX2

Les ADNc de la pro-IL-1 β murine, de l'APEX2 et de la séquence P2A-Scarlet ont été amplifiés par PCR, flanqués par les sites de restrictions BsrG1 et NHE1 avec des amorces synthétisées chez Eurofins à partir des plasmides pCMV-mouse-pro-IL-1 β , pWPT-EF1 α -P2X4-APEX2-GFP et pcDNA3-rP2X2-GCaMP6-P2A-Scarlet, respectivement. Les différents fragments ont été insérés dans le vecteur pAAV-CW3SL-EGFP par digestion enzymatique (BsrG1/NHE1), dont la EGFP a été préalablement retirée par digestion enzymatique BsrG1/NHE1. Le néo-plasmide pWPT-CW3SL-pro-mIL-1 β -APEX2-P2A-Scarlet a été ensuite amplifié par miniprep (Promega, A1330) puis midiprep (Macherey-Nagel, 740420.50).

5.2.2. Construction du rapporteur IL-1 β promoteur-mNeogreen

L'ADNc de la mNeogreen a été amplifié par PCR, flanqué par les sites de restrictions Not1 et Xho1 à partir du pcDNA3.1-mNeogreen-Calflux-NLuc-hTRPV1 avec des amorces synthétiques. Le fragment a été inséré par digestion enzymatique (Not1/Xho1), en C-terminal du promoteur dans le plasmide pWPT-IL-1 β -promoteur-Flag/HA, dont l'étiquette Flag/HA a été retiré par digestion enzymatique (Not1/Xho1). Le néo-plasmide pWPT-IL-1 β -promoteur-mNeogreen a été ensuite amplifié en miniprep puis midiprep.

5.2.3. Production de lentivirus

Les HEK293T sontensemencées en boîte de diamètre 14 cm. 24h après, les cellules à une confluence de 70% sont transfectées via la technique au phosphate de calcium. Brièvement, 3 plasmides sont utilisés : le plasmide d'intérêt, le plasmide d'enveloppe lentivirale codant pour la protéine VSV-G (pMD2G) et le plasmide « packaging » contenant des gènes codant pour la structure et la réplication des lentivirus (pSPAX2). Chaque plasmide est mélangé dans de l'eau, à raison de 824 μ L d'eau par boîte (quantité de plasmide : pMD2g = 5 μ g/boîte ; pSPAX2 = 15 μ g/boîte ; plasmide d'intérêt = 20 μ g/boîte). Du calcium 8X est ajouté en goutte à goutte dans le mix eau-plasmide (288 μ L de calcium/boîte) puis le mélange est oxygéné et incubé 20 min à température ambiante (RT). Pendant l'incubation, un tube d'HBSS est préparé avec un volume équivalent à celui du mix en cours d'incubation (soit 1152 μ L /boîte). Après incubation, la solution contenant les plasmides est ajoutée en goutte à goutte dans la solution d'HBSS cette dernière est oxygénée et introduite dans les boîtes de 14 cm, à raison de 2,3 mL/boîte.

6h post transfection, le milieu est remplacé par du DMEM, 1% SVF (Biowest, S1810-500), 1% P/S (pour Penicilline-Streptomycine 10 000U/mL, Gibco, 15140-122) et les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO₂ sur 2 jours. 72h post-transfection, le surnageant est récupéré, filtré avec des filtres 0.45 μ m (Millipore) et du polyéthylène glycol (40% PEG 600, Sigma, 81253) 4X est ajouté pour précipiter les protéines. Après incubation à 4°C sur la nuit, les tubes sont centrifugés 30 min, 2600g à 4°C et le culot est resuspendu dans 100 μ L de PBS. Des aliquots de 40 μ L sont stockés à -80°C.

5.2.4. Production d'Adeno-Associated virus (AAV)

Les HEK293T sont ensemencées en boîte de diamètre 14 cm 24h après, les cellules à une confluence de 70% sont transfectées via la technique au phosphate de calcium avec le plasmide d'intérêt, le plasmide pDJ codant pour des protéines de capsid virale des sérotypes AAV2, 8 et 9 et le plasmide pHelper codant pour des facteurs de répliquons pour les AAV (quantité de plasmide : pDJ = 13 µg/boîte ; pHelper = 13 µg/boîte ; plasmide d'intérêt = 13 µg/boîte). 6h post transfection, le milieu est remplacé par du DMEM, 1% SVF, 1% P/S et les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO₂ sur 2 jours. La suite du protocole pour la purification et la concentration des AAV utilise le kit AAVpro® Purification Kit Maxi (Takara, 6666). Brièvement, 72h post-transfection, les cellules sont rincées une fois en PBS puis décollées au Versène et centrifugées à 4°C à deux reprises, successivement 2000g pendant 10 min puis 2000g pendant 1 min. Entre chaque centrifugation, seul le culot cellulaire est conservé. Ce dernier est resuspendu avec 4 mL d'AAV extraction solution A plus et incubé 5 min à RT. Une centrifugation à 4°C, de 9000g pendant 10 min est réalisée puis le surnageant est transféré dans un nouveau tube dans lequel sont introduits 400 µL d'AAV extraction solution B. 40 µL de Cryonase Cold-active nuclease sont ajoutés puis les tubes sont incubés 1h à 37°C. 400 µL de Precipitator A sont introduits puis les échantillons sont agités 10s au vortex, incubés 30 min à 37°C, de nouveau agités au vortex 10s puis 200 µL de Precipitator B sont ajoutés avant une centrifugation de 9000g pendant 5 min à 4°C, précédé d'une agitation au vortex. Le surnageant est filtré avec des filtres 0.45 µm puis le filtrat contenant les AAV est introduit dans des colonnes Amicon Ultra-15, 100 kDa (Millipore, UFC901024). Les tubes sont centrifugés à 2000g pendant 5 min à 15°C, le filtrat est retiré et le contenu du filtre est resuspendu dans 2 mL de solution de resuspension. Le procédé de centrifugation-resuspension est répété jusqu'à l'obtention d'un volume inférieur à 100 µL dans le filtre Amicon. Le contenu du filtre est resuspendu puis aliquoté et stocké à -80°C.

5.3. Cultures primaires et transductions

5.3.1. Culture primaire post-natale de neurones et transduction

Les cultures primaires sont réalisées selon le protocole décrit dans l'article Moutin *et al.*, 2020. Brièvement, les structures d'intérêts (hippocampe et/ou cortex) sont extraites de cerveaux de souris P0 (Gibco, A12475-01, **figure 24A**). Elles sont récoltées dans de l'Hibernate A et sont digérées avec 2.5 mg de papaïne (diluée dans 600 µL d'Hibernate A ; Sigma, P4762) pendant 10 min à 37°C et 50 µL de DNase 1 (Roche, 10104159000) pendant 5 minutes additionnelles. L'action de la papaïne est arrêtée par l'ajout de milieu MC+ (noté CM+) et les tissus sont dissociés mécaniquement durant 3 sessions d'aspirations-refoulements à l'aide d'un cône de 1 mL. Les cellules dissociées sont disposées délicatement dans un tube de 2 mL d'Hibernate A contenant 4% de BSA (Albumine sérique bovine, Sigma, A7906-50G) dans lequel des bulles ont été générées pour éviter de mélanger la suspension cellulaire à la BSA, puis centrifugées pendant 7 min à 300g. Les cellules sont ensuite resuspendues dans du milieu MC+,ensemencées dans des supports de culture prétraités à la Poly-ornithine (0.03 mg/mL ; Sigma, P3655-100MG) et à la laminine (1 µg/mL ; Sigma, L2020), puis maintenues à 37°C, 5% CO₂ (**figure 24B**). Après 2 jours *in vitro* (DIV2), 1 µM d'AraC (cytosine β-D-arabinofuranoside hydrochloride, Sigma, C6645) est ajouté dans les cultures pour limiter la prolifération gliale pendant 8 à 18 heures. A DIV3, 80% du milieu est remplacé par du milieu « MC- ». Les cultures sont transduites à DIV7 avec 0.2 µL à 10 µL du virus d'intérêt et les expériences sont conduites 6 à 8 jours post-transduction (DIV13 à DIV15).

Milieu MC+ : Neurobasal-A (Gibco, 12349015) supplémenté de 2% B27 (Gibco, 17504044), 0.25% Glutamax (Gibco, 35050037), 0.25% L-glutamine (Gibco, 25030-024), 10% SVF (sérum de vœu fœtal décomplémenté) (Gibco, 10270105) et 1% P/S

Milieu MC- : BrainPhys (Stemcell tech., 05790) supplémenté de 2% B27, 0.25% Glutamax et 1% P/S.

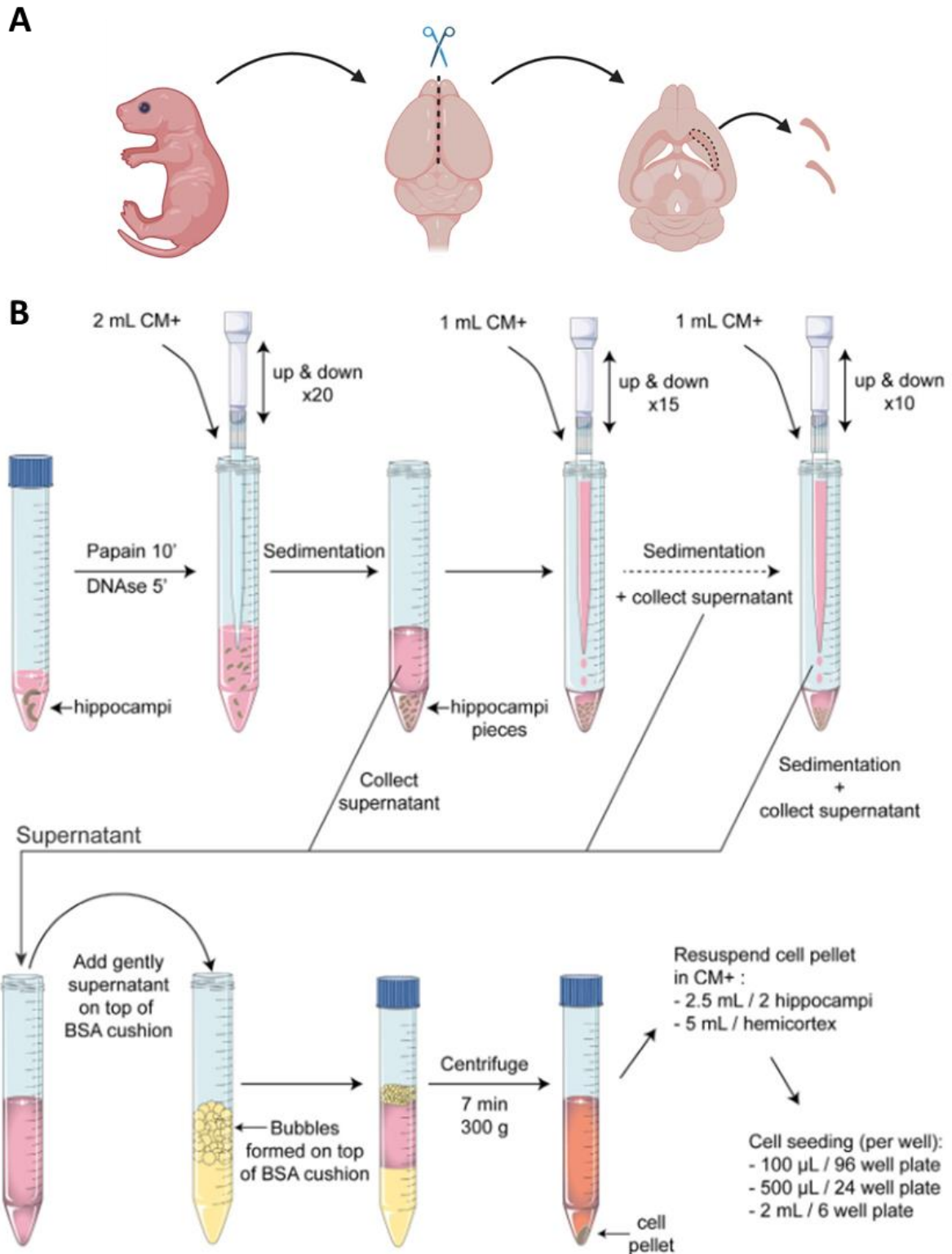


Figure 24 : Vue d'ensemble du protocole de culture hippocampique de souris post-natales (adapté de Moutin *et al.*, 2020)

A : Représentation schématique de la dissection de l'hippocampe. **B** : Représentation schématique de la dissociation et de l'ensemencement des cellules.

5.3.2. Culture et transduction de tranches organotypiques d'hippocampe

Une membrane (Membrane LCR, PTFE hydrophile, 0.45 μm , 47 mm diamètre, Millicell, FHLC04700) est découpée en cercles de 6 mm de diamètre, puis 5 cercles sont disposés dans un insert de culture (Millicell, PICM0RG50), lui-même placé dans une boîte de pétri 10 cm contenant 6 mL de milieu de culture permettant de créer un dispositif à l'interface entre l'air et le milieu. Les tranches organotypiques d'hippocampe sont réalisées à partir de souriceaux P7. Les hippocampes sont extraits dans leur intégralité après hémisection du cerveau dans de l'Hibernate A, puis sont disposés sur une platine de coupe munie d'un bras contenant une lame, destinée à réaliser des tranches de 400 μm d'épaisseur. Ces dernières sont resuspendues dans 1 mL d'Hibernate-A puis transférées dans une pétri 35 mm pour être séparées les unes des autres délicatement à la P1000. Les tranches sont ensuite disposées sur les membranes puis incubées à 37°C, 5% CO₂. A DIV3, le milieu est renouvelé et les tranches sont transduites avec 0.2 μL à 2 μL du virus d'intérêt, puis incubées à 33°C, 5% CO₂. Le milieu est de nouveau renouvelé à DIV10. Les expériences sont conduites entre 11 à 13 jours post-transduction (DIV14 à DIV16).

Milieu de culture : Minimum Essential Medium (Gibco, 51200-046) supplémenté de 25% Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco, 14025-050), 25% Horse Serum (Gibco, 26050-070), 1% P/S, 0.5% L-glutamine, 10 mM HEPES (Gibco, 15630-056), 5 mM Tris-HCl 1M pH 7.5 (Gibco, 15567-027).

5.4. Cultures et transductions de lignées cellulaires

5.4.1. Culture des cellules HEK293T & HEK-Blue™ IL-1R

Les HEK293T et les HEK-Blue IL-1R sont cultivées dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) + GlutaMAX + 4.5 g/L de glucose supplémenté avec 10% de SVF (Sérum de Vœu Fœtal décomplémenté, Biowest) et 1% P/S. Pour leur entretien bi-hebdomadaire, les cellules sont rincées une fois en PBS puis décollées au Versène (Gibco, 15040-033). Elles sont ensuite diluées au 1/10^e etensemencées dans une flasque de culture T₇₅.

5.4.2. Culture et création de la lignée stable de THP-1 exprimant le biosenseur de BRET de l'IL-1 β murin

Les THP-1 sont une lignée de monocytes humains. Ces cellules en suspension sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 (Gibco, 21875-034) supplémenté avec 10% de SVF et 1% P/S et sont entretenues deux fois par semaine. Les cellules sontensemencées dans une plaque 6 puits

à environ 1.10^6 cellules/puits. Les THP-1 sont transduites avec 6 μL du plasmide pWPT-EF1 α -NLuc-IL-1 β -YPet + 6 μL de mix Lentiblast (Ozbioscience) (3 μL de LentiBlast A + 3 μL de LentiBlast B). Les cellules transduites sont ensuite amplifiées et entretenues deux fois par semaine. Une partie sera congelée pour conserver la lignée créée.

5.4.3. Culture et création de la lignée stable de neuroblastome SH-SY5Y exprimant le biosenseur de BRET de l'IL-1 β

Les SH-SY5Y sont cultivées dans un milieu DMEM + GlutaMAX + 4.5 g/L de glucose supplémenté avec 10% de SVF, 1% P/S et 2 mM de glutamine et sont entretenues deux fois par semaine. Les cellules sont ensemencées en plaque 6 puits à une confluence de 50% et sont transduites avec 0.5, 1, 1.5, 2, et 2.5 μL de suspension lentivirale contenant le plasmide pWPT-CamKIIa-NanoLuc-IL-1 β -YPet afin de créer une lignée stable. L'expression est vérifiée à DIV10 post-transduction par immunocytochimie afin de conserver uniquement la condition avec la meilleure expression. La lignée stable est ensuite amplifiée et entretenue normalement. Une fraction de cellules est congelée.

5.4.4. Différenciation des SH-SY5Y

La différenciation des SH-SY5Y est décrite dans l'article Shipley *et al.*, 2016. Ce protocole est constitué de 11 étapes réparties sur une période de 18 jours (**figure 25**) et, est appliqué sur les lignées SH-SY5Y non transduites et exprimant de manière stable le biosenseur de BRET de l'IL-1 β . Brièvement, le premier jour (équivalent à 0 sur le schéma), 50 000 cellules/mL sont ensemencées dans des supports de culture non traités. Le milieu de différenciation 1 est changé aux jours 1, 3 et 5. Le 7^e jour, les cellules sont diluées au 1/2^e dans de nouveaux supports de culture non traités avec du milieu de différenciation 1. Le milieu de différenciation 2 est ajouté sur les cellules au jour 8 et ces dernières sont de nouveau diluées au 1/2^e à jour 10, sur des supports de culture prétraités à la poly-ornithine. Le changement de milieu pour le milieu de différenciation 3 est réalisé les jours 11, 14 et 17 et les cultures sont prêtes le 18^e jour.

Milieu de différenciation 1 : DMEM + GlutaMAX + 4.5 g/L glucose supplémenté de 2.5% de SVF, 1% P/S, 2 mM Glutamine et 10 μM d'acide rétinoïque (RA) (Sigma, R2625-50MG).

Milieu de différenciation 2 : : DMEM + GlutaMAX + 4.5 g/L glucose supplémenté de 1% de SVF, 1% P/S, 2 mM Glutamine et 10 μM RA.

Milieu de différenciation 3 : Neurobasal supplémenté de B27 1X, 20 mM KCl, 1% P/S, 2 mM Glutamax, 50 ng/mL BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor, Hellobio, HB3485), 2 mM db-cAMP (dibutyryl cyclic Adenosine Mono-Phosphate, Sigma, D0627-25mg) et 10 μ M RA.

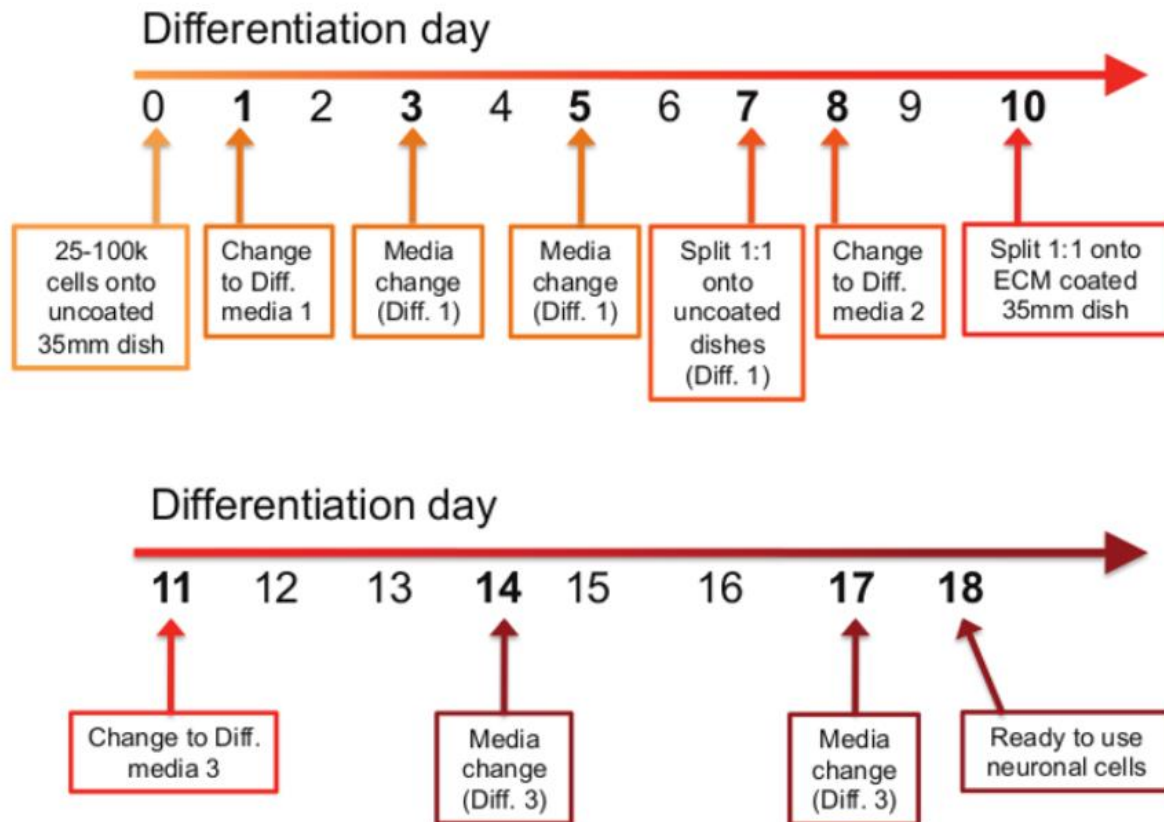


Figure 25 : Chronologie du protocole de différenciation des SH-SY5Y (adapté de Shipley *et al.*, 2016)

5.4.5. Culture et création de la lignée neuronale HT-22 exprimant le biosenseur de BRET de l'IL-1 β

La lignée HT-22 est cultivée dans le même milieu que celui utilisé pour les HEK293T et entretenue de manière bi-hebdomadaire. Les cellules sontensemencées en plaque 6 puits à une confluence de 50% puis transduites avec 1, 3 et 6 μ L de suspension lentivirale contenant le plasmide pWPT-CamKIIa-NanoLuc-IL-1 β -YPet + 5.5 μ L de mix LentiBlast (5 μ L LentiBlast A + 0.5 μ L LentiBlast B) afin de créer une lignée stable. L'expression est vérifiée à DIV10 post-transduction par immunocytochimie afin de conserver la condition avec la meilleure expression. La lignée stable est ensuite amplifiée et entretenue normalement. Une fraction de cellules est congelée.

5.4.6. Différenciation des HT-22

Le protocole de différenciation des cellules HT-22 s'établit sur 24h à 48h. Les cellules sont ensemencées dans des plaques 12 ou 96 puits à une confluence de 1.10^4 cellules/mL et incubées à 37°C pendant 24 ou 48h avec du milieu de différenciation A, B ou C (cf. composition des milieux, ci-après). Les cellules sont ensuite lavées une fois au PBS et incubées avec du milieu MC- en attendant la réalisation des expériences.

Milieu de différenciation A : DMEM + GlutaMAX + 4.5 g/L glucose supplémenté de N2 supplement 1X (Thermofisher, 17502048), 50 ng/mL de NGF- β (Nerve Growth Factor β , Sigma, SRP4304-25ug), 100 μ M de PDBu (Phorbol 12, 13-dibutyrate, Sigma, 524390-1MG), 100 μ M de db-cAMP (dibutyryl-cyclic AMP, Sigma, D0627-25mg,) et 1% P/S.

Milieu de différenciation B : Neurobasal A supplémenté de 2mM de glutamine, N2 supplement 1X et 1% P/S.

Milieu de différenciation C : Neurobasal A supplémenté de 2% B27, 1% P/S, 50 ng/mL de BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor, Hellobio, HB3485) et 10 μ M de RA.

5.5. Biochimie

5.5.1. Western Blot

Les cellules sont lavées une fois au PBS puis solubilisées dans un tampon de lyse RIPA (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100) contenant des inhibiteurs de phosphatases et de protéases sans EDTA (Thermofisher, A32961). Les lysats sont ensuite incubés sur glace pendant 30 min et centrifugés pendant 15 min, 15 900g à 4°C. Les surnageants contenant les protéines solubilisées sont récoltés et conservés à -20°C.

Les échantillons sont dilués dans du tampon de charge 4X (NuPAGE LDS sample buffer, Invitrogen, NP0007) + 5% β -mercaptoéthanol, puis chauffés à 80°C pendant 5 min. Les protéines sont ensuite séparées sur gel 4-12% Bis-Tris (Invitrogen, NW04125) soit en tampon MES (Thermofisher, J62138.AP), qui confère une meilleure résolution pour les protéines de bas poids moléculaire, soit en tampon MOPS (Thermofisher, J62847.AP), qui confère une meilleure résolution pour les protéines de haut poids moléculaire. Les protéines sont ensuite transférées du gel sur une membrane en nitrocellulose (Invitrogen, IB23002). Le profil de migration est révélé avec une coloration transitoire au rouge Ponceau (Sigma, P7170-1L) puis la membrane est saturée avec une solution de PBS-T (PBS 1X + 0.5% Tween-20 (Sigma,

P7949-500ML) + 5% lait écrémé) pendant 30 min, avant d'être incubée à 4°C sur la nuit avec un anticorps primaire + agitation (**tableau 7**). Elle est ensuite lavée trois fois avec du PBS-T puis incubée 2h à RT avec un anticorps secondaire couplé à une peroxydase de Raifort (**tableau 7**). La révélation se fait grâce à une réaction de chimiluminescence grâce au kit Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad, 170-5061) et l'acquisition est faite au Chemidoc (BioRad). Pour révéler une autre protéine d'intérêt, la membrane est incubée 30 min à RT dans une solution de 0.1% d'azide de sodium (Sigma, S8032-25G) pour neutraliser la peroxydase. L'ensemble des marquages avec les anticorps primaires et secondaires est identique à celui décrit précédemment.

Tableau 7 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expériences de Western-Blot

Anticorps primaire			
Nom	Espèce	Dilution	Référence
IL-1 β	Chèvre	1/1000 ^e	R&D (AF-401-NA)
GFP	Souris	1/2000 ^e	Roche (11814460001)
NanoLuc	Lapin	1/1000 ^e	Promega (cadeau)
Caspase-1	Lapin	1/1000 ^e	GeneTex (GTX133447)
THOP-1 (EP24.15pAb)	Lapin	1/1000 ^e	Enzo (ENZ-ABS841-0100)
Actine	Souris	1/1000 ^e	DSHB (JLA20)
Anticorps secondaire			
Nom	Espèce	Dilution	Référence
GAPDH-HRP	Lapin	1/5000 ^e	Cell Signaling (3683)
Streptavidin-HRP		1/1000 ^e	Invitrogen (S911)
Lapin-HRP	Chèvre	1/1000 ^e	Jackson Immunosearch (111-035-144)
Souris-HRP	Cheval	1/1000 ^e	Cell Signaling (7076)
Chèvre-HRP		1/1000 ^e	Jackson Immunosearch (705-035-003)

5.5.2. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

- Dosage du biosenseur de BRET de l'IL-1 β murin

Les lignées de THP-1 exprimant le biosenseur de BRET murin sont récoltées et comptées puis centrifugées 5 min à 100g. Le culot cellulaire est resuspendu dans une solution d'ACSF (140 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 3 mM KCl, 10 mM Hepes, 10 mM D-glucose, PH 7,4 ajusté avec

NaOH et osmolarité de 315 mOsmol ajustée avec NaCl), et ensemencé à une confluence finale de 1.10^6 cellules/mL dans une plaque 12 puits. L'incubation des cellules pendant 1h à 37°C avec une solution d'ACSF représente la condition contrôle. Pour visualiser la maturation du biosenseur, les THP-1 sont pré-incubées (15 min à 37°C) avec soit 10 μ M de MCC950 (Sigma, CP-456773), soit de l'ACSF puis stimulées pendant 45 min à 37°C avec 10 μ M de nigéricine (Invitrogen, N1495). Les surnageants sont ensuite récoltés et conservés sur glace jusqu'à la réalisation de l'ELISA et les cellules sont traitées comme décrit dans la partie 5.5.1. afin d'obtenir les extraits cellulaires pour une analyse par Western-Blot.

Les dosages d'IL-1 β murine par ELISA sont réalisés grâce au kit Quantikine[®] HS ELISA (R&D Systems, MLB00C). Brièvement, 50 μ L de diluant RD1N sont introduits dans chaque puits suivi de 50 μ L du standard, du contrôle ou des échantillons. La plaque est couverte et incubée 2h à RT sous agitation. 5 lavages sont effectués et 100 μ L de conjugué IL-1 β HS murin sont ajoutés dans chaque puits suivi d'une incubation de 2h à RT. Après 5 nouveaux lavages, 100 μ L de la solution de révélation sont ajoutés par puits suivi d'une incubation de 30 min, à RT et à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée avec 100 μ L de la solution d'arrêt puis une lecture d'absorbance à 450 nm est réalisée à l'aide du lecteur de plaque TECAN Spark.

- Dosage du biosenseur de BRET de l'IL-1 β humain

Les neurones co-transduits à DIV 7 avec des AAV contenant les plasmides pAAV-FLEX-Rev-NLuc-IL-1 β -YPet et le pAAV-CamKIIA-iCre sont incubés avec 100 μ M de D-AP5 (Hellobio, HB0225-10mg) dès DIV10 et jusqu'au jour de l'expérience, avec un renouvellement de l'antagoniste des récepteurs NMDA à DIV13. A DIV15, les cellules sont lavées deux fois et incubées 15 min avec les solutions décrites dans le **tableau 8**. Les neurones sont ensuite stimulés avec 50 μ M de NMDA pendant 15 min, puis les surnageants sont récoltés et conservés sur glace jusqu'à la réalisation de l'ELISA et les cellules sont traitées comme décrit dans la partie 5.5.1 afin d'obtenir les extraits cellulaires pour une analyse par Western-Blot.

Tableau 8 : Traitements pharmacologiques appliqués aux cultures primaires de neurones pour doser la libération d'IL-1 β par ELISA

Conditions	Solutions de lavage	Solutions de stimulation
1	ACSF + TTX	ACSF + TTX
2	ACSF + TTX + D-AP5	ACSF + TTX + D-AP5
3	ACSF + TTX	ACSF + TTX + NMDA
4	ACSF + TTX + D-AP5	ACSF + TTX + D-AP5 + NMDA

Composés utilisés pour les différentes solutions : TTX (3 μ M, Tetrodotoxin citrate, Hellobio, HB1035), NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate, Sigma, M3262)

Les ELISA dosant l'IL-1 β humaine sont réalisés grâce au kit Quantikine[®] HS ELISA (R&D Systems, HSLB00D). Brièvement, 50 μ L de diluant RD1-63 sont introduits dans chaque puits suivi de 100 μ L du standard, du contrôle ou des échantillons. La plaque est couverte et incubée 2h à RT sous agitation. 4 lavages sont effectués et 200 μ L de conjugué IL-1 β HS humain sont ajoutés par puits suivi d'une incubation de 1h à RT. Après 4 nouveaux lavages, la plaque est incubée pendant 30 min à RT avec 200 μ L/puits de Streptavidin polymer-HRP 1X. Lavée 4 fois, 200 μ L de la solution de révélation sont ajoutés par puits suivi d'une incubation de 30 min, à RT et à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée avec 50 μ L de la solution d'arrêt puis une lecture d'absorbance à 450 nm est réalisée à l'aide du lecteur de plaque TECAN Spark.

5.5.3. Mesure indirecte de la bioactivité de l'IL-1 β par dosage spectrophotométrique de la SEAP produite par des HEK-Blue[™] IL-1R

Partie 1 :

Pour un dosage de la bioactivité de l'IL-1 β libérée par les THP-1, les cellules sont récoltées et comptées puis centrifugées 5 min à 100g. Le culot cellulaire est resuspendu dans une solution d'ACSF pour avoir une confluence finale de 1.10^6 cellules / mL. Une plaque 24 puits estensemencée à raison de 500 000 cellules / puits. Les cellules incubées 1h à 37°C avec une solution d'ACSF représentent la condition contrôle. Pour la visualisation de la bioactivité du biosenseur, les THP-1 sont pré-incubées (15 min à 37°C) soit avec 10 μ M de MCC950, soit avec de l'ACSF puis sont stimulées pendant 45 min à 37°C avec 10 μ M de nigéricine. Les surnageants sont ensuite récoltés et conservés sur glace pour la partie 2.

Pour un dosage de la bioactivité de l'IL-1 β libérée par les cultures primaires de neurones, les cellules sont délicatement lavées une fois avec une solution d'ACSF préalablement chauffée à 37°C, puis incubées dans cette même solution. Les neurones sont prétraités ou non avec 100 μ M de D-AP5 pendant 15 min à 37°C puis stimulés pharmacologiquement pendant 15 min à 37°C avec 50 μ M de NMDA. La condition contrôle est stimulée avec de l'ACSF. Les surnageants sont ensuite récoltés et conservés sur glace pour la partie 2.

Partie 2 :

La suite de la technique est réalisée suivant le protocole Quanti-Blue™ Solution (Invivogen, rep-qbs). Brièvement, au jour 1, les HEK-Blue IL-1R sont lavées une fois avec du PBS, puis décollées au Versène. Les cellules sont resuspendues pour obtenir une suspension à 3.10^5 cellules/mL. 20 µL des surnageants et/ou des solutions contrôles sont introduits dans une plaque 96 puits et ce volume est complété par 180 µL de suspension cellulaire HEK-Blue pour obtenir environ 50 000 cellules par puits. La plaque est incubée à 37°C, 5% CO₂ sur la nuit. Au jour 2, une solution de Quanti-Blue (0.5 mL QB reagent + 0.5 mL de QB buffer dans 50 mL H₂O milliQ final) est préparée puis incubée 10 min à RT. 20 µL de surnageant provenant des cellules HEK-Blue stimulées sont prélevés puis introduits dans une nouvelle plaque 96 puits, celle-ci, complétée par 180 µL de solution de Quanti-Blue. La plaque est ensuite incubée à 37°C pendant 4h puis une lecture d'absorbance à 640 nm au TECAN Spark est effectuée.

5.5.4. Purification du biosenseur de BRET de l'IL-1β

Les HEK293T ont étéensemencées en plaque 6 puits et transfectées à la Lipofectamine 2000. Brièvement, 100 µL d'opti-MEM sont mélangés avec soit 500 ng soit 1µg de plasmide codant pour le biosenseur. En parallèle, un autre tube contenant 100 µL d'opti-MEM et 6 µL de Lipofectamine 2000 est préparé et les deux mélanges sont incubés 5 min à RT (les volumes indiqués pour la transfection sont donnés pour un seul puits de la plaque 6 puits). Après incubation, le tube contenant le plasmide est transféré dans celui contenant la lipofectamine et l'ensemble est de nouveau incubé 20 min à RT. 200 µL du mélange final sont ajoutés sur les cellules. 48h post-transfection, elles sont lavées une fois avec du PBS puis solubilisées dans un tampon de lyse RIPA contenant des inhibiteurs de phosphatases et de protéases sans EDTA. Les lysats sont ensuite incubés sur glace pendant 30 min puis centrifugés pendant 15 min, 15 900g à 4°C. Les protéines solubilisées sont séparées dans deux tubes : 40 µL/condition forme la fraction appelée TE (contenant toutes le protéines) et le reste des surnageants est conservé pour une immunoprécipitation.

A J1, 100 µL de billes d'agarose couplées à un nanocorps reconnaissant la GFP (Nanotag, N0310) par condition sont resuspendues puis lavées deux fois avec le tampon RIPA et, entre chaque lavage, les billes sont centrifugées pendant 1 min à 1000g. Elles sont ensuite resuspendues dans le même tampon et distribuées dans les échantillons et incubées toute la nuit à 4°C sur roue. A J2, les tubes sont centrifugés pendant 1 min à 1000g et 40 µL de surnageant par condition sont conservés pour former la fraction FLT (fraction contenant toutes les protéines

qui n'ont pas été retenues par le nanocorps présent sur les billes) et traités pour une analyse en Western-Blot. Les échantillons sont lavés trois fois avec du tampon de lyse et centrifugés pendant 1 min à 1000g entre chaque lavage. Après le dernier rinçage, chaque fraction est divisée en deux puis centrifugée 1 min à 1000g. Les culots sont resuspendus avec 600 µL de tampon Tris-NaCl (noté TN, tampon optimal pour l'activité enzymatique de THOP1) pour une des fractions et 400 µL de tampon ICE (tampon optimal pour l'activité enzymatique de caspase-1) pour l'autre puis 3 nouveaux lavages, avec les solutions mentionnées précédemment, sont réalisés. Entre chaque lavage, une centrifugation de 1 min à 1000g pour conserver les culots est effectuée. Les échantillons, repris dans 1 mL de tampon TN ou ICE sont ensuite de nouveau divisés en deux. Une fraction est traitée pour analyse en Western-Blot et l'autre pour une expérience de BRET *in vitro*.

5.6. Immunofluorescence et analyse

5.6.1. Cellules en cultures

Le protocole d'immunocytochimie décrit est le même pour toutes les cultures cellulaires présentées dans cette étude. Les cellules sont cultivées en plaque 24 puits, sur des lamelles de verre prétraitées avec 1M d'HCl pendant 6h à 50°C puis rincées à l'eau. Le milieu des cultures est retiré puis les cellules sont fixées avec 400 µL de PBS contenant 4% de PFA pendant 10 min à RT, lavées une fois au PBS et perméabilisées dans une solution de PBS + 3% BSA + 0.1% Triton X-100 pendant 30 min. Les lamelles sont incubées 24h à 4°C avec les anticorps primaires (**tableau 9**), lavées 3 fois et incubées 2h à RT avec les anticorps secondaires (**tableau 9**). Les anticorps primaires et secondaires sont dilués dans la solution de perméabilisation. Un marquage des noyaux au DAPI (1/5000^e) dans de l'eau est réalisé pendant 5 min à RT puis les lamelles sont montées sur lame à l'aide d'un milieu de montage (DAKO, S3023).

5.6.2. Tranches organotypiques d'hippocampe

Les tranches organotypiques sont transférées de l'insert de culture dans une plaque 24 puits, fixées avec 400 µL de PFA 4% pendant 1h30 sous agitation, lavées une fois au PBS puis incubées 2h à RT dans 400 µL de solution de perméabilisation. Le milieu est retiré puis les tranches sont incubées à 4°C sous agitation durant 2 jours avec les anticorps primaires (**tableau 9**), rincées 3 fois et incubées 2h à RT avec les anticorps secondaires (**tableau 9**). Les anticorps primaires et secondaires sont dilués dans la solution de perméabilisation. Un marquage des

noyaux au DAPI (1/5000^e) est réalisé pendant 5 min à RT puis les tranches sont montées entre lame et lamelle avec un milieu de montage.

Tableau 9 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expériences d'immunofluorescence

Anticorps primaires			
Nom	Espèce	Dilution	Référence
GFP	Lapin	1/2000 ^e	Sigma (SAB4301138)
MAP2	Poulet	1/1000 ^e	Synaptic Systems (188006)
GFAP	Souris	1/1000 ^e	Sigma (G3893)
mNeongreen	Souris	1/1000 ^e	Chromotek (32F6)
PSD95	Lapin	1/1000 ^e	GeneTex (GTX133091)
Neun	Souris	1/1000 ^e	Millipore (MAB377)
IL-1 β	Chèvre	1/1000 ^e	R&D (AF-401-NA)
Anticorps secondaires			
Nom	Espèce	Dilution	Référence
Lapin CF488A	Ane	1/2000 ^e	Sigma (SAB600036)
FluoTag-X2 anti-poulet IgY Aberrior Star Red	Chameau	1/500 ^e	Synaptic Systems (N0702)
Souris A594	Chèvre	1/1000 ^e	Molecular Probes (A11020)
Lapin A557	Ane	1/1000 ^e	R&D Systems (NL004)
Souris CF488A	Ane	1/1000 ^e	Sigma (SAB46000035)
Chèvre A488	Ane	1/1000 ^e	Molecular Probes (A11055)

5.6.3. Analyse de la localisation subcellulaire de l'IL-1 β

Les images sont traitées à l'aide du logiciel Fiji. Les épines et leurs dendrites associés sont sélectionnées avec une surface fixe. 20 épines et dendrites sont quantifiés par image. Les mesures de fluorescences sont reportées sur Excel pour effectuer le ratio épine/dendrite. L'analyse statistique est un One-way ANOVA avec une correction au False Discovery Rate, effectuée sur GraphPad Prism 8.

5.7. Enregistrement et analyses des signaux de BRET et des signaux fluorescents

5.7.1. BRET en lecteur de plaques

Les neurones exprimant le biosenseur de BRET de l'IL-1 β , les SH-SY5Y et les HT-22 sont cultivés en plaques 96 puits noires à fond transparent. Les cellules sont lavées une fois puis incubées dans 50 μ L d'ACSF contenant de la Furimazine (Promega, N112B) diluée au 1/800^e. Le signal basal de BRET est enregistré à l'aide d'un lecteur de plaques (détaillé plus bas dans cette section) puis les neurones sont stimulés pharmacologiquement avec différents composés et le signal de BRET post-stimulation est enregistré. Composés pharmacologiques utilisés et concentrations finales : 50 μ M de glutamate (Hellobio, HB0383), 50 μ M d'AMPA (Hellobio, HB0052), 50 μ M de KA (Hellobio, HB0355), 10 ou 50 μ M de NMDA, 100 μ M de D-AP5, de 0.01 à 10 μ M de TCN201 (HelloBio, HB0604), de 0.01 à 10 μ M de Ro25-6981 maleate (HelloBio, HB0554), 500 nM de MCC950 et 50 μ M de YVAD (Sigma, SML0429).

Les THP-1 en suspension sont lavées une fois avec de l'ACSF puis 50 μ L de cette même solution contenant de la Furimazine diluée au 1/800^e est ajouté. Le signal basal de BRET est enregistré pendant 5 min avant de stimuler les cellules soit avec de l'ACSF, soit avec 10 μ M de nigéricine et d'enregistrer le signal de BRET post-stimulation pendant 40 min. Le prétraitement avec 10 μ M de MCC950 s'effectue juste avant de débiter l'acquisition du signal basal de BRET et ces cellules restent exposées à ce composé durant toute l'expérience.

Les expériences de clivage *in vitro* du biosenseur de BRET de l'IL-1 β par la caspase-1 ou THOP1 recombinant sont réalisées en plaques 96 puits blanches. Deux quantités de biosenseur transfectées (500 ng et 1 μ g) sont purifiées (cf. section « purification du biosenseur de BRET de l'IL-1 β ») et diluées soit dans du tampon TN (25 mM Tris-HCl et 150 mM NaCl), soit dans du tampon ICE (29 mM DTT (Sigma, 646563-10X.5ML), 200 mM Hepes, 0.2% CHAPS (Sigma, C9426) et 20% Sucrose (Sigma, S7903)). 50 μ L des diluats sont introduits dans la plaque, additionnés de furimazine diluée au 1/800^e et de 50 μ L de THOP1 à une concentration de 0.5 ng ou 5 ng d'enzyme/ μ L, ou de 50 μ L de caspase-1 à 0.5 unité/ μ L. Les signaux de BRET sont ensuite enregistrés pendant 30 min.

Les acquisitions sont réalisées avec deux lecteurs de plaques différents : un Tecan Infinite 500 (une acquisition toutes les 2 secondes, $\lambda_{exc/em}$ = 470/530) ou un Tecan Spark (une acquisition par seconde, $\lambda_{exc/em}$ = 470/530). Les deux lecteurs ne possèdent pas de système d'injection mais

permettent le maintien à 37°C tout au long de l'expérience. L'ensemble des données sont transférées sur Excel. Le ratio de BRET est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Ratio de BRET} = \frac{\text{Luminescence de l'accepteur}}{\text{Bioluminescence du donneur}}$$

La normalisation du signal de BRET (en %) en fonction du signal basal est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Signal de BRET (\%)} = \frac{\text{Ratio de BRET}}{\text{Moyenne des ratios de BRET avant stimulation}}$$

Les données sont transférées sur GraphPad Prism 8 pour les analyses statistiques.

5.7.2. BRET en vidéo-microscopie

Les neurones sont transduits à DIV7 avec un lentivirus contenant le plasmide pWPT-NLuc-IL-1 β -YPet et cultivés en boîte 35 mm (Ibidi, 81156-400) spécialement conçue pour la vidéo-microscopie. Les cellules sont lavées une fois puis 400 μ L d'ACSF est ajouté dans la chambre de culture. Les champs neuronaux sont ensuite sélectionnés visuellement grâce à la fluorescence émise par l'excitation lumineuse de la YPet, en privilégiant un réseau peu dense, mais ramifié avec la présence d'épines dendritiques. 100 μ L d'ACSF contenant de la Furimazine est ajouté (dilution 1/160^e). Une acquisition de la bioluminescence de la Nano-luciférase est réalisée sur chaque champ afin de ne conserver uniquement ceux qui expriment le biosenseur. Le signal de BRET basal est enregistré pendant 5 minutes, constitué d'une acquisition de 10s de la bioluminescence de la NLuc suivi d'une acquisition de 10s de la luminescence de la YPet. Une stimulation des cultures par ajout de 500 μ L d'ACSF ou de KCl 50 mM contenant ou non 100 μ M de D-AP-5 est réalisée puis le signal de BRET est consécutivement enregistré pendant 10 min. Enfin, 50 μ M de NMDA sont ajoutés et l'enregistrement du signal de BRET poursuivi pendant 5 min. Toutes les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence dédié à l'acquisition de bioluminescence (Axiovert 200M, Carl Zeiss). L'acquisition des images est réalisée avec une caméra Evolve (Photometrics) équipée d'un détecteur EMCCD rétro-éclairé. Les paramètres d'acquisition séquentielle de la lumière émise à 450 et 535 nm sont 5 MHz, Em gain 200, avec respectivement, un filtre d'émission FF01-450/70-25 (Semrock) et HQ535/50 nm (No. 63944, Chroma). Les signaux sont acquis via le logiciel Metamorph® et sont traités sur le logiciel open-source Fiji grâce à un programme conçu par l'équipe du Dr. Perroy (Chastagnier *et al.*,

2018). Brièvement, le bruit de fond est soustrait sur l'ensemble de l'image puis toutes les acquisitions sont alignées dans le temps. Un seuil est déterminé pour discriminer le signal du bruit de fond. L'image du signal de l'accepteur est divisée par son image correspondante pour la bioluminescence du donneur, pixel par pixel. Enfin, des mesures ratiométriques sur la nouvelle image (obtenue par ratio de l'accepteur sur le donneur) sont effectuées. Les données sont ensuite exportées sur GraphPad Prism 8 pour l'analyse statistique.

5.7.3. Mesure du potentiel membranaire avec une sonde de voltage génétiquement encodée (GEVI)

Les neurones sont cultivés en boîte de 35 mm spécialement conçue pour la microscopie et sont transduites à DIV7 avec 0.2 μ L d'AVV contenant le plasmide codant pour l'expression de VARNAM. Entre DIV 13 et DIV 15, les cellules sont lavées une fois et incubées avec 400 μ L d'ACSF dans la chambre de culture. La fluorescence de VARNAM est enregistrée à 607 ± 35 nm après une excitation à 550 nm à l'aide de LED (15 mW/mm²), avec une fréquence d'acquisition d'images de 1000 Hz. Les enregistrements sont réalisés sur le même microscope que celui utilisé pour les acquisitions des signaux de BRET en vidéo-microscopie. Le $\Delta F/F$ est obtenu par ratio de la variation de la fluorescence émise par la GEVI sur la fluorescence basale, corrigé par ajustement linéaire à l'aide des moyennes quadratiques pour prendre en compte le photoblanchiment, selon la formule suivante :

$$\Delta F/F = \frac{F - Bdf}{\sqrt{\text{moyenne}(\text{fluorescence basale})^2}}$$

Avec : F : valeur de fluorescence mesurée à un temps donné ; Bdf : bruit de fond

Les données sont ensuite exportées sur GraphPad Prism 8.

5.7.4. Mesure de la variation de calcium intracellulaire avec une sonde calcique génétiquement encodée

Les HT-22 sont cultivées en plaque 96 puits et sont transduites avec 1 μ L d'AAV contenant le plasmide codant pour l'expression de la GCaMP6 + 5,5 μ L de Lentiblast (5 μ L de la solution A et 0.5 μ L de la solution B). 7 jours post-transduction, les cellules sont lavées une fois et incubées avec 50 μ L d'ACSF. La fluorescence de la GCaMP6 est enregistrée à 530 nm avec le lecteur de plaque Tecan Spark. Les cellules sont stimulées avec soit de l'ACSF, soit 50 μ M de NMDA. La stimulation contrôle est effectuée avec 0.05% de Triton. Le signal de fluorescence

obtenu est divisé par la moyenne de la fluorescence basale puis les données sont exportées sur GraphPad Prism 8.

5.7.5. Mesure de la fluorescence émise par la dégradation du Mca-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys (Dnp)-OH par THOP1

Dans une plaque 96 puits blanche, sont introduits en triplicatas 50 μ L de TN contenant 20 μ M de substrat (Mca-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys (Dnp)-OH), puis soit 50 μ L de TN, soit 50 μ L de TN dans lequel est dilué l'enzyme THOP1 pour une concentration finale de 0.5 ng/ μ L. La fluorescence est enregistrée à l'aide d'un lecteur de plaque Tecan Spark ($\lambda_{exc/em}$ = 320/405) préchauffé à 37°C, pendant 20 min.

5.8. Préparation des échantillons pour l'analyse par spectrométrie de masse

5.8.1. Biotinylation des échantillons

Les neurones corticaux sont cultivés en boîte 100 mm et transduits à DIV 7 avec un AVV contenant la construction pAAV-CW3SL-mIL-1 β -APEX2-P2A-Scarlet. A DIV 14, les cellules sont incubées 30 min à 37°C avec 7 mL d'ACSF contenant 500 μ M de Biotin Phenol (Iris biotech, LS-3500.0250). Après cette incubation, les neurones sont stimulés soit avec 100 μ M de D-AP-5 pendant 15 min soit avec 50 μ M de NMDA pendant 7 ou 15 min. 1 mM d'H₂O₂ est ajouté par boîte, pendant 1 min, pour déclencher la réaction de biotinylation. Les neurones sont ensuite lavés 3 fois avec une solution de quenching (10 mM d'azide de sodium, 10 mM d'ascorbate de sodium et 5 mM de Trolox (Sigma, 238813-5g)) afin de stopper la réaction. Les cellules sont lysées dans le tampon de lyse RIPA contenant la solution de quenching et des inhibiteurs de protéases et phosphatases. Les lysats sont récoltés et incubés 30 min sur glace avant une centrifugation à 16 000g pendant 10 min à 4°C. La fraction solubilisée est conservée et séparée en deux : une partie sera l'extrait total, utilisée pour une analyse par Western-Blot et l'autre servira à l'expérience de précipitation des protéines biotinylées.

5.8.2. Précipitation des protéines biotinylées

Des billes magnétiques couplées à de la streptavidine (150 μ L / boîte 100 mm) (Thermofisher, 88817) sont lavées 2 fois avec le tampon de lyse RIPA et une fois avec ce même tampon additionné d'inhibiteurs de protéases et phosphatases avant d'être incubées à 4°C sur la nuit dans les fractions solubles récoltées (cf. section précédente). Les billes sont ensuite lavées

successivement avec : 1 solution RIPA + inhibiteurs de protéases et phosphatases, 1 solution RIPA seul, 1 solution KCl 1M, 1 solution Na₂CO₃ 0.1M et 2 lavages en tampon RIPA. Entre chaque lavage, les tubes sont disposés sur un support aimanté afin de retenir les billes et d'enlever les surnageants. Enfin, les échantillons sont élués dans 40 µL de tampon de charge NuPage LDS sample buffer 2X additionné de DTT 10 mM et de biotine 2 mM, puis chauffés 10 min à 80°C avant d'être conservé à – 80°C. La biotine ajoutée dans le dernier détergent va entrer en compétition avec les protéines biotinylées retenues par la streptavidine. Lors de l'éluat, la biotine libre se lie à la streptavidine, permettant aux protéines de se retrouver dans l'éluat. L'analyse par spectrométrie de masse des échantillons est faite par la plateforme de protéomique de l'institut.

RÉSULTATS

6. Principaux modèles cellulaires utilisés dans cette étude

Avant de détailler les résultats obtenus au cours de mes travaux de recherches, les deux principaux modèles cellulaires utilisés pendant ce travail vont être présentés. Pour caractériser le biosenseur et valider la plupart des outils employés dans cette étude, nous avons travaillé avec un modèle de THP-1. Ces cellules sont des monocytes humains, pouvant être différenciées en macrophages, qui sont les principaux producteurs d'IL-1 β dans le système périphérique. Cette lignée immortalisée peut être conservée en culture pendant plus de 3 mois, sans diminution de l'activité cellulaire. Modèle simple, les THP-1 ont été largement utilisés dans de nombreuses études visant à comprendre l'impact de composés bactériens, tels que le LPS, sur la production de cytokines et l'initiation de l'inflammation. De la même manière, cette lignée cellulaire a permis de grandes avancées sur la compréhension cellulaire et moléculaire de l'inflammasome NLRP3, de la synthèse des différentes protéines le composant à la maturation de la caspase-1 et des cytokines associées telles que l'IL-1 β (pour revue (Chanput *et al.*, 2014)). Comme mentionné dans la section 2, la synthèse d'IL-1 β et de certains composants de l'inflammasome requiert un « priming » des cellules immunitaires via la stimulation des TLR, afin de permettre au deuxième signal de danger d'induire l'activation de l'inflammasome. Les THP-1, font toutefois exception à cette règle, car il a été montré que dans ces cellules l'étape de priming n'était pas nécessaire pour induire la synthèse de l'inflammasome. Seul le deuxième signal permettant l'assemblage et l'activation de la plateforme moléculaire est requis (Gritsenko *et al.*, 2020). Nous avons donc choisi de travailler sur ce modèle cellulaire pour étudier la maturation du biosenseur de l'IL-1 β , en l'absence de priming et donc de synthèse d'IL-1 β endogène.

D'autre part, l'ensemble de la caractérisation de l'IL-1 β neuronale a été effectuée sur des cultures primaires de neurones provenant de souriceaux âgés de P0 à P3 (Moutin *et al.*, 2020). Le protocole présente l'avantage de pouvoir sélectionner et cultiver la ou les régions cérébrales d'intérêts (hippocampe et cortex dans cette étude), selon les besoins mais aussi selon la quantité de matériel biologique nécessaire. De plus, ce protocole génère des cocultures neurones-cellules gliales permettant d'assurer la survie des cellules et d'établir un réseau neuronal actif. Enfin, il participe à la réduction du nombre d'animaux en accord avec la règle des 3R grâce à la conservation des femelles et l'utilisation de leurs portées après mise bas, puisque nous travaillons avec un modèle de culture post-natale. Par comparaison, les cultures embryonnaires impliquent l'euthanasie de la femelle gestante. Durant ces travaux, nous avons majoritairement travaillé sur des cultures de neurones d'hippocampe, en nous basant sur les données de la

littérature qui corrélient une action de l'IL-1 β sur la modulation des processus mnésiques et de la neuro-excitabilité. Ponctuellement, des cultures primaires de neurones corticaux ont été utilisées quand nous avons besoin d'une grande quantité de matériel biologique pour les expériences de protéomique.

7. Caractérisation du biosenseur de BRET de l'IL-1 β dans une lignée de THP-1

La construction du premier biosenseur de BRET de l'IL-1 β (Compan, Baroja-Mazo, Bragg, *et al.*, 2012) a permis une avancée majeure dans la visualisation spatio-temporelle de la maturation de cette cytokine au sein des macrophages. Avant mon arrivée dans l'équipe, le biosenseur a été amélioré en remplaçant le couple RLuc-Venus par le couple NLuc-YPet. Le changement du donneur et de l'accepteur d'énergie du biosenseur de BRET de l'IL-1 β , pouvant entraîner une modification des propriétés biologiques de ce dernier, il a été nécessaire de vérifier que ces améliorations n'impactent pas la maturation et la libération du biosenseur.

7.1. Expression et maturation du biosenseur par les THP-1

Dans un premier temps, nous avons souhaité savoir si la fusion de la NLuc et de la YPet, aux deux extrémités de l'IL-1 β , n'altérerait pas son clivage par la caspase-1. Ainsi, le biosenseur a été exprimé dans la lignée cellulaire de monocyte humain THP-1, grâce à une approche lentivirale. Le lentivirus contient l'ADNc codant pour le biosenseur, précédé d'un promoteur EF1 α , promoteur ubiquitaire permettant une expression constitutive de la protéine transgénique dans une large variété de cellules *in vitro*. Afin de visualiser la maturation de l'IL-1 β , le BRET a été mesuré sur des monocytes non primés pendant 5 min (signal basal) puis pendant 40 minutes après ajout soit d'ACSF (solution saline contrôle), soit de nigéricine, un activateur de l'inflammasome. Ce DAMP induit une diminution du signal de BRET, 15 min après la stimulation, pour atteindre 20% du signal basal (**figure 26**). Ce résultat est en accord avec les données obtenues précédemment avec l'ancienne version du biosenseur (Compan, Baroja-Mazo, Bragg, *et al.*, 2012). Le pré-traitement avec du MCC950, un inhibiteur de l'assemblage de l'inflammasome, abolie la diminution du signal de BRET observée après ajout de nigéricine. Ces données montrent que la fusion de la NLuc et de la YPet aux extrémités de l'IL-1 β n'entrave pas le clivage de la cytokine par la caspase-1.

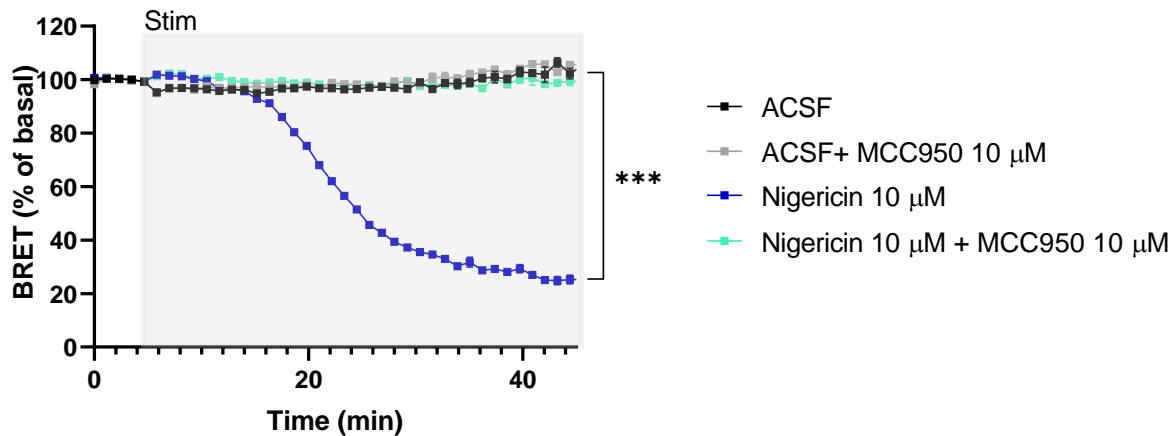


Figure 26 : Maturation du biosenseur de BRET de l'IL-1 β dans les THP-1

Le signal basal est enregistré pendant 5 min, puis les cellules sont stimulées par de l'ACSF (courbe noire), de l'ACSF + MCC950 10 μ M (courbe grise), de la nigéricine 10 μ M (courbe bleue) ou de la nigéricine 10 μ M + MCC950 10 μ M (courbe turquoise) et le signal de BRET post-stimulation est enregistré pendant 40 min. Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM, N=4 expériences indépendantes. Analyse statistique par le Two-way ANOVA et correction par le FDR. P-value : $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)

7.2. Libération du biosenseur par les macrophages : dosage ELISA et Western-Blot

Nous avons ensuite souhaité vérifier si la fusion du donneur et de l'accepteur de BRET pouvait altérer la libération de la forme mature de l'IL-1 β . Pour répondre à cette question, la présence de l'IL-1 β -YPet dans le surnageant a été analysée par dosage ELISA et par Western-Blot. Les THP-1 sont des cellules immunitaires humaines qui, de manière endogène, produisent, mûrissent et libèrent de l'IL-1 β lorsqu'elles sont activées par deux signaux de danger. Ainsi, sans LPS, il n'y a pas de synthèse d'IL-1 β puisque ce composé est responsable du priming des THP-1, considéré comme le premier signal de danger. De plus, dans nos expériences les cellules ne sont pas préalablement stimulées avec ce PAMP donc la synthèse de la cytokine n'a normalement pas lieu. Cependant, pour s'assurer de mesurer spécifiquement la maturation et la libération de l'IL-1 β -YPet et non de la forme endogène, nous avons exprimé la version murine du biosenseur et utilisé un kit ELISA qui reconnaît exclusivement cette espèce. La **figure 27A** présente la concentration d'IL-1 β (en pg/mL) mesurée dans le surnageant pour les différentes conditions expérimentales et la **figure 27B** présente le Western-Blot pour ces mêmes surnageants et leurs lysats cellulaires associés. Pour les cellules non transduites, aucune IL-1 β n'est détectée dans le surnageant, que ce soit par ELISA ou par Western-Blot et ce, même après activation de

l'inflammasome par la nigéricine. Dans les cellules transduites avec le biosenseur murin, nous pouvons confirmer l'expression de la forme précurseur du biosenseur par la présence de bandes à 80 kDa dans les lysats cellulaires, révélées avec des anticorps dirigés respectivement contre l'IL-1 β murin et la GFP (reconnaissant la YPet, panneau de droite, **figure 27B**). Une stimulation avec de la nigéricine pendant 45 min entraîne une libération d'IL-1 β -YPet d'environ 860 pg/mL (**figure 27A**). Cette libération est également détectée en Western-Blot par la présence d'une bande de forte intensité à 45 kDa dans les surnageants (panneau de gauche, **figure 27B**), confirmant la libération de la forme mature. Cette même bande, de plus faible intensité, est aussi présente au niveau des lysats cellulaires, ainsi qu'une autre bande vers 58 kDa. La présence de deux bandes (45 kDa et 58 kDa) s'explique par l'existence simultanée de différentes formes d'IL-1 β clivée. En effet, cette cytokine est clivée au niveau de l'Asp26 et Asp116 et les deux bandes peuvent indiquer qu'une fraction du biosenseur a été clivée que sur un des deux sites. De plus, la présence résiduelle d'IL-1 β -YPet mature dans les lysats s'explique par un clivage et une libération continue de la cytokine par les cellules immunitaires dont l'inflammasome a été activé. En revanche, aucune libération d'IL-1 β -YPet n'est détectée par ces deux techniques dans les THP-1 transduites et stimulées pendant 45 min avec de l'ACSF ou prétraitées avec du MCC950 pendant 15 min. Ces résultats sont concordants avec ceux attendus car l'ACSF, une solution saline, n'est pas un signal de danger pour les cellules et le MCC950 inhibe l'assemblage de l'inflammasome responsable de la maturation de l'IL-1 β . Ainsi la présence de la YPet et de la NLuc n'altère pas la maturation et la libération de l'IL-1 β dans les THP-1.

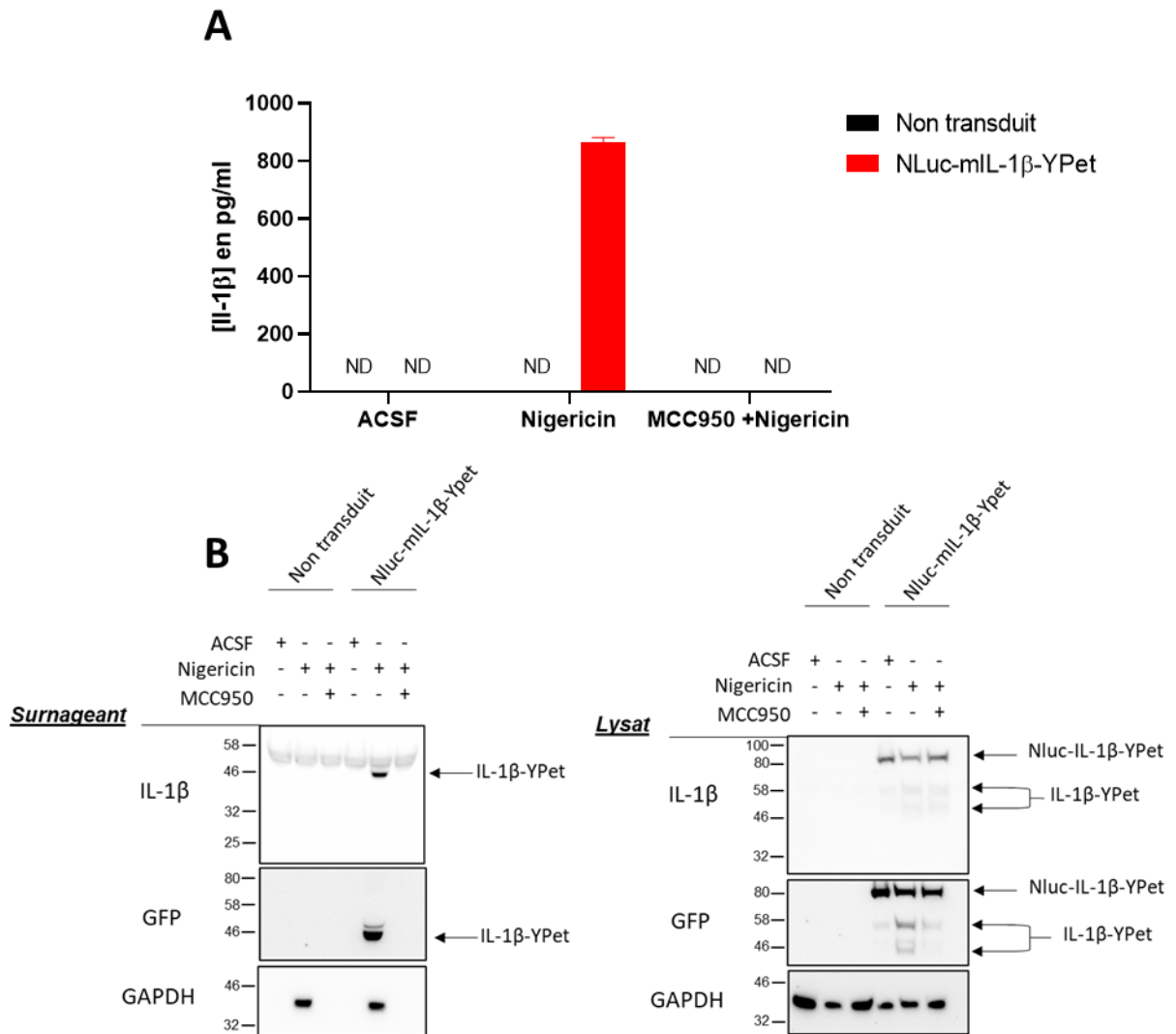


Figure 27 : Analyse de la maturation et de la libération d'IL-1β-YPet par ELISA et Western-Blot induite chez les THP-1 après activation de l'inflammasome par la nigéricine

A : Graphique représentant la concentration d'IL-1β (en pg/mL) mesurée par ELISA dans le surnageant des cellules exprimant ou non le biosenseur murin de l'IL-1β en fonction des différents traitements (ACSF, nigéricine 10 μM ou MCC950 10 μM + nigéricine 10 μM). ND : Non Détecté. **B** : Western Blot réalisés sur les surnageants et les lysats cellulaires des THP-1 exprimant ou non le biosenseur murin de l'IL-1β. Les membranes obtenues sont incubées avec un anticorps dirigé contre l'IL-1β murin (panneau du haut), contre la GFP (panneau central) pour révéler la présence du biosenseur sous forme précurseur ou clivé ou contre la GAPDH (panneau du bas) qui est un contrôle de charge pour s'assurer que la même quantité de protéine ait été introduite dans le gel. Les données sont représentées par la moyenne ± SEM, N=4 expériences indépendantes.

7.3. Bioactivité de la forme mature du biosenseur BRET de l'IL-1 β : dosage indirect par HEK-Blue

Bien que la maturation et la libération de l'IL-1 β ne soient pas entravées par la présence du donneur et de l'accepteur d'énergie, il est nécessaire de savoir si, la YPet présente sur la partie C-terminale de la cytokine pourrait inhiber la bio activité de l'IL-1 β . En effet, la forme mature de la cytokine fait 17 kDa. Cependant la YPet, possédant une taille de 27 kDa, pourrait empêcher la liaison de l'IL-1 β à son récepteur par encombrement stérique ou modification conformationnelle de la protéine. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé le système appelé HEK-Blue™ IL-1R, développé par Invivogen. Brièvement, ces cellules HEK expriment, de manière stable, les récepteurs à l'IL-1 murin et humain ainsi que la SEAP (Secreted Alkaline Phosphatase). L'expression de cette dernière est sous le contrôle du promoteur minimal de l'interféron β fusionné à cinq sites de liaisons de NF- κ B et cinq sites de liaisons de AP-1. Suite à leur activation, les récepteurs à l'IL-1 induisent la voie de signalisation dépendante de MyD88, conduisant à la production des facteurs de transcriptions NF- κ B et AP1. Ces facteurs de transcriptions interagissent avec leurs sites de liaisons respectifs et entraînent la production et la sécrétion de la SEAP, qui sera alors dosée grâce à un kit colorimétrique appelé Quanti-Blue™ (**figure 28A**). Ce système est conçu pour détecter les formes bioactives de l'IL-1 β humaine et murine, les formes immatures de la cytokine ne pouvant pas activer les récepteurs à l'IL-1.

Cette approche permet de détecter la présence d'IL-1 β mature dans une gamme allant de 0.1 à 100 pg/mL (**figure 28B**). En effet seule la partie linéaire de la gamme étalon permet une quantification précise de la concentration d'IL-1 β bioactive dans les surnageants. Nous considérerons donc l'IL-1 β comme non détectable pour des concentrations inférieures à 0.1 pg/ml.

Afin de vérifier la bio-activité du biosenseur de BRET, les mêmes expériences que celles présentées dans la section 7.2 ont été réalisées. Sur les cellules non transduites, quel que soit le traitement effectué, aucune IL-1 β bioactive n'est détectée. Des résultats similaires sont observés par l'ajout d'ACSF sur des cellules exprimant le biosenseur. Sur ces mêmes cellules, une stimulation avec de la nigéricine pendant 45 minutes est suffisante pour détecter l'IL-1 β -YPet bioactive (environ 0.5 pg/mL ; **figure 28C**). En revanche, sur des THP-1 exprimant le biosenseur, une stimulation avec de la nigéricine, précédée d'un traitement au MCC950 pendant 15 minutes bloque cette libération car aucune IL-1 β bioactive n'est détectée. Ainsi, l'ajout de la YPet en position C-terminale de l'IL-1 β n'altère pas la bio-activité de la cytokine mature, libérée

dans le milieu extracellulaire. Nous ne pouvons néanmoins, pas affirmer que la fusion de la protéine fluorescente n'engendre pas de changements conformationnels du biosenseur. Pour répondre à cela, il aurait fallu réaliser les mêmes expériences sur des cellules exprimant l'IL-1 β non fusionnée à la YPet et comparer les mesures de bio activité avec les résultats obtenus sur les THP-1 exprimant le biosenseur. Cependant, l'ensemble des résultats présentés montre que les sites de clivages de la caspase-1 ainsi que les sites de liaisons au récepteur à l'IL-1 ne sont que peu ou pas altérés.

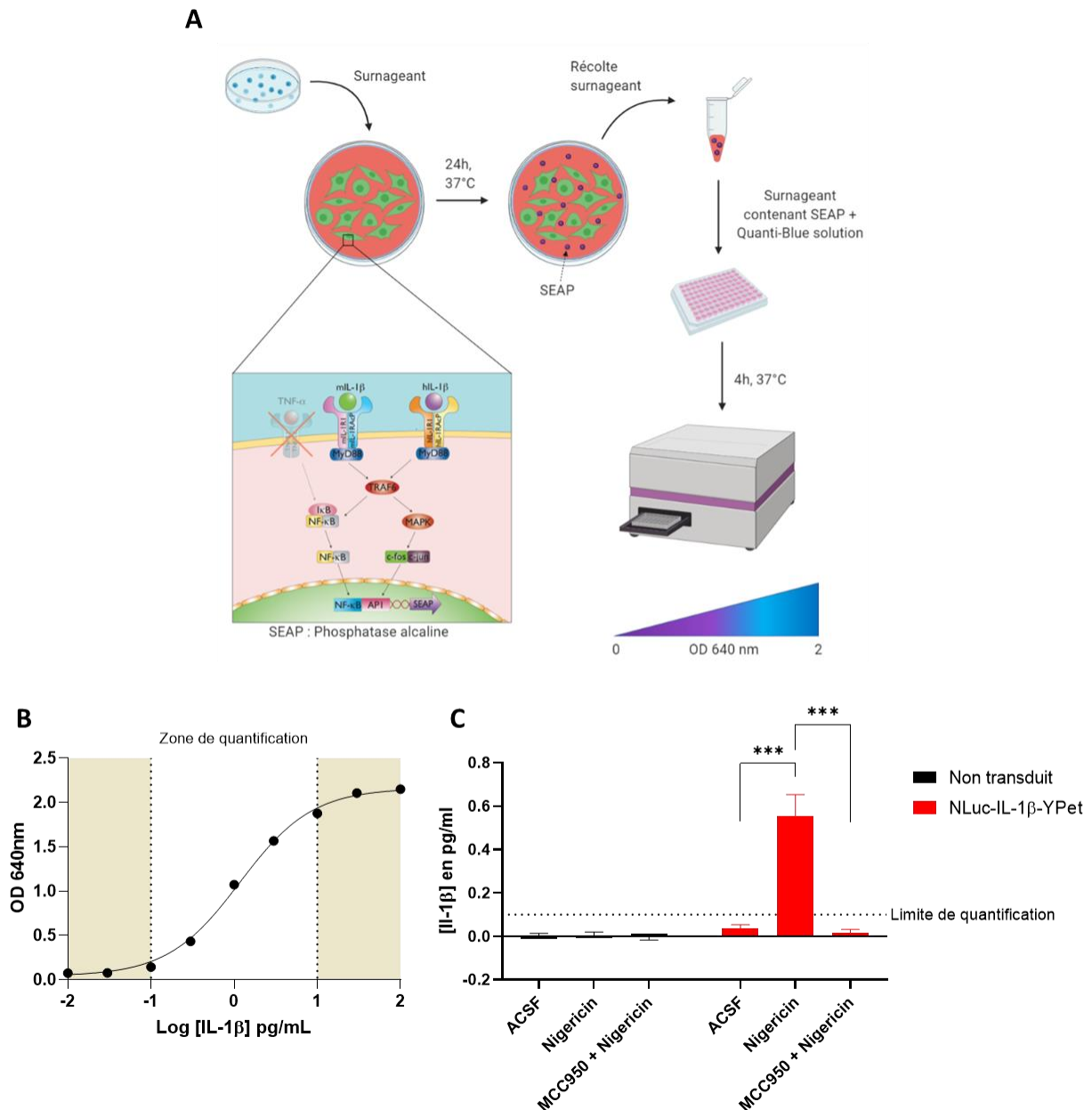


Figure 28 : Détermination de la bio activité du biosenseur de BRET de l'IL-1 β après maturation et libération par les THP-1

A : Schéma récapitulatif de la technique HEK-Blue™ IL-1R. Les surnageants des monocytes traités, contenant l'IL-1β libérée sont incubés sur des HEK-Blue™ pendant 24h à 37°C. Le surnageant des HEK est ensuite récolté, puis incubé en plaque 96 puits 4h à 37°C avec une solution de Quanti-Blue™, et l'absorbance est mesurée à 640 nm. **B** : Graphique représentant l'absorbance de la SEAP à 640 nm en fonction du logarithme de la concentration d'IL-1β (en pg/mL). La gamme étalon possède une zone de quantification dans laquelle l'absorbance mesurée permet de quantifier la quantité de cytokine bioactive. Au-dessus, la concentration est saturante, en-dessous, la concentration se confond avec le bruit de fond. **C** : Graphique représentant la quantité d'IL-1β bioactive (en pg/mL) libérée par des THP-1 non transduites ou exprimant le biosenseur de BRET et stimulées avec de l'ACSF ou 10 μM de nigéricine, prétraitées ou non de 10 μM de MCC950. N=8, résultats présentés sous forme de moyenne ± SEM. Analyse statistique two-way ANOVA + correction avec le False Discovery Rate. P-value : $p < 0.05$ (*) ; $p < 0.01$ (**) ; $p < 0.001$ (***)).

8. Synthèse, maturation et libération d'IL-1 β par les neurones

L'objectif de cette section est de déterminer si les neurones peuvent synthétiser, maturer et libérer de l'IL-1 β mature et si cette dernière est bioactive.

Comme mentionné dans l'introduction, en condition inflammatoire dans le SNC, l'IL-1 β est majoritairement produite par la microglie et par les astrocytes. En condition physiologique, cette cytokine possède de nombreuses activités modulatrices de la neuro-excitabilité mais aucune étude n'a mis en évidence la production de cette cytokine. Seuls quelques travaux ont suggéré une possible expression d'IL-1 β et une synthèse *de novo* lors d'une LTP dans les neurones hippocampiques de rat (Breder *et al.*, 1988 ; Lechan *et al.*, 1990 ; Watt & Hobbs, 2000). Basé sur ces évidences, nous avons recherché si les neurones hippocampiques pouvaient synthétiser de l'IL-1 β , ce qui pourrait expliquer les effets de cette cytokine sur la plasticité synaptique. Pour cela, nous avons opté pour une nouvelle approche d'hybridation *in-situ* plus spécifique et plus sensible que l'hybridation classique : le RNAscope.

8.1. Etude de la synthèse neuronale d'IL-1 β endogène

Les expériences présentées dans la section 8.1 ont été réalisées par Valentin Garcia, sous la supervision de Hélène Hirbec, deux membres de l'équipe.

8.1.1. ARN messenger et RNAscope

L'objectif de cette partie est de démontrer la capacité des neurones pyramidaux de l'hippocampe à synthétiser de l'IL-1 β par une technique d'hybridation *in situ* appelée RNAscope. Elle permet de visualiser, localiser et quantifier spatialement l'expression d'ARN au niveau cellulaire tout en préservant la structure tissulaire. La quantification repose sur l'hybridation et l'amplification, avec des marqueurs fluorescents, d'une paire de sondes en double Z, conçues pour cibler spécifiquement l'ARN sélectionné (schéma récapitulatif ; **figure 29A**) (F. Wang *et al.*, 2012).

Avant de déterminer si les neurones expriment l'ARNm de l'IL-1 β , nous avons voulu valider les sondes reconnaissant l'ARNm de cette cytokine (appelées « sonde IL-1 β ») dans des cellules immunitaires. Ainsi, des macrophages primaires (BMDM pour Bone Marrow Derived Macrophages) en culture ont été stimulés pendant 2h avec du LPS (1 μ g/mL), un PAMP initiant la transcription du gène de l'IL-1 β , ou avec une solution saline. Ensuite, ces cellules ont été

incubées avec les sondes spécifiques pour l'ARNm de l'IL-1 β , puis un processus d'amplification de signal a été réalisé afin de rendre visible lesdites sondes. En complément de cette technique, un marquage des noyaux cellulaires au DAPI a été réalisé (**figure 29B**). Les images obtenues montrent une absence de marquage pour les cellules non stimulées. En revanche, certains BMDM sont marqués après une stimulation au LPS pendant 2h suggérant fortement que les sondes IL-1 β reconnaissent bien l'ARNm de cette cytokine.

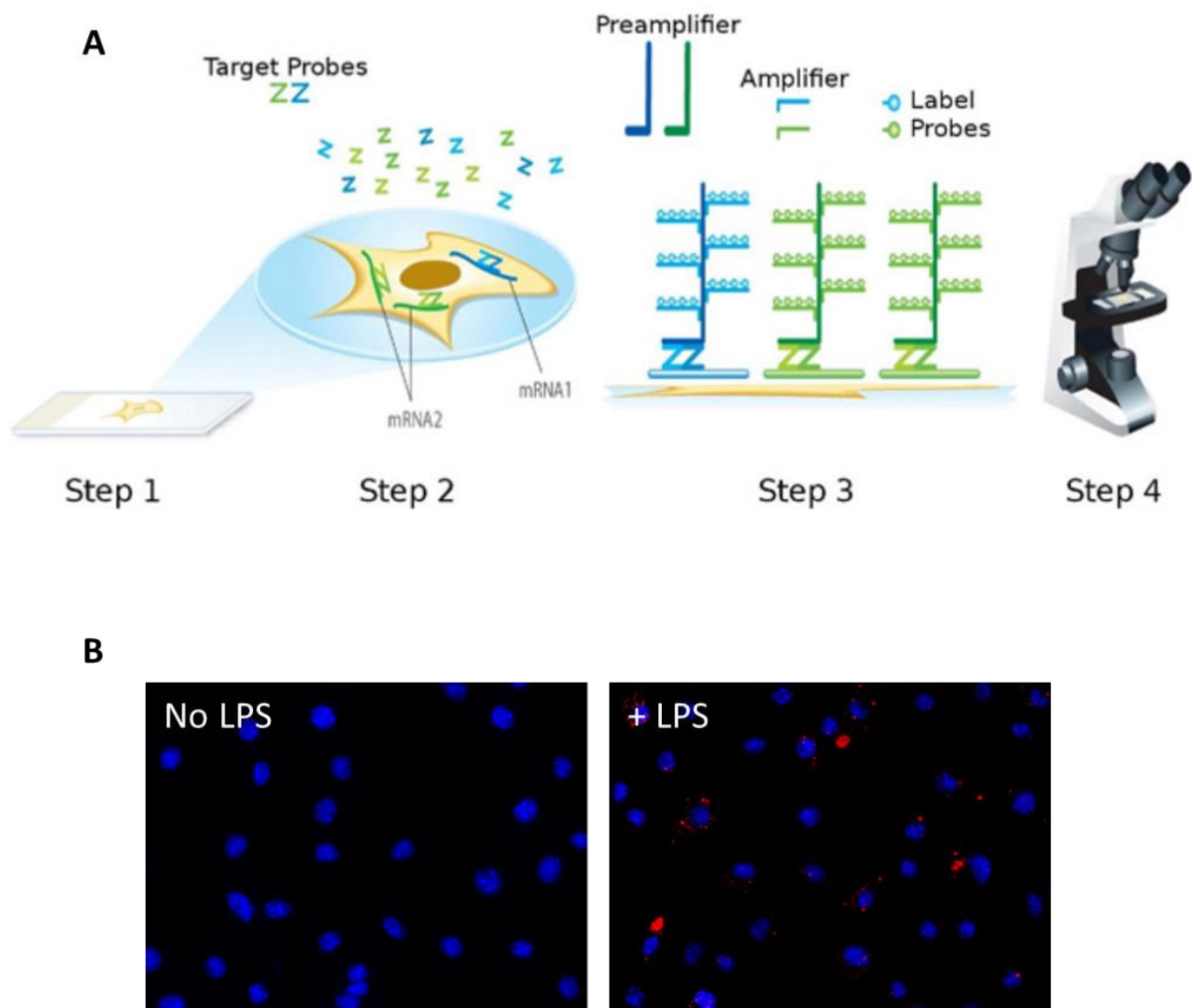


Figure 29 : Validation des sondes reconnaissant l'ARNm de l'IL-1 β par RNAscope

A : La première étape consiste à fixer et perméabiliser les cellules pour permettre la pénétration des sondes. Dans la deuxième étape, les sondes spécifiques d'un ARN s'hybrident en paires sur les multiples ARN cibles. Dans la troisième étape, plusieurs molécules d'amplification du signal sont hybridées, chacune reconnaissant une sonde cible spécifique, et chaque sonde de marquage unique est conjuguée à un fluorophore ou une enzyme différente. À l'étape 4, les signaux sont détectés à l'aide d'un microscope (d'après Wang *et al.*, 2012). **B** : Marquage RNAscope de l'IL-1 β grâce à une sonde spécifique (points rouge) et contre-marquage au DAPI des noyaux cellulaires (bleu) de macrophages non stimulés (panneau de gauche) ou stimulés avec 1 μ g/mL de LPS pendant 2h (panneau de droite).

8.1.2. Synthèse d'ARNm d'IL-1 β neuronal

Une fois la sonde IL-1 β validée sur macrophages, nous avons souhaité savoir si les neurones pyramidaux de l'hippocampe exprimaient l'ARNm de l'IL-1 β . Pour répondre à la question, des tranches aigües d'hippocampe provenant de souris Thy1-GFP (mutation génétique permettant une expression éparse et aléatoire de la GFP dans des neurones pyramidaux pour faciliter la reconstruction et l'analyse d'image) ont été incubées avec les sondes spécifiques pour l'ARNm de l'IL-1 β , puis un processus d'amplification de signal a été réalisé afin de rendre visible lesdites sondes. La spécificité du RNAscope est telle que, théoriquement, un point équivaut à une molécule d'ARNm (F. Wang *et al.*, 2012). En complément de cette technique, une immunohistochimie a été réalisée sur les tranches pour révéler l'expression de la GFP, ainsi qu'un contremarquage des noyaux cellulaires au DAPI (bleu ; **figure 30A**). L'utilisation de la sonde RNAscope de l'IL-1 β permet de mettre en évidence la présence d'un marquage ponctiforme au niveau du *stratum pyramidale* de l'aire CA1 de l'hippocampe (**figure 30B**). Ce marquage est plus faible lorsque les tranches sont incubées avec une sonde négative, sonde reconnaissant un ARN provenant d'une bactérie présente dans le sol (**figure 30C**). L'ensemble de ces données confirment la présence d'IL-1 β au sein de l'hippocampe en condition physiologique.

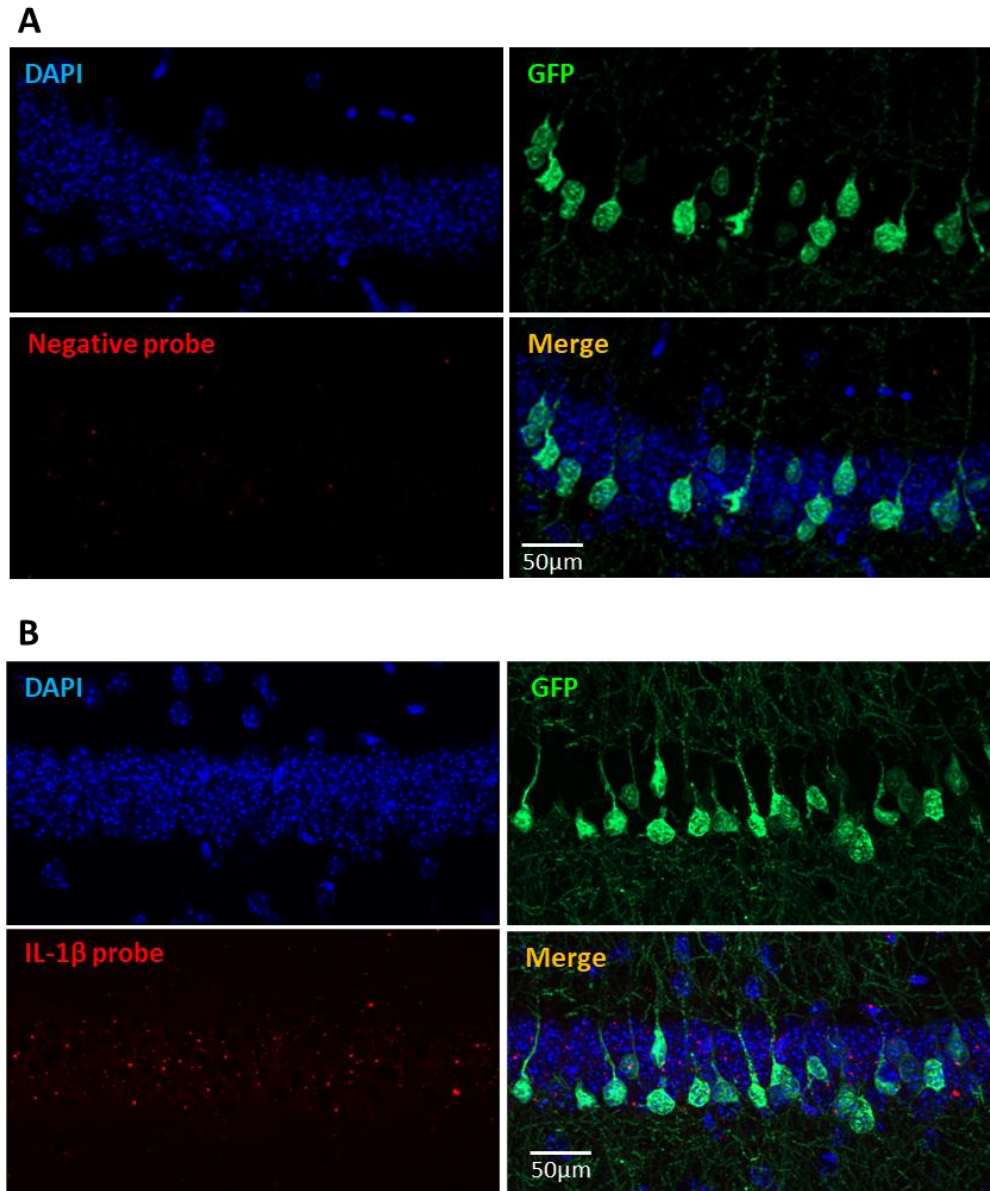


Figure 30 : RNAscope et immunohistochimie sur tranches aiguës d'hippocampe de souris Thy1-GFP

Marquage RNAscope (en rouge) d'un ARN non spécifique (sonde négative ; **A**) ou de l'IL-1 β grâce à une sonde spécifique (IL-1 β probe ; **B**) et marquage immunohistochimique de la GFP exprimée aléatoirement par les neurones pyramidaux de l'hippocampe (vert) de l'aire CA1. Les noyaux cellulaires sont marqués avec du DAPI (bleu). Le merge correspond à l'assemblage des 3 images précédentes.

Nous avons cherché à déterminer si le marquage ponctiforme obtenu sur les tranches aiguës d'hippocampe, représentant les molécules d'ARNm de l'IL-1 β , est présent au sein des neurones. Le *stratum pyramidale*, bien que constitué des corps cellulaires neuronaux, est aussi composé de cellules gliales. Ainsi, l'acquisition d'image est suivie d'un travail de reconstruction en 3 dimensions sur le logiciel IMARIS (Oxford instrument[®]). Les images

8.2. Données préliminaires : caractérisation de la régulation transcriptionnelle de l'IL-1 β à l'aide d'un rapporteur fluorescent

8.2.1. Visualisation de l'activité du promoteur de l'IL-1 β à l'aide d'un rapporteur fluorescent : la GFP

8.2.1.1. Validation de la construction promoteur-IL-1 β -GFP

D'après la littérature, la mise en place d'une LTP et les expériences comportementales d'apprentissage entraînent une augmentation de l'expression d'ARNm de l'IL-1 β dans l'hippocampe (Depino *et al.*, 2004 ; Schneider *et al.*, 1998). L'objectif de cette partie consiste à visualiser cette augmentation d'expression, sur de courts temps après stimulation des cellules, avec l'utilisation d'un rapporteur fluorescent : la GFP. Cette protéine a été insérée dans deux plasmides, le premier contenant un promoteur ubiquitaire EF1 α et le deuxième muni du promoteur minimal de l'IL-1 β (Iwawaki *et al.*, 2015). Pour valider cette approche, ces constructions ont été exprimées dans des macrophages par transduction avec des lentivirus. Les cellules ont ensuite été stimulées avec du LPS (1 μ g/mL) pendant 4h et un marquage immunocytochimique a été réalisé pour révéler l'expression de la GFP (vert) ainsi qu'un contre-marquage des noyaux cellulaires au DAPI (bleu ; **figure 32**). Les images obtenues montrent que la GFP sous le contrôle du promoteur EF1 α (**figure 32A**) s'exprime, indépendamment de la stimulation au LPS, puisque ce promoteur n'est pas soumis au priming. En revanche, lorsque la GFP est sous le contrôle du promoteur de l'IL-1 β (**figure 32B**), son expression est très faible en condition basale puis augmente fortement lorsque les cellules sont stimulées au LPS. Ces résultats valident la construction du rapporteur d'activité transcriptionnelle du promoteur de l'IL-1 β .

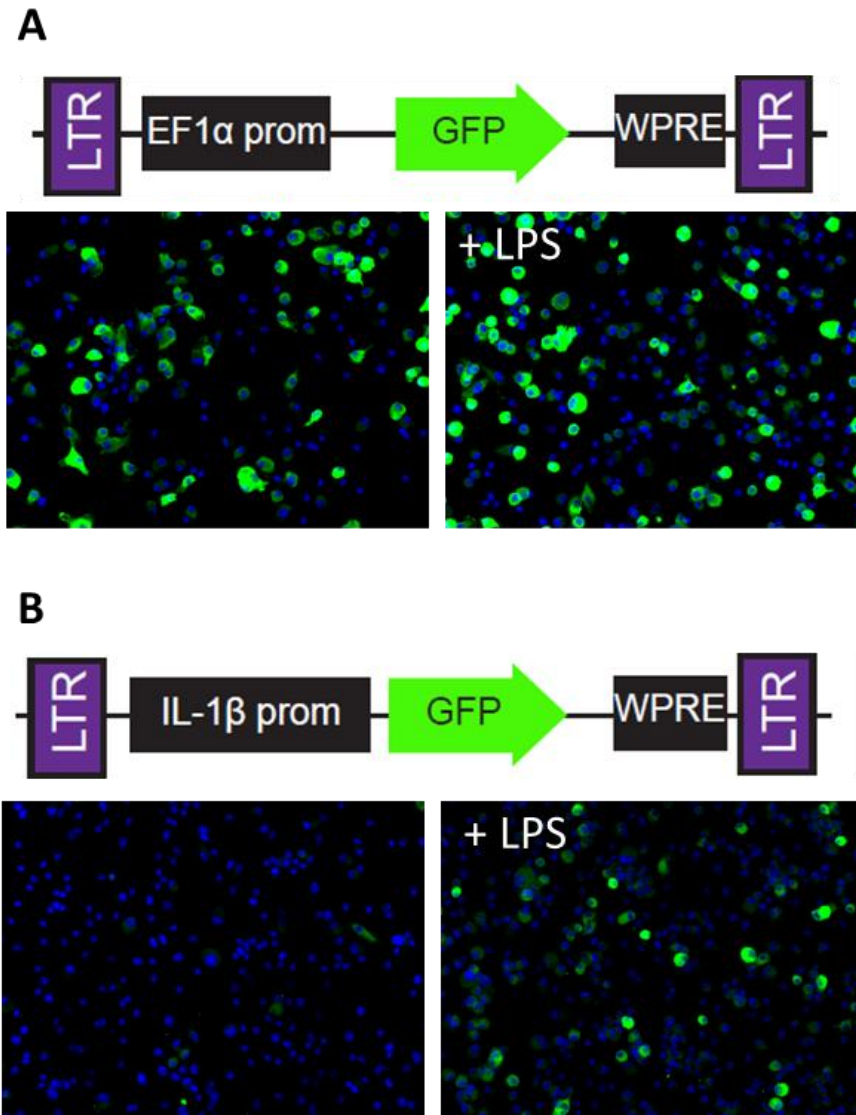


Figure 32 : Expression et validation de la construction promoteur-IL-1 β -GFP dans des macrophages

A et B : Immunocytochimie de macrophages exprimant soit la construction promoteur EF1 α -GFP (**A**) soit la construction promoteur IL-1 β -GFP (**B**) en condition basale (panneaux de gauche, marquage vert) et stimulés avec du LPS (1 μ g/mL) pendant 4h (panneaux de droite, même marquage). Un marquage des noyaux cellulaires avec du DAPI (bleu) permet de vérifier l'expression de ces constructions dans les cellules.

8.2.1.2. Activité du promoteur de l'IL-1 β dans des neurones d'hippocampe

De la même manière que pour les macrophages, la séquence codante pour l'expression de la GFP sous le contrôle du promoteur de l'IL-1 β a été exprimée par approche lentivirale, dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe. Ces dernières ont été stimulées 5 min avec de l'ACSF ou du KCl₅₅ (solution entraînant une dépolarisation massive des neurones), puis remises en milieu de culture pendant 15 à 30 min avant fixation. Des marquages immunocytochimiques ont été réalisés pour révéler l'expression de la GFP (vert), de MAP2 (rouge), une protéine du cytosquelette exclusive des neurones matures, et de GFAP (violet ; **Figure 33A-B**), une protéine spécifique des astrocytes. Les images obtenues montrent que la GFP s'exprime en condition basale (ACSF) et que certains neurones en condition KCl₅₅ semblent avoir une fluorescence verte plus intense (**figure 33A**). De manière intéressante, la colocalisation entre le marquage GFP et MAP2 suggère que, dans nos conditions expérimentales, le promoteur de l'IL-1 β n'est actif que dans les neurones. En effet, aucune colocalisation des marquages GFP et GFAP n'est observée. La fluorescence de la GFP semble en moyenne plus élevée à 15 min après stimulation au KCl₅₅, par rapport à une stimulation ACSF (**figure 33C**). Cependant, 30 min post-stimulation, la fluorescence entre les deux conditions est identique (**figure 33B et D**). Ces données préliminaires obtenues sont le fruit d'une seule expérience, ce qui pourrait expliquer l'absence de différence statistique observée ainsi que l'important écart-type présent dans le jeu de données à 30 min. Néanmoins, ces résultats révèlent aussi une transcription basale du promoteur de l'IL-1 β dans les neurones. Pour rappel, l'objectif *in fine*, est de visualiser l'expression du reporter fluorescent sur de courts temps après stimulations (de l'ordre de 10 à 15 min). Or, le temps de maturation de la GFP est de 25 min, donc trop lent pour notre objectif. Nous avons décidé d'adopter une nouvelle stratégie.

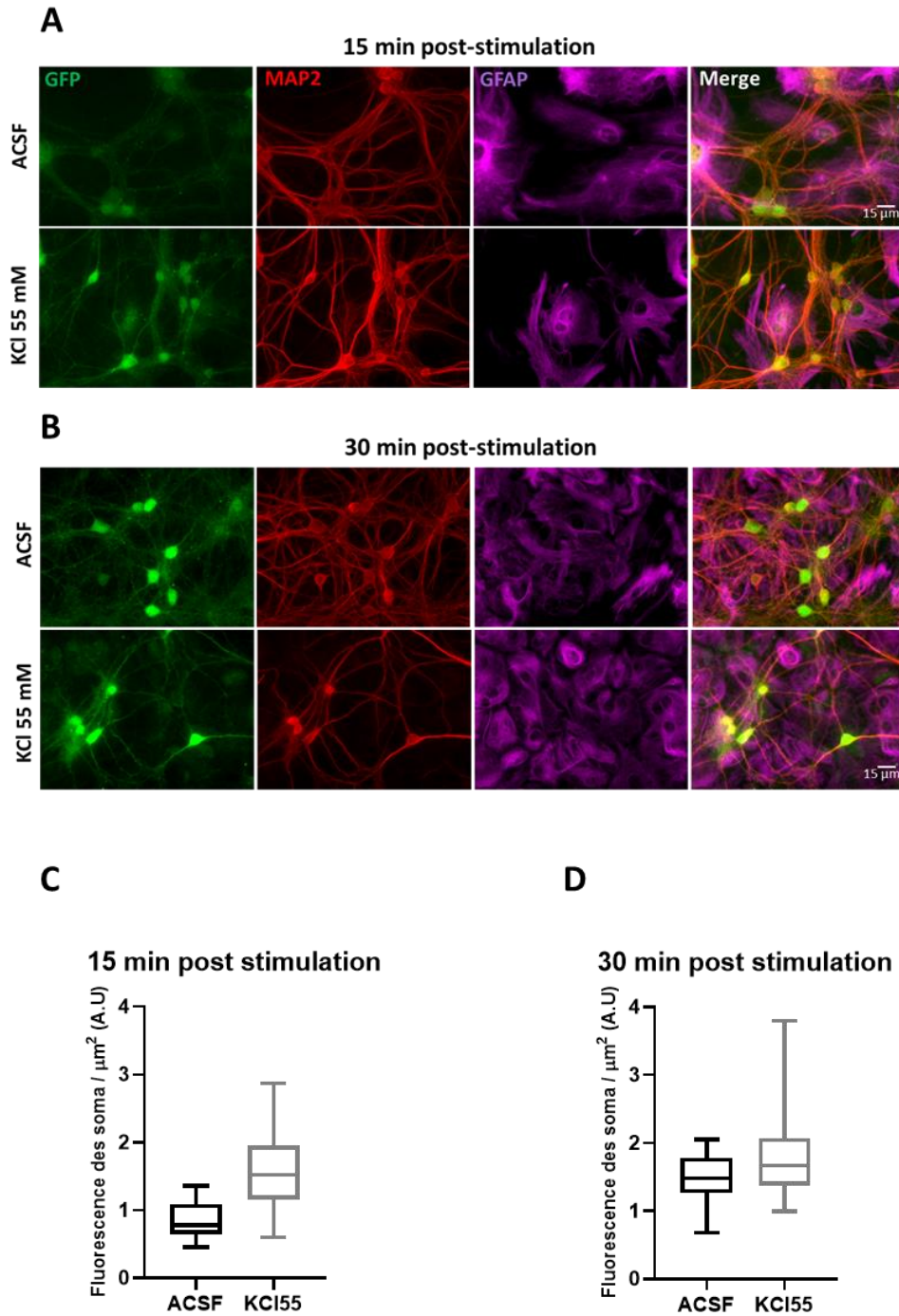


Figure 33 : Activité transcriptionnelle de la construction promoteur-IL-1 β -GFP dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe

A-B : Immunocytochimie sur des cultures de neurones primaires d'hippocampe exprimant la construction promoteur-IL-1 β -GFP, stimulées 5 min avec soit de l'ACSF (panneaux du haut) soit du KCl 55 mM (panneaux du bas) puis réincubées avec de l'ACSF pendant 15 min (**A**) ou 30 min (**B**). Pour montrer l'expression spécifique de cette construction dans les neurones, des marquages GFP (vert), MAP2 (rouge) et GFAP (violet) ont été réalisés. **C-D** : Quantification des marquages GFP sur des somas par rapport à la surface cellulaire (en μm^2). Ces mesures ont été réalisées à 15 min post-stimulation (**C**) et 30 min post-stimulation (**D**). Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM, N=1.

8.2.2. Visualisation de l'activité du promoteur de l'IL-1 β à l'aide d'un reporteur fluorescent : la mNeogreen

Pour mesurer l'activité du promoteur de l'IL-1 β à des temps courts, nous avons donc décidé de changer de reporteur et d'opter pour une protéine dont le temps de maturation est de 10 min : la mNeogreen. L'ADNc de la mNeogreen a été insérée à la place de la GFP, en aval du promoteur de l'IL-1 β . Afin de valider la construction, cette dernière a été exprimée, par approche lentivirale, dans une culture de THP-1. A la différence des précédentes expériences conduites sur les THP-1 pour lesquelles nous analysons la maturation de l'IL-1 β , nous cherchons ici à visualiser un mécanisme associé à la synthèse de la cytokine. Ainsi, nous avons voulu nous assurer que cette lignée active tous les mécanismes cellulaires pour permettre la synthèse d'IL-1 β en grande quantité, et par conséquent, nous permettre de visualiser l'activité du promoteur de l'IL-1 β conduisant à cette synthèse. De ce fait, les THP-1 ont été différenciées en macrophages par ajout de PMA (Phorbol-12-mystirate-13-acetate) pendant 30 min avant de subir l'étape de priming par exposition à du LPS à 1 μ g/mL pendant 1 à 4h. Un immunomarquage de la mNeogreen (vert) ainsi qu'un contremarquage des noyaux des cellules avec le DAPI (bleu) ont été réalisés (**figure 34A**). La quantification du marquage (**figure 34B**) révèle une expression de la mNeogreen en en absence de LPS, que ce soit directement après la différenciation des THP-1 (condition PMA) ou après différenciation et incubation pendant 4h avec du milieu de culture (condition PMA + RPMI). La quantification de la fluorescence moyenne pour les différents temps de stimulation au LPS ne démontre pas de différences marquant avec les conditions sans LPS. Ces résultats nous laissent penser que l'ajout de PMA pourrait être considéré par les cellules comme un signal de danger capable d'activer le promoteur de l'IL-1 β et entraîner la synthèse de la mNeogreen à l'instar du LPS. Si tel est le cas, ces différents traitements génèrent des macrophages activés et expliqueraient pourquoi aucune différence n'est observée dans les différentes conditions. Pour vérifier cette hypothèse, il aurait fallu quantifier la pro-IL-1 β présente dans les cellules et comparer ces résultats avec la quantification de la fluorescence de la mNeogreen. Concrètement, la construction codant pour l'expression de la mNeogreen sous le contrôle du promoteur de l'IL-1 β n'a pas pu être validée dans les macrophages.

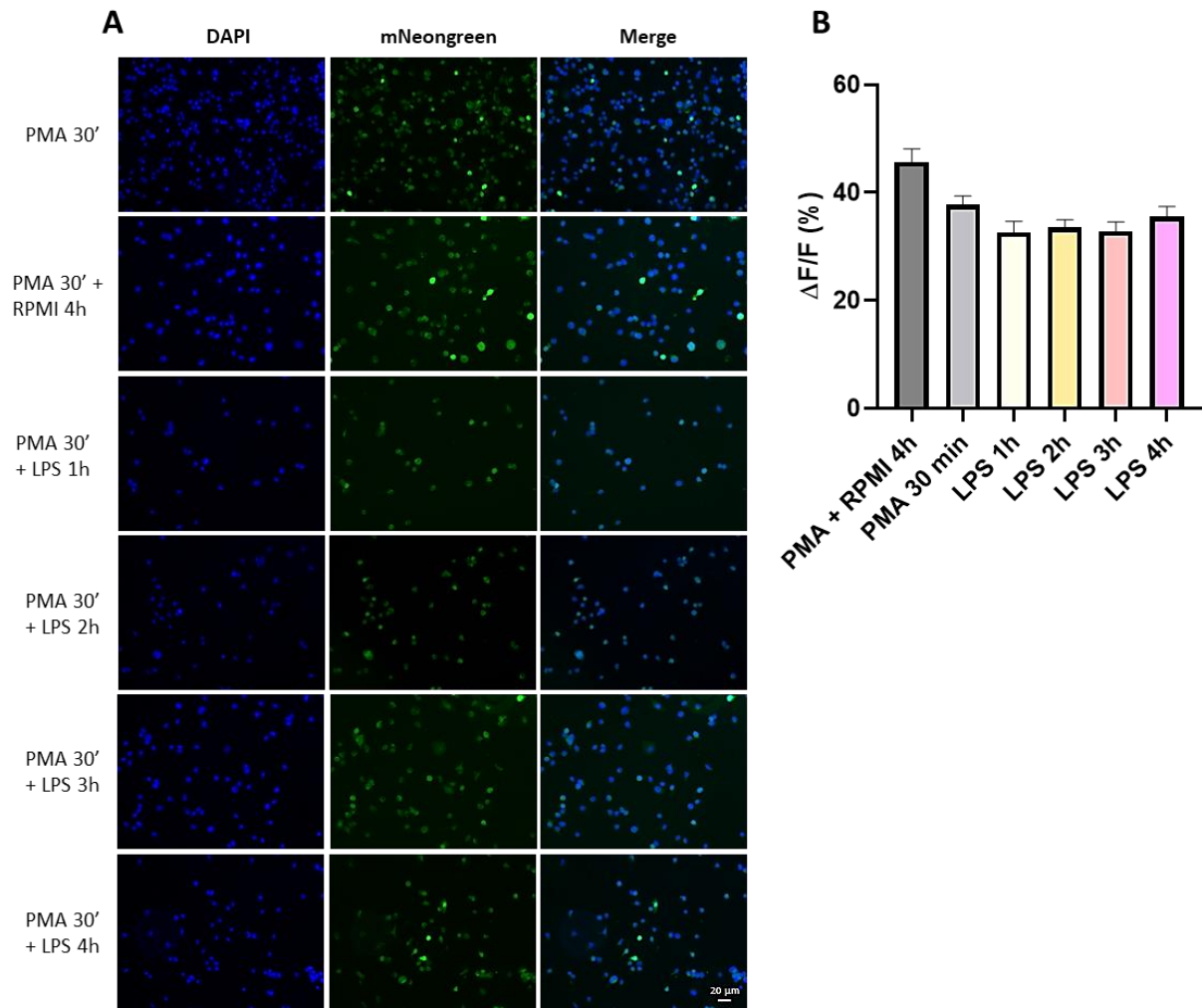


Figure 34 : Visualisation de l'activité transcriptionnelle du promoteur de l'IL-1 β à l'aide d'un reporteur fluorescent la mNeogreen

A : Immunocytochimie des THP-1 exprimant la mNeogreen (marquage vert). Le noyau des cellules est détecté avec du DAPI (marquage bleu). **B** : Quantification de la fluorescence émise par l'amplification de la mNeogreen en fonction des différentes conditions expérimentales. Le $\Delta F/F$ représente la variation de la fluorescence des cellules par rapport à la fluorescence basale. N=1.

8.3. Caractérisation de l'expression et de la maturation de l'IL-1 β dans les neurones à l'aide du biosenseur BRET de l'IL-1 β

8.3.1. Validation de la spécificité d'expression cellulaire du biosenseur en fonction du promoteur utilisé

Le biosenseur de BRET de l'IL-1 β a été créé pour étudier la maturation de cette cytokine dans différents types cellulaires. Dans cette optique, la construction a été insérée dans deux plasmides pour que son expression soit sous le contrôle d'un promoteur GFAP (expression spécifique dans les astrocytes) ou d'un promoteur CaMKIIa (promoteur spécifique des neurones excitateurs ; **figure 35A**). Ces constructions ont été transduites dans des cultures primaires de neurones par approche lentivirale. Des marquages immunocytochimiques ont été réalisés pour révéler l'expression de la YPet grâce à un anticorps anti-GFP (marquage vert) et de PSD95, une protéine de la post synapse exclusivement présente dans les neurones (rouge ; **figure 35B**). Les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI (bleu). Les images obtenues démontrent la présence du marquage GFP dans les neurones pour la construction exprimant le promoteur CaMKIIa, grâce à la détection de PSD95 qui nous permet d'identifier ce type cellulaire. Pour la construction possédant le promoteur GFAP, le marquage GFP associé se trouve dans des cellules dont la morphologie est similaire à celle des astrocytes. Ces résultats démontrent que l'expression dans les astrocytes ou les neurones est spécifique en fonction du promoteur choisi et valident nos constructions. Ainsi, pour la suite de l'étude, les protéines transgéniques seront spécifiquement exprimées dans les neurones excitateurs en culture grâce au promoteur CaMKIIa placé en amont de la séquence codante.

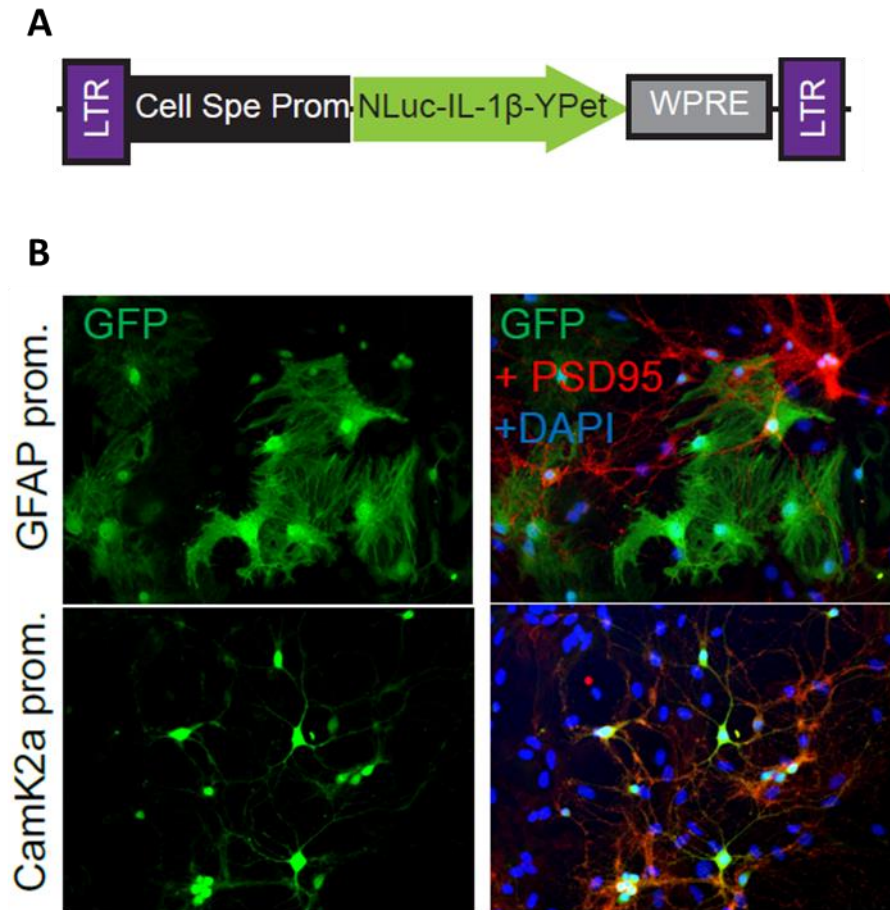


Figure 35 : Expression spécifique du biosenseur de BRET de l'IL-1 β dans des astrocytes ou des neurones sur culture primaire de neurones hippocampiques

A : Schéma de la construction lentivirale permettant l'expression du biosenseur dans un type cellulaire spécifique. Il contient des séquences LTR pour une production lentivirale, un promoteur spécifique (GFAP ou CaMKIIa), la séquence codante pour le biosenseur et une séquence WPRE permettant d'augmenter l'expression biologique de la protéine transgénique. Cette séquence provenant du virus de l'hépatite B entraîne une augmentation de la stabilité de l'ARNm. **B** : Immunocytochimie sur des cultures primaires de neurones. Le biosenseur et les neurones sont respectivement détectés avec des anticorps dirigés contre la Ypet (anti-GFP, vert) et contre une protéine d'échafaudage post-synaptique PSD95 (rouge). Les noyaux cellulaires sont révélés avec un marquage DAPI (bleu).

8.3.2. Maturation de l'IL-1 β dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe

8.3.2.1. Maturation de l'IL-1 β dépendante des NMDARs

Comme mentionné dans l'introduction, l'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-1 β dans l'hippocampe est induit après la mise en place d'une LTP ou suite à une tâche d'apprentissage (Depino *et al.*, 2004 ; Schneider *et al.*, 1998). Or, l'induction d'une LTP passe par l'activation des récepteurs glutamatergiques des neurones excitateurs (Ascher & Nowak, 1988 ; Collingridge *et al.*, 1983 ; B. Y. N. Dale & Roberts, 1985 ; Lynch *et al.*, 1983 ; Macdermott *et al.*, 1986). Nous avons émis l'hypothèse que la maturation de l'IL-1 β neuronale pouvait être dépendante d'une activité neuronale soutenue. Pour tester cette hypothèse, le biosenseur de BRET a été exprimé par approche lentivirale dans des neurones excitateurs hippocampiques en culture primaire. Afin de visualiser la maturation de l'IL-1 β , le BRET a été mesuré pendant 10 min (signal basal) puis pendant 20 minutes après ajout d'ACSF ou différentes stimulations conduisant à une forte activité neuronale (**figure 36**). La **figure 36A** présente l'évolution du signal de BRET au cours du temps en fonction de deux stimulations différentes : une stimulation avec de la 4-Aminopyridine (ou 4-AP, agent organique inhibiteur des canaux potassiques dépendants du voltage) et une stimulation avec de l'ATP (un agoniste des récepteurs purinergiques pouvant activer l'inflammasome NLRP3). L'application de 4-AP induit une faible diminution du signal de BRET. L'analyse statistique en ANOVA à deux facteurs démontre une significativité du traitement à la 4-AP sur la maturation de biosenseur de l'IL-1 β sur les neurones excitateurs de l'hippocampe. Pour démontrer l'implication du système excitateur glutamatergique, nous avons réalisé la même expérience en exposant les neurones à du glutamate (**figure 36B**). Cette stimulation induit une diminution du signal de BRET pour atteindre 75% du signal basal. Pour déterminer quel type de récepteurs du glutamate est impliqué dans la maturation de l'IL-1 β , nous avons réalisé la même expérience en exposant les cultures avec 50 μ M de différents agonistes des récepteurs ionotropique du glutamate : de l'AMPA, du kaïnate (KA) et du NMDA (**Figure 36C**). Une stimulation avec de l'AMPA induit une légère diminution transitoire du signal de BRET, assimilable à un artefact de stimulation. Seul le NMDA conduit à une diminution durable du signal de BRET pour atteindre 70% du signal basal. De plus, la diminution du BRET observée avec le glutamate et le NMDA est abolie par ajout de MK801 ou de D-AP5, des inhibiteurs des récepteurs NMDA (**figure 36B et C**). L'ensemble de ces résultats démontrent l'implication des récepteurs ionotropiques du glutamate, et plus précisément les récepteurs NMDA dans la maturation de l'IL-1 β neuronale.

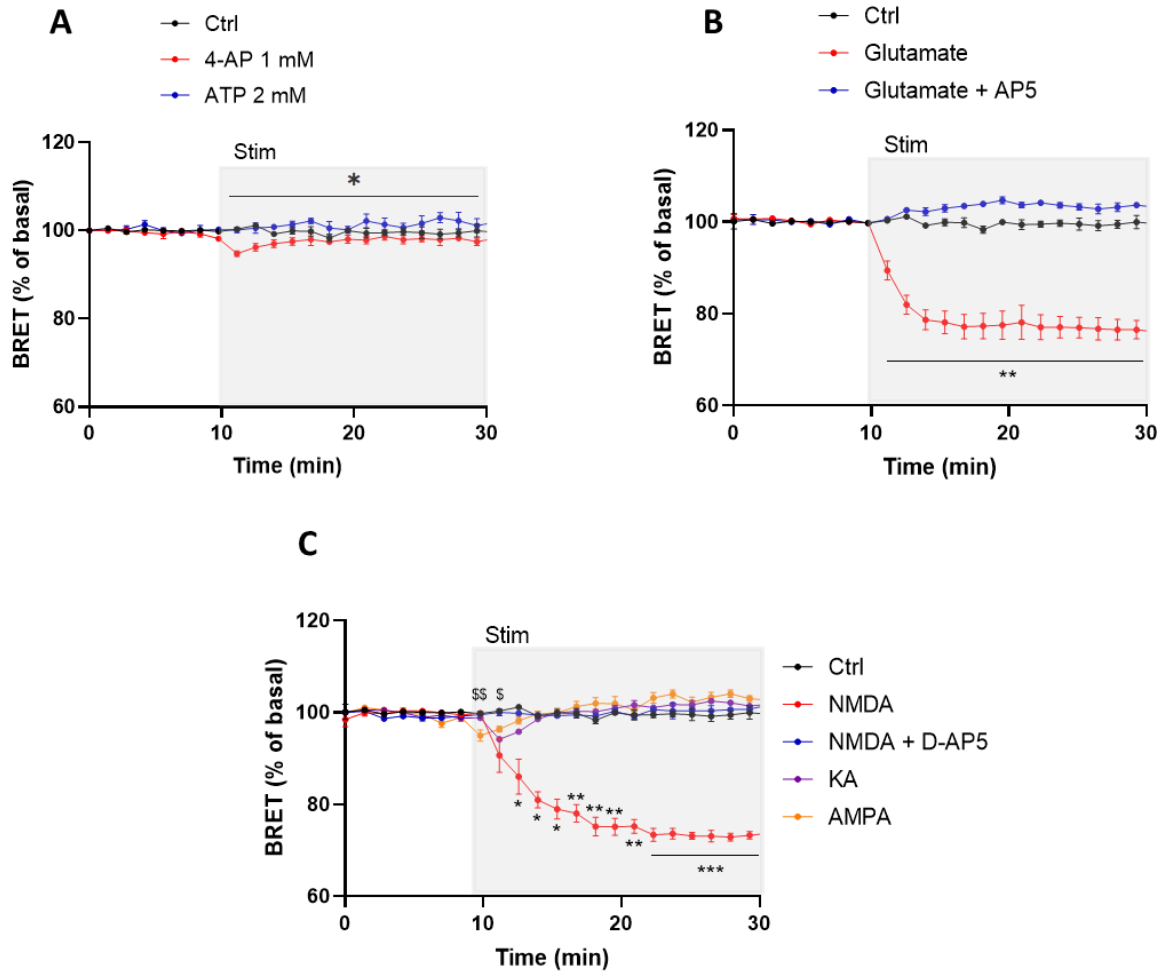


Figure 36 : Une stimulation des récepteurs NMDA conduit au clivage du biosenseur de BRET de l'IL-1 β

A : BRET en population au cours du temps sur culture primaire de neurones exprimant le biosenseur de BRET de l'IL-1 β et stimulée avec une solution saline (Ctrl), de la 4-AP (1 mM) ou de l'ATP (2 mM). **B** : Même expérience avec une stimulation au glutamate (50 μ M) précédée ou non d'un traitement avec 100 μ M de MK801. **C** : Même expérience avec une stimulation par différents agonistes des récepteurs glutamatergiques (AMPA, Kaïnate (KA), NMDA ; 50 μ M par composé) et prétraitées ou non avec un inhibiteur réversible (D-AP5, 100 μ M) du récepteur NMDA. Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM, N=3 expériences indépendantes. Analyse statistique par Two-way ANOVA avec correction par le FDR. (***) correspond à la comparaison entre Ctrl et NMDA ; (\$\$\$) correspond à la comparaison entre Ctrl et AMPA. P-value : $p < 0.05$ (*, \$), $p < 0.01$ (**, \$\$), $p < 0.001$ (***, \$\$\$).

8.3.2.2. Caractérisation des sous-unités des NMDARs impliquées dans la maturation

Comme mentionné dans l'introduction, les récepteurs NMDA sont majoritairement des hétérodimères, composés de 2 sous-unités obligatoires GluN1A et de 2 autres sous-unités, GluN2 ou GluN3 (Vyklícky *et al.*, 2014). Les données de la littérature précisent que ce type de récepteur est particulièrement abondant dans l'hippocampe avec une composition majoritaire en sous-unités GluN1/GluN2A ou GluN1/GluN2B (Al-Hallaq *et al.*, 2007 ; Paoletti *et al.*, 2013 ; Rauner & Köhr, 2011). Basé sur ces données, nous nous sommes demandés si la maturation de l'IL-1 β était dépendante de l'activation d'un récepteur hétérodimérique particulier. Le biosenseur a été exprimé dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe. Le signal de BRET est enregistré pendant 10 min (signal basal) puis les neurones sont stimulés avec de l'ACSF ou avec 10 μ M de NMDA et le BRET est enregistré pendant 50 min. Pendant toute la durée de l'acquisition, les neurones sont exposés à différentes concentrations (de 0 à 10 μ M) d'inhibiteurs pharmacologiques des sous-unités NMDA : un inhibiteur des sous-unités GluN2A (TCN201), un inhibiteur des sous-unités GluN2B (Ro25-6981) ou une combinaison des deux inhibiteurs (**figure 37**). Sur les cultures prétraitées au TCN201, une diminution du signal de BRET est observée quelle que soit la concentration de l'inhibiteur, passant de 100% à environ 80% du signal basal (**figure 37A**). Le résultat est identique pour des cultures prétraitées avec le Ro25-6981 (**figure 37B**). En revanche, la combinaison des deux inhibiteurs, avec une concentration fixe de 10 μ M de TCN201 et une concentration croissante de Ro25-6981 entraîne une inhibition progressive de la diminution du signal de BRET et cette diminution est totalement abolie quand les cultures sont exposées à 10 μ M de TCN201 et Ro25-6981 (**figure 37C**). Ces résultats démontrent que l'inhibition combinée des sous-unités GluN2A et GluN2B bloque la maturation de l'IL-1 β dans les neurones. Cela suggère soit que le clivage de la cytokine nécessite l'activation combinée des récepteurs NMDA hétérodimériques GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B et que l'inhibition d'un des deux types de récepteurs n'est pas suffisant pour bloquer la maturation, soit que le clivage est dépendant de récepteurs NMDA hétérotrimériques GluN1/GluN2A/GluN2B. En effet, l'hypothèse de l'implication de récepteurs NMDA hétérotrimériques est d'autant plus pertinente que nos résultats présentant la maturation de l'IL-1 β en présence de concentration croissantes en TCN201 et Ro25-6981 semblent être corrélées avec la pharmacologie desdits récepteurs. D'après la littérature, les récepteurs NMDA hétérotrimériques sont présents dans l'hippocampe, majoritairement sous la forme GluN1/GluN2A/GluN2B (cf. section 3.3.3.1.2). Ensuite, l'inhibition seule de la sous-unité GluN2A ou GluN2B de ces derniers n'est pas suffisante pour bloquer l'activité du

récepteur et n'est pas non plus suffisante pour inhiber la maturation du biosenseur. En revanche, l'application combinée d'inhibiteurs GluN2A et GluN2B est nécessaire pour abolir leur activité (Cheriyana *et al.*, 2016 ; Hansen *et al.*, 2014 ; Stroebel *et al.*, 2014), combinaison aussi requise pour inhiber la maturation de l'IL-1 β dans les neurones de l'hippocampe.

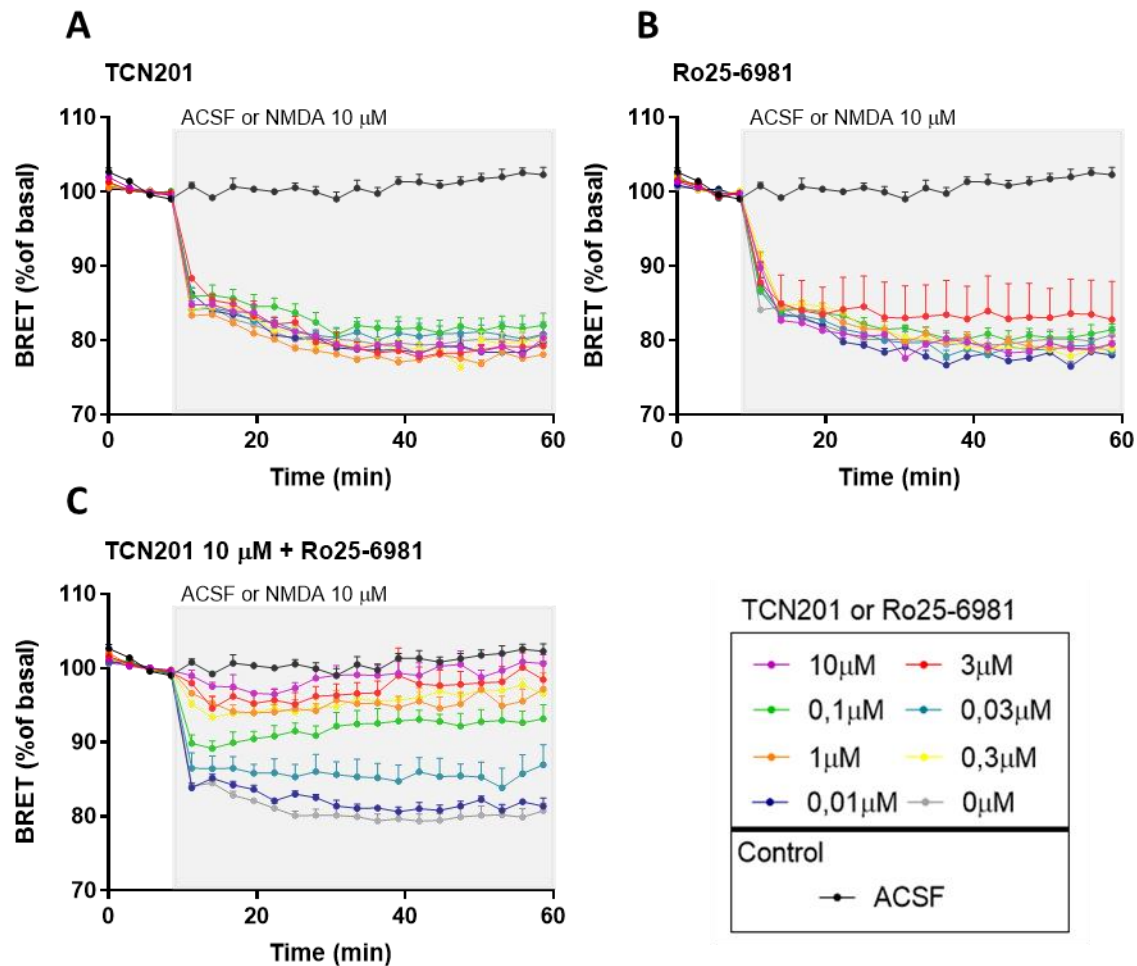


Figure 37 : Relation dose-effet de l'inhibition des sous-unités GluN2A et GluN2B du récepteur NMDA sur le clivage du biosenseur de BRET de l'IL-1 β

BRET en population au cours du temps sur cultures primaires de neurones exprimant le biosenseur, stimulées avec de l'ACSF ou 10 μ M de NMDA et exposées à des concentrations croissantes (de 0 à 10 μ M) d'un inhibiteur des sous-unités GluN2A (**A**), GluN2B (**B**) ou une combinaison des deux inhibiteurs (**C**). Les données sont représentées en moyenne \pm SEM, N=4 expériences indépendantes.

8.3.2.3. Localisation subcellulaire du biosenseur dans les neurones

Nous savons maintenant que la maturation de l'IL-1 β dans les neurones est dépendante des récepteurs NMDA. Sachant que ces récepteurs sont principalement exprimés au niveau de la post-synapse des neurones (Gardoni *et al.*, 2011), nous avons souhaité savoir si l'IL-1 β était elle-aussi, préférentiellement localisée au niveau des épines dendritiques, à proximité de ces récepteurs. Pour répondre à cette question, des cultures primaires de neurones d'hippocampe ont été transduites avec des lentivirus codant soit pour le biosenseur de BRET de l'IL-1 β , soit pour le tandem NLuc-Ypet, soit avec une construction GluN1a-Venus. Le tandem NLuc-YPet est une fusion du donneur et de l'accepteur. Ce contrôle nous permet de vérifier si la présence de ce couple au niveau de la pro-IL-1 β n'influence pas l'adressage de la cytokine dans un compartiment cellulaire spécifique. La construction GluN1a-Venus est une simple fusion de la protéine fluorescente sur la sous-unité obligatoire du récepteur NMDA, récepteur majoritairement présent dans les épines dendritiques. Cette protéine transgénique est un contrôle positif qui nous permet de quantifier une protéine majoritairement exprimée dans les épines dendritiques. Les cultures ont été fixées puis immuno-marquées pour révéler la Ypet ou Venus (vert, noté GFP) et PSD95 (rouge) afin de localiser les épines dendritiques (**Figure 38A**). Pour chaque neurone, un ratio épine / dendrite a été effectué en sélectionnant la zone dans laquelle les marquages GFP et PSD95 co-localisent (épine) et la zone dendritique présente sous l'épine dans laquelle seul le marquage GFP est présent (magnification sur la **figure 38A**). Le ratio est présenté en **figure 38B**. Premièrement, comme attendu la construction GluN1a-Venus est significativement plus enrichie au niveau des épines (ratio d'environ 3) que le tandem NLuc-Ypet (ratio d'environ 2). De la même manière, la construction GluN1a-Venus est aussi significativement plus enrichie au niveau des épines que le biosenseur de BRET (ratio d'environ 3 contre 2.5 pour le biosenseur). De plus, il apparaît aussi que le biosenseur de BRET de l'IL-1 β est significativement enrichi dans les épines par rapport au tandem (ratio d'environ 2.5 contre 2 pour le tandem). Ces résultats démontrent que le biosenseur de BRET de l'IL-1 β semble préférentiellement localisé dans les épines dendritiques par rapport aux dendrites.

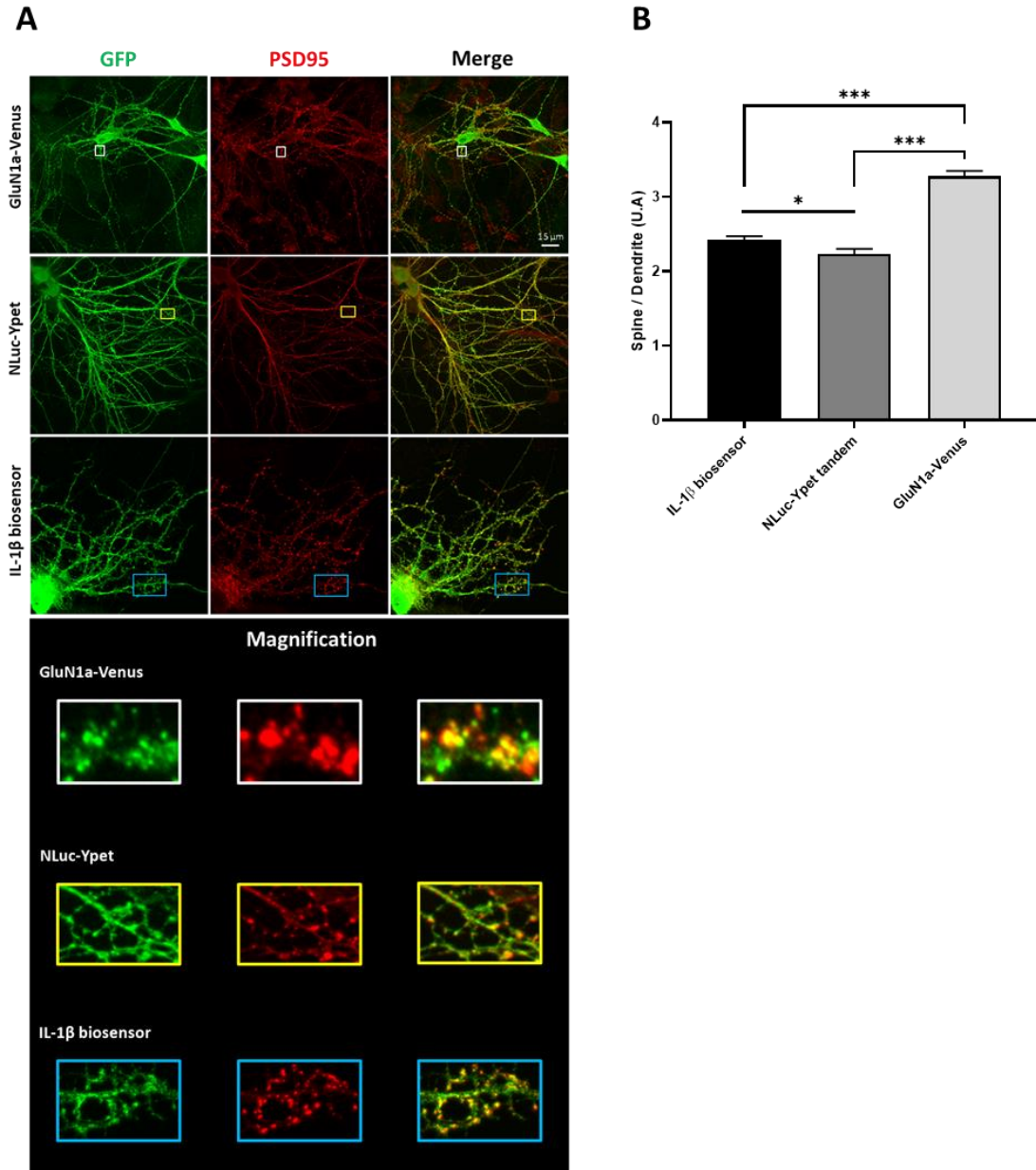


Figure 38 : Localisation subcellulaire du biosenseur de BRET de l'IL-1 β dans les neurones excitateurs de l'hippocampe en culture

A – panneau du haut : Immunocytochimies sur des neurones excitateurs en culture exprimant GluN1a-Venus (panneau du haut), le tandem NLuc-YPet (panneau central) ou le biosenseur de BRET (panneau de droite). Un marquage anti-Ypet ou Venus (vert, noté GFP, panneaux de gauche) et anti-PSD95 (rouge, panneaux centraux) permet de détecter respectivement l'expression de la protéine transgénique et la protéine d'échafaudage présente en post-synapse des neurones. La superposition des deux images est présentée dans les panneaux de droite (merge). **A – panneau du bas** : Zooms sur une arborisation dendritique (magnification), pour les trois conditions expérimentales et les marquages GFP, PSD95 ainsi que la superposition des deux images. La couleur jaune-orangée représente une colocalisation entre les marquages GFP et PSD95. **B** : Ratio de la colocalisation de fluorescence GFP-PSD95 présente dans les épines dendritiques sur la fluorescence de la dendrite associée à l'épine en fonction de la protéine transgénique exprimée (biosenseur de l'IL-1 β , tandem NLuc-YPet et GluN1a-Venus). Les histogrammes représentent la moyenne des neurones analysés \pm SEM, N=4. Analyse statistique par one-way ANOVA avec correction par le FDR. P-value : $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

8.3.2.4. Maturation de L'IL-1 β dans les différents compartiments neuronaux en BRET en vidéo-microscopie

Les résultats obtenus en section 8.3.2.3 suggèrent que le biosenseur de BRET de l'IL-1 β est préférentiellement localisé dans les épines dendritiques et ceux obtenus en section 8.3.2.1 démontrent que le processus de maturation intervient lors de l'activation des récepteurs NMDA. En s'appuyant sur ces évidences, nous avons souhaité savoir si la maturation de l'IL-1 β : 1/ intervient uniquement dans les épines dendritiques ou dans l'ensemble du neurone et 2/ si elle se produit lorsque l'activité neuronale est induite, non seulement par administration exogène d'un agoniste des récepteurs NMDA, mais aussi via un stimulus non spécifique des récepteurs au glutamate, entraînant une dépolarisation massive de l'ensemble des neurones. Pour répondre à cette question, le signal de BRET, de cultures primaires de neurones d'hippocampe a été suivi en vidéo-microscopie. Cette technique permet de mesurer en temps réel, sur cellule, la bioluminescence de la NLuc ainsi que la luminescence de la Ypet au cours du temps et ce, dans les différents compartiments cellulaires (**Figure 39A**). La stimulation des neurones a été induite par une dépolarisation chimique au KCl. L'acquisition des signaux luminescents du donneur et de l'accepteur d'énergie est réalisée séquentiellement à raison de 10s par signal respectivement. Le ratio de BRET, représentant la luminescence de l'accepteur sur la bioluminescence du donneur, est calculé ultérieurement et présenté en fausses couleurs, les couleurs les plus chaudes représentant un fort signal de BRET. Le protocole d'acquisition du signal de BRET s'établit sur 20 min et comprend 5 min d'enregistrement basal, 10 min d'enregistrement après dépolarisation des neurones (stimulation au KCl) ou en contrôle avec de l'ACSF. A la fin de l'expérience, une stimulation avec du NMDA est utilisée comme contrôle positif. Les variations de BRET ont été analysées dans les 3 principaux compartiments cellulaires : soma, dendrite et épine. Dans le soma des neurones (**Figure 39B**), une stimulation avec du KCl 50 mM induit une diminution du signal de BRET (de 100% à 90% du signal basal). L'addition de 50 μ M de NMDA en fin d'enregistrement entraîne une nouvelle diminution du signal de BRET. Pour la condition contrôle en ACSF, il n'y a pas d'inflexion du BRET et une diminution du signal, atteignant environ 85% du signal basal, est observée après une stimulation avec du NMDA. En revanche, la préincubation des cultures avec du D-AP5 (100 μ M) inhibe la maturation de l'IL-1 β , induite par des stimulations au KCl 50 mM ou au NMDA. Ce phénomène, observé dans le soma, est également visible dans les dendrites (**Figure 39C**) et dans les épines dendritiques (**Figure 39D**). De manière surprenante, le simple ajout d'ACSF induit une diminution significative du signal de BRET dans les dendrites et les épines de l'ordre de 5%. Ce phénomène peut s'expliquer par une stimulation mécanique induite par l'ajout du liquide dans la chambre

de culture pouvant conduire une dépolarisation du réseau neuronal. Hypothèse d'autant plus probable car l'absence de magnésium dans ACSF utilisé facilite l'ouverture des récepteurs NMDA. L'ensemble de ces résultats démontre que, lors d'une activité neuronale soutenue induite par une stimulation non spécifique des récepteurs au glutamate, la maturation de l'IL-1 β a lieu dans les différents compartiments neuronaux étudiés et n'est pas localisée dans un compartiment cellulaire précis. De plus, la diminution du BRET n'est pas non plus supérieure dans un compartiment en particulier.

en moyenne \pm SEM. N=7 expériences indépendantes. Analyse statistique en 2-way ANOVA + correction avec le False Discovery Rate. (***) correspond à la comparaison entre ACSF et KCl50 ; (+++) correspond à la comparaison entre ACSF et KCl50-D-AP5 ; (\$\$\$) correspond à la comparaison entre KCl50 et KCl50-D-AP5. p-value : $p < 0,05$ (*,+,\$) ; $p < 0,01$ (**,++,\$\$) ; $p < 0,001$ (***,+++,\$\$\$).

8.3.2.5. Maturation indépendante de la voie canonique

Bien que la maturation de l'IL-1 β neuronale passe par l'activation du récepteur NMDA, nous avons souhaité savoir si ce phénomène était dépendant de l'inflammasome NLRP3 ou de la caspase-1. La caspase-1 est considérée comme l'enzyme principale responsable du clivage de cette cytokine dans les cellules immunitaires. Il a été montré dans la littérature, que cette enzyme est exprimée et activée dans les neurones spinaux mais aussi dans les neurones hippocampiques après injection de kainate chez le rat (Compan, Baroja-Mazo, López-Castejón, *et al.*, 2012 ; Lindberg *et al.*, 2004 ; Vaccari *et al.*, 2008). Afin de vérifier son implication dans le clivage du biosenseur de l'IL-1 β , ce dernier a été exprimé dans des cultures primaires de neurones. Après 10 min d'enregistrement du signal basal de BRET, les cultures ont été stimulées avec de l'ACSF ou avec 50 μ M de NMDA puis le signal a été enregistré pendant 20 min. Pendant toute l'acquisition, certaines cultures ont été prétraitées avec 500 nM de MCC950, un inhibiteur de l'inflammasome NLRP3 (**Figure 40A**) ou avec 50 μ M d'YVAD, un inhibiteur de caspase-1 (**Figure 40B**). Dans les 2 cas, ces inhibiteurs ne bloquent pas la diminution du signal de BRET (passant de 100% à 75%) observée après une stimulation au NMDA. Ces résultats montrent que la maturation de l'IL-1 β est un phénomène indépendant de la voie canonique, décrite dans les cellules immunitaires.

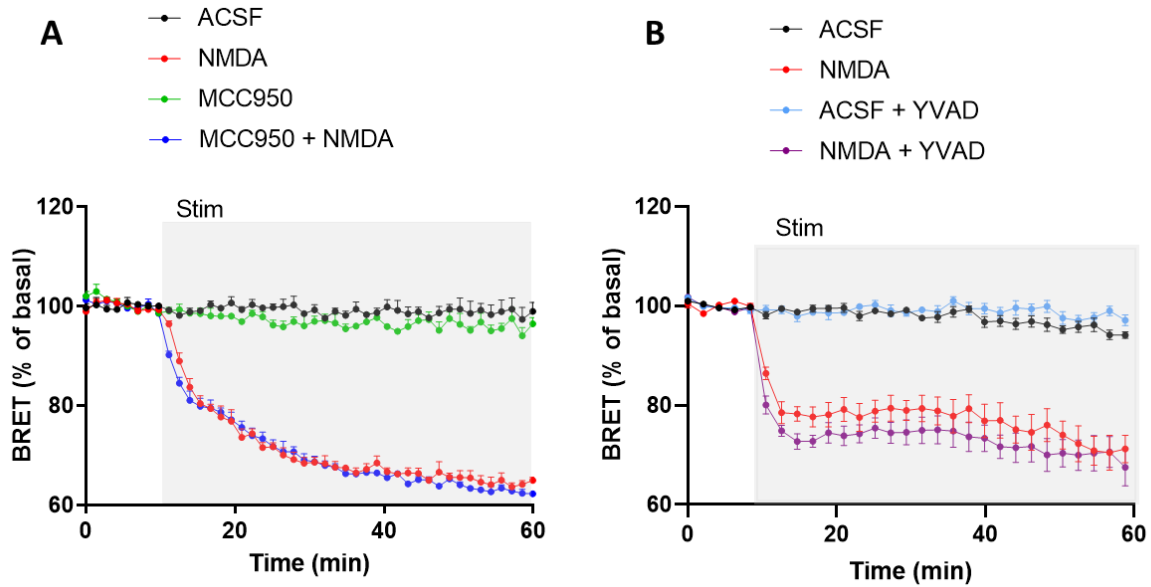


Figure 40 : Maturation neuronale du biosenseur de BRET de l'IL-1 β indépendante de la voie canonique

Variation du BRET au cours du temps sur des cultures primaires de neurones exprimant le biosenseur, stimulées avec 50 μ M de NMDA et pré-incubées ou non avec (A) un inhibiteur de l'assemblage de l'inflammasome (MCC950 500 nM) ou (B) un inhibiteur de la caspase-1 (YVAD 50 μ M). Les données sont représentées en moyenne \pm SEM, N=4 expériences indépendantes.

8.4. Etude de la libération d'IL-1 β neuronale

8.4.1. Détection de l'IL-1 β libérée par ELISA

Nous avons ici souhaité déterminer si l'IL-1 β maturée dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe était libérée dans le milieu extracellulaire. Cependant, nous avons constaté, durant les expériences de BRET en vidéo-microscopie, qu'une stimulation ACSF induisait un clivage de la cytokine. Or cette maturation est dépendante de l'activation des récepteurs NMDA, ce qui suggère qu'un simple ajout d'ACSF est capable d'augmenter l'activité neuronale. Nous avons donc souhaité vérifier cette hypothèse en enregistrant l'activité neuronale des cultures. Pour ce faire, deux options : 1/ soit un enregistrement électrophysiologique, soit 2/ une sonde sensible au voltage. N'ayant pas le matériel nécessaire pour des expériences d'électrophysiologie dans l'équipe, nous avons opté pour l'utilisation d'une sonde sensible au voltage. Pour comprendre ce phénomène, nous avons décidé d'exprimer dans les cultures primaires de neurones d'hippocampe un indicateur de voltage génétiquement encodé (ou GEVI) dénommé VARNAM (Voltage-Activated Red Neuronal

Activity Monitor). Cette construction est composée d'une fusion entre la rhodopsine Ace et le fluorophore mRuby3. En raison du chevauchement des spectres d'absorption d'Ace et d'émission de mRuby3, une partie de la fluorescence émise par la mRuby3 est absorbée par l'opsine. L'intensité d'absorption d'Ace étant par ailleurs proportionnelle au voltage, la fluorescence de mRuby3 fusionnée à Ace est directement fonction du potentiel membranaire (**Figure 41A**). Les données de la littérature montrent que les propriétés biophysiques de VARNAM permettent de détecter des potentiels d'action (PA) *in vitro* et *in vivo* (Kannan *et al.*, 2018). Les cultures ont été lavées une fois puis 400 μ L d'ACSF, contenant ou non 3 mM de TTX, sont ajoutés dans la chambre de culture. Les signaux de fluorescence avec et sans TTX sont présentés en **figure 41B et C**. Le signal enregistré sur un neurone cultivé en ACSF montre les potentiels d'action générés par ce dernier, qui présentent un motif de décharges répétées (**Figure 41B**). L'ajout de 3 μ M de TTX abolie complètement les variations de fluorescence induite par VARNAM (**figure 41C**). Dans notre modèle de culture primaire, ces motifs de décharges sont probablement causés par l'important remaniement des réseaux suite à la dissociation des cellules et à leur mise en culture. Ces résultats suggèrent que ce modèle cellulaire présente une hyperexcitabilité du réseau neuronal.

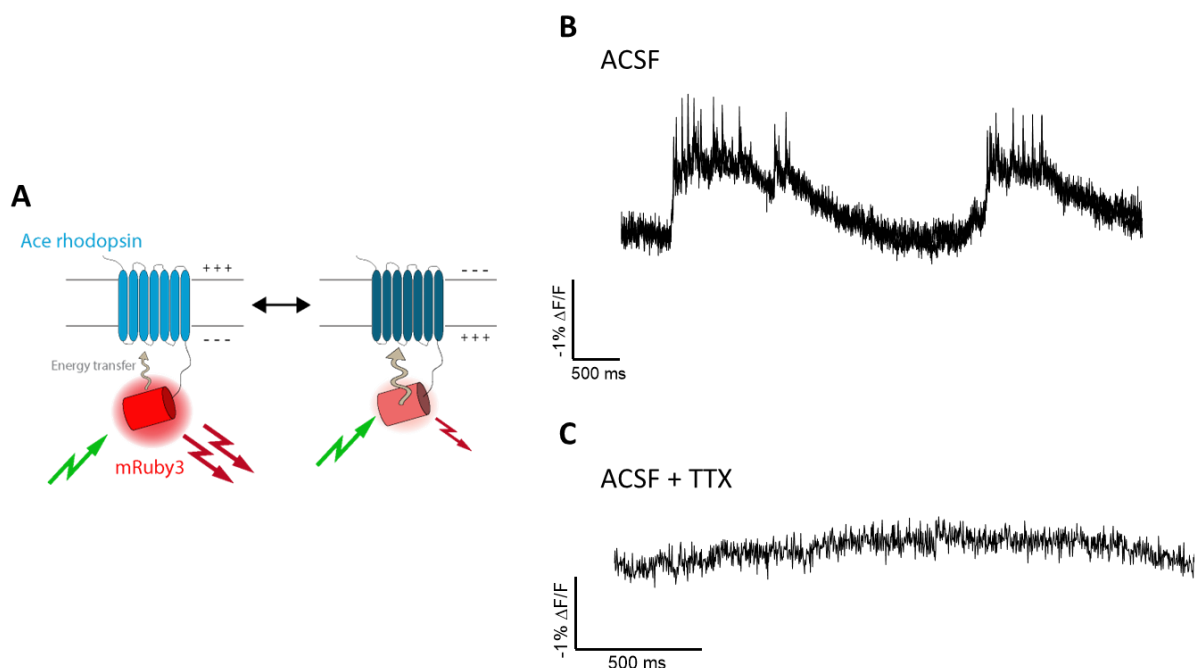


Figure 41 : Visualisation de l'activité neuronale à l'aide d'une sonde GEVI

A : Représentation schématique de la sonde de voltage VARNAM. L'Ace rhodopsine ancrée à la membrane plasmique est fusionnée à la protéine fluorescente mRuby3. L'intensité d'absorption d'Ace de la fluorescence émise par la mRuby3 est directement fonction du potentiel membranaire. Plus le potentiel de membrane est élevé, moins la sonde sera fluorescente. **B-C** : Tracés représentant la variation

de la fluorescence de VARNAM ($-\Delta F/F$) au cours du temps, GEVI exprimée dans des neurones en cultures et stimulés soit avec de l'ACSF (**B**), soit avec de l'ACSF additionnée de 3 μM de TTX (**C**). La fréquence d'acquisition des images est de 1000 Hz.

Compte tenu des données obtenues avec VARNAM, nous avons voulu contrôler, avec une expérience préliminaire, si 1/ l'ACSF induisait une libération d'IL-1 β par les neurones et 2/ si l'ajout de tétrodotoxine (TTX) diminue cette libération basale en réduisant l'activité des neurones. Ainsi des cultures primaires d'hippocampe ont été transduites avec le biosenseur de BRET de l'IL-1 β humain, prétraitées ou non avec 3 μM de TTX, stimulées avec de l'ACSF et le surnageant dosé par un ELISA reconnaissant spécifiquement la forme humaine de l'IL-1 β . Les résultats (**figure 42A**) montrent que le traitement avec de la TTX diminue significativement la libération basale d'IL-1 β . Dans l'optique de vérifier si cette libération est plus importante après une stimulation NMDA et d'abolir la sécrétion basale induite par l'ACSF, les données préliminaires ainsi que les résultats obtenus avec VARNAM nous ont fait changer d'approche en atténuant l'excitabilité neuronale par ajout de 100 μM d'un inhibiteur réversible des récepteurs NMDA, le D-AP5, à partir de DIV10, renouvelé à DIV13 et DIV15. De plus, afin de mesurer l'impact d'une stimulation NMDA sur la libération d'IL-1 β , l'ensemble des cultures exprimant le biosenseur de BRET humain a été exposé à 3 μM de TTX avant l'expérience. Les cellules sont lavées une fois avec de l'ACSF contenant de la TTX, additionné ou non de D-AP5 (selon les conditions expérimentales) puis incubées avec de l'ACSF + 3 μM de TTX et stimulées 15 min avec 50 μM de NMDA en présence ou non de 100 μM de D-AP5. La libération de la cytokine a été dosée dans le surnageant des neurones par le même test ELISA utilisé pour l'obtention des données préliminaires, dont les résultats sont présentés en **figure 42B**. La ligne en pointillée représente la quantification de la condition TTX seule, condition utilisée pour normaliser les données à 100%. L'addition simple de D-AP5 dans le milieu n'entraîne pas de libération supplémentaire de la cytokine par rapport à la condition TTX. En revanche, la stimulation des récepteurs NMDA génère une augmentation significative du taux de libération d'IL-1 β équivalent à 3 fois la quantité basale retrouvée en TTX. Cette augmentation est significativement réduite, lorsque les neurones sont pré-incubés avec du D-AP5 avant la stimulation au NMDA. Ces résultats montrent que les neurones pyramidaux de l'hippocampe sont capables de libérer de l'IL-1 β mature en réponse à une stimulation avec du NMDA.

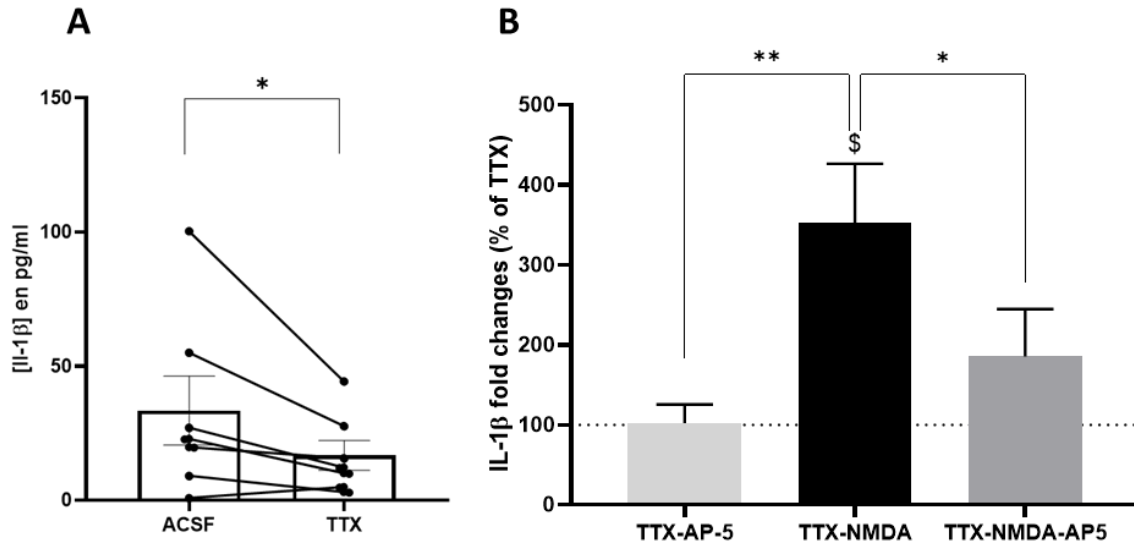


Figure 42 : Détection et quantification de l'IL-1β-Ypet libérée par les neurones

A : Quantification par ELISA de l'IL-1β-Ypet libérée dans le surnageant par des neurones hippocampiques en culture, prétraités ou non avec 3 μM de TTX et stimulés avec de l'ACSF. **B** : Même expérience dans laquelle les cultures sont pré-incubées avec 3 μM de TTX puis stimulées avec 50 μM de NMDA en présence ou non de 100 μM de D-AP5. Les données sont normalisées par rapport à la libération d'IL-1β induite dans la condition TTX (100%). Les résultats sont représentés par la moyenne ± SEM. Analyse statistique : Wilcoxon test, N=7 expériences indépendantes (**A**) et one-simple t-test avec correction par FDR pour comparer les conditions TTX et TTX-NMDA. Kruskal-Wallis avec correction par FDR, N=8 expériences indépendantes (**B**). P-value : p < 0,05 (*, \$) ; p < 0,01 (**).

8.4.2. Détection par le dosage HEK-Blue

Comme mentionné dans l'introduction, le clivage de l'IL-1β dans les cellules immunitaires est réalisé par la caspase-1, mais d'autres enzymes telles que la neutrophile élastase, la cathepsine G, la protéinase-3 et la chymase participent aussi à la maturation de la cytokine. Cependant, ces enzymes ne génèrent pas le fragment d'IL-1β de 17 kDa, mais une protéine clivée un peu plus longue, qui a pour conséquence une diminution de sa bio-activité (Black *et al.*, 1988 ; Hazuda & Simon, 1990 ; P. Li *et al.*, 1995 ; Roona *et al.*, 1999). Etant donné que la maturation de l'IL-1β dans les neurones est indépendante de la caspase-1, nous avons souhaité valider que la forme mature de la cytokine produite par ce type cellulaire est aussi biologiquement active. Le protocole utilisé pour cette section est celui des HEK-Blue, présenté dans la section des résultats 7.3. Les cultures primaires sont transduites soit avec le biosenseur de BRET humain, soit avec la construction tandem, puis elles sont stimulées avec différents composés. Ensuite, les surnageants sont récupérés et la présence d'IL-1β bioactive dosée (**Figure 43A**). La **figure 43B**

présente la concentration d'IL-1 β (en pg/mL) en fonction des différentes conditions expérimentales. Quelles que soient les conditions, toutes les concentrations mesurées sont en dessous du seuil de détection. Ces résultats ne nous permettent pas d'affirmer que l'IL-1 β libérée est bioactive. Pour déterminer ce paramètre, il serait nécessaire de développer un système de détection plus sensible. Nous pourrions par exemple, envisager un système tel que le iLite[®] IL-6 de Svar. Ce modèle est basé sur le même principe que les HEK-Blue, cependant, la SEAP est remplacée par une luciférase. Ainsi, la bio-activité de l'IL-6 est visible par l'apparition de bioluminescence. En remplaçant ce système par celui de l'IL-1 β , nous pourrions visualiser en temps réel la production de bioluminescence par la luciférase nouvellement synthétisée, tout en diminuant significativement le bruit de fond induit par les dosages spectrophotométriques.

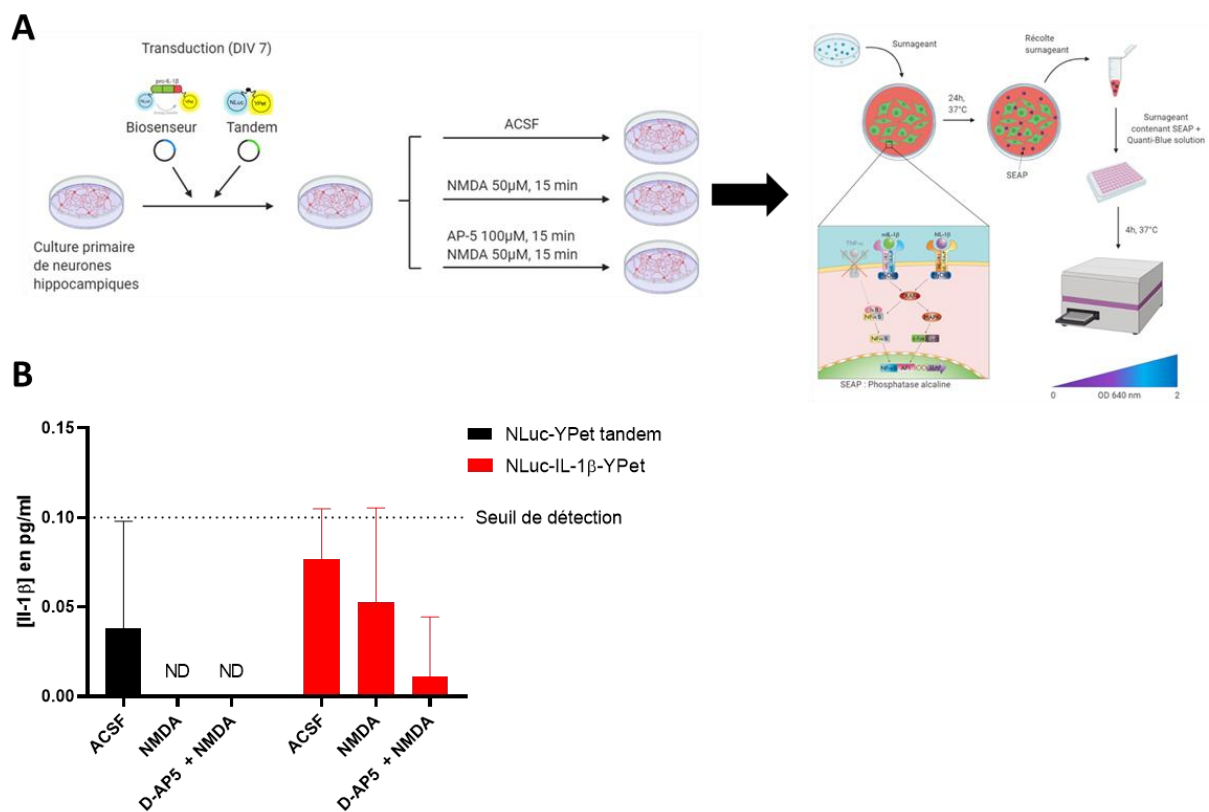


Figure 43 : Détermination de la bio activité de l'IL-1 β -Ypet de la fraction libérée par les neurones, par dosage indirect avec les HEK-Blue

A : Schéma récapitulatif de l'expérience. Les cultures sont transduites à DIV 7 pour exprimer soit le biosenseur, soit le tandem. A DIV 15, les cultures sont stimulées avec de l'ACSf, 50 μ M de NMDA ou 50 μ M de NMDA + 100 μ M de D-AP5. Les surnageants sont récoltés et exposés sur les HEK-Blue pour dosage de la SEAP à J2. **B** : Graphique représentant la concentration d'IL-1 β (en pg/mL) mesurée dans le surnageant des cellules en fonction des différentes conditions expérimentales. Résultats représentés sous forme de moyenne \pm SEM. N=3 expériences indépendantes.

9. Mécanismes impliqués dans la production de l'IL-1 β neuronale

La section 8 des résultats montre que les neurones excitateurs de l'hippocampe sont capables de synthétiser, maturer et libérer de l'IL-1 β suite à la stimulation des récepteurs NMDA. Il apparait également que le clivage de la cytokine s'effectue indépendamment de l'inflammasome NLRP3 et de la caspase-1. Ces résultats soulèvent plusieurs questions importantes : quelle protéase, activée par les récepteurs NMDA, permet le clivage de l'IL-1 β ? Quel est le mécanisme moléculaire ou la voie de signalisation impliquée dans la maturation de cette cytokine dans les neurones ? Dans cette dernière section, nous aborderons les différentes stratégies mises en place pour décrypter la signalisation neuronale associée à l'IL-1 β et déterminer plus spécifiquement quelle protéase clive cette cytokine.

9.1. Caractérisation de la maturation de l'IL-1 β dans des lignées « neuronales »

Pour décrypter la signalisation neuronale impliquée dans la production d'IL-1 β , nous avons souhaité travailler sur des lignées « neuronales ». Les lignées cellulaires permettent d'obtenir une grande quantité de matériel en peu de temps et sont faciles à manipuler génétiquement, permettant ainsi l'obtention de lignées stables. Présentant un cycle de réplication accéléré, elles sont utiles pour réaliser des criblages pharmacologiques afin d'identifier des mécanismes et/ou voies de signalisations. Par comparaison avec les cultures primaires de neurones qui sont beaucoup plus fragiles, les lignées peuvent être maintenues pendant des mois mais nécessitent d'être différenciées en neurones car leurs caractéristiques cellulaires se rapprochent plus des cellules épithéliales que des neurones primaires post-mitotiques quiescents au stade indifférencié. Nous avons décidé d'utiliser deux lignées « neuronales » : les SH-SY5Y et les HT-22.

9.1.1. Lignée SH-SY5Y

Les SH-SY5Y sont des cellules provenant de neuroblastome humain. Générées en 1970 à partir d'une biopsie de moëlle osseuse, elles ont été sous-clonées pour donner la lignée connue aujourd'hui. Ces cellules d'origine humaine, présentes à l'état de « neuroblastome-like », peuvent être différenciées en neurones matures. Ce modèle a été utilisé dans l'étude de diverses pathologies neurodégénératives telles que Parkinson ou Alzheimer mais il est aussi largement employé dans le domaine de la neuro-virologie (Shiple *et al.*, 2016). De plus, cette lignée cellulaire a été choisie car elle exprime un récepteur NMDA contenant les sous-unités GluN2A

ou GluN2B (Elnagar *et al.*, 2018 ; Hernandez-Martinez *et al.*, 2017 ; Xu *et al.*, 2019), et représente donc un modèle intéressant pour caractériser la maturation de l'IL-1 β dans les neurones.

Pour étudier la maturation du biosenseur dans cette lignée cellulaire, les SH-SY5Y non différenciées ont été transduites avec des quantités croissantes d'une construction lentivirale contenant un promoteur ubiquitaire (EF1 α), suivi de la séquence codante pour le biosenseur de BRET de l'IL-1 β humain. L'expression du biosenseur a été ensuite vérifiée par Western-Blot et immunocytochimie (**figure 44**). Les cellules exprimant la plus grande quantité de biosenseur ont été sélectionnées pour le reste de l'étude (**figure 44A**, condition 2.5 μ L). L'analyse par immunofluorescence montre qu'environ 50 % de ces cellules expriment le biosenseur et que ce dernier est localisé de façon homogène dans le cytoplasme (**figure 44B**). De manière surprenante, l'immunomarquage a révélé l'expression de MAP2, marquage qui devrait normalement être absent dans les cellules non-différenciées. Ceci laisse penser que cette lignée est potentiellement en cours de différenciation. En parallèle de la conception de la lignée stable, nous avons mis en place le protocole de différenciation et réalisé des marquages immunocytochimiques de la protéine neuronale NeuN et de la protéine du cytosquelette β 3-tubuline sur des SH-SY5Y différenciés et non différenciés (**figure 44C**). L'analyse par immunofluorescence montre une expression de ces deux protéines, mais surtout révèle des changements morphologiques majeurs. Parmi ces modifications, sont retrouvées la présence d'un « réseau » neuronal avec des prolongements et des connexions entre les cellules, mais aussi un changement de morphologie des corps cellulaires, passant d'une forme ovoïde à une forme plus allongée. Après amplification de la lignée stable, des expériences de BRET ont été réalisées à la fois sur des SH-SY5Y « non différenciées » et différenciées afin de déterminer si elles sont capables de maturer l'IL-1 β (**figure 44D-E**). Les cellules ont été exposées soit à de l'ACSF, soit à 50 μ M de NMDA ou de 4-AP (agent organique inhibiteur des canaux potassiques induisant une dépolarisation massive des neurones), en présence ou non de 100 μ M de D-AP5. Quel que soit l'état de différenciation des SH-SY5Y, aucune diminution significative du signal de BRET n'est observée et ce, indépendamment du traitement utilisé (**figure 44D-E**). Ces données démontrent une absence de maturation du biosenseur de l'IL-1 β dans ce modèle cellulaire. Ceci peut être dû à l'absence de la protéase qui est présente dans les cultures primaires. Il est également possible que la différenciation des cellules en neurones ne soit pas suffisante pour induire le clivage, ou encore que les récepteurs NMDA ne possèdent pas les sous-unités requises pour activer la voie de signalisation participant à la maturation de la

cytokine. Il aurait été intéressant de vérifier que le récepteur NMDA exprime bien les sous-unités GluN2A et GluN2B. De même, il aurait fallu transduire les SH-SY5Y avec le biosenseur de BRET sous le contrôle du promoteur CaMKIIa afin que la protéine transgénique s'exprime uniquement dans les neurones différenciés, nous permettant ainsi de vérifier les cellules complètement différenciées des autres. En l'état actuel des expériences, cette lignée cellulaire n'est donc pas un bon modèle pour étudier la maturation de l'IL-1 β .

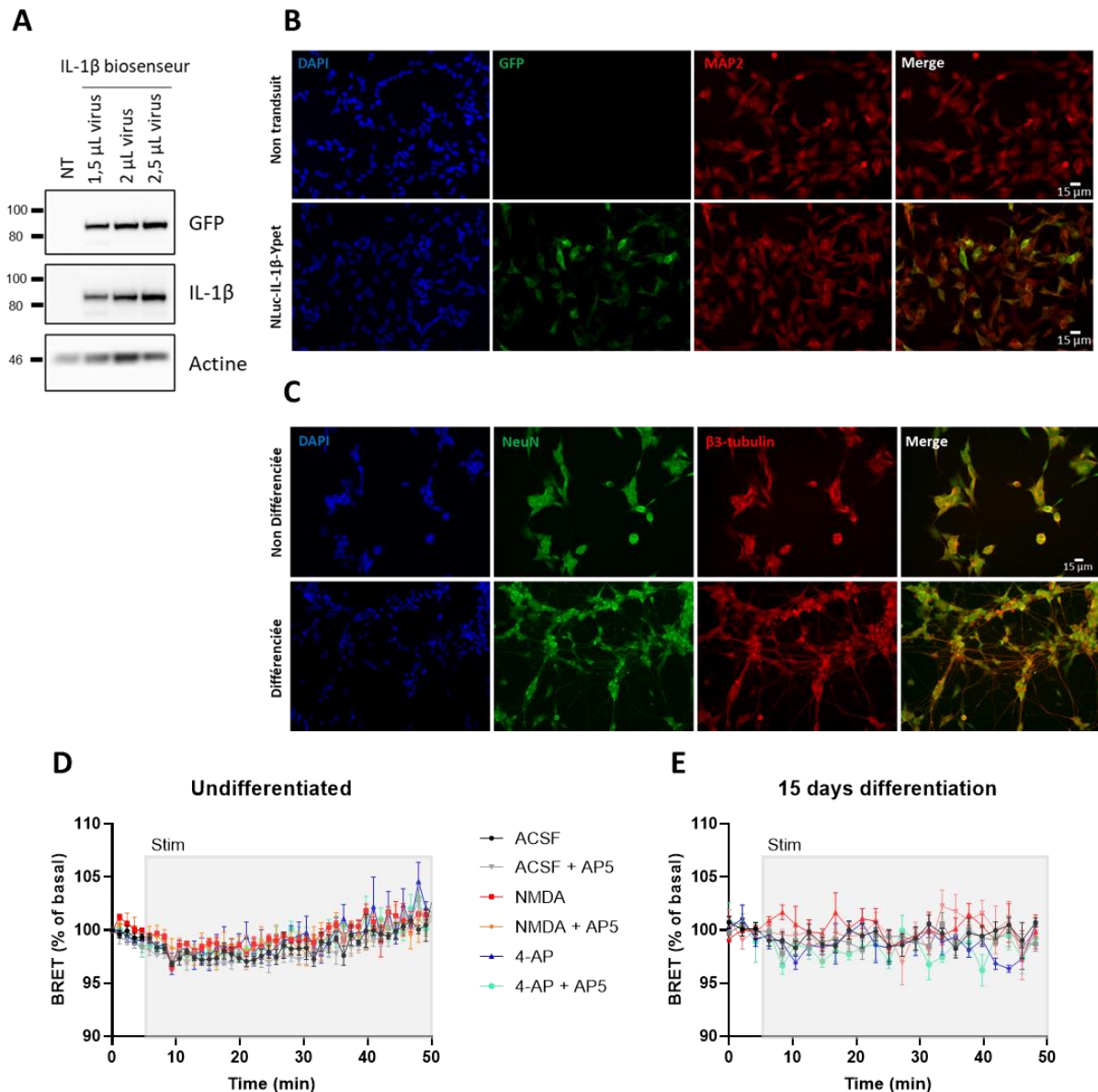


Figure 44 : Maturation du biosenseur de BRET de l'IL-1 β dans la lignée cellulaire SH-SY5Y

A : Expression du biosenseur de BRET dans les SH-SY5Y visualisée par Western-Blot (bande vers 80 kDa) en fonction de la quantité de lentivirus utilisé pour la transduction. **B** : Expression du biosenseur de BRET dans les SH-SY5Y non différenciées, visualisée par immunocytochimie (marquage vert) dans les cellules transduites comparées aux cellules non transduites. **C** : Immunocytochimie de la protéines

neuronal NeuN (vert) et de la β 3-tubuline (rouge) dans les SH-SY5Y non différenciées (panneau du haut) et différenciées (panneau du bas). Les noyaux cellulaires ont été marqués au DAPI (bleu). Le merge représente la superposition des images NeuN et β 3-tubuline. **D** : Expérience de BRET en population sur des SH-SY5Y non différenciées exprimant le biosenseur de BRET. La stimulation avec la solution contrôle (ACSF) ou différents composés (50 μ M de NMDA ou 4-AP +/- 100 μ M de D-AP5) est indiquée par une zone grisée (stim). **E** : Même expérience que le panneau C mais sur des SH-SY5Y différenciées en neurones-like. Les courbes représentent la moyenne \pm SEM par point, n=4.

9.1.2. Lignée HT-22

La lignée cellulaire HT-22 est un sous-clone de la lignée parent HT-4 qui sont des précurseurs immortalisés de neurones hippocampiques de souris. Grâce à leurs origines, les cellules HT-22 ont été largement utilisées comme modèle cellulaire de neurones d'hippocampes dans de nombreuses études, notamment portées sur la cytotoxicité du glutamate. En plus de cette particularité, ces cellules expriment les sous-unités GluN1 de récepteur NMDA à leur membrane, mais les autres sous-unités n'ont pas été caractérisées à ce jour (Bonaterra *et al.*, 2018 ; M. He *et al.*, 2013 ; Zhao *et al.*, 2012). Le dernier point intéressant concerne le temps nécessaire pour leur différenciation en neurones matures, qui se limite à 48h contre 15 jours pour les SH-SY5Y. Les HT-22 apparaissent donc être un modèle intéressant pour notre étude. Dans un premier temps, une mise au point de la différenciation de ces cellules a été réalisée. Alors qu'elles arborent une morphologie de type épithéliale quand elles ne sont pas différenciées, après 24h et 48h de différenciation, les HT-22 présentent une connectivité, avec des prolongements visibles et une forme plus allongée, plus typique des neurones (flèches rouges, **figure 45A**). Cependant, nous avons observé que la division cellulaire est toujours présente après 48h de différenciation, ce qui pourrait signifier une différenciation en neurone incomplète, malgré la reproduction des protocoles de la littérature.

De la même manière que les SH-SY5Y, cette lignée a été transduite par approche lentivirale, afin d'exprimer de manière stable le biosenseur de l'IL-1 β sous le contrôle du promoteur CaMKIIa. Ensuite, des expériences de BRET ont été réalisées sur des HT-22 non différenciées ou après 24 à 48h de différenciation (**figure 45B à D**). Après une lecture basale de 5min, les cellules ont été stimulées avec de l'ACSF ou 50 μ M de NMDA puis le signal de BRET est enregistré pendant 45 min. Quel que soit l'état de différenciation des cellules, l'ajout de NMDA n'entraîne pas de maturation du biosenseur car aucune variation du signal de BRET n'est enregistrée. Afin de vérifier la fonctionnalité des récepteurs NMDA au sein des HT-22, un indicateur calcique génétiquement encodé (GECI), le GCaMP6, a été exprimé dans cette lignée.

Après lecture basale de la fluorescence pendant 2 min, les cellules ont été stimulées avec de l'ACSF (courbe noire) ou du NMDA (courbe rouge), puis la fluorescence est enregistrée pendant 5 min. Quelle que soit la stimulation, aucune augmentation de fluorescence n'est détectée (**figure 45E**). Une stimulation au Triton (contrôle positif) est ensuite réalisée. Cet agent entraîne la perméabilisation des cellules et une entrée de calcium indépendante des récepteurs NMDA. Cette stimulation induit une forte augmentation de fluorescence pour les deux conditions expérimentales. Ces résultats semblent indiquer que les récepteurs NMDA 1/ ne soient pas fonctionnels dans cette lignée ou 2/ ne soient finalement pas exprimés dans les HT-22. Il serait intéressant de vérifier l'expression des sous-unités GluN1, GluN2A et GluN2B à la synapse de ces cellules. Enfin, il est aussi possible que la protéase responsable du clivage de l'IL-1 β dans les cultures primaires de neurones ne soit pas présente dans cette lignée. De manière générale, les deux lignées SH-SY5Y et HT-22 ne semblent pas exprimer la machinerie nécessaire à la maturation de l'IL-1 β .

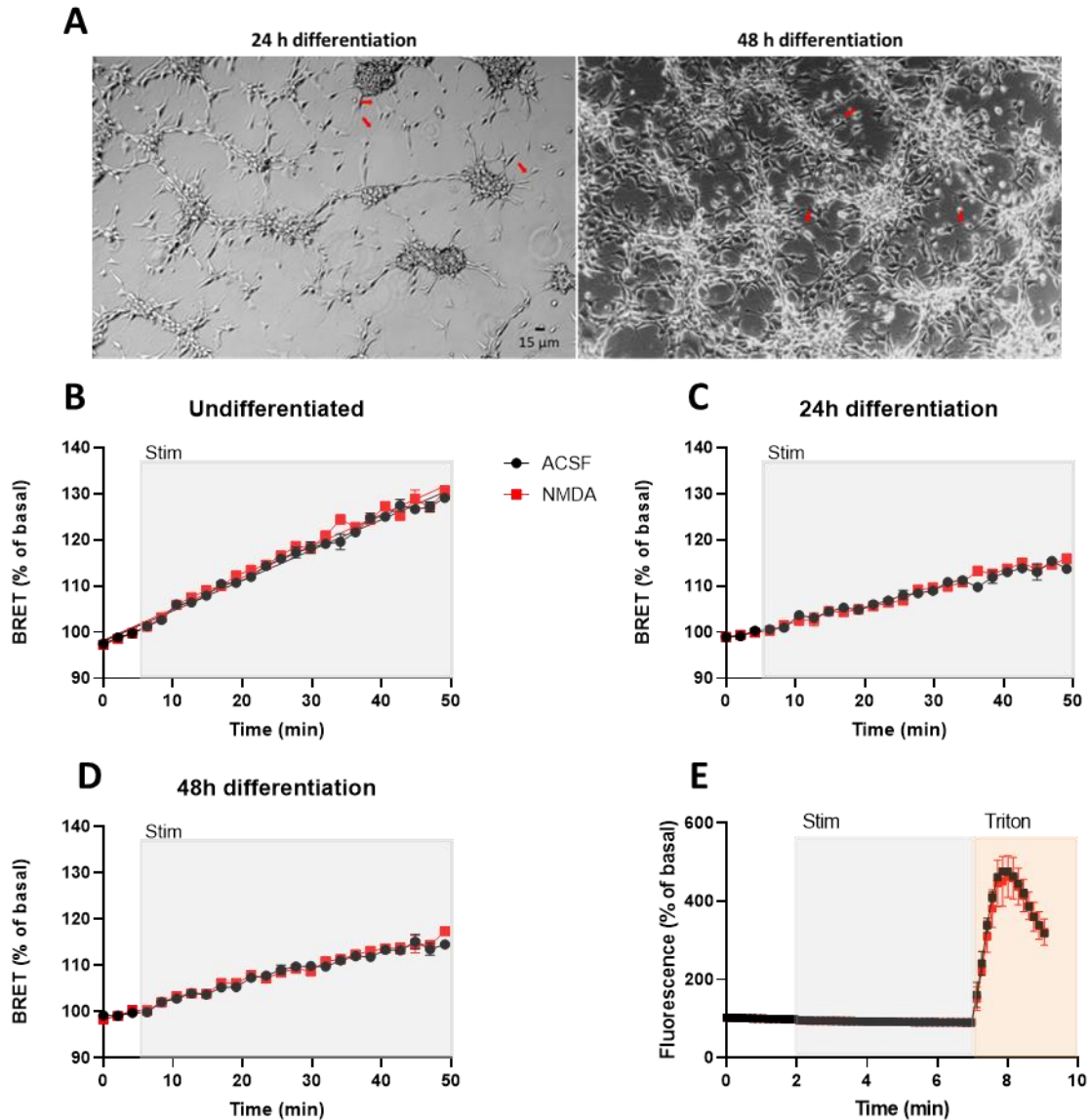


Figure 45 : Maturation du biosenseur de BRET de l'IL-1 β dans la lignée cellulaire HT-22

A : Acquisitions en lumière blanche au microscope à contraste de phase de cellules HT-22 en cours de différenciation. Dès 24h (image de gauche), des prolongements apparaissent et la forme des cellules change. Après 48h de différenciation (image de droite), les HT-22 forment un réseau dense, malgré une division cellulaire toujours présente. **B-D** : BRET en population sur des HT-22 exprimant le biosenseur de BRET de l'IL-1 β non différenciées (**B**), après 24h (**C**) ou 48h (**D**) de différenciation. La stimulation avec la solution contrôle (ACSF) ou avec 50 μ M de NMDA a lieu après la lecture du signal basal (encadré gris). Les courbes représentent la moyenne \pm SEM par point, n=4.

9.2. Décryptage de la voie de signalisation neuronale de l'IL-1 β

Du fait de l'absence de maturation de l'IL-1 β dans les lignées immortalisées, nous avons changé de stratégie en développant une analyse protéomique de l'interactome de l'IL-1 β neuronale dans des cultures primaires de neurones.

9.2.1. Expression de l'IL-1 β -APEX2 dans des cultures primaires de neurones et spectrométrie de masse

9.2.1.1. Technologie APEX et fusion IL-1 β -APEX2

La technologie APEX est une méthode capable de détecter et de « marquer » rapidement (vitesse de réaction inférieure à une minute) toute interaction, labile comme forte, entre une protéine et l'enzyme. Appelée peroxydase ascorbate ou APEX, cette enzyme provenant du soja (Martell *et al.*, 2012 ; Rhee *et al.*, 2013) possède une masse de 27 kDa et, est présente sous forme monomérique (Lam *et al.*, 2014). Elle catalyse l'oxydation de la biotine phénol en biotine phenoxy en présence de peroxyde d'hydrogène. Le produit oxydé, le radical biotine phenoxy, est hautement réactif (< 1ms) et va former des liaisons covalentes au niveau des protéines endogènes proches du site actif de l'enzyme, particulièrement sur les acides aminés tyrosines, tryptophanes, cystéines et histidines (Amini *et al.*, 2002 ; Bhaskar *et al.*, 2003 ; Rogers *et al.*, 2008). Cette réaction est appelée biotinylation, puisque la liaison covalente est formée entre l'acide aminé et la biotine. Un des plus grands avantages des marquages APEX est la possibilité d'identifier l'intégralité des protéines interagissant avec la protéine cible à une faible proximité (estimée à moins de 20 nm dans les cellules vivantes), même les interactions les plus labiles, transitoires et rares. Cependant, il est important de noter que le réactif biotine phénol peut être toxique pour les cellules, rendant le marquage APEX inadapté à des études *in vivo*.

Dans l'objectif de réaliser l'interactome de l'IL-1 β neuronale, l'APEX2 a été fusionnée sur la partie C-terminale de la pro-IL-1 β recombinante (panneau du haut, **figure 46A**). Le plasmide a été ensuite inséré dans une construction AAV contenant un promoteur CaMKIIa, permettant une expression spécifique dans les neurones excitateurs, et un reporteur fluorescent d'expression cellulaire, la Scarlet. Les séquences codantes pour l'APEX et la Scarlet sont séparées par une séquence codante P2A, générant un ARNm unique codant pour l'IL-1 β -APEX2-P2A-Scarlet. Lors de la traduction, la séquence P2A s'auto-clive, séparant physiquement l'IL-1 β -APEX de la Scarlet. L'expression de la Scarlet nous permet de vérifier

visuellement que la construction est bien exprimée dans les cultures. En présence de biotin-phénol, l'APEX fusionnée à l'IL-1 β va pouvoir biotinyler toutes les protéines interagissant avec la cytokine (panneau du bas, **figure 46A**). Des cultures primaires de neurones corticaux ont été transduites avec ce vecteur viral. Par comparaison avec les autres expériences sur culture primaire, nous avons fait le choix d'étudier l'interactome de l'IL-1 β dans des neurones corticaux car nous avons besoin d'une grande quantité de matériel biologique pour la protéomique. Le protocole de culture utilisé tout au long de cette étude nous fournit quantitativement pour un souriceau, quatre fois plus de neurones corticaux, qu'hippocampiques. Pour vérifier la fonctionnalité de l'APEX2 et l'efficacité du protocole de marquage, du peroxyde d'hydrogène et de la biotin-phénol ont été ajoutés dans le milieu pour initier la réaction de biotinylation avant de fixer les cellules et de réaliser un immuno-marquage. Les images présentées en **figure 46B** montrent l'expression de la construction dans les neurones grâce à un anticorps dirigé contre l'IL-1 β (panneau de gauche en vert) mais aussi l'activité de l'enzyme, grâce à un marquage streptavidine qui reconnaît la biotine (rouge, panneau central). La combinaison de ces deux images montre que l'expression de l'IL-1 β -APEX2, tout comme la réaction de biotinylation, ont bien lieu dans les neurones (panneau de droite). Ces résultats confirment que la construction est fonctionnelle et qu'elle s'exprime bien dans les neurones corticaux en culture.

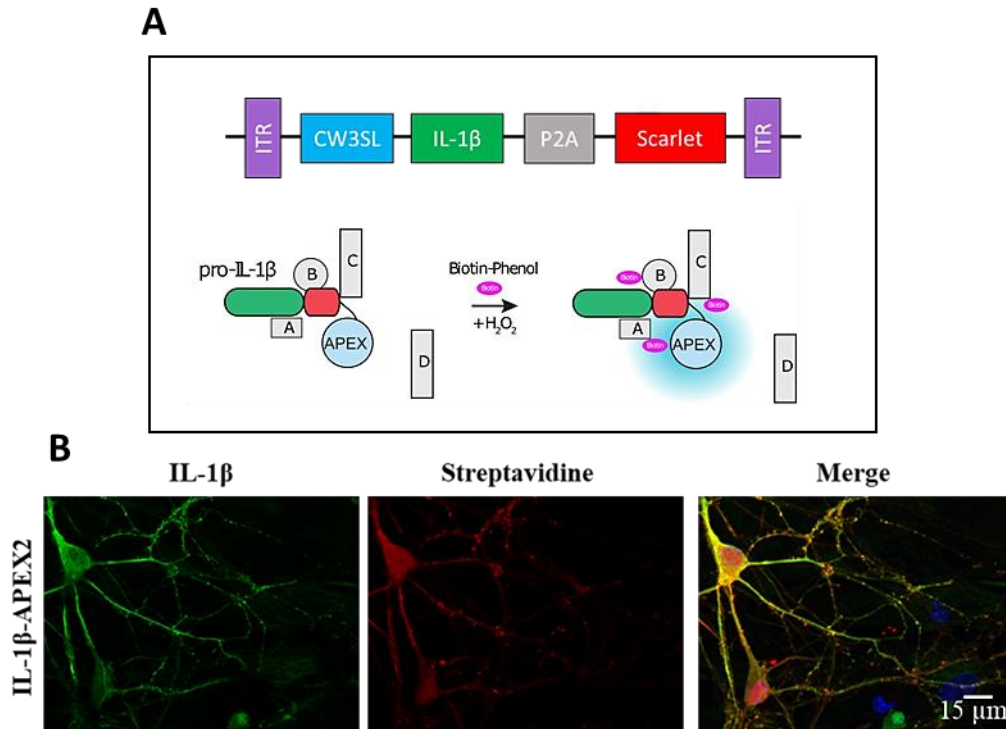


Figure 46 : Expression et fonctionnalité de l'IL-1 β -APEX2 dans les cultures primaires de neurones corticaux

A : Schéma de la construction utilisée (image du haut). Le plasmide est constitué de séquences ITR pour la production d'AAV, d'une séquence CW3SL (C : CamKIIa ; W3 : WPRE3 ; SL : Sv40 late) composée de la séquence minimale du promoteur CamKIIa ainsi que des séquences minimales de WPRE3 et du signal de polyadénylation tardif SV40. Cette séquence permet une forte expression de la protéine transgénique dans les neurones excitateurs corticaux. Le plasmide contient aussi la séquence codante pour l'IL-1 β , un motif P2A et une séquence Scarlet afin de visualiser l'expression de la construction par fluorescence avant la réalisation du protocole de marquage. L'image du bas présente le fonctionnement de la construction. L'ajout d'H₂O₂ et de biotin-phénol permet à l'APEX2 de biotinyler toutes les protéines proches. **B** : Immunocytochimie sur des cultures primaires de neurones exprimant la construction IL-1 β -APEX2 (vert) avec une enzyme fonctionnelle capable de biotinyler les protéines environnantes (rouge).

9.2.1.2. Spectrométrie de masse et génération de l'interactome

L'interactome de l'IL-1 β a été analysé dans différentes conditions : en présence de 100 μ M de D-AP5 pendant 15 min, après stimulation avec 50 μ M de NMDA pendant 7 min (noté NMDA 7') ou 15 min (noté NMDA 15'). La condition D-AP5 correspond à la condition contrôle pour laquelle nous nous attendons à identifier les protéines interagissant avec la forme pro-IL-1 β . Le temps d'incubation de 15 min avec le NMDA a été sélectionné car il correspond à la durée pour laquelle nous obtenons une diminution maximale du signal de BRET (voir **figure 36**, section 8.3.2.1) dans les cultures primaires. Le temps 7 minutes est un temps intermédiaire au cours

duquel nous espérons détecter la protéase et/ou des composants de la voie de signalisation responsable de la maturation de l'IL-1 β . A l'issue de la réaction de biotinylation avec le peroxyde d'hydrogène, les cellules sont lysées et les protéines biotinylées isolées par immunoprécipitation avec des billes streptavidine. La biotinylation et la purification des protéines ont été confirmées par western-blot (**figure 47A**), dans lequel est retrouvé l'IL-1 β -APEX2 (bande vers 50 kDa) et l'ensemble des protéines biotinylées grâce au marquage streptavidine. Visuellement, il semble que l'intensité des bandes obtenues pour les conditions AP5 et NMDA 7' soient similaires tandis que la condition NMDA 15' semble présenter une plus forte intensité, laissant penser qu'il y aurait plus de protéines biotinylées. Dans la condition contrôle (noté « ctrl », **figure 47A**), pour laquelle les cultures de neurones ont été traitées de la même façon sans exprimer la fusion IL-1 β -APEX2, aucun marquage n'est observable, démontrant la spécificité de la réaction. Les échantillons ont ensuite été analysés par la plateforme de protéomique présente au sein de l'institut. Un schéma récapitulatif de l'expérience est présenté en **figure 47B**.

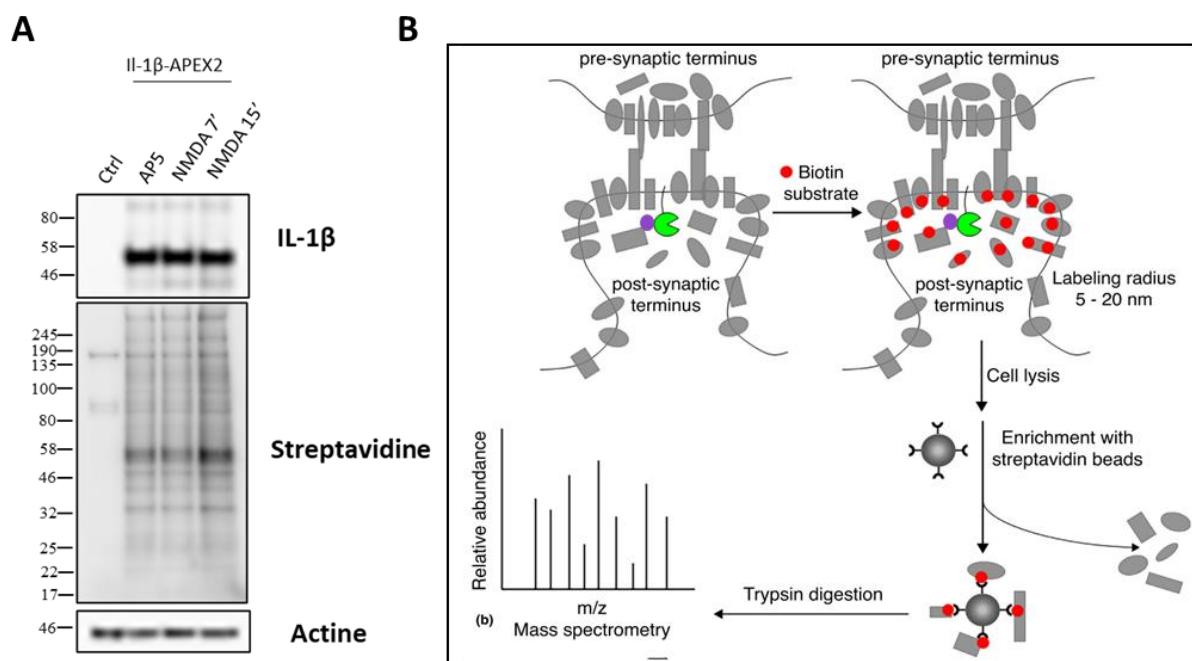


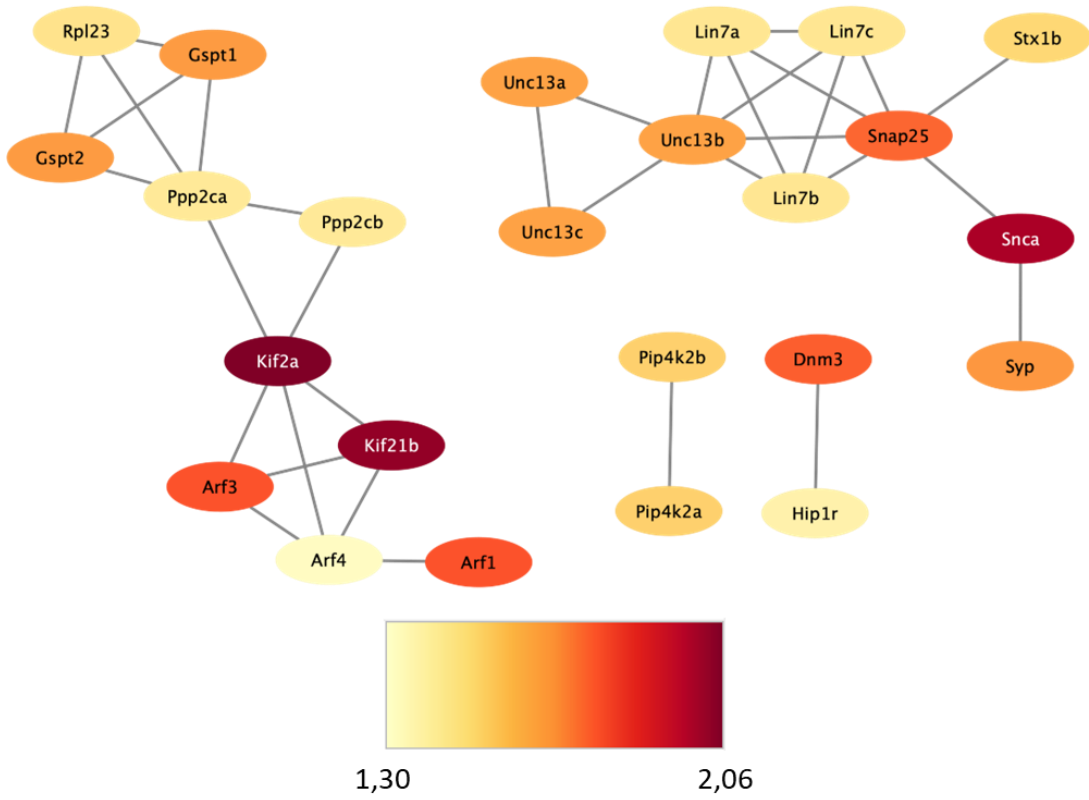
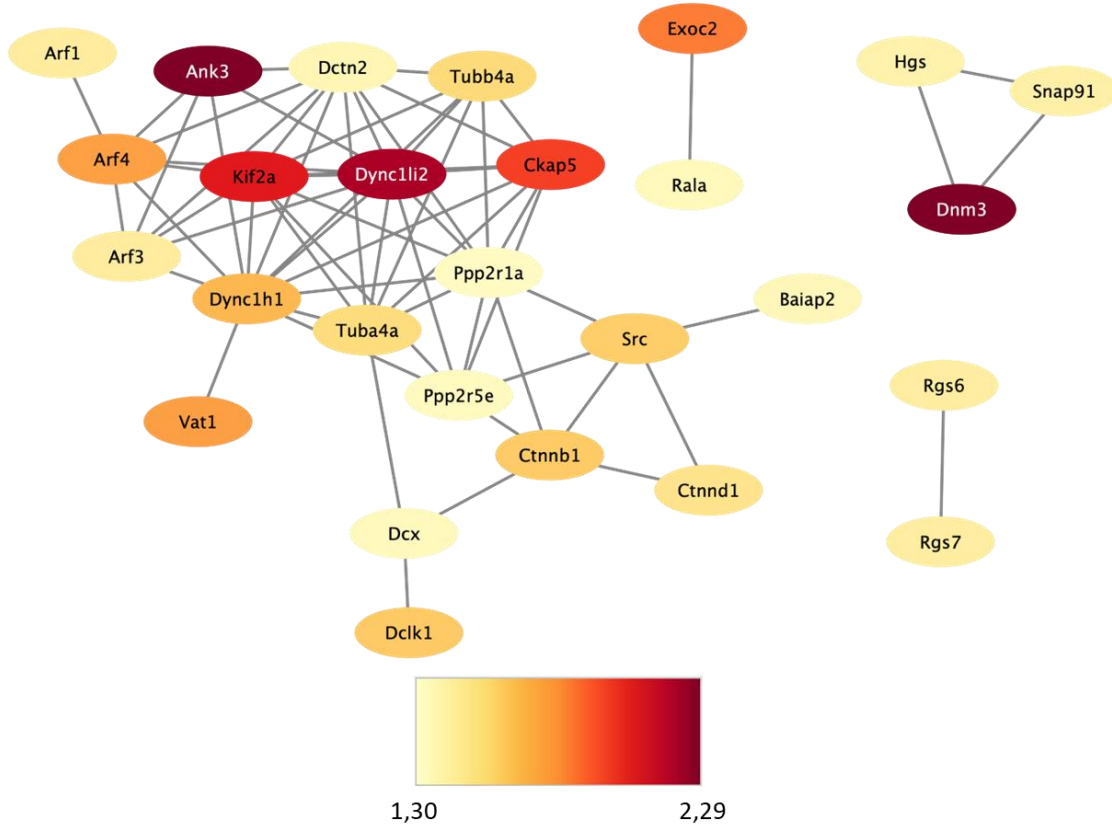
Figure 47 : Protocole de préparation des échantillons pour l'analyse par spectrométrie de masse

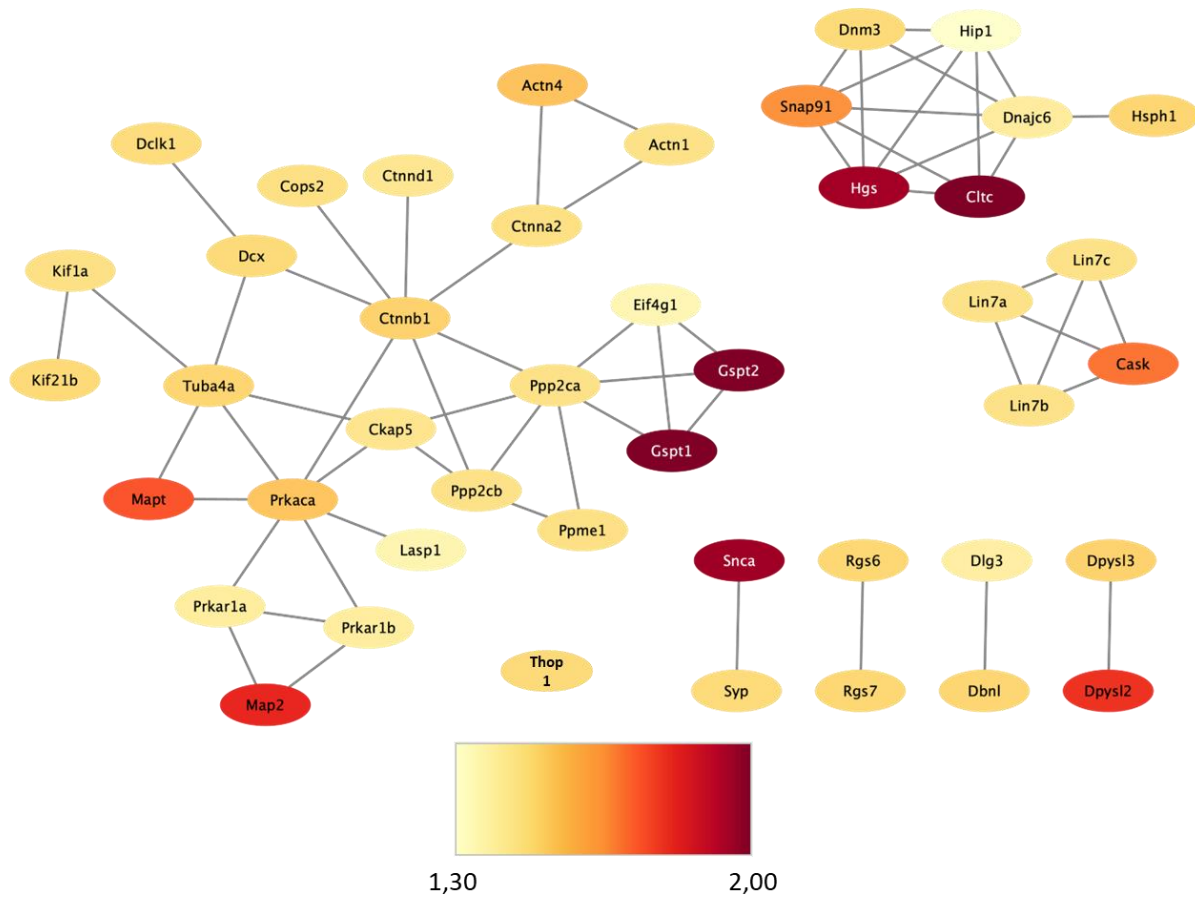
A : Western Blot des échantillons cellulaires biotinylés et lysés pour les 4 conditions suivantes : non transduit et pas de stimulation (ctrl), incubation avec 100 μ M de D-AP5 pendant 15 min (AP5) et stimulation avec 50 μ M de NMDA pendant 7 min (NMDA 7') ou 15 min (NMDA 15'). **B** : Schéma récapitulatif du traitement des échantillons de l'étape de la biotinylation par activation de l'APEX2, à l'envoi en spectrométrie de masse (adapté de Han *et al.* 2018).

9.2.2. Analyse moléculaire de l'interactome de l'IL-1 β

9.2.2.1. Interactome de l'IL-1 β neuronale en condition basale et après stimulation neuronale

Les immunoprécipitats ont été digérés avec de la trypsine et les peptides des digestats analysés par spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Grâce au logiciel MaxQuant, les protéines ont été identifiées en comparant la masse/charge des peptides et la masse/charge de leurs fragments MS2 avec la digestion théorique et la fragmentation théorique des protéines de la base de données *Mus musculus Complete Proteome Set* (SwissProt). Les intensités MS des protéines ont été extraites à l'aide du logiciel Skyline (v 19.1) et l'analyse a permis de calculer l'enrichissement et la significativité de chaque protéine dans les immunoprécipitats AP5 vs Ctrl ; NMDA 7' vs Ctrl et NMDA 15' vs Ctrl. Ainsi, sur les 962 protéines identifiées au total, 99 protéines ont été détectées comme significativement enrichies dans la condition AP5, 46 protéines dans la condition NMDA 7' et 69 protéines pour NMDA 15' (**tableau 10**). L'IL-1 β ressort comme protéine la plus enrichie. Ce résultat démontre que la fusion IL-1 β -APEX2 a entraîné la biotinylation de la cytokine. Par analyse bio-informatique sur STRING et Cytoscape, les interactomes de l'IL-1 β neuronale pour chaque condition ont été générés grâce aux bases de données d'interactions protéines-protéines connues dans la littérature (**figure 48**). Bien que l'objectif de cette section soit principalement d'identifier la protéase responsable de clivage de l'IL-1 β neuronale, l'ensemble de ces données nous permet de mieux comprendre le comportement de cette cytokine et des acteurs associés et ouvre des hypothèses et champs d'investigations vers l'étude de la localisation précise de l'IL-1 β dans les neurones, mais aussi vers les mécanismes potentiellement impliqués dans la maturation et la sécrétion de la cytokine. L'analyse des protéines significativement enrichies révèle la présence d'une protéase potentiellement intéressante et retrouvée uniquement après 15 min de stimulation NMDA (**tableau 10**) : la Thimet Oligopeptidase 1 (notée THOP1 et surlignée en jaune, **tableau 10, vert**). Cette protéase fera l'objet de la section 9.3.

A**Interactome AP5****B****Interactome NMDA 7 min**

C**Interactome NMDA 15 min****Figure 48 : Identification et caractérisation des interactomes de l'IL-1 β -APEX2**

Représentations schématiques des interactomes de l'IL-1 β -APEX2 exprimée dans des neurones excitateurs corticaux, comparant les conditions AP5 vs Ctrl (A, titre gris), NMDA 7min vs Ctrl (B, titre bleu) et NMDA 15 min vs Ctrl (C, titre vert). Les protéines avec $p < 0.05$ ont été considérées comme significativement enrichies et une analyse STRING a identifié dans les bases de données publiques les nombreuses interactions protéines-protéines signalées entre les différentes protéines de ces listes. Chaque ligne des graphiques représente une interaction protéine-protéine rapportée précédemment dans la littérature entre deux protéines de la liste. La couleur des cercles de protéines correspond au $-\log_{10}$ (p-value) de l'enrichissement en protéines.

Protein names	UniProtKB accession numbers	Gene names	LFQ intensity A	LFQ intensity B	LFQ intensity C	LFQ intensity D	-Log p-value AP5 vs Ctrl
Interleukin-1 beta	P10749	Il1b	-15,51	-11,33	-11,05	-9,93	3,17
E3 ubiquitin-protein ligase RNF213	E9Q555	Rnf213	-11,62	-11,23	-11,12	-11,84	2,49
Nuclear protein localization protein 4 homolog	P60670	Nploc4	-16,15	-14,35	-13,86	-14,23	1,13
Dynamin-3	Q8BZ98	Dnm3	-15,78	-14,91	-14,01	-15,51	1,75
Ankyrin-3	G5E8K5	Ank3	-14,73	-14,79	-13,81	-14,37	0,33
Lipid phosphate phosphatase-related protein type 4	Q7TME0	Lppr4	-14,93	-14,89	-15,19	-12,93	2,07
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 9	O35239	Ptpn9	-16,08	-15,92	-15,81	-14,55	0,34
Clathrin heavy chain 1	Q68FD5	Cltc	-7,06	-6,84	-6,36	-6,28	1,11
Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	Q6PDL0	Dync1li2	-15,61	-15,51	-13,78	-14,49	0,75
Unconventional myosin-Ib	P46735	Myo1b	-15,48	-15,24	-14,54	-13,84	0,92
Kinesin-like protein KIF2A	P28740	Kif2a	-11,79	-11,39	-11,57	-12,11	2,06
Inactive phospholipase C-like protein 2	Q8K394	Plcl2	-16,35	-15,11	-16,14	-15,06	1,19
Kinesin-like protein KIF21B	Q9QXL1;B7 ZNG0;Q7M 6Z4	Kif21b	-12,35	-11,46	-12,82	-12,12	2,03
Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A;Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3B	Q8R050;Q1 49F3	Gspt1;Gs pt2	-14,72	-13,50	-14,01	-13,57	1,65
Alpha-synuclein	O55042	Snca	-14,94	-13,43	-14,07	-10,71	1,99
Septin-6	Q9R1T4	Sept6	-13,93	-13,56	-13,45	-13,44	0,71
Cytoskeleton-associated protein 5	A2AGT5	Ckap5	-15,35	-15,29	-13,09	-14,08	0,76
Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	Q99LI8	Hgs	-13,67	-13,47	-12,98	-11,77	1,27
Large proline-rich protein BAG6	Q9Z1R2	Bag6	-15,33	-14,78	-14,46	-15,74	0,66
Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1-like 1	Q8VE33	Gdap1l1	-15,99	-16,78	-15,26	-14,78	1,04
Exocyst complex component 2	Q9D4H1	Exoc2	-14,87	-15,92	-13,90	-15,73	0,61
Microtubule-associated protein 2	P20357	Map2	-9,53	-8,89	-8,54	-6,59	0,70
Dihydropyrimidinase-related protein 2	O08553	Dpysl2	-7,74	-7,18	-7,11	-6,17	0,56
Neuronal membrane glycoprotein M6-a	P35802	Gpm6a	-15,20	-12,28	-16,39	-10,84	0,95
ADP-ribosylation factor 1;ADP-ribosylation factor 3;ADP-ribosylation factor 2	P84078;P61 205;Q8BSL7	Arf1;Arf 3;Arf2	-13,98	-12,31	-12,95	-12,34	1,77
Synaptosomal-associated protein 25	P60879	Snap25	-14,71	-13,28	-17,12	-15,20	1,74
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	Q62465	Vat1	-15,21	-12,60	-12,57	-14,90	1,20
ADP-ribosylation factor 4	P61750	Arf4	-13,23	-11,22	-11,51	-11,26	1,32
Microtubule-associated protein tau	P10637	Mapt	-13,79	-15,54	-13,81	-11,82	0,44
Destrin	Q9R0P5	Dstn	-15,63	-15,53	-11,12	-10,51	0,62
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV	P08414	Camk4	-15,09	-16,56	-15,55	-15,11	0,36
Rho-associated protein kinase 2	P70336	Rock2	-12,63	-12,49	-12,12	-11,99	1,05
Peripheral plasma membrane protein CASK	O70589	Cask	-13,52	-12,86	-12,44	-12,48	1,06
CaM kinase-like vesicle-associated protein	Q3UHL1	Camkv	-12,25	-11,45	-11,07	-10,69	0,78
Rho guanine nucleotide exchange factor 12	Q8R4H2	Arhgef1 2	-15,63	-15,36	-14,59	-16,23	1,02
Synaptophysin	Q62277	Syp	-14,12	-10,14	-11,41	-8,52	1,66
Tubulin-folding cofactor B	Q9D1E6	Tbcb	-16,45	-14,93	-14,49	-13,82	0,82
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	Q9JHU4	Dync1h1	-7,78	-7,64	-7,28	-7,67	0,81
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	Q9CR16	Ppid	-13,82	-15,24	-12,81	-13,32	0,74

Gephyrin;Molybdopterin adenylyltransferase;Molybdopterin molybdenumtransferase	Q88UV3	Gphn	-13,98	-13,05	-13,68	-12,87	1,15
Microtubule-actin cross-linking factor 1	Q9QXZ0	Macf1	-9,98	-9,99	-9,74	-10,56	0,40
Clathrin coat assembly protein AP180	Q61548;Q7M6Y3	Snap91	-12,74	-12,31	-11,80	-11,21	0,79
Coronin-1B	Q9WUM3	Coro1b	-14,69	-13,40	-12,52	-12,27	0,99
Protein unc-13 homolog B;Protein unc-13 homolog A;Protein unc-13 homolog C	Q9Z1N9;Q4KUS2;Q8K0T7	Unc13b;Unc13a;Unc13c	-15,61	-15,40	-15,59	-15,68	1,63
Syntaxin-1B	P61264;Q00262	Stx1b	-11,61	-10,79	-11,38	-11,87	1,50
Serine/threonine-protein kinase DCLK1	Q9JLM8	Dclk1	-10,12	-9,95	-9,10	-9,15	0,64
Catenin beta-1	Q02248	Ctnnb1	-12,83	-12,28	-12,02	-12,21	0,94
Abl interactor 2	P62484	Abi2	-15,51	-15,11	-14,48	-13,99	1,07
Neuronal proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	P05480;Q62270;Q922K9;Q62190;P16056	Src	-15,86	-14,43	-13,27	-14,87	0,33
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 4;Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 11;Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15	P35123;Q99K46;Q8R5H1	Usp4;Usp11;Usp15	-15,62	-14,10	-14,23	-13,88	1,58
Synaptogyrin-1	O55100	Syng1	-16,10	-15,53	-13,76	-9,96	1,48
Tubulin beta-4A chain	Q9D6F9	Tubb4a	-11,71	-11,00	-10,77	-11,14	0,62
Alpha-actinin-4	P57780;O88990	Actn4	-10,35	-9,95	-9,82	-8,97	0,56
Tubulin alpha-4A chain	P68368	Tuba4a	-9,98	-9,54	-9,31	-9,32	0,63
cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	P05132	Prkaca	-16,47	-15,98	-15,96	-13,73	0,80
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23	Q6PB44	Ptpn23	-15,97	-13,68	-16,02	-15,24	1,52
Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 beta;Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 alpha	Q80XI4;O70172	Pip4k2b;Pip4k2a	-15,40	-13,83	-15,03	-13,23	1,51
Niban-like protein 1	Q8R1F1	Fam129b	-15,64	-14,62	-14,19	-13,94	1,11
Dihydropyrimidinase-related protein 3	Q62188	Dpysl3	-7,70	-7,10	-6,97	-6,57	0,69
Heat shock protein 105 kDa	Q61699	Hsph1	-11,29	-11,15	-10,87	-10,49	0,30
Catenin delta-1	P30999	Ctnnd1	-12,02	-11,86	-11,26	-11,38	0,21
Drebrin-like protein	Q62418	Dbnl	-13,56	-13,43	-13,21	-12,67	0,42
Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	Q8BMJ2	Lars	-11,90	-11,76	-11,41	-11,51	0,42
Regulator of G-protein signaling 7;Regulator of G-protein signaling 6	O54829;Q9Z2H2	Rgs7;Rgs6	-15,86	-14,07	-13,84	-12,96	1,23
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	Q3UM45	Ppp1r7	-15,67	-14,62	-14,78	-14,34	1,06
Neuronal migration protein doublecortin	O88809	Dcx	-13,47	-12,20	-12,06	-11,88	0,99
Reticulon-1	Q8K0T0	Rtn1	-13,22	-12,20	-12,30	-12,14	0,66
Dual specificity protein phosphatase 3	Q9D7X3	Dusp3	-13,54	-14,25	-12,95	-13,63	0,25
SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 3	Q812A2	Srgap3	-14,14	-13,34	-13,39	-12,66	0,62
COP9 signalosome complex subunit 2	P61202	Cops2	-15,99	-15,34	-14,70	-14,65	0,90
Catenin alpha-2	Q61301	Ctnna2	-12,61	-12,14	-12,09	-11,75	1,12
Protein phosphatase methylesterase 1	Q8BVQ5	Ppme1	-15,66	-15,02	-15,33	-15,69	0,86
60S ribosomal protein L23	P62830	Rpl23	-15,67	-13,04	-12,91	-12,48	1,44

Kinesin-like protein KIF1A	P33173;Q60575	Kif1a	-13,27	-14,90	-13,36	-12,88	0,22
Catenin delta-2	O35927	Ctnnd2	-16,17	-15,45	-15,31	-14,24	0,97
Alpha-actinin-1	Q7TPR4	Actn1	-12,02	-12,23	-11,34	-11,51	0,26
Protein lin-7 homolog C;Protein lin-7 homolog A;Protein lin-7 homolog B	O88952;Q8JZS0;O88951	Lin7c;Lin7a;Lin7b	-15,52	-15,64	-15,90	-14,29	1,43
Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform;Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	P63330;P62715	Ppp2ca;Ppp2cb	-14,84	-11,84	-12,05	-11,41	1,42
Importin-9	Q91YE6	Ipo9	-15,97	-14,62	-15,45	-15,02	0,19
Disks large homolog 3	P70175	Dlg3	-15,35	-13,61	-13,55	-12,55	1,40
Glucose 1,6-bisphosphate synthase	Q8CAA7	Pgm2l1	-15,32	-12,80	-13,86	-12,86	1,12
Putative tyrosine-protein phosphatase auxilin	Q80TZ3	Dnajc6	-13,85	-12,49	-12,02	-11,63	1,04
cAMP-dependent protein kinase type I-beta regulatory subunit;cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit;cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit, N-terminally processed	P12849;Q9DBC7	Prkar1b;Prkar1a	-15,26	-15,61	-15,21	-13,85	0,12
Huntingtin-interacting protein 1-related protein	Q9JKY5	Hip1r	-15,36	-15,43	-14,07	-15,91	1,38
Cofilin-1	P18760	Cfl1	-9,34	-8,73	-8,56	-8,11	1,37
Dynactin subunit 2	Q99KJ8	Dctn2	-15,73	-16,16	-14,19	-13,35	0,97
Ubiquitin thioesterase OTUB1	Q7TQI3	Otub1	-11,25	-11,11	-11,11	-10,36	0,73
Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2	Q8BKX1	Baiap2	-15,02	-15,39	-13,37	-13,81	0,54
Calcium-dependent secretion activator 1	Q80TJ1;Q8BYR5	Cadps	-12,62	-12,43	-12,31	-12,19	0,88
LIM and SH3 domain protein 1	Q61792	Lasp1	-11,34	-10,44	-10,93	-8,67	1,14
Ras-related protein Ral-A	P63321	Rala	-13,90	-14,94	-13,48	-13,05	0,23
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	Q6NZJ6	Eif4g1	-12,66	-13,16	-12,90	-12,39	0,79
Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta	Q99LB6	Mat2b	-16,28	-15,27	-15,23	-14,54	0,07
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform	Q61151	Ppp2r5e	-15,45	-15,17	-13,60	-14,32	0,51
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	Q76MZ3;Q7TNP2	Ppp2r1a	-11,41	-10,86	-10,48	-10,90	0,85
Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	P21279	Gnaq	-11,72	-11,26	-11,39	-11,01	0,80
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	P56399	Usp5	-11,92	-11,43	-11,03	-11,75	0,66
Serine/threonine-protein kinase MARK1	Q8VHJ5	Mark1	-15,52	-15,58	-13,17	-13,94	0,60
Huntingtin-interacting protein 1	Q8VD75	Hip1	-15,95	-14,18	-14,24	-15,11	0,70

Protein names	UniProt KB accession numbers	Gene names	LFQ intensity A	LFQ intensity B	LFQ intensity C	LFQ intensity D	-Log p-value NMDA 7' vs Ctrl
Interleukin-1 beta	P10749	Il1b	-16,46	-10,43	-10,15	-9,63	3,30
Synaptogyrin-1	O55100	Syngn1	-15,81	-12,78	-13,80	-12,34	1,39
Lipid phosphate phosphatase-related protein type 4	Q7TME0	Lppr4	-16,12	-13,64	-13,62	-13,29	1,84
Destrin	Q9R0P5	Dstn	-13,48	-12,25	-12,11	-11,57	1,65
Regulator of G-protein signaling 7;Regulator of G-protein signaling 6	O54829;Q9Z2H2	Rgs7;Rgs6	-17,46	-15,01	-14,44	-13,95	1,42
Microtubule-associated protein 2	P20357	Map2	-8,76	-8,53	-7,94	-7,44	1,35
Inactive phospholipase C-like protein 2	Q8K394	Plcl2	-17,07	-16,70	-15,81	-14,70	1,46
Serine/threonine-protein kinase MARK1	Q8VHJ5	Mark1	-12,92	-13,70	-13,34	-13,19	1,31
Dynactin subunit 2	Q99KJ8	Dctn2	-17,39	-14,63	-14,40	-15,96	1,37
Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1-like 1	Q8VE33	Gdap1l1	-16,22	-14,36	-14,34	-13,85	1,84
ADP-ribosylation factor 1;ADP-ribosylation factor 3;ADP-ribosylation factor 2	P84078;P61205;Q8BSL7	Arf1;Arf3;Arf2	-15,09	-14,27	-13,23	-13,24	1,43
Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	Q99LI8	Hgs	-14,28	-13,20	-13,58	-12,83	1,39
Dynamin-3	Q8BZ98	Dnm3	-15,76	-14,45	-13,93	-13,95	2,64
Cytoskeleton-associated protein 5	A2AGT5	Ckap5	-14,08	-13,44	-13,09	-13,12	1,95
Niban-like protein 1	Q8R1F1	Fam129b	-16,70	-16,08	-15,41	-15,72	1,38
ADP-ribosylation factor 4	P61750	Arf4	-13,87	-13,18	-12,29	-12,02	1,73
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	Q3UM45	Ppp1r7	-16,86	-15,68	-15,04	-14,84	1,41
Clathrin coat assembly protein AP180	Q61548;Q7M6Y3	Snap91	-12,66	-12,64	-12,06	-11,38	1,40
Neuronal migration protein doublecortin	O88809	Dcx	-12,97	-12,59	-12,25	-11,53	1,35
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 9	O35239	Ptpn9	-16,15	-16,66	-15,63	-15,40	2,29
Serine/threonine-protein kinase DCLK1	Q9JLM8	Dclk1	-9,53	-9,23	-8,59	-8,33	1,60
Unconventional myosin-Ib	P46735	Myo1b	-14,96	-13,83	-13,96	-13,99	1,80
Ankyrin-3	G5E8K5	Ank3	-14,96	-14,43	-13,33	-13,56	2,44
Tubulin alpha-4A chain	P68368	Tuba4a	-10,75	-10,78	-9,96	-9,35	1,53
Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2	Q8BKX1	Baiap2	-13,42	-15,22	-13,78	-12,77	1,36
Reticulon-1	Q8K0T0	Rtn1	-13,60	-13,23	-12,20	-12,17	1,46
Large proline-rich protein BAG6	Q9Z1R2	Bag6	-15,74	-15,52	-14,71	-14,61	1,85
Neuronal proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	P05480;Q62270;Q922K9;Q62190;P16056	Src	-13,75	-13,78	-13,51	-13,79	1,59
Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	Q6PDL0	Dync1li2	-16,25	-15,04	-14,14	-16,30	2,20
Catenin beta-1	Q02248	Ctnnb1	-12,72	-12,39	-11,98	-12,05	1,59
Tubulin beta-4A chain	Q9D6F9	Tubb4a	-10,96	-11,30	-10,40	-10,19	1,54
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform	Q61151	Ppp2r5e	-14,18	-14,95	-14,59	-14,26	1,34
Peripheral plasma membrane protein CASK	O70589	Cask	-12,81	-12,86	-12,52	-12,26	1,54
Kinesin-like protein KIF2A	P28740	Kif2a	-11,76	-11,16	-11,24	-10,59	2,04
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	Q62465	Vat1	-13,73	-13,43	-12,82	-12,99	1,74
Rho guanine nucleotide exchange factor 12	Q8R4H2	Arhgef12	-14,76	-14,60	-14,53	-14,43	1,67

Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	P56399	Usp5	-11,55	-11,54	-11,33	-10,86	1,31
Catenin delta-1	P30999	Ctnnd1	-11,78	-12,01	-11,41	-11,38	1,48
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	Q76M23;Q7TNP2	Ppp2r1a	-11,12	-10,93	-10,77	-10,59	1,33
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	Q9JHU4	Dync1h1	-7,28	-7,06	-6,95	-6,90	1,66
Ras-related protein Ral-A	P63321	Rala	-13,80	-14,24	-13,95	-14,02	1,35
E3 ubiquitin-protein ligase RNF213	E9Q555	Rnf213	-11,43	-11,25	-11,03	-11,20	3,16
Syntaxin-1B	P61264;Q0262	Stx1b	-11,53	-11,39	-10,99	-11,11	1,61
Microtubule-actin cross-linking factor 1	Q9QXZ0	Macf1	-10,35	-10,15	-9,81	-9,68	1,64
Dual specificity protein phosphatase 3	Q9D7X3	Dusp3	-13,68	-14,29	-13,66	-13,56	1,45
Exocyst complex component 2	Q9D4H1	Exoc2	-17,20	-14,59	-13,85	-16,41	1,83

Protein names	UniProt KB accession numbers	Gene names	LFQ intensity A	LFQ intensity B	LFQ intensity C	LFQ intensity D	-Log p-value NMDA 15' vs Ctrl
Interleukin-1 beta	P10749	Il1b	-13,78	-9,88	-10,44	-9,99	3,46
Nuclear protein localization protein 4 homolog	P60670	Nploc4	-16,09	-14,71	-15,39	-14,41	2,75
Dynamin-3	Q8BZ98	Dnm3	-15,99	-13,60	-13,32	-13,61	1,47
Ankyrin-3	G5E8K5	Ank3	-14,44	-15,18	-13,77	-13,41	1,74
Lipid phosphate phosphatase-related protein type 4	Q7TME0	Lppr4	-16,65	-13,10	-13,16	-13,33	2,38
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 9	O35239	Ptpn9	-15,80	-15,71	-15,69	-15,01	2,23
Clathrin heavy chain 1	Q68FD5	Cltc	-6,74	-6,52	-6,93	-6,56	2,29
Unconventional myosin-1b	P46735	Myo1b	-14,93	-14,51	-14,62	-14,08	2,12
Inactive phospholipase C-like protein 2	Q8K394	Plcl2	-17,07	-15,34	-14,49	-14,02	2,06
Kinesin-like protein KIF21B	Q9QXL1;B7ZNG0;Q7M6Z4	Kif21b	-12,52	-11,64	-12,44	-12,01	1,47
Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A;Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3B	Q8R050;Q149F3	Gspt1;Gspt2	-14,48	-13,66	-15,28	-13,35	2,00
Alpha-synuclein	O55042	Snca	-17,13	-11,97	-13,24	-12,39	1,95
Septin-6	Q9R1T4	Sept6	-13,84	-13,60	-13,79	-13,26	1,96
Cytoskeleton-associated protein 5	A2AGT5	Ckap5	-15,13	-13,09	-12,95	-12,87	1,42
Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	Q99LI8	Hgs	-13,22	-12,17	-12,89	-12,31	1,95
Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1-like 1	Q8VE33	Gdap1l1	-17,25	-13,49	-13,67	-15,91	1,36
Microtubule-associated protein 2	P20357	Map2	-8,32	-7,70	-7,54	-6,99	1,81
Dihydropyrimidinase-related protein 2	O08553	Dpysl2	-7,22	-6,88	-7,55	-6,47	1,78
Neuronal membrane glycoprotein M6-a	P35802	Gpm6a	-13,92	-11,21	-12,59	-11,73	1,78
Microtubule-associated protein tau	P10637	Mapt	-13,55	-10,88	-13,32	-11,19	1,73
Destrin	Q9R0P5	Dstn	-13,21	-11,47	-12,11	-11,45	1,71
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV	P08414	Camk4	-16,84	-14,04	-15,17	-14,12	1,70
Rho-associated protein kinase 2	P70336	Rock2	-12,60	-12,43	-12,45	-12,18	1,70
Peripheral plasma membrane protein CASK	O70589	Cask	-12,62	-12,05	-12,21	-12,43	1,68
CaM kinase-like vesicle-associated protein	Q3UHL1	Camkv	-11,00	-10,79	-10,66	-10,11	1,67

Synaptophysin	Q62277	Syp	-12,51	-9,42	-10,89	-10,23	1,47
Tubulin-folding cofactor B	Q9D1E6	Tbcb	-15,08	-14,41	-14,19	-13,87	1,66
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	Q9CR16	Ppid	-15,56	-12,67	-15,44	-13,34	1,65
Gephyrin;Molybdopterin adenyltransferase;Molybdopterin molybdenumtransferase	Q8BUV3	Gphn	-13,42	-13,16	-13,17	-12,46	1,65
Clathrin coat assembly protein AP180	Q61548;Q7M6Y3	Snap91	-11,86	-11,60	-11,93	-11,40	1,64
Coronin-1B	Q9WUM3	Coro1b	-13,84	-12,87	-12,86	-12,60	1,63
Serine/threonine-protein kinase DCLK1	Q9JLM8	Dclk1	-9,14	-8,55	-8,63	-8,22	1,46
Catenin beta-1	Q02248	Ctnnb1	-12,35	-12,54	-11,97	-11,62	1,49
Abi interactor 2	P62484	Abi2	-16,32	-13,54	-14,05	-13,76	1,59
Synaptogyrin-1	O55100	Syng1	-14,79	-10,43	-11,89	-11,36	1,54
Alpha-actinin-4	P57780;O88990	Actn4	-10,47	-9,94	-10,48	-9,59	1,53
Tubulin alpha-4A chain	P68368	Tuba4a	-9,93	-9,74	-9,47	-9,55	1,48
cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	P05132	Prkaca	-14,01	-13,52	-13,81	-13,88	1,52
Niban-like protein 1	Q8R1F1	Fam129b	-15,79	-14,69	-15,38	-14,37	1,50
Dihydropyrimidinase-related protein 3	Q62188	Dpysl3	-6,85	-6,48	-6,96	-6,48	1,49
Heat shock protein 105 kDa	Q61699	Hsph1	-10,97	-11,19	-10,94	-10,83	1,48
Catenin delta-1	P30999	Ctnnd1	-11,37	-11,58	-10,90	-11,38	1,42
Drebrin-like protein	Q62418	Dbnl	-14,84	-12,50	-13,46	-12,83	1,48
Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	Q8BMJ2	Lars	-11,47	-11,15	-11,08	-11,39	1,48
Regulator of G-protein signaling 7;Regulator of G-protein signaling 6	O54829;Q9Z2H2	Rgs7;Rgs6	-14,35	-13,82	-13,70	-14,00	1,48
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	Q3UM45	Ppp1r7	-15,20	-14,57	-14,70	-14,62	1,47
Neuronal migration protein doublecortin	O88809	Dcx	-12,24	-11,32	-11,37	-11,28	1,47
Thimet oligopeptidase	Q8C1A5	Thop1	-15,53	-15,74	-15,13	-13,60	1,45
SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 3	Q812A2	Srgap3	-12,89	-12,40	-12,46	-12,15	1,45
COP9 signalosome complex subunit 2	P61202	Cops2	-14,80	-14,54	-14,80	-14,22	1,45
Catenin alpha-2	Q61301	Ctnna2	-11,93	-11,84	-12,69	-11,55	1,45
Protein phosphatase methylesterase 1	Q8BVQ5	Ppme1	-16,20	-14,51	-14,81	-14,47	1,45
Kinesin-like protein KIF1A	P33173;Q60575	Kif1a	-13,74	-12,50	-12,85	-12,88	1,44
Catenin delta-2	O35927	Ctnnd2	-15,12	-13,78	-14,97	-13,97	1,44
Alpha-actinin-1	Q7TPR4	Actn1	-12,21	-12,48	-12,11	-11,47	1,44
Protein lin-7 homolog C;Protein lin-7 homolog A;Protein lin-7 homolog B	O88952;Q8JZ50;O88951	Lin7c;Lin7a;Lin7b	-15,52	-14,95	-16,13	-12,93	1,44
Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform;Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	P63330;P62715	Ppp2ca;Ppp2cb	-12,72	-12,30	-12,32	-12,29	1,44
Importin-9	Q91YE6	Ipo9	-15,87	-16,21	-16,69	-14,49	1,42
Disks large homolog 3	P70175	Dlg3	-13,97	-12,46	-13,87	-12,37	1,38
Glucose 1,6-bisphosphate synthase	Q8CAA7	Pgm2l1	-13,86	-13,60	-13,52	-13,32	1,40
Putative tyrosine-protein phosphatase auxilin	Q80TZ3	Dnajc6	-11,97	-11,58	-11,90	-11,55	1,39
cAMP-dependent protein kinase type I-beta regulatory subunit;cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit;cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit, N-terminally processed	P12849;Q9DBC7	Prkar1b;Prkar1a	-14,53	-17,08	-13,50	-14,20	1,39

Ubiquitin thioesterase OTUB1	Q7TQI3	Otub1	-10,82	-10,12	-11,22	-10,88	1,36
Calcium-dependent secretion activator 1	Q80TJ1;Q8BYR5	Cadps	-12,37	-11,83	-11,97	-11,83	1,35
LIM and SH3 domain protein 1	Q61792	Lasp1	-10,98	-9,40	-10,26	-9,92	1,35
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	Q6NZJ6	Eif4g1	-16,23	-13,04	-12,68	-12,81	1,35
Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta	Q99LB6	Mat2b	-14,81	-16,86	-15,38	-14,52	1,34
Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	P21279	Gnaq	-11,57	-11,48	-11,89	-11,34	1,32
Huntingtin-interacting protein 1	Q8VD75	Hip1	-14,78	-14,40	-14,77	-14,74	1,30

Tableau 10 : Liste des protéines co-immunoprécipitées avec l'IL-1 β -APEX2

Ces tableaux communiquent des informations détaillées sur les protéines statistiquement enrichies avec l'IL-1 β -APEX2 en comparant la condition contrôle (notée Ctrl) avec la condition AP5 (tableau gris), NMDA 7 min (tableau bleu) et NMDA 15 min (tableau vert). Sont présentés le nom de la protéine, le numéro d'accèsion UniProtKB, le nom du gène, le $-\log_{10}$ (p-value) du test de Student de la différence d'intensité MS dans l'IP de la condition AP5, NMDA 7 min et NMDA 15 min vs Ctrl et l'intensité de quantification sans marquage (LFQ intensity) qui représente l'intensité du signal spectrométrique mesurée pour chaque protéine exprimée.

L'analyse de l'enrichissement des ontologies géniques (GO) identifie les voies et processus biologiques significativement enrichis pour une liste de gènes donnée et permet de replacer l'analyse protéine-protéine dans des mécanismes biologiques globaux, ou détaillés dans la littérature. Ainsi, l'analyse des annotations GO des protéines identifiées permet de rechercher des enrichissements pour les fonctions moléculaires (MF), les processus biologiques (BP), les localisations cellulaires (CC) et les voies de signalisations contenues dans la base de données KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Les enrichissements GO des interacteurs de l'IL-1 β neuronale, présentés en **tableau 11**, ont été obtenus par comparaison de chaque protéine avec la base de données *Mus musculus*.

9.2.2.1.1. Les enrichissements GO de fonction moléculaire (GO:MF)

L'annotation fonctionnelle met en évidence un enrichissement en terme GO de fonction moléculaire (GO:MF ; **tableau 11**) pour deux groupes principaux de protéines. Pour les conditions de stimulations au NMDA, nous retrouvons des protéines du cytosquelette (NMDA 7', « structural constituent of cytoskeleton » : $p=0.017$; NMDA 15', « actin filament binding » : $p=1.50^E-06$). Pour la condition NMDA 15', des protéines synaptiques sont spécifiquement retrouvées (« structural constituent of post synapse » : $p=1.25^E-04$; « structural constituent of synapse » : $p=4.59^E-04$). Enfin, pour les 3 conditions, le deuxième grand groupe de fonctions identifiées est centré sur des protéines impliquées dans la signalisation des récepteurs métabotropiques du glutamate (AP5, « GTPase activity » : $p=2.09^E-06$; « GTP binding » : $p=5.80^E-06$; NMDA 7', « guanyl nucleotide binding » : $p=5.78^E-05$; « GTP

binding » : $p=2.29^E-05$; NMDA 15', « protein phosphatase binding » : $p=1.74^E-03$; « protein phosphatase 2A binding » : $p=4.10^E-02$). La présence de protéines du cytosquelette suggère que la cytokine est transportée vers la post-synapse. L'identification des protéines appartenant à des voies de signalisations médiées par les récepteurs métabotropiques du glutamate nous apporte aussi une identification potentielle de la signalisation à étudier qui pourrait être impliquée dans la maturation de l'IL-1 β .

Source	Term name	P-value	Intersections
Condition AP-5			
GO:MF	syntaxin-1 binding	7,07E-10	SNAP25,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C
GO:MF	SNARE binding	1,84E-09	SNCA,SNAP25,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B
GO:MF	syntaxin binding	3,02E-07	SNAP25,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C
GO:MF	GTPase activity	2,09E-06	ARF1,ARF3,ARF2,DNM3,GSPT1,GSPT2
GO:MF	GTP binding	5,80E-06	ARF1,ARF3,ARF2,DNM3,GSPT1,GSPT2,PIP4K2B
GO:MF	microtubule binding	4,32E-04	KIF2A,KIF21B,SNCA,DNM3
GO:MF	tubulin binding	1,76E-03	KIF2A,KIF21B,SNCA,DNM3
GO:MF	PDZ domain binding	3,60E-03	LIN7C,LIN7A,LIN7B,DLG3
GO:MF	microtubule motor activity	1,30E-02	KIF2A,KIF21B
GO:MF	protein N-terminus binding	1,80E-02	SNCA,SNAP25,UNC13A
GO:MF	thiol-dependent deubiquitinase	1,80E-02	USP4,USP11,USP15
GO:MF	deubiquitinase activity	1,85E-02	USP4,USP11,USP15
GO:MF	omega peptidase activity	2,33E-02	USP4,USP11,USP15
GO:MF	ubiquitin-like protein-specific protease activity	2,74E-02	USP4,USP11,USP15
GO:MF	cytoskeletal motor activity	3,81E-02	KIF2A,KIF21B
Condition NMDA 7 min			
GO:MF	GTP binding	2,29E-05	ARF4,TUBB4A,TUBA4A,ARF1,ARF3,ARF2,RALA
GO:MF	guanyl ribonucleotide binding	5,61E-05	ARF4,TUBB4A,TUBA4A,ARF1,ARF3,ARF2,RALA
GO:MF	guanyl nucleotide binding	5,78E-05	ARF4,TUBB4A,TUBA4A,ARF1,ARF3,ARF2,RALA
GO:MF	cytoskeletal motor activity	1,06E-02	KIF2A,MYO1B,DYNC1H1
GO:MF	structural constituent of cytoskeleton	1,79E-02	ANK3,TUBB4A,TUBA4A
GO:MF	cell adhesion molecule binding	4,43E-02	IL1B,ANK3,CTNNB1,SRC
GO:MF	nucleoside-triphosphatase activity	4,77E-02	RNF213,DNM3,KIF2A
Condition NMDA 15 min			
GO:MF	actin filament binding	1,50E-06	MYO1B,DSTN,CORO1B,ACTN4,DBNL,CTNNA2,ACTN1,LASP1,HIP1
GO:MF	structural constituent of postsynapse	1,25E-04	GPHN,DNM3,ACTN1,DLG3
GO:MF	structural constituent of synapse	4,59E-04	GPHN,DNM3,ACTN1,DLG3
GO:MF	protein phosphatase binding	1,74E-03	MAPT,CTNNB1,PPME1,PPP2CA,CTNND1,DLG3
GO:MF	heat shock protein binding	2,31E-03	CLTC,SNCA,MAPT,PPID
GO:MF	cytoskeletal regulatory protein binding	5,89E-03	MAP2,ACTN1
GO:MF	transmembrane transporter binding	6,60E-03	ANK3,ACTN4,CTNNB1,ACTN1,PPP2CA
GO:MF	protein phosphatase 2A binding	4,10E-02	MAPT,PPME1,PPP2CA

Tableau 11 : Liste des enrichissements GO : MF de l'IP IL-1 β -APEX2

Tableaux d'enrichissements des termes GO :MF les plus significatifs dans les conditions AP5 (tableau gris), NMDA 7' (tableau bleu) et NMDA 15' (tableau vert) vs Ctrl. Chaque tableau regroupe la fonction associée aux termes (Sources), le nom des termes, la p-value ainsi que les protéines identifiées qui sont regroupées dans chaque terme (intersections). Les termes sont classés en fonction de leur significativité.

9.2.2.1.2. Les enrichissements GO de processus biologiques (GO:BP)

De la même manière que la section précédente, l'enrichissement en termes GO de processus biologiques (GO:BP, **tableau 12**) met en évidence un groupe de protéines impliquées dans le transport des protéines et l'exocytose vésiculaire et ce, dans les 3 conditions : AP5, « neurotransmitter secretion : $p=1.92^E-12$; « exocytosis » : $p=2.39^E-12$; « regulated exocytosis » : $p=1.47^E-09$; NMDA 7', « synaptic vesicle transport » : $p=1.71^E-03$; « exocytosis » : $p=4.79^E-03$; NMDA 15', « synaptic vesicle transport » : $p=1.72^E-05$; « glutamate secretion » : $p=5.63^E-04$). Ces processus donnent de potentielles indications sur le mode de transport et de libération de l'IL-1 β par les neurones. D'après les données, il est tout à fait possible que la cytokine soit libérée par les neurones, via un processus d'exocytose. Ce phénomène pourrait être lié à la libération de neurotransmetteurs. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait réaliser des marquages immunocytochimiques de l'IL-1 β et des protéines présentes au sein ou à la membrane des vésicules synaptiques de sécrétion. Bien que les mécanismes de libération de l'IL-1 β dans les cellules immunitaires soient encore controversés, le dogme actuel est que cette cytokine est cytoplasmique. Les neurones présentant un mécanisme de production d'IL-1 β atypique, il est possible que cette cytokine suive une sécrétion de type vésiculaire.

Source	Term name	P-value	Intersections
Condition AP-5			
GO:BP	neurotransmitter secretion	1,92E-12	SNCA,SNAP25,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B,LIN7C,LIN7A,LIN7B
GO:BP	signal release from synapse	1,92E-12	SNCA,SNAP25,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B,LIN7C,LIN7A,LIN7B
GO:BP	exocytosis	2,39E-12	SNCA,ARF1,SNAP25,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B,SYNGR1,LIN7C,LIN7A,LIN7B
GO:BP	vesicle organization	1,40E-11	SNCA,ARF1,DNM3,SNAP25,UNC13B,UNC13A,UNC13C,PIP4K2B,PIP4K2A,STX1B
GO:BP	synaptic vesicle priming	2,72E-11	SNCA,SNAP25,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B
GO:BP	neurotransmitter transport	2,92E-11	SNCA,SNAP25,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B,LIN7C,LIN7A,LIN7B
GO:BP	regulation of neurotransmitter levels	4,10E-11	SNCA,SNAP25,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B,LIN7C,LIN7A,LIN7B
GO:BP	regulated exocytosis	1,47E-09	SNCA,ARF1,SNAP25,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B,SYNGR1

GO:BP	calcium ion-regulated exocytosis of neurotransmitter	6,38E-09	SNAP25,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B
GO:BP	synaptic vesicle cycle	9,11E-09	SNCA,DNM3,SNAP25,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B
GO:BP	synaptic vesicle exocytosis	1,86E-08	SNCA,SNAP25,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B
GO:BP	vesicle-mediated transport in synapse	2,19E-08	SNCA,DNM3,SNAP25,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B
GO:BP	calcium-ion regulated exocytosis	2,88E-08	ARF1,SNAP25,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B
GO:BP	exocytic process	8,47E-08	SNCA,SNAP25,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B
GO:BP	positive regulation of secretion by cell	3,81E-07	IL1B,SNCA,ARF1,SNAP25,UNC13B,UNC13A,PTPN23,STX1B
GO:BP	regulation of synaptic plasticity	4,49E-07	SNCA,ARF1,SNAP25,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,SYNGR1,CFL1
GO:BP	positive regulation of secretion	1,18E-06	IL1B,SNCA,ARF1,SNAP25,UNC13B,UNC13A,PTPN23,STX1B
GO:BP	regulation of short-term neuronal synaptic plasticity	3,46E-06	SYP,UNC13B,UNC13A,SYNGR1
GO:BP	establishment or maintenance of epithelial cell apical/basal polarity	4,05E-06	LIN7C,LIN7A,LIN7B,DLG3,ARF4
GO:BP	regulation of neuronal synaptic plasticity	4,18E-06	SNCA,SYP,UNC13B,UNC13A,SYNGR1
GO:BP	establishment or maintenance of bipolar cell polarity	8,55E-06	LIN7C,LIN7A,LIN7B,DLG3,ARF4
GO:BP	establishment or maintenance of apical/basal cell polarity	8,55E-06	LIN7C,LIN7A,LIN7B,DLG3,ARF4
GO:BP	vesicle fusion	2,97E-05	SNCA,SNAP25,PIP4K2B,PIP4K2A,STX1B
GO:BP	vesicle docking involved in exocytosis	3,09E-05	UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B
GO:BP	organelle membrane fusion	3,61E-05	SNCA,SNAP25,PIP4K2B,PIP4K2A,STX1B
GO:BP	organelle fusion	1,29E-04	SNCA,SNAP25,PIP4K2B,PIP4K2A,STX1B
GO:BP	synaptic vesicle transport	1,43E-04	SNCA,ARF1,DNM3,LIN7A
GO:BP	receptor internalization	1,49E-04	SNCA,ARF1,DNM3,SNAP25
GO:BP	vesicle docking	1,58E-04	UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B
GO:BP	membrane fusion	3,23E-04	SNCA,SNAP25,PIP4K2B,PIP4K2A,STX1B
GO:BP	synaptic vesicle localization	4,22E-04	SNCA,ARF1,DNM3,LIN7A
GO:BP	organelle localization by membrane tethering	5,01E-04	UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B
GO:BP	establishment or maintenance of cell polarity	5,03E-04	LIN7C,LIN7A,LIN7B,DLG3,CFL1,ARF4
GO:BP	receptor metabolic process	6,51E-04	SNCA,ARF1,DNM3,SNAP25
GO:BP	regulation of lipid metabolic process	6,59E-04	IL1B,RNF213,SNCA,ARF1,PIP4K2B,PIP4K2A
GO:BP	membrane docking	8,22E-04	UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B
GO:BP	synaptic vesicle recycling	8,22E-04	SNCA,DNM3,SYP,STX1B
GO:BP	maintenance of cell polarity	1,72E-03	LIN7C,LIN7A,LIN7B
GO:BP	receptor-mediated endocytosis	2,13E-03	SNCA,ARF1,DNM3,SNAP25
GO:BP	synaptic vesicle membrane organization	2,14E-03	SNAP25,STX1B,SYNGR1
GO:BP	regulation of exocytosis	2,37E-03	SNCA,ARF1,SYP,UNC13B,STX1B
GO:BP	positive regulation of neurotransmitter secretion	2,38E-03	SNCA,UNC13A,STX1B
GO:BP	positive regulation of neurotransmitter transport	3,65E-03	SNCA,UNC13A,STX1B
GO:BP	presynaptic endocytosis	3,80E-03	SNCA,DNM3,SYP
GO:BP	synaptic vesicle endocytosis	3,80E-03	SNCA,DNM3,SYP
GO:BP	regulation of long-term neuronal synaptic plasticity	4,17E-03	SNCA,SYP,SYNGR1
GO:BP	negative regulation of insulin receptor signaling pathway	4,62E-03	IL1B,PIP4K2B,PIP4K2A
GO:BP	regulation of postsynaptic membrane neurotransmitter receptor levels	4,87E-03	DNM3,SNAP25,STX1B,DLG3
GO:BP	regulation of neurotransmitter secretion	4,94E-03	SNCA,SYP,UNC13A,STX1B
GO:BP	neuromuscular junction development	5,34E-03	UNC13B,UNC13A,UNC13C

GO:BP	negative regulation of cellular response to insulin stimulus	6,43E-03	IL1B,PIP4K2B,PIP4K2A
GO:BP	regulation of neurotransmitter transport	7,83E-03	SNCA,SYP,UNC13A,STX1B
GO:BP	postsynapse organization	8,26E-03	ARF1,DNM3,DLG3,CFL1,ARF4
GO:BP	regulation of glutamate secretion	1,08E-02	IL1B,SNCA
GO:BP	glutamate secretion	1,85E-02	IL1B,SNCA
GO:BP	lipid storage	2,03E-02	IL1B,RNF213
GO:BP	dendritic spine development	2,49E-02	ARF1,DNM3,CFL1,ARF4
GO:BP	regulation of synapse structure or activity	2,52E-02	SNCA,DNM3,STX1B,CFL1,ARF4
GO:BP	establishment of vesicle localization	2,70E-02	SNCA,ARF1,DNM3
GO:BP	positive regulation of exocytosis	2,74E-02	SNCA,ARF1,UNC13B
GO:BP	negative regulation of amine transport	2,84E-02	IL1B,SNCA
GO:BP	maintenance of location	3,27E-02	IL1B,RNF213,SNCA
GO:BP	vesicle localization	3,69E-02	SNCA,ARF1,DNM3
GO:BP	regulation of insulin receptor signaling pathway	3,96E-02	IL1B,PIP4K2B,PIP4K2A
GO:BP	regulation of cellular response to insulin stimulus	4,13E-02	IL1B,PIP4K2B,PIP4K2A
GO:BP	protein localization to cell periphery	4,28E-02	SNAP25,STX1B,LIN7C,LIN7A,LIN7B
GO:BP	positive regulation of ion transport	4,55E-02	IL1B,SNCA,ARF1
GO:BP	synaptic transmission, glutamatergic	4,58E-02	UNC13B,UNC13A,UNC13C
GO:BP	regulation of amino acid transport	4,60E-02	IL1B,SNCA

Condition NMDA 7 min

GO:BP	establishment of vesicle localization	3,19E-07	DNM3,MYO1B,DYNC1H1,CTNNB1,ARF1,HGS,DCTN2,MAP2
GO:BP	vesicle localization	7,93E-07	DNM3,MYO1B,DYNC1H1,CTNNB1,ARF1,HGS,DCTN2,MAP2
GO:BP	dendrite development	8,17E-06	DNM3,ARF4,DCLK1,CASK,ARF1,BAIAP2,MAP2,DCX,MARK1
GO:BP	establishment of organelle localization	1,04E-04	DNM3,MYO1B,DYNC1H1,CTNNB1,ARF1,HGS,DCTN2,MAP2,MARK1
GO:BP	Golgi vesicle transport	1,34E-03	ANK3,EXOC2,MYO1B,ARF4,ARF1,ARF3
GO:BP	synaptic vesicle transport	1,71E-03	DNM3,CTNNB1,ARF1,MAP2
GO:BP	dendritic spine development	2,69E-03	DNM3,ARF4,CASK,ARF1,BAIAP2
GO:BP	exocytosis	4,79E-03	EXOC2,STX1B,CASK,ARF1,HGS,SYNGR1,RALA
GO:BP	synaptic vesicle localization	5,00E-03	DNM3,CTNNB1,ARF1,MAP2
GO:BP	regulation of exocytosis	5,64E-03	EXOC2,STX1B,CASK,ARF1,HGS,RALA
GO:BP	regulation of dendritic spine development	1,46E-02	DNM3,CASK,ARF1,BAIAP2
GO:BP	positive regulation of secretion by cell	2,02E-02	IL1B,EXOC2,STX1B,CASK,ARF1,HGS
GO:BP	maintenance of location	2,13E-02	IL1B,RNF213,ANK3
GO:BP	post-Golgi vesicle-mediated transport	2,28E-02	ANK3,EXOC2,MYO1B
GO:BP	dendrite morphogenesis	2,58E-02	DNM3,DCLK1,CASK,BAIAP2,DCX
GO:BP	lipid storage	2,82E-02	IL1B,RNF213
GO:BP	dendritic spine organization	2,88E-02	DNM3,CASK,ARF1,BAIAP2
GO:BP	postsynapse organization	2,90E-02	DNM3,ARF4,CASK,ARF1,BAIAP2
GO:BP	dephosphorylation	3,14E-02	PTPN9,SRC,DUSP3,PPP1R7,PPP2R5E,PPP2R1A
GO:BP	neuron projection organization	3,89E-02	DNM3,CASK,ARF1,BAIAP2
GO:BP	positive regulation of secretion	4,58E-02	IL1B,EXOC2,STX1B,CASK,ARF1,HGS

Condition NMDA 15 min

GO:BP	establishment of vesicle localization	2,40E-07	MYO1B,SNCA,HGS,MAP2,DPYSL2,ACTN4,CTNNB1,DNM3
GO:BP	vesicle localization	5,96E-07	MYO1B,SNCA,HGS,MAP2,DPYSL2,ACTN4,CTNNB1,DNM3

GO:BP	synaptic vesicle transport	1,72E-05	SNCA,MAP2,DPYSL2,CTNNB1,DNM3
GO:BP	dendrite morphogenesis	6,52E-05	CASK,ABI2,DBNL,DCX,DNM3,DCLK1,CTNNA2
GO:BP	synaptic vesicle localization	6,73E-05	SNCA,MAP2,DPYSL2,CTNNB1,DNM3
GO:BP	regulation of glutamate secretion	2,46E-04	IL1B,SNCA,DPYSL2
GO:BP	glutamate secretion	5,63E-04	IL1B,SNCA,DPYSL2
GO:BP	presynaptic endocytosis	9,94E-04	CLTC,SNCA,DNM3,SYP,DNAJC6
GO:BP	synaptic vesicle endocytosis	9,94E-04	CLTC,SNCA,DNM3,SYP,DNAJC6
GO:BP	neuron projection extension	1,42E-03	MAP2,MAPT,CTNNB1,DBNL,DCX,DCLK1
GO:BP	hyaluronan biosynthetic process	1,50E-03	IL1B,CLTC
GO:BP	cell-cell junction assembly	1,65E-03	IL1B,ABI2,ACTN4,PRKACA,CTNNB1
GO:BP	regulation of amino acid transport	1,83E-03	IL1B,SNCA,DPYSL2
GO:BP	regulation of microtubule cytoskeleton organization	1,96E-03	CLTC,SNCA,MAP2,MAPT,HSPH1
GO:BP	synaptic vesicle recycling	2,02E-03	CLTC,SNCA,DNM3,SYP,DNAJC6
GO:BP	neuron migration	2,21E-03	GPM6A,MAPT,CTNNB1,DCX,DCLK1,CTNNA2
GO:BP	transferrin transport	2,31E-03	CLTC,MYO1B
GO:BP	regulation of dendritic spine morphogenesis	3,37E-03	CASK,ABI2,DBNL,DNM3
GO:BP	hyaluronan metabolic process	4,87E-03	IL1B,CLTC
GO:BP	axon extension	5,94E-03	MAP2,MAPT,DBNL,DCX,DCLK1
GO:BP	acidic amino acid transport	6,00E-03	IL1B,SNCA,DPYSL2
GO:BP	regulation of microtubule polymerization	6,30E-03	SNCA,MAP2,MAPT
GO:BP	cell-cell junction organization	8,08E-03	IL1B,ABI2,ACTN4,PRKACA,CTNNB1
GO:BP	dendritic spine morphogenesis	8,67E-03	CASK,ABI2,DBNL,DNM3
GO:BP	regulation of organic acid transport	9,63E-03	IL1B,SNCA,DPYSL2
GO:BP	signal release from synapse	1,01E-02	SNCA,CASK,PRKACA,SYP,LIN7C,CADPS
GO:BP	neurotransmitter secretion	1,01E-02	SNCA,CASK,PRKACA,SYP,LIN7C,CADPS
GO:BP	dicarboxylic acid transport	1,35E-02	IL1B,SNCA,DPYSL2
GO:BP	regulation of defense response to virus	1,42E-02	IL1B,NPLOC4
GO:BP	negative regulation of platelet-derived growth factor receptor signaling pathway	1,52E-02	SNCA,HGS
GO:BP	regulation of Arp2/3 complex-mediated actin nucleation	1,56E-02	CORO1B,ABI2,CTNNA2
GO:BP	synapse assembly	1,86E-02	SNCA,GPM6A,MAPT,DBNL,DNM3,EIF4G1
GO:BP	glycosaminoglycan biosynthetic process	1,91E-02	IL1B,CLTC
GO:BP	microtubule polymerization	2,11E-02	SNCA,MAP2,MAPT
GO:BP	regulation of anion transport	2,34E-02	IL1B,SNCA,DPYSL2
GO:BP	regulation of amine transport	2,34E-02	IL1B,SNCA,DPYSL2
GO:BP	positive regulation of neuron death	2,37E-02	IL1B,SNCA,MAPT,CTNNB1
GO:BP	aminoglycan biosynthetic process	2,55E-02	IL1B,CLTC
GO:BP	regulation of cell size	2,56E-02	MAP2,MAPT,DBNL,LARS,DCX
GO:BP	regulation of microtubule polymerization or depolymerization	2,65E-02	SNCA,MAP2,MAPT
GO:BP	dendritic spine organization	2,69E-02	CASK,ABI2,DBNL,DNM3
GO:BP	amine transport	2,70E-02	IL1B,SNCA,DPYSL2
GO:BP	postsynapse organization	2,70E-02	CASK,GPHN,ABI2,DBNL,DNM3
GO:BP	negative regulation of microtubule polymerization	3,03E-02	SNCA,MAP2
GO:BP	negative regulation of cell projection organization	3,15E-02	PTPN9,MAP2,CORO1B,DPYSL3,DNM3
GO:BP	regulation of long-term neuronal synaptic plasticity	3,28E-02	SNCA,SYNGR1,SYP
GO:BP	actin filament bundle assembly	3,41E-02	MYO1B,CORO1B,ACTN4,DPYSL3,ACTN1
GO:BP	synaptic vesicle exocytosis	3,56E-02	SNCA,CASK,PRKACA,SYP,CADPS
GO:BP	neuron projection organization	3,63E-02	CASK,ABI2,DBNL,DNM3
GO:BP	mucopolysaccharide metabolic process	3,64E-02	IL1B,CLTC

GO:BP	actin filament bundle organization	3,74E-02	MYO1B,CORO1B,ACTN4,DPYSL3,ACTN1
GO:BP	positive regulation of filopodium assembly	4,46E-02	GPM6A,DPYSL3,DNM3
GO:BP	response to magnesium ion	4,54E-02	SNCA,ANK3
GO:BP	regulation of postsynapse organization	4,97E-02	CASK,ABI2,DBNL,DNM3

Tableau 12 : Liste des enrichissements GO : BP de l'IP IL-1 β -APEX2

Tableaux d'enrichissements des termes GO : BP les plus significatifs dans les conditions AP5 (tableau gris), NMDA 7' (tableau bleu) et NMDA 15' (tableau vert) vs Ctrl. Chaque tableau regroupe la fonction associée aux termes (Sources), le nom des termes, la p-value ainsi que les protéines identifiées qui sont regroupées dans chaque terme (intersections). Les termes sont classés en fonction de leur significativité.

9.2.2.1.3. Les enrichissements GO de localisation cellulaire (GO:CC)

Les annotations de localisation cellulaire (GO:CC, **tableau 13**) révèlent un fort enrichissement au niveau de la post-synapse des neurones et des épines dendritiques et ce, dans les 3 conditions analysées (AP5, « postsynaptic density » : $p=4.02^E-09$; « dendritic spine » : $p=3.03^E-02$; NMDA 7', « postsynaptic density » : $p=5.48^E-05$; « postsynaptic specialization, intracellular component » : $p=5.69^E-03$; NMDA 15', « postsynaptic density, intracellular component » : $p=1.61^E-04$; « Schaffer collateral – CA1 synapse » : $p=1.60^E-03$; « dendritic spine » : $p=1.79^E-02$). Ceci conforte les résultats obtenus dans la section 2 qui relie une stimulation des récepteurs NMDA et une forte activité neuronale à la maturation de l'IL-1 β . Néanmoins, il apparaît que la localisation de la cytokine ne soit pas exclusivement réservée à la post-synapse puisqu'un enrichissement pour d'autres compartiments neuronaux a été révélé (AP5, « cell cortex » : $p=5.37^E-04$, « growth cone » : $p=2.55^E-02$; NMDA 7', « cytoplasmic region » : $p=1.04^E-02$, « nuclear lamina » : $p=2.03^E-02$; NMDA 15', « growth cone » : $p=6.35^E-09$, « nuclear periphery » : $p=1.96^E-02$, « cell cortex region » : $p=3.45^E-02$). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans la section 8.3.2.3 lors de l'analyse de la localisation subcellulaire de l'IL-1 β , dont l'enrichissement en éléments post-synaptiques sous-tend une expression préférentielle de cette cytokine dans les épines dendritiques. En complément de l'analyse protéomique et de l'analyse de la localisation subcellulaire de l'IL-1 β avec des images prises sur un microscope apotome, il conviendrait de réitérer l'expérience, cette fois-ci en utilisant une microscopie à plus haute résolution telle que le STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy) ou le STED (Stimulated Emission Depletion microscopy) permettant de distinguer 2 protéines à 100-150 nm d'intervalle (contre 500 à 700 nm pour de la microscopie classique), afin de confirmer ou d'infirmer les hypothèses relatives à la localisation de la cytokine dans les neurones.

Source	Term name	P-value	Intersections
Condition AP-5			
GO:CC	transport vesicle	1,51E-11	SNCA,SNAP25,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B,SYNGR1,LIN7C,LIN7A,LIN7B
GO:CC	transport vesicle membrane	4,37E-11	SNCA,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,SYNGR1,LIN7C,LIN7A,LIN7B
GO:CC	postsynaptic density	4,02E-09	ARF1,DNM3,SYP,RPL23,LIN7C,LIN7A,LIN7B,PPP2CA,DLG3,HIP1R
GO:CC	synaptic vesicle	4,21E-09	SNCA,SNAP25,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B,SYNGR1
GO:CC	exocytic vesicle	7,74E-09	SNCA,SNAP25,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B,SYNGR1
GO:CC	presynaptic active zone	1,99E-08	SNAP25,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B
GO:CC	neuromuscular junction	3,46E-08	SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B,SYNGR1
GO:CC	terminal bouton	4,43E-08	SNCA,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,PPP2CA
GO:CC	distal axon	9,52E-08	SNCA,SNAP25,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,PPP2CA,DLG3,CFL1
GO:CC	exocytic vesicle membrane	2,41E-07	SNCA,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,SYNGR1
GO:CC	synaptic vesicle membrane	2,41E-07	SNCA,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,SYNGR1
GO:CC	presynaptic membrane	1,95E-06	SNAP25,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B
GO:CC	axon terminus	5,63E-06	SNCA,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,PPP2CA
GO:CC	neuron projection terminus	1,07E-05	SNCA,SYP,UNC13B,UNC13A,UNC13C,PPP2CA
GO:CC	calyx of Held	1,09E-04	UNC13B,UNC13A,UNC13C
GO:CC	cell cortex region	4,68E-04	UNC13B,UNC13A,UNC13C
GO:CC	cell cortex	5,37E-04	SNCA,UNC13B,UNC13A,UNC13C,HIP1R,CFL1
GO:CC	neuron spine	1,59E-03	DNM3,SYP,HIP1R,CFL1,ARF4
GO:CC	excitatory synapse	1,87E-03	SYP,UNC13A,UNC13C
GO:CC	bicellular tight junction	3,39E-03	LIN7C,LIN7A,LIN7B,DLG3
GO:CC	tight junction	4,48E-03	LIN7C,LIN7A,LIN7B,DLG3
GO:CC	photoreceptor inner segment	5,30E-03	DNM3,SNAP25,PIP4K2A
GO:CC	apical junction complex	6,57E-03	LIN7C,LIN7A,LIN7B,DLG3
GO:CC	autophagosome	1,22E-02	IL1B,PIP4K2B,PIP4K2A
GO:CC	growth cone	2,55E-02	SNCA,SNAP25,DLG3,CFL1
GO:CC	site of polarized growth	2,89E-02	SNCA,SNAP25,DLG3,CFL1
GO:CC	dendritic spine	3,03E-02	DNM3,HIP1R,CFL1,ARF4
GO:CC	postsynaptic density membrane	3,52E-02	LIN7C,LIN7A,LIN7B
GO:CC	basolateral plasma membrane	3,67E-02	LIN7C,LIN7A,LIN7B,DLG3
GO:CC	ruffle membrane	3,91E-02	HIP1R,CFL1,ARF4
Condition NMDA 7 min			
GO:CC	postsynaptic density	5,49E-05	DNM3,DCLK1,CTNNB1,SRC,CASK,ARF1,BAIAP2,MAP2
GO:CC	asymmetric synapse	6,20E-05	DNM3,DCLK1,CTNNB1,SRC,CASK,ARF1,BAIAP2,MAP2
GO:CC	microtubule	2,25E-04	DNM3,KIF2A,DYNC1H1,TUBB4A,TUBA4A,BAIAP2,DCX
GO:CC	synaptic membrane	8,57E-04	DNM3,ANK3,STX1B,CTNNB1,CASK,RGS7,BAIAP2
GO:CC	cell leading edge	1,01E-03	ARF4,CTNNB1,SRC,ARF1,ARF2,BAIAP2,MAP2
GO:CC	microtubule associated complex	1,07E-03	DYNC1L1,KIF2A,DYNC1H1,DCTN2,MAP2
GO:CC	postsynaptic specialization, intracellular component	5,69E-03	CTNNB1,SRC,BAIAP2
GO:CC	cytoplasmic region	1,04E-02	CTNNB1,TUBB4A,BAIAP2,MAP2,DCX
GO:CC	nuclear lamina	2,03E-02	STX1B,CASK
GO:CC	cell cortex	2,49E-02	EXOC2,DYNC1H1,DSTN,CTNNB1
GO:CC	cell projection membrane	3,07E-02	ARF4,CTNNB1,SRC,CASK,MAP2
GO:CC	cytoplasmic dynein complex	4,28E-02	DYNC1L1,DYNC1H1

GO:CC	ruffle membrane	4,31E-02	ARF4, SRC, MAP2
GO:CC	dendritic shaft	4,51E-02	CTNNB1, BAIAP2, MAP2
Condition NMDA 15 min			
GO:CC	site of polarized growth	3,16E-10	SNCA, MAP2, DPYSL2, GPM6A, MAPT, DPYSL3, DBNL, DCX, DCLK1, CTNND1, DLG3
GO:CC	growth cone	6,35E-09	SNCA, MAP2, DPYSL2, GPM6A, MAPT, DPYSL3, DCX, DCLK1, CTNND1, DLG3
GO:CC	postsynaptic specialization, intracellular component	5,17E-06	GPHN, CTNNB1, CTNNA2, CTNND1, DLG3
GO:CC	lamellipodium	2,81E-05	CORO1B, ABI2, CTNNB1, DPYSL3, DBNL, CTNNA2, CTNND1
GO:CC	actin filament	3,76E-05	MYO1B, CORO1B, ABI2, DPYSL3, DBNL, ACTN1
GO:CC	postsynaptic density, intracellular component	1,61E-04	CTNNB1, CTNNA2, CTNND1, DLG3
GO:CC	presynaptic membrane	1,80E-04	CLTC, GPM6A, CASK, CTNNB1, SYP, CTNNA2, HIP1
GO:CC	presynaptic active zone	4,10E-04	GPM6A, CTNNB1, SYP, CTNNA2, CTNND1
GO:CC	cortical actin cytoskeleton	6,67E-04	DSTN, ACTN4, DBNL, ACTN1, LASP1
GO:CC	filopodium	8,16E-04	MYO1B, MAP2, GPM6A, ABI2
GO:CC	neuron spine	1,33E-03	ABI2, PRKACA, DNMT3, SYP, ACTN1, CTNND1
GO:CC	Schaffer collateral - CA1 synapse	1,60E-03	CASK, CTNNB1, SYP, CTNND1, PRKAR1B
GO:CC	presynaptic active zone cytoplasmic component	2,38E-03	CTNNB1, CTNNA2, CTNND1
GO:CC	main axon	2,93E-03	MAP2, ANK3, MAPT
GO:CC	adherens junction	3,18E-03	ABI2, CTNNB1, CTNNA2, LIN7C, CTNND1
GO:CC	cortical cytoskeleton	3,19E-03	DSTN, ACTN4, DBNL, ACTN1, LASP1
GO:CC	extrinsic component of plasma membrane	3,33E-03	GPHN, CTNNB1, CTNNA2, CTNND1, GNAQ, HIP1
GO:CC	transport vesicle membrane	4,06E-03	CLTC, SNCA, SYNGR1, SYP, LIN7C
GO:CC	neuromuscular junction	5,39E-03	ANK3, SYNGR1, PRKACA, SYP
GO:CC	terminal bouton	6,77E-03	SNCA, DPYSL2, SYP, PPP2CA
GO:CC	catenin complex	9,38E-03	CTNNB1, CTNNA2, CTNND1
GO:CC	synaptic vesicle membrane	1,01E-02	CLTC, SNCA, SYNGR1, SYP
GO:CC	exocytic vesicle membrane	1,01E-02	CLTC, SNCA, SYNGR1, SYP
GO:CC	axon initial segment	1,01E-02	MAP2, ANK3
GO:CC	dendritic spine	1,79E-02	ABI2, PRKACA, DNMT3, ACTN1, CTNND1
GO:CC	neuron projection terminus	1,86E-02	PTPN9, SNCA, DPYSL2, SYP, PPP2CA
GO:CC	nuclear periphery	1,96E-02	MAP2, MAPT, CASK
GO:CC	cell cortex region	3,45E-02	CTNNB1, CTNNA2, CTNND1

Tableau 13 : Liste des enrichissements GO : CC de l'IP IL-1 β -APEX2

Tableaux d'enrichissements des termes GO : CC les plus significatifs dans les conditions AP5 (tableau gris), NMDA 7' (tableau bleu) et NMDA 15' (tableau vert) vs Ctrl. Chaque tableau regroupe la fonction associée aux termes (Sources), le nom des termes, la p-value ainsi que les protéines identifiées qui sont regroupées dans chaque terme (intersections). Les termes sont classés en fonction de leur significativité.

9.2.2.1.4. Les enrichissements GO de voies KEGG (GO:KEGG)

L'annotation fonctionnelle met en évidence un enrichissement en termes GO:KEGG (**tableau 14**) pour trois à cinq voies de signalisations, en fonction de la condition analysée. Ces voies ne semblent pas revêtir un intérêt particulier dans le cadre de cette étude. En effet, les voies identifiées sont liées aux pathogènes bactériens (« Salmonelle infection », « Legionellosis », « Bacterial invasion of epithelial cell »), à la mobilité des cellules immunitaires (« Leukocyte transendothelial migration ») ou encore aux jonctions cellulaires (« Adherens junction », « Tight junction »). Les deux seules voies intéressantes qui peuvent nous donner des informations tant sur le mécanisme de sécrétion (« Synaptic vesicle cycle ») que sur une voie potentiellement impliquée dans la production d'IL-1 β (« Phospholipase D signaling pathway ») ont été uniquement identifiées dans la condition AP5. Il faut noter que l'analyse KEGG est biaisée par la présence de l'IL-1 β dans les protéines identifiées. Une nouvelle analyse sans cette cytokine devrait permettre l'identification d'autres voies plus pertinentes.

Source	Term name	P-value	Intersections
Condition AP-5			
KEGG	Synaptic vesicle cycle	2,23E-06	DNM3,SNAP25,UNC13B,UNC13A,UNC13C,STX1B
KEGG	Legionellosis	1,08E-03	IL1B,ARF1,ARF2
KEGG	Endocytosis	5,87E-03	ARF1,ARF3,ARF2,DNM3
KEGG	mRNA surveillance pathway	2,10E-02	GSPT1,GSPT2,PPP2CA,PPP2CB
KEGG	Phospholipase D signaling pathway	2,39E-02	ARF1,ARF2,DNM3
Condition NMDA 7 min			
KEGG	Salmonella infection	7,23E-07	IL1B,DYNC1L12,EXOC2,DYNC1H1,CTNNB1,TUBB4A,TUBA4A,ARF1,ARF2,DCTN2,RALA
KEGG	Endocytosis	5,20E-03	DNM3,ARF4,SRC,ARF1,ARF3,ARF2,HGS
KEGG	Phagosome	3,97E-02	DYNC1L12,DYNC1H1,TUBB4A,TUBA4A,HGS
Condition NMDA 15 min			
KEGG	Adherens junction	5,28E-03	ACTN4,CTNNB1,CTNNA2,ACTN1,CTNND1
KEGG	Leukocyte transendothelial migration	5,66E-03	ROCK2,ACTN4,CTNNB1,CTNNA2,ACTN1,CTNND1
KEGG	Tight junction	8,21E-03	ROCK2,ACTN4,PRKACA,TUBA4A,ACTN1,PPP2CA,DLG3
KEGG	Bacterial invasion of epithelial cells	4,62E-02	CLTC,CTNNB1,DNM3,CTNNA2

Tableau 14 : Liste des enrichissements GO : KEGG de l'IP IL-1 β -APEX2

Tableaux d'enrichissements des termes GO les plus significatifs dans les conditions AP5 (tableau gris), NMDA 7' (tableau bleu) et NMDA 15' (tableau vert) vs Ctrl. Chaque tableau regroupe la fonction associée aux termes (Sources), le nom des termes, la p-value ainsi que les protéines identifiées qui sont regroupées dans chaque terme (intersections). Les termes sont classés en fonction de leur significativité.

9.3. Candidat potentiellement impliqué dans la maturation de l'IL-1 β neuronale : la métalloprotéase Thimet Oligopeptidase 1

La Thimet Oligopeptidase (aussi connu sous les noms EC 3.4.24.15 ; EP24.15 ; THOP1) est une enzyme inactivatrice de neuropeptides initialement identifiée dans des homogénats de cerveau de rats (Acker *et al.*, 1987 ; Orlowksi *et al.*, 1983). D'après les données recensées sur « The Human Protein Atlas », cette enzyme n'est pas seulement présente dans le cerveau. Elle est aussi retrouvée dans le tissu endocrinien, le système respiratoire et digestif, le foie, le pancréas, les reins, mais aussi en grande quantité dans les organes génitaux, notamment masculin. Appartenant à la famille M3 des métallopeptidases (Pierotti *et al.*, 1990 ; Rawlings & Barrett, 1993 ; Ray *et al.*, 2004), ses principaux substrats sont la bradykinine, la neurotensine, les peptides opioïdes ou encore l'hormone gonadotrophique (GnRH) (Molineaux *et al.*, 1988 ; Rioli *et al.*, 1998). Dans le cerveau de rat, la distribution cellulaire de THOP1 semble être majoritairement nucléaire, mais l'enzyme peut être mobilisée dans le cytoplasme, voire sécrétée via les mécanismes de sécrétion non-conventionnelle en impliquant la calmoduline et/ou la protéine 14-3-3 ϵ (Carreño *et al.*, 2005 ; Massarelli *et al.*, 1999 ; Oliveira *et al.*, 2005).

Identifiée comme significativement enrichie dans l'interactome de l'IL-1 β pour la condition de stimulation au NMDA 15 min uniquement, cette enzyme a retenu notre attention pour plusieurs raisons. Elle appartient à la famille des M3 métalloprotéases qui sont des enzymes dont l'expression peut être modulée par l'activité récepteurs NMDA, mais aussi par des facteurs de transcriptions tels que NF- κ B et AP1 (Rempe *et al.*, 2016 ; Wójtowicz & Mozrzymas, 2014). Lorsque THOP1 est invalidée dans un modèle murin, l'animal présente des troubles de la mémoire et de l'apprentissage, phénotype proche de celui identifié après une délétion de l'IL-1 β (Santos *et al.*, 2019). Alors que nous pensions initialement trouver un enrichissement en cathepsine, caspase ou une autre enzyme connue dans la littérature comme étant impliquée dans la maturation de l'IL-1 β , THOP1 est la seule protéase qui est ressortie de cette analyse. A ce jour, toutes les données de la littérature montrent que cette protéase clive des petits peptides composés de 5 à 22 acides aminés (Ferro *et al.*, 2020) et une maturation de l'IL-1 β (269 acides aminés) par THOP1 n'a jamais été décrite.

9.3.1. Invalidation de l'expression de THOP1 par des shRNA

Pour vérifier l'implication de THOP1 dans la maturation de l'IL-1 β neuronale, nous avons décidé d'invalider son expression au sein de cultures primaires de neurones corticaux par le biais de shRNA. Cinq shRNAs provenant de la librairie Sigma (décrit comme séquences KO THOP1) ont été insérées dans des plasmides lentiviraux pour permettre une expression cellulaire stable. 7 jours après transduction des cultures neuronales, ces dernières ont été lysées et l'invalidation de THOP1 a été analysée par Western-Blot (**figure 49**). Sur les 5 shRNA testés, le shRNA numéro 5 est létal pour les neurones et a été exclu de l'étude. Pour les deux conditions de transductions utilisées (0.75 μ L et 0.075 μ L de virus contenant les shRNA), l'anticorps dirigé contre THOP1 révèle une diminution de la protéase (bande à 78 kDa) par comparaison avec la condition non transduite (noté (-)). Ces résultats montrent que les 4 shRNAs testés invalident l'expression de THOP1 dans les cultures primaires de neurones. Cependant, ces cultures étant composées de neurones et d'astrocytes, l'analyse du Western-Blot ne permet pas de discriminer le niveau d'expression de la protéine dans un type cellulaire donné au sein de cette culture. Il serait nécessaire de réaliser une expérience en immunofluorescence afin de déterminer 1/ si THOP1 est exprimé dans les neurones et/ou dans les astrocytes et 2/ si l'efficacité des shRNA est spécifique des neurones.

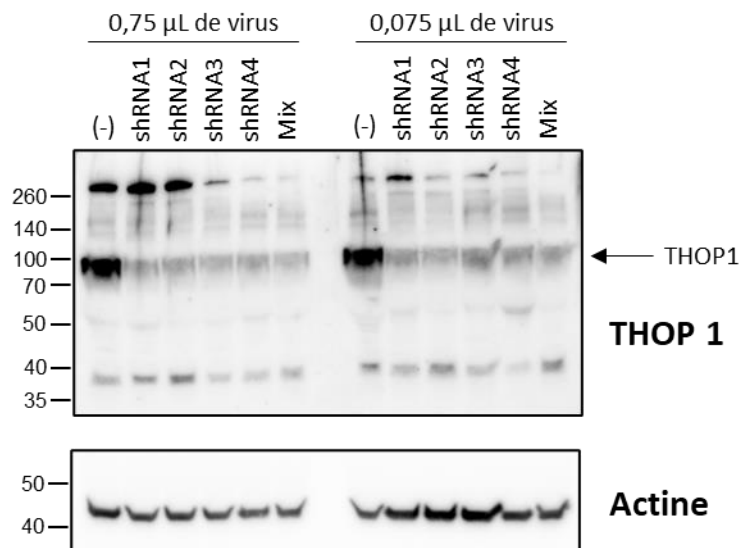


Figure 49 : Invalidation de l'expression de THOP1 dans des cultures primaires de neurones

Western-Blot réalisés sur des extraits de cultures primaires de neurones exprimant ou non séparément ou simultanément (mix) 4 shRNA, dirigés contre THOP1. L'expression de la protéine d'intérêt, attendue à 78 kDa est révélée par un anticorps dirigé contre cette dernière.

9.3.2. Etude du clivage *in vitro* de l'IL-1 β par THOP1

9.3.2.1. Clivage dans des cultures primaires de neurones

Nous avons ensuite souhaité visualiser l'implication de THOP1 dans la maturation de l'IL-1 β neuronale. Pour cela, des cultures primaires ont été co-transduites avec le biosenseur de BRET de l'IL-1 β et soit un des 4 shRNAs, un mix des 4 ou sans shRNA. L'acquisition du signal de BRET est composée d'un signal basal de 5 min suivi d'une stimulation des cultures avec de l'ACSF ou 50 μ M de NMDA puis d'une acquisition post-stimulation (**figure 50**). Pour les cellules exprimant uniquement le biosenseur, sans shRNA, une diminution du signal de BRET est observée (de 100% à 80%) après stimulation des récepteurs NMDA (**figure 50**). Ces données représentent le contrôle positif de l'expérience. En présence d'un ou plusieurs shRNA, la stimulation NMDA induit toujours une maturation du biosenseur similaire aux cultures n'exprimant pas de shRNAs. L'ensemble de ces données montrent que l'invalidation de THOP1 dans les cultures primaires n'inhibe pas la maturation du biosenseur de BRET de l'IL-1 β après stimulation au NMDA. Ces résultats suggèrent que 1/ soit l'invalidation de THOP1 par les shRNAs est insuffisante même si elle paraît importante lors de l'analyse en Western-Blot, 2/ soit l'invalidation dans les neurones est moins efficace qu'attendue. Comme mentionné dans la section précédente, une immunofluorescence sur les cultures de neurones nous permettrait de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses.

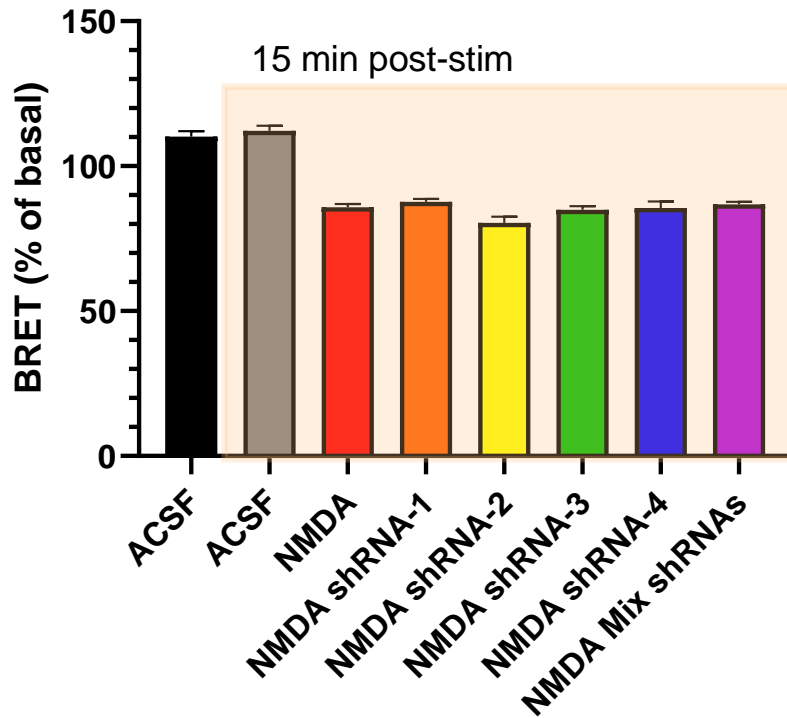


Figure 50 : Maturation du biosenseur de BRET de l'IL-1 β dans des cultures primaires de neurones invalidées pour la protéine THOP1 par l'approche des shRNAs

BRET en plaque sur des cultures primaires de neurones corticaux exprimant soit le biosenseur seul, soit le biosenseur et un shRNA, soit le mix des 4 shRNAs et stimulées avec soit de l'ACSF soit 50 μ M de NMDA. Chaque barre de l'histogramme représente une moyenne du signal de BRET par condition pour un intervalle de temps donné. Les données avant stimulation (ACSF) sont composées des signaux obtenus pendant les cinq premières minutes d'acquisition. Les conditions représentées dans le cadre « 15 min post-stim » sont composées de la moyenne des signaux de BRET mesurés dans l'intervalle de temps 15-18 min après stimulation avec du NMDA. Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM. N=3.

9.3.2.2. Clivage *in vitro* de protéines recombinantes

Compte tenu des résultats précédents, nous avons décidé de simplifier le modèle d'étude en examinant l'activité de la protéase recombinante THOP1 sur le biosenseur de BRET de l'IL-1 β purifié *in-vitro*. Pour cela, il a fallu purifier le biosenseur de BRET de l'IL-1 β à partir de cellules HEK293T transfectées avec le plasmide codant pour le biosenseur. Après solubilisation des protéines, l'IL-1 β a été purifiée grâce à des nanocorps se liant à la GFP (et reconnaissant la YPet). La **figure 51** présente le Western-Blot des échantillons durant toute l'étape d'immunoprécipitation. Les extraits totaux (noté TE) sur les 3 premières pistes du Western Blot montrent que les cellules transfectées exprimaient bien le biosenseur (bandes à 80 kDa) à des niveaux différents selon la quantité de plasmides transfectés (500ng vs 1 μ g). Les 3 pistes suivantes (FLT) représentent le surnageant prélevé à la fin de l'immunoprécipitation et avant le lavage des billes. Cette fraction FLT contient toutes les protéines qui ne sont pas liées aux nanocorps et montrent que la majorité de l'IL-1 β a été purifiée.

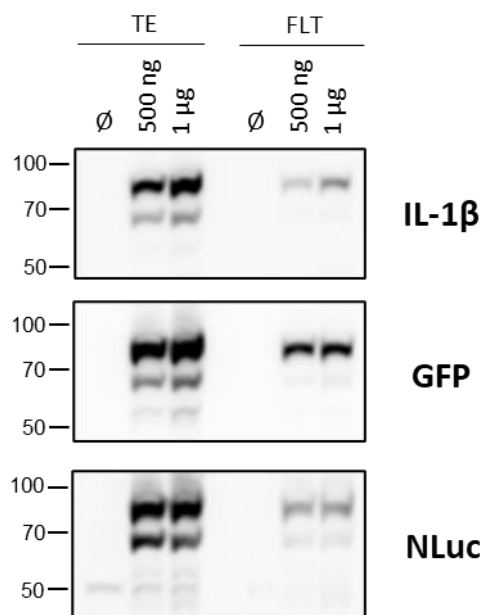


Figure 51 : Expression du biosenseur de BRET de l'IL-1 β dans les lysats cellulaires pendant l'immunoprécipitation

Western-Blot des lysats cellulaires de HEK293T, exprimant le biosenseur de BRET, révélé avec des anticorps dirigés contre l'IL-1 β , la GFP (reconnaissant la Ypet) et la NLuc. Les 3 premières pistes représentent la quantité de protéine transgénique dans les cellules fraîchement lysées. Les 3 pistes suivantes correspondent aux protéines, présentes dans le surnageant, n'ayant pu être liées aux billes durant l'expérience d'immunoprécipitation.

Nous avons ensuite réalisé la réaction enzymatique *in vitro* en incubant l'IL-1 β purifiée soit avec la protéine recombinante THOP1 soit avec la protéine recombinante caspase-1 comme contrôle positif du clivage de l'IL-1 β par une protéase. Dans un premier temps, nous avons testé l'activité enzymatique de THOP1 sur un substrat spécifique qui émet de la fluorescence lorsqu'il est clivé (**figure 52A**). Les résultats obtenus démontrent une augmentation de fluorescence, atteignant la limite de quantification de l'appareil (> 65000 RFU), en présence de THOP1 (courbe rouge), comparé à la condition contrôle qui correspond seulement au substrat dilué dans du tampon. L'activité de THOP1 validée, nous avons ensuite incubé l'IL-1 β en présence de THOP1 ou de caspase-1 dans leurs tampons spécifiques. Deux concentrations de THOP1 ont été utilisées : 1X qui correspond à une concentration de 0.5 ng d'enzyme/ μ L et 10X correspondant à 5ng d'enzyme/ μ L. Nous avons également utilisé deux concentrations d'IL-1 β purifiées (500ng et 1 μ g). La maturation a ensuite été étudiée en BRET pendant 30 min (**figure 52B et C**). L'addition de THOP1, 1X ou 10X, n'induit aucune inflexion du signal de BRET, comparé au contrôle négatif sans protéase (condition TN pour Tris-NaCl, tampon optimal de fonctionnement de l'enzyme) à environ 450 milli BRET unit (mBu). En revanche, le signal de BRET obtenu pour caspase-1 est proche de 0 mBu par rapport à son contrôle ICE (environ 250 mBu, tampon optimal de fonctionnement de l'enzyme), signifiant un clivage presque intégral de la cytokine après 30 min d'incubation à 37°C. Ces résultats ont été parallèlement vérifiés par Western-blot (**figure 52D**). Pour les deux conditions de transfections, un clivage de l'IL-1 β est visible en présence de caspase-1. Les deux bandes présentes (45 kDa et 50 kDa), détectées avec l'anticorps dirigé contre l'IL-1 β et contre la GFP, s'expliquent par l'existence simultanée de différentes formes d'IL-1 β clivée. En effet, cette cytokine est clivée au niveau de l'Asp26 et Asp116 et les deux bandes peuvent indiquer qu'une fraction du biosenseur a été clivée que sur un des deux sites. Cette explication est aussi valable pour les deux bandes détectées avec l'anticorps dirigé contre la NLuc. En revanche, pour toutes les autres conditions, dont celles contenant THOP1, aucun clivage n'est observé, et le biosenseur est uniquement présent sous forme de pro-IL-1 β (vers 80 kDa). L'ensemble de ces résultats démontre que THOP1 seule ne semble pas conduire à la maturation de l'IL-1 β .

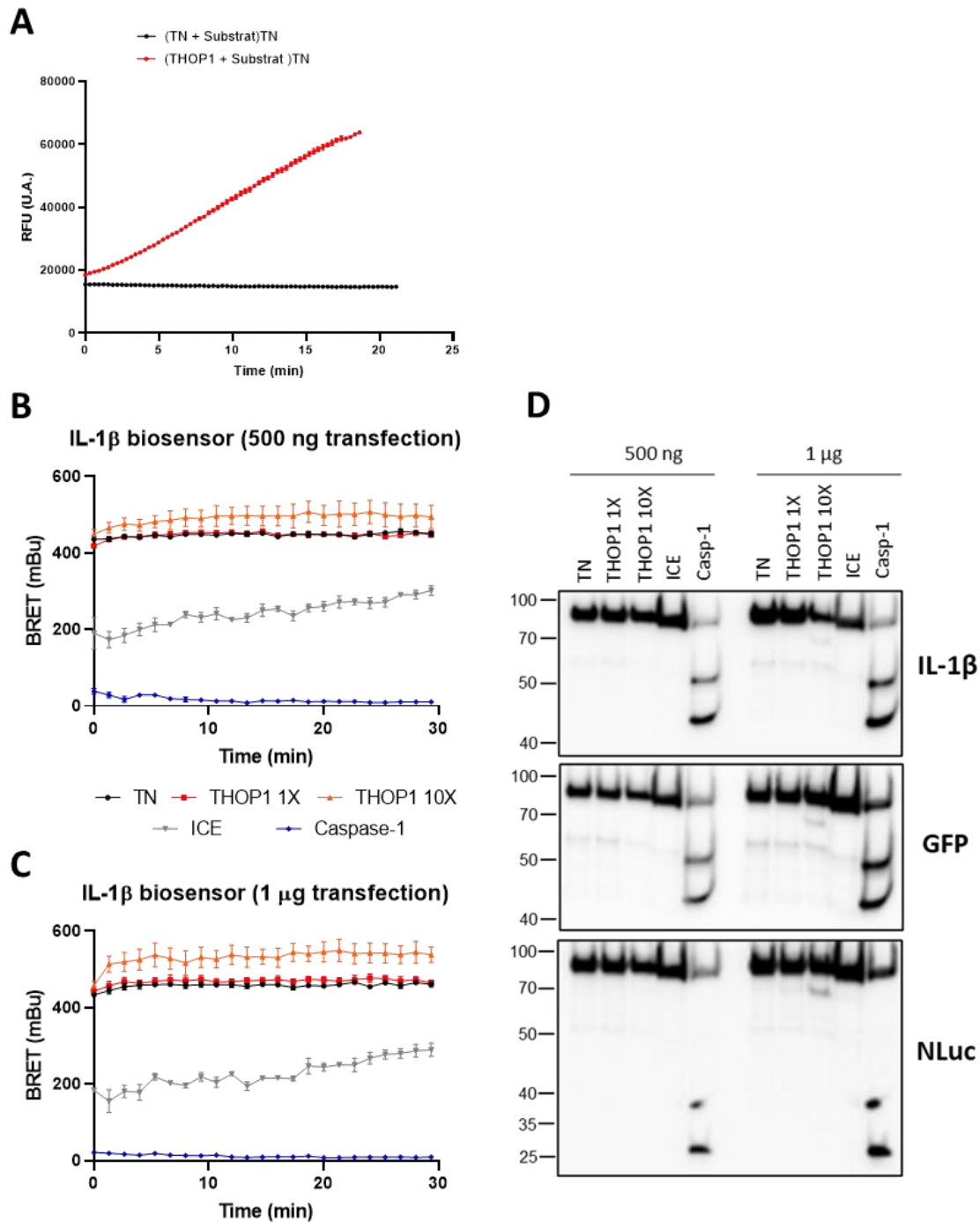


Figure 52 : Maturation du biosenseur de BRET de l'IL-1 β *in vitro*

A : Graphique présentant l'acquisition de fluorescence au cours du temps émise par la dégradation du substrat par THOP1 (courbe rouge) ou par le substrat seul (courbe noire). **B-C** : Graphiques présentant l'évolution du signal de BRET au cours du temps. Le signal a été obtenu pour des quantités variables de protéase THOP1 (1X : courbe rouge et 10X : courbe orange) et des quantités variables d'IL-1 β (500 ng (**B**) ou 1 μ g (**C**)). La quantité de protéase caspase-1 (courbe bleue) est fixe. Les solutions TN (courbe noire) et ICE (courbe grise) correspondent au tampon permettant respectivement une activité optimale des protéases THOP1 et Caspase-1. **D** : Même expérience mais analysée par Western-Blot avec marquage de l'IL-1 β , de la GFP (reconnaissant aussi la Ypet) et de la NLuc.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

10. L'interleukine 1 beta : une cytokine aux multiples fonctions

L'IL-1 β est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans l'initiation de l'inflammation. Identifiée en 1984, sa découverte a permis une avancée majeure dans la compréhension de la mise en place de la réponse inflammatoire (Auron *et al.*, 1984). La production d'IL-1 β bioactive dans les cellules immunitaires passe majoritairement par la voie canonique qui implique dans un premier temps la signalisation TLR pour la synthèse de la cytokine immature et, dans un deuxième temps l'activation de l'inflammasome, conduisant au clivage par la caspase-1 de l'IL-1 β en sa forme mature (M. Sharma & De Alba, 2021). Libérée dans le milieu extracellulaire, cette cytokine se lie sur le récepteur à l'IL-1, récepteur exprimé par de nombreux types cellulaires, tant immunitaires que non-immunitaires (C. A. Dinarello, 2018). Dans le système nerveux central, la production d'IL-1 β a été caractérisée dans la microglie, les macrophages résidants du système nerveux central. Les mécanismes de synthèse, de maturation et de libération de cette cytokine s'avèrent être majoritairement similaires à ce qui a été découvert dans les cellules du système périphérique (Alexopoulou *et al.*, 2001 ; Walsh, Reinke, *et al.*, 2014). Ces derniers sont aujourd'hui particulièrement bien caractérisés notamment pour différentes pathologies cérébrales, dont les maladies neurodégénératives et les épilepsies (Liu & Chan, 2014b ; Mohseni-Moghaddam *et al.*, 2021 ; Zhou *et al.*, 2016).

Un nombre croissant d'études montre aussi une implication de l'IL-1 β dans la régulation de mécanismes physiologiques. En particulier, au niveau des neurones de l'hippocampe, en condition homéostatique, la cytokine module les mécanismes d'induction et de maintenance de la LTP en contrôlant l'activité des récepteurs NMDA (Avital *et al.*, 2003 ; Goshen *et al.*, 2007 ; Viviani *et al.*, 2003). En l'état actuel des connaissances, il ne semble pas que les cellules gliales de l'hippocampe, en condition physiologique, soient capables de synthétiser de l'IL-1 β . En revanche quelques équipes ont identifié que certains neurones, et en particulier les neurones magnocellulaires de l'hypothalamus du rat sont capables de synthétiser la cytokine (Breder *et al.*, 1988 ; Lechan *et al.*, 1990 ; Watt & Hobbs, 2000). Compte tenu de l'effet de l'IL-1 β sur les mécanismes de mémoire, nous avons émis l'hypothèse que les neurones de l'hippocampe pouvaient synthétiser et libérer de l'IL-1 β mature. Au cours de mon travail de thèse, nous avons donc cherché à caractériser la synthèse, la maturation et la libération d'IL-1 β par les neurones hippocampiques.

11. L'IL-1 β est synthétisée par les neurones excitateurs de l'hippocampe

Au cours de ces travaux, nous nous sommes premièrement intéressés à la synthèse de l'IL-1 β par les neurones excitateurs de l'hippocampe, notamment en sachant que ces derniers expriment des récepteurs TLR (Cameron *et al.*, 2007 ; Pauff & Miller, 2012). Nous avons pu déterminer que certains neurones hippocampiques de l'aire CA1, en condition homéostatique expriment l'ARNm de l'IL-1 β . Cette expression est relativement faible avec en moyenne environ 0.7 molécule d'ARN par neurone. Ces résultats montrent que tous les neurones n'expriment pas cette cytokine, mais restent cohérent car une forte expression est plutôt attendue dans les cellules gliales en condition inflammatoire. Cette faible expression dans les neurones Thy1 positifs suggère une faible libération résultant en une faible concentration locale de cytokine. Il est décrit dans la littérature que les neurones expriment une chaîne accessoire du récepteur à l'IL-1 (IL-1R3AcPb) possédant une forte affinité pour l'IL-1 β (Huang *et al.*, 2011). Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'en condition physiologique, la faible libération de la cytokine par les neurones va activer spécifiquement ce récepteur de haute affinité et, *in fine*, activer les voies de signalisations spécifiques associées. Ensuite, il est aussi intéressant de se demander pourquoi l'ARNm de l'IL-1 β n'est pas exprimée par l'ensemble des neurones de l'aire CA1 de l'hippocampe. L'expression est-elle dépendante de l'activité neuronale, ou présente dans un circuit ayant eu une activité récente ? Il eut été intéressant soit de stimuler les neurones de façon globale par injection de kaïnate *in vivo*, soit de stimuler un réseau neuronal en particulier par induction d'une tâche d'apprentissage chez la souris avant de réaliser les marquages RNAscope ainsi qu'un co-immunomarquage de c-fos. C-fos appartient à la famille des gènes transcrits précocement et, est un marqueur de référence pour visualiser l'activation de la transcription après une activité neuronale. Ce co-marquage nous permettrait ainsi de déterminer si l'ARNm de l'IL-1 β est exprimé dans des neurones activés.

En parallèle, pour confirmer ou infirmer l'hypothèse qu'une activité neuronale induit l'activation du promoteur de l'IL-1 β et la transcription de l'ARNm de la cytokine, nous avons enregistré l'activité du promoteur de l'IL-1 β à l'aide d'un reporteur fluorescent dans des cultures primaires de neurones. Nous sommes parvenus à montrer que l'activation de ce promoteur semble avoir lieu 15 min après une forte stimulation neuronale. Il aurait été intéressant d'enregistrer l'activité du promoteur de l'IL-1 β dans un système plus intégré tel que des tranches d'hippocampe ou directement *in vivo*, car le modèle de culture primaire possède une activité neuronale basale soutenue. Cependant, ces résultats préliminaires sont en accord

avec la littérature dans laquelle il est indiqué que la mise en place d'une LTP et/ou des expériences d'apprentissage entraînent une augmentation de l'expression d'ARNm de l'IL-1 β dans l'hippocampe dès 15 min après stimulation (Depino *et al.*, 2004 ; Schneider *et al.*, 1998).

Ces résultats nous amènent à nous demander si les voies gouvernant la synthèse d'IL-1 β dans les neurones sont identiques à celles présentes en périphérie. En effet, dans les cellules immunitaires, la synthèse d'IL-1 β est orchestrée par les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1. Ces derniers sont activés lorsque la voie TLR, principalement, est stimulée par un élément de danger tel que le LPS par exemple (Akira, 2003). Dans le SNC, chez l'adulte, une augmentation de l'ARNm de NF- κ B a été mise en évidence après une activation synaptique (Meberg *et al.*, 1996). De plus, les récepteurs TLRs comme les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 sont démontrés comme grandement impliqués dans la régulation des processus de mémoire et d'apprentissage (Acioglu *et al.*, 2022 ; Ahn *et al.*, 2008 ; Merlo *et al.*, 2005 ; Pennypacker *et al.*, 1994). Les neurones exprimant les récepteurs TLRs, il aurait été intéressant de stimuler la voie TLR dans les neurones et visualiser la synthèse d'ARNm de l'IL-1 β par marquages RNAscope. Dans la continuité de cette idée, nous pourrions envisager de stimuler la voie TLR avec du LPS sur un modèle neuronal exprimant la construction promoteur-IL-1 β -mNeogreen et d'effectuer des immunomarquages de la Neogreen et de NF- κ B pour confirmer ou infirmer l'implication de ces récepteurs dans l'activation du promoteur de l'IL-1 β , donc dans la synthèse de la cytokine. Bien que les voies sous-jacentes menant au complexe NF- κ B ne soient pas encore totalement connues, la signalisation NF- κ B semble être un des acteurs centraux à explorer pour mieux comprendre la synthèse d'IL-1 β neuronale.

12. Les neurones excitateurs de l'hippocampe mûrent l'IL-1 β

12.1. Le biosenseur de BRET de l'IL-1 β : avancée majeure dans la localisation spatio-temporelle cellulaire de la maturation de la cytokine

L'étude de l'IL-1 β dans le SNC en condition physiologique a débuté quelques années après son identification. Comme mentionné précédemment, les premières démonstrations de la présence de cette cytokine dans les neurones hypothalamiques de rat datent de 1988-1990 (Breder *et al.*, 1988 ; Lechan *et al.*, 1990). La spécificité des anticorps ou des sondes d'hybridation *in situ*, n'ont pas été confirmés sur les souris KO par exemple. De plus les études de libération sont réalisées par Western-blot et ELISA, techniques n'ayant aucune résolution spatio-temporelle et ne permettant d'identifier les cellules libérant la cytokine. Pour pallier à ces limites, un biosenseur de BRET de l'IL-1 β a été construit (Compan, Baroja-Mazo, Bragg, *et al.*, 2012) puis amélioré. Au cours de cette étude nous avons pu montrer que ce biosenseur possède les mêmes propriétés biologiques que la version endogène de la cytokine (clivage par la caspase-1 et activation du complexe récepteur à l'IL-1), malgré la présence du donneur et de l'accepteur d'énergie de part et d'autre de l'IL-1 β . A l'aide de promoteurs spécifiques, nous avons été capable d'exprimer la construction dans un type cellulaire précis (notamment dans les neurones excitateurs de l'hippocampe et du cortex). La cytokine s'exprime dans les différents compartiments des neurones, mais un enrichissement préférentiel du biosenseur de BRET est observé dans les épines dendritiques.

Ces résultats sont en accord avec les données obtenues en spectrométrie de masse. En effet, indépendamment de la condition de stimulation, les interactomes de l'IL-1 β révèlent un enrichissement majoritaire de protéines ayant un lien avec les vésicules synaptiques et la post-synapse. Les termes GO de localisation cellulaire présentent une significativité dans le transport vésiculaire et les vésicules synaptiques. A cela s'ajoute un enrichissement dans la localisation post-synaptique de l'IL-1 β . Les mécanismes de libération n'étant pas connus à ce jour, il est possible que, exclusivement dans les neurones, la cytokine soit à la fois transportée du soma vers les dendrites et les épines dendritiques par des vésicules via le réseau du cytosquelette, mais soit aussi en libre circulation dans le cytoplasme. Une autre question est de savoir si le clivage de la cytokine s'opère à proximité des récepteurs NMDA, en particulier à proximité des récepteurs exprimant les sous-unités GluN2A et GluN2B. Il est décrit dans la littérature que les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2A sont localisés au niveau de l'espace synaptique tandis que ceux exprimant les sous-unités GluN2B sont présents dans l'espace péri-

synaptique (Tovar & Westbrook, 1999). Il serait intéressant de réaliser un co-marquage de l'IL-1 β et des sous-unités GluN2A et GluN2B des récepteurs NMDA pour affiner la localisation de la cytokine dans les neurones. Les résultats obtenus sur la maturation de l'IL-1 β neuronale en vidéo-microscopie démontrent que même si la cytokine est préférentiellement localisée dans les épines dendritiques, le clivage s'opère dans les différents compartiments neuronaux. Ceci indique que la maturation ne semble pas nécessiter une proximité directe avec les récepteurs NMDA. En prenant en compte le remaniement des réseaux, l'hyperexcitabilité des cultures ainsi que la surexpression du biosenseur de BRET de l'IL-1 β , il est vraisemblable que notre modèle d'étude ne soit pas adapté pour répondre à cette question. Il conviendrait alors de confirmer la localisation et la maturation de l'IL-1 β dans un système plus intégré, comme des tranches d'hippocampe avec un mécanisme d'expression de la cytokine qui n'entraîne pas la saturation du système à cause d'une surexpression par approche virale.

12.2. Maturation de l'IL-1 β neuronale et inflammasome

Les mécanismes de maturation de l'IL-1 β par les cellules immunitaires sont bien caractérisés. La majorité des cellules produisant cette cytokine exprime un ou plusieurs inflammasomes, qui vont répondre à différents types de stimuli (Lamkanfi & Dixit, 2012). Le clivage de l'IL-1 β en sa forme bioactive s'opère, principalement par les voies canonique et non-canonique dans le cytoplasme et mineurairement grâce à des protéases extracellulaires (Afonina *et al.*, 2015 ; Antonopoulos *et al.*, 2015 ; Rathinam *et al.*, 2019 ; M. Sharma & De Alba, 2021). Cependant, les cellules immunitaires ne sont pas les seules à exprimer des composants de l'inflammation puisque, les neurones pyramidaux semblent également posséder les inflammasomes NLRP1 (S. E. Adamczak *et al.*, 2014 ; Kaushal *et al.*, 2015 ; M. S. Tan *et al.*, 2014). Le rôle de cette plateforme moléculaire dans le clivage de l'IL-1 β neuronale n'a jamais été démontré. A ce jour, le rôle de cet inflammasome semble se limiter dans les neurones, en condition inflammatoire, à l'induction de la pyroptose qui est une mort par lyse cellulaire provoquée par l'inflammasome et surtout la caspase-1, entraînant la libération de DAMPs dans le milieu extracellulaire.

Au cours de nos travaux, nous n'avons pas pu étudier l'implication de l'inflammasome NLRP1 dans la maturation de l'IL-1 β neuronale. En effet, à ce jour, il n'existe aucun inhibiteur pharmacologique qui soit spécifique de cet inflammasome. En revanche, nos données indiquent que le clivage, induit par la signalisation NMDA, est indépendant de l'inflammasome NLRP3 et de la caspase-1.

12.3. Maturation de l'IL-1 β neuronale et récepteurs NMDA

Au cours de cette étude, nous avons montré que le clivage de la cytokine dans les neurones hippocampiques s'opère durant une activité neuronale soutenue (induite par exemple par une stimulation au KCl ou à la 4-AP), et passe par l'activation des récepteurs NMDA. Grâce à l'utilisation de différents agents pharmacologiques ciblant les sous-unités GluN2A (TCN201) et GluN2B (Ro25-6981), nous sommes parvenus à montrer que la maturation de l'IL-1 β est toujours active lorsque GluN2A seule ou GluN2B seule est inhibée. En revanche, le blocage pharmacologique simultané de ces deux sous-unités du récepteur NMDA conduit à une abolition de la maturation de l'IL-1 β . Ces données suggèrent que le clivage de la cytokine dans les neurones s'opère soit par l'intermédiaire de l'activation synchrone des récepteurs NMDA hétérodimériques GluN1-GluN2A et GluN1-GluN2B, soit nécessite l'activation de récepteurs NMDA hétérotrimériques. Découverts il y a plus de vingt ans (Kew *et al.*, 1998) mais récemment étudiés, les récepteurs NMDA hétérotrimériques sont composés des deux sous-unités obligatoires GluN1 et de deux sous-unités GluN2 ou GluN3, différentes l'une de l'autre. Ils sont particulièrement abondant dans l'hippocampe (15 à 50% des récepteurs NMDA totaux) sous la forme GluN1A/GluN2A/GluN2B (Al-Hallaq *et al.*, 2007 ; Paoletti *et al.*, 2013 ; Rauner & Köhr, 2011). La conformation di / tri-hétéromère influence les propriétés d'ouverture et de perméabilité aux cations des récepteurs, ouvrant un nouveau champ d'investigation dans les domaines de la plasticité synaptique (Kumar & Kumar, 2021). En effet, un récepteur NMDA hétérodimérique contenant les sous unités GluN2A ou GluN2B présente une haute conductance ainsi qu'une forte sensibilité au blocage magnésium et à la perméabilité au calcium (Paoletti *et al.*, 2013). Dans le cadre d'un récepteur NMDA hétérotrimérique GluN1/GluN2A/GluN2B, il semble que les propriétés fonctionnelles soient dépendantes des sous-unités exprimées. En effet, la présence simultanée de deux sous-unités GluN2 différentes entraîne une plus faible sensibilité du récepteur aux inhibiteurs GluN2A et GluN2B par comparaison avec les hétérodimères exprimant la même sous-unité (Hansen *et al.*, 2014 ; Stroebel *et al.*, 2014). De manière intéressante, les données obtenues concernant la maturation de l'IL-1 β en présence de concentration croissantes en TCN201 et Ro25-6981 semblent être corrélées avec les données de la littérature sur la pharmacologie des récepteurs NMDA hétérotrimériques. En effet, le clivage de la cytokine est progressivement aboli à mesure que les concentrations en inhibiteurs augmentent, donc à mesure que le courant entrant de ce type de récepteur diminue. Les données de la littérature montrent que 1 μ M d'inhibiteur GluN2A et GluN2B bloque entre 30 et 50% du courant entrant des récepteurs NMDA hétérotrimériques (Cheriyana *et al.*, 2016 ; Hansen *et al.*,

2014 ; Stroebel *et al.*, 2014). A cette même concentration, nous avons encore une diminution du signal de BRET de 5%. A 10 μ M d'inhibiteurs, les courants générés par le récepteur hétérotrimérique sont diminués d'au moins 80% et à ces concentrations, la maturation de l'IL-1 β est abolie. L'ensemble de ces données renforcent l'hypothèse d'une implication des récepteurs NMDA hétérotrimériques dans la maturation de l'IL-1 β neuronale, mais suggèrent aussi que la protéase responsable de ce clivage requiert un courant entrant minimal provenant de ces récepteurs pour être produite et/ou activée.

12.4. La métalloprotéase THOP1

Nos données de la spectrométrie de masse ont conduit à l'identification d'un candidat potentiellement impliqué dans la maturation de l'IL-1 β appelé THOP1 ou Thimet Oligopeptidase 1. Cette enzyme appartient à la famille M3 des métalloprotéases, famille dont l'expression peut être modulée par l'activité des récepteurs NMDA, mais aussi par des facteurs de transcriptions tels que NF- κ B et AP1 (Rempe *et al.*, 2016 ; Wójtowicz & Mozrzymas, 2014). Lorsque THOP1 est invalidée dans un modèle murin, l'animal présente des troubles de la mémoire et de l'apprentissage, phénotype proche de celui identifié après une délétion de l'IL-1 β (Santos *et al.*, 2019). A ce jour, aucune interaction fonctionnelle entre le récepteur NMDA et THOP1 n'a pu être démontrée. Pour essayer de démontrer l'implication de THOP1 dans le clivage de l'IL-1 β neuronale, nous avons premièrement décidé d'invalider l'expression de l'enzyme par des shRNA et de visualiser la maturation de l'IL-1 β en enregistrant le signal de BRET. Les résultats obtenus montrent que cette invalidation n'a pas affecté la maturation de la cytokine. Néanmoins, il semble que l'efficacité des shRNA ne soit pas de 100%, résultant en une invalidation partielle de THOP1. De plus, nous n'avons pas pu déterminer si les shRNA invalidaient l'expression de l'enzyme dans les neurones ou dans les cellules gliales. Il serait intéressant de reproduire les mêmes expériences sur le modèle murin KO pour THOP1, créé par l'équipe de Ferro (Santos *et al.*, 2019). Ensuite, nous avons voulu simplifier ce modèle en visualisant le clivage de la cytokine directement dans un tube à essai à partir de la protéine recombinante THOP1 et du biosenseur de BRET de l'IL-1 β purifié. Les données obtenues montrent une absence de clivage du biosenseur par THOP1, clivage quasiment intégral lorsque nous avons réalisé la même expérience avec l'enzyme caspase-1. L'ensemble de nos résultats suggèrent que ce candidat ne serait pas la protéase responsable du clivage de l'IL-1 β .

Il convient d'analyser de nouveau les résultats de spectrométrie de masse, voire de refaire entièrement cette expérience. En effet, il est possible que les temps de stimulations effectués

(NMDA 7min et 15 min) soient trop longs et nous aurions dû ajouter un temps supplémentaire, plus court. Une autre hypothèse serait que la conformation tridimensionnelle de la protéase rende la biotinylation impossible, puisque cette liaison covalente se forme préférentiellement sur les acides aminés tyrosines, tryptophanes, cystéines et histidines. L'hypothèse inverse serait que la protéase soit biotinylée à plusieurs reprises. Lors de l'étape de précipitation, nous avons utilisé des billes magnétiques couplées à de la streptavidine, reconnaissant la biotine. La liaison biotine-streptavidine est extrêmement forte, à tel point que nous devons ajouter de la biotine dans la solution d'éluion, afin de créer une compétition entre la biotine libre et les protéines biotinylées. Il est possible que les détergents utilisés ne soient pas assez puissants pour détacher la protéase des billes et que, *in fine*, cette protéase n'ait pas pu être éluée.

13. L'IL-1 β est libérée par les neurones excitateurs de l'hippocampe dans le milieu extracellulaire

Les mécanismes de libération d'IL-1 β bioactive par les cellules immunitaires restent encore aujourd'hui fortement débattus. De nombreuses voies de sécrétions ont été décrites telles qu'une sécrétion par les vésicules endolysosomales, les vésicules de sécrétions lysosomales, les exosomes et les corps-multivésiculaires (Andrei *et al.*, 1999 ; MacKenzie *et al.*, 2001 ; Qu *et al.*, 2007). L'avancée des recherches a permis de réfuter certaines de ces voies, d'autres sont encore sujettes à débat. Le mécanisme de sécrétion qui apparaît être aujourd'hui le plus probant dans les cellules immunitaires passe par la formation de pores via la GSDMD (Xia *et al.*, 2021), mais des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Dans le SNC, les mécanismes de libération de l'IL-1 β par les cellules gliales restent inconnus, mais il semble fort probable que ces mécanismes soient similaires à ceux décrits en périphérie. Au niveau des neurones de l'hippocampe, nous sommes parvenus à démontrer par dosage ELISA qu'ils étaient capables de libérer de l'IL-1 β dans le milieu extracellulaire. De plus, cette libération est augmentée quand les neurones sont stimulés avec du NMDA. La quantité d'IL-1 β libérée étant très faible, nous n'avons pas été en mesure de déterminer, avec les outils à notre disposition (dosage indirect avec les HEK-Blue), si cette cytokine présente dans le surnageant des cellules était ou non bioactive. Cependant, dans l'hypothèse où la cytokine serait bioactive, l'identification d'une faible libération neuronale est en accord avec les données de la littérature puisqu'il a été montré que l'IL-1 β module la transmission synaptique pour des concentrations comprises entre 1 à 10 aM (équivalent à 10^{-18} - 10^{-17} M) (Luk *et al.*, 1999 ; Stemkowski *et al.*, 2021). De plus, au niveau des neurones, de faibles concentrations d'IL-1 β entraîne la formation

du complexe récepteur à l'IL-1 par liaison de l'IL-1 β entraîne le recrutement de l'IL-1R3AcPb. Cette sous-unité est décrite comme étant un variant d'épissage de la chaîne accessoire IL-1R3AcP, exclusivement exprimée dans le système nerveux central, et beaucoup plus affine pour l'IL-1 β que le variant IL-1R3AcP (Huang *et al.*, 2011 ; H. L. Lu *et al.*, 2008). L'IL-1R3AcPb est impliquée dans la phosphorylation de la protéine Src neuronale qui à son tour, phosphoryle la sous-unité GluN2B pour potentialiser l'influx calcique médié par les NMDARs (Viviani *et al.*, 2003). L'activation de ce complexe pourrait être responsable du rôle facilitateur de l'IL-1 β dans la formation de la mémoire dans l'hippocampe (Yirmiya *et al.*, 2002), observé pour de faibles concentrations d'IL-1 β .

Actuellement, aucune donnée de la littérature ne mentionne un mécanisme de libération de l'IL-1 β ou d'autres cytokines par les neurones. Toutefois, dans nos expériences de protéomique, la comparaison des interactomes entre les différents traitements expérimentaux (AP5, NMDA 7 et 15 min) à la condition contrôle (**figure 53**) ainsi que les enrichissements des termes GO en processus biologiques et localisations cellulaires démontrent une significativité pour les protéines impliquées dans le transport, la localisation, la maturation et la fusion des vésicules ainsi que dans les mécanismes d'exocytose. De nombreuses protéines du cytosquelette ainsi que des protéines impliquées dans la régulation des vésicules ont aussi été retrouvées dans toutes les conditions expérimentales. La présence de nombreuses protéines du cytosquelette peut s'expliquer car la pro-IL-1 β circule librement dans le cytoplasme. De manière intéressante, des processus biologiques liés à la sécrétion du glutamate en condition NMDA uniquement ont aussi été identifiés. Il est possible que la libération de la cytokine par les neurones puisse être associée à la libération de neurotransmetteurs par un mécanisme d'exocytose. En effet, au niveau de la pré-synapse des neurones, la glutamine est métabolisée en glutamate et ce neurotransmetteur, est ensuite encapsulé dans des vésicules synaptiques à l'aide de transporteurs spécifiques (Du *et al.*, 2020). Cela signifie que, tout comme l'IL-1 β , le glutamate est transitoirement en libre circulation dans le cytoplasme. Grâce aux données de spectrométrie de masse, nous pouvons penser que l'ARNm de l'IL-1 β soit acheminé au niveau des synapses pour y être traduit en protéine. Lors d'une activité neuronale, la cytokine serait clivée dans le cytoplasme puis encapsulée dans des vésicules synaptiques glutamatergique pour être libérée dans la fente synaptique. Cette hypothèse permet aussi d'expliquer l'action rapide et ciblé de la cytokine, à très faible concentration, sur ces récepteurs majoritairement présents en post-synapse. Afin de confirmer cette hypothèse, il conviendrait de vérifier une potentielle colocalisation entre l'IL-1 β et des vésicules synaptiques en réalisant un co-marquage avec des

anticorps dirigés contre la cytokine et VGLUT1 (Vesicular glutamate transporter 1) par exemple.

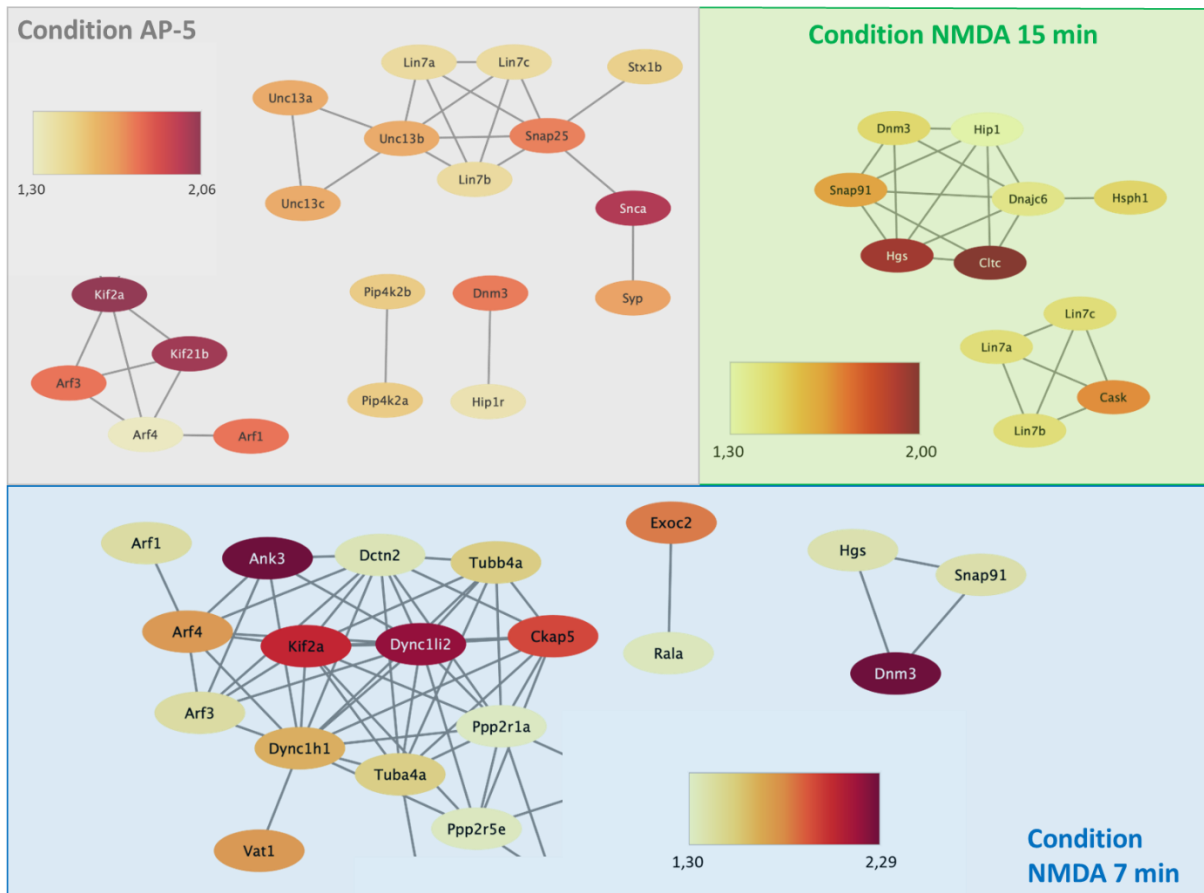


Figure 53 : Éléments des interactomes identifiant les protéines liées au transport vésiculaire

Extraits des interactomes pour les conditions AP5 (gris), NMDA 7 min (bleu) et NMDA 15 min (vert) présentés en intégralité dans la 3^e section des résultats. Les protéines identifiées sont associées au transport (Lin7a-b-c, Kif2a, Arf1, Hgs) à la localisation (Arf1, Cltc, Snca) à la maturation (Unc13a-b-c), à la fusion des vésicules (Exoc2, Snap25, Stx1b) ou aux mécanismes d'exocytose (Exoc2, Rala, Dnm3, Snca).

14. Perspectives : développement d'outils pour étudier la maturation du biosenseur de BRET de l'IL-1 β dans un modèle plus intégré : tranches organotypiques d'hippocampe

Comme nous l'avons démontré précédemment, les neurones pyramidaux de l'hippocampe sont capables de synthétiser, maturer et libérer de l'IL-1 β . Le modèle de culture primaire utilisé pour valider ces résultats possède de nombreux avantages, mais aussi certains inconvénients. Premièrement, le remaniement des réseaux après la mise en culture génère une hyperexcitabilité des cultures avec un motif de type épileptique, ce qui nous place dans une configuration plutôt inflammatoire. Deuxièmement, le réseau en place ne reflète pas celui qui est retrouvé dans le cerveau. Malgré ces inconvénients, la culture primaire reste un modèle de choix pour décrypter les mécanismes moléculaires. Afin d'aller plus loin dans l'étude de la maturation de l'IL-1 β neuronale, nous avons décidé d'opter pour un modèle plus intégré : les tranches organotypiques d'hippocampe. A la différence de la culture cellulaire, ce modèle consiste à mettre en culture, à l'interface liquide – air, des tranches d'hippocampe. Comme mentionné dans l'introduction (cf. section 3.3.3.1.1), la conduction du signal nerveux au sein de l'hippocampe suit majoritairement le circuit suivant. L'influx nerveux arrive dans le gyrus denté puis est transmis dans l'aire CA3, suivi de l'aire CA1 pour ressortir par le cortex entorhinal. Les tranches organotypiques d'hippocampe ont pour avantage de préserver le réseau neuronal retrouvé *in vivo* en plus de pouvoir être conservées pendant plus de 15 jours

Nous avons donc mis en place le protocole de culture de tranches organotypique au cours de cette étude. Durant toute la mise au point, nous avons réalisé des immunomarquages à différents jours *in vitro*, de la protéine neuronale NeuN pour suivre l'évolution de la conservation des différentes aires hippocampiques. Ces immunohistochimies ont été complétées avec un marquage des noyaux au DAPI ainsi que des cellules mortes avec de l'iodure de propidium (**figure 54A**). En l'état actuel des expériences, la mise au point est longue et peu concluante car nous observons une migration des cellules et d'importants remaniements induits par de la mort cellulaire (marquage rouge) qui ont lieu à partir de la mise en culture de la tranche. Cela conduit progressivement en une déstructuration complète des tranches organotypiques d'hippocampe. A titre de comparaison, la **figure 54B** extraite de Czapla, Reiterer and Funke, 2022, présente un marquage NeuN sur une tranche organotypique d'hippocampe après 15 jours de culture, lorsque ce protocole est bien maîtrisé. L'architecture cellulaire des différentes aires hippocampiques (DG, CA3 et CA1) est distincte et bien conservée. D'importants ajustements

sont en cours de réalisation afin que nous puissions obtenir un modèle fonctionnel, important pour les perspectives de cette étude.

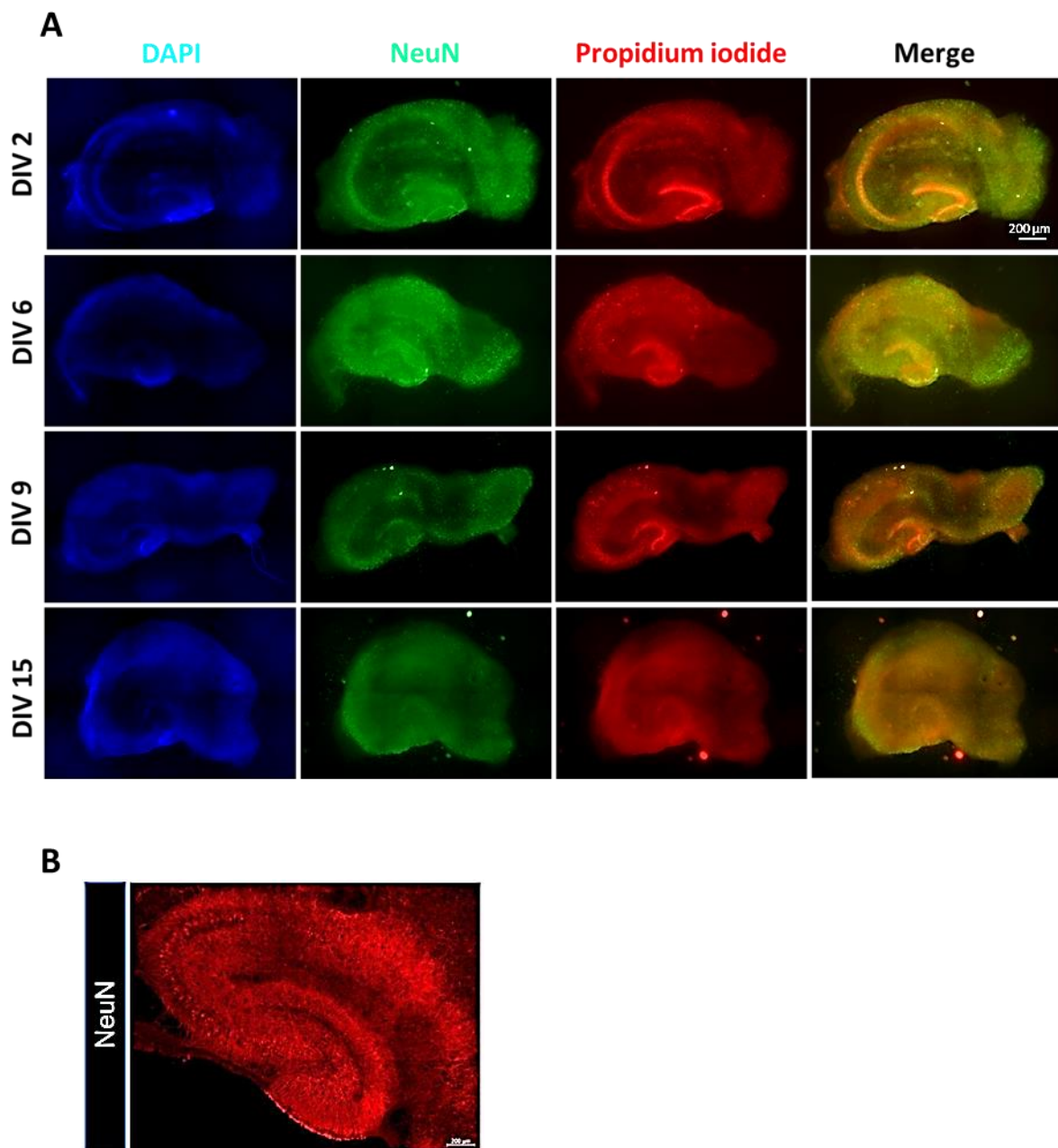


Figure 54 : Suivi de l'architecture cellulaire des tranches organotypiques d'hippocampe de la mise en culture jusqu'à 15 jours *in vitro*

A : Immuno-marquage de la protéine neuronale NeuN (vert) et marquage chimique des cellules mortes à l'iodure de propidium (rouge) sur des tranches organotypiques d'hippocampe à DIV2, 6, 9 et 15 afin de suivre l'évolution des réseaux neuronaux au cours du temps. Les noyaux cellulaires ont été marqués au DAPI (bleu). Le merge correspond à la superposition des images GFP et Propidium iodide. **B :** Marquage de la protéine NeuN dans une tranche organotypique d'hippocampe après 15 jours en culture (d'après Czapla *et al.*, 2022), révélant les différentes aires hippocampiques (DG, CA3 et CA1).

L'objectif principal des tranches organotypiques d'hippocampe est de pouvoir générer une excitation neuronale plus physiologique, limitant ainsi les biais induits par une stimulation chimique, et en parallèle de visualiser la maturation du biosenseur de BRET de l'IL-1 β . Cette stimulation peut être de deux types : soit électrophysiologique, soit optogénétique. Le choix d'utiliser l'optogénétique paraît plus judicieux puisque cette méthode est plus facilement compatible avec le BRET en microscopie car, premièrement nous disposons du matériel nécessaire pour l'acquisition d'images et, deuxièmement le spectre d'excitation des channel-rhodopsines et le spectre excitation/émission de la YPet ne se chevauchent pas. Ainsi, nous avons décidé de coupler ce système de stimulation par la lumière pour générer une excitabilité neuronale dans l'aire CA3 de l'hippocampe dans l'objectif de visualiser la maturation du biosenseur de BRET de l'IL-1 β , qui en résulte dans l'aire CA1. Pour cela, il faut exprimer spécifiquement la channel-rhodopsine et le biosenseur de BRET dans les aires CA3 et CA1 de l'hippocampe, respectivement. Nous avons opté pour l'utilisation de la Cheriff, une channel-rhodopsine génétiquement modifiée qui présente une cinétique d'activation plus rapide et une plus grande sensibilité à la lumière bleue par rapport à la ChR2 (Hochbaum *et al.*, 2014). Elle comporte une eGFP en C-terminal utilisée comme rapporteur d'expression cellulaire.

En parallèle de la mise en place du modèle de tranches organotypiques d'hippocampe, nous avons développé des AVV contenant la séquence codante pour la Cheriff ou le biosenseur de BRET, sous le contrôle de promoteurs spécifiques de l'aire CA3 ou CA1, respectivement. Par recherche sur l'Allen Brain Atlas, Mouse Brain, nous avons sélectionné trois promoteurs identifiés comme permettant une expression spécifique dans les aires CA3 et le DG : Spock1, Prkcd et Cpne4. La séquence minimale de 1kb, selon prédiction, de ces promoteurs a été synthétisée et insérée dans un vecteur AAV contenant la Cheriff-eGFP. De la même manière, nous avons aussi identifié deux promoteurs plus spécifiques de l'aire CA1 (Doc2b et Kcnh7). A leur tour synthétisés, ils ont été insérés dans un vecteur AAV contenant le biosenseur de BRET de l'IL-1 β . Les constructions ont été validées par séquençage et seront testées prochainement, soit sur des tranches organotypiques viables, soit éventuellement *in vivo*.

15. Perspectives : Etude de la production d'IL-1 β neuronale dans un modèle murin KI exprimant le biosenseur de BRET de l'IL-1 β

15.1. Mutagénèse et conception du modèle

En parallèle de mes travaux de recherches, l'équipe a décidé de créer un modèle murin génétiquement modifié exprimant le biosenseur de BRET de l'IL-1 β . Dans une souris de fond génétique C57Bl/6J, la séquence codante (ADNc) pour le biosenseur a été insérée dans le locus *Il-1 β* à la place des exons 2 et 3. Cette insertion inactive l'expression de l'IL-1 β endogène. L'addition de 2 sites LoxP de part et d'autre de la séquence codante pour le biosenseur permet d'inactiver conditionnellement l'expression de la protéine transgénique (**figure 55**). Ce modèle a été généré par le Centre d'Immunophénomique de Marseille.

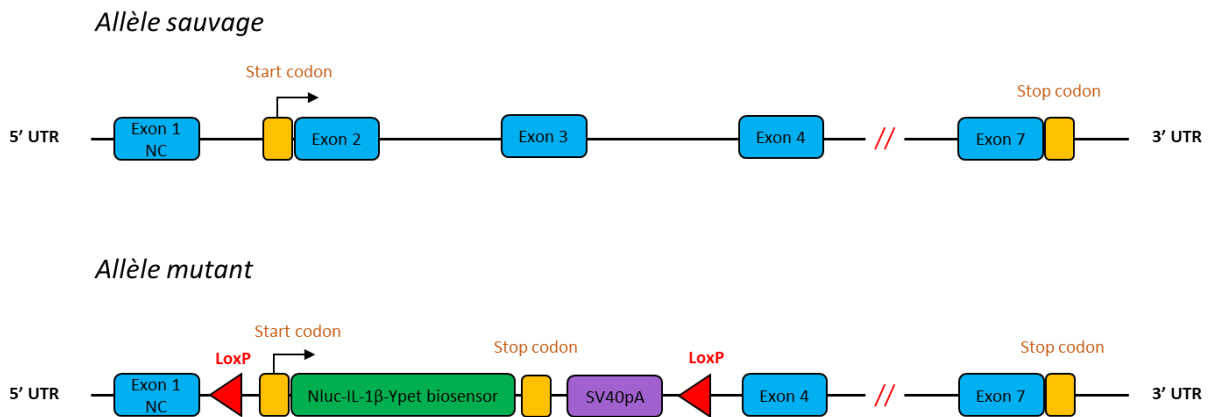


Figure 55 : Représentation schématique de la construction génétique du modèle murin KI exprimant le biosenseur de BRET de l'IL-1 β

Une souche Knock-in est générée par introduction de l'ADNc codant pour le biosenseur de BRET de l'IL-1 β flanqué par deux sites LoxP, dans le gène endogène codant pour l'IL-1 β à la place des exons 2 et 3.

15.2. Avantages du modèle KI

Le premier modèle murin rapporteur qui a permis de visualiser le « statut inflammatoire » directement dans l'animal est appelé IDOL (Iwawaki *et al.*, 2015). Développé par l'équipe de Tamamura, ce modèle contient une séquence codante pour une luciférase sous le contrôle du promoteur minimal de l'IL-1 β , insérée juste en amont de la séquence tronquée de l'IL-1 β codante pour les sites de clivages de la caspase-1, suivi d'un motif d'adressage pour la dégradation par le protéasome. Cette construction a été ensuite insérée par transgénèse dans l'animal. En condition homéostatique, la luciférase produite est suivie du motif de dégradation

et n'émettra pas de bioluminescence. En condition inflammatoire, la caspase-1 activée clive la protéine transgénique au niveau des sites de clivages de l'IL-1 β qui relie la luciférase au motif de dégradation. La luciférase n'étant plus dégradée va émettre de la bioluminescence en présence de son substrat, qui pourra être détectée par un système adéquat. Grâce à cette construction, les auteurs ont été capables de visualiser indirectement ce qu'ils ont appelé le « statut inflammatoire » induit par la production d'IL-1 β , par mesure de bioluminescence, directement *in vivo* après injection de LPS. Par comparaison avec le modèle IDOL, la lignée KI pour le biosenseur de BRET de l'IL-1 β présente plusieurs avantages.

- La NLuc du biosenseur est environ 100 fois plus brillante que la luciférase du modèle IDOL, lui conférant une meilleure sensibilité.
- En tant que modèle KI, il contient le promoteur complet de l'IL-1 β ainsi que la séquence complète qui code pour la cytokine.
- L'excitation directe de la YPet permet d'avoir un reporteur visuel de l'expression de l'IL-1 β dans les tissus.
- L'inactivation conditionnelle de l'allèle muté, par croisement avec un modèle exprimant la Cre recombinase, représente un avantage supplémentaire pour étudier le rôle de l'IL-1 β dans un type cellulaire donné.

Par rapport aux modèles cellulaires utilisés dans nos travaux où l'expression du biosenseur est induite par transduction, la lignée KI présente l'avantage d'exprimer le biosenseur de BRET sous le contrôle du promoteur endogène. Cette propriété permet d'éviter toute réaction inflammatoire potentiellement générée par les approches virales dont nous avons eu recours pour exprimer ce biosenseur. De plus, les systèmes viraux peuvent conduire à des artefacts liés à la surexpression importante de la protéine transgénique. Nous avons notamment remarqué qu'une trop forte expression du biosenseur de BRET dans les neurones entraînait un changement morphologique important des épines dendritiques, arborant une forme semblable à un filopode. Ces raisons font du modèle murin KI pour le biosenseur de BRET de l'IL-1 β un système d'étude de choix dans la compréhension des rôles de cette cytokine, en particulier dans le SNC.

15.3. Données préliminaires : caractérisation de la production d'IL-1 β dans les macrophages

Les premiers animaux KI ont été générés en fin d'année dernière. Nous avons souhaité dans un premier temps caractériser si 1/ l'expression du biosenseur était détectable dans les cellules immunitaires des souris KI et 2/ si la bio-activité du biosenseur exprimé par les souris KI est identique à celles de l'IL-1 β endogène.

15.3.1. Expression de l'IL-1 β endogène et du biosenseur de BRET

Ces expériences ont été réalisées par deux membres de l'équipe (Sandra Pierredon et Margo Bierry) sur des macrophages dérivés de la moëlle osseuse (BMDM).

Les résultats obtenus en immunofluorescence, en Western-blot et par mesure de l'expression de la bioluminescence (**figure 56**) montrent que :

- L'expression du biosenseur de BRET est détectable uniquement après « priming » des macrophages.
- Les souris hétérozygotes (WT/KI) expriment à la fois le biosenseur de BRET et l'IL-1 β endogène.
- Chez les souris homozygotes (KI/KI), l'expression du biosenseur de BRET remplace l'expression de l'IL-1 β endogène.

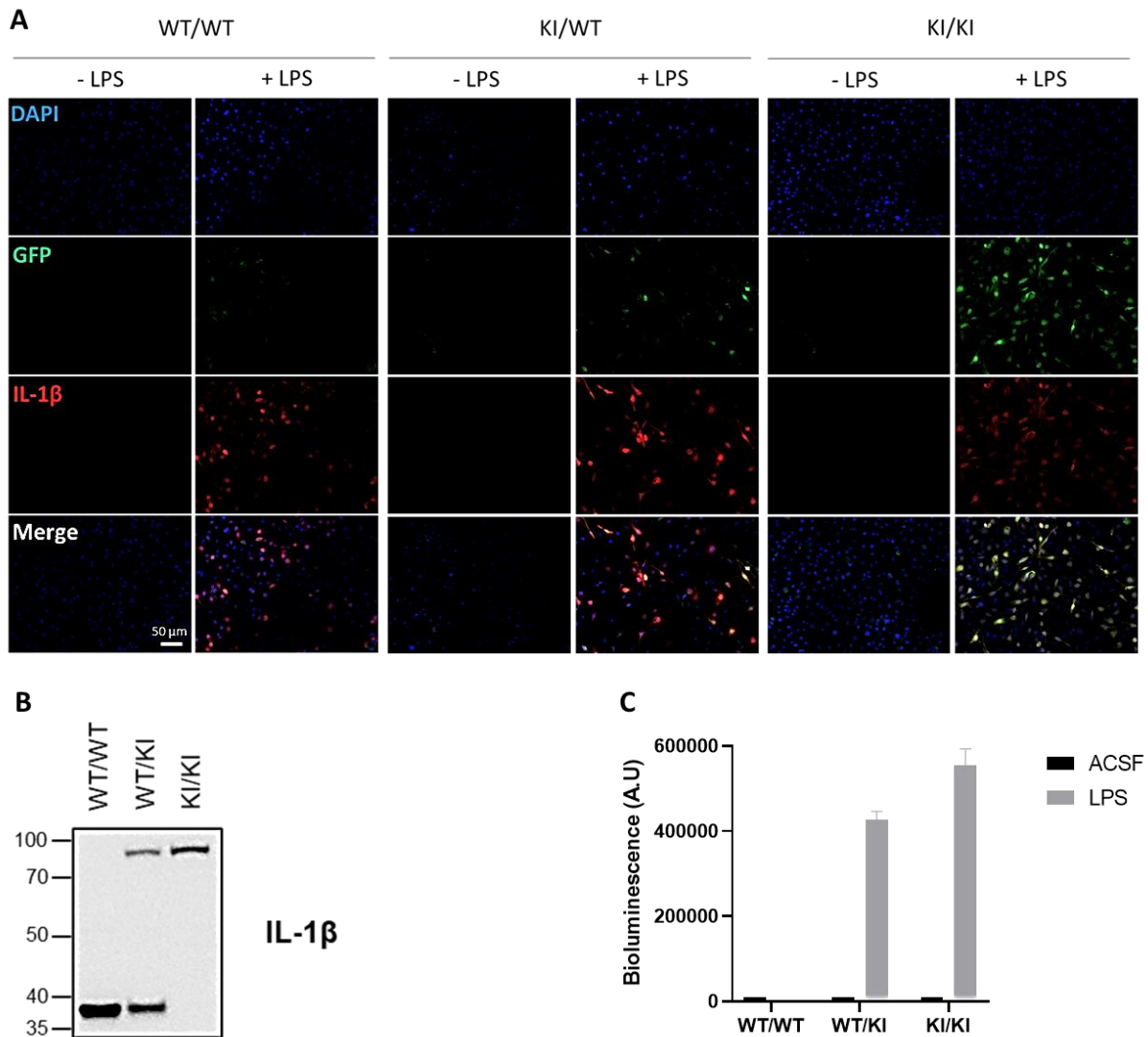


Figure 56 : Expression de l'IL-1 β endogène ou du biosenseur de BRET de macrophages provenant des lignées WT, hétérozygote KI/WT et homozygote KI/KI

A : Marquages immunocytochimiques de l'IL-1 β (rouge) et de la YPet (vert, noté GFP) dans des macrophages stimulés ou non avec du LPS et provenant soit d'une lignée WT exprimant uniquement l'IL-1 β endogène (panneau de gauche), soit d'une lignée hétérozygote (KI/WT) co-exprimant la forme native et le biosenseur (panneau central), soit d'une lignée homozygote (KI/KI) n'exprimant que le biosenseur de manière endogène (panneau de droite). Les images du bas (Merge) représentent la fusion des marquages IL-1 β et GFP. Les noyaux cellulaires ont été marqués avec du Hoescht (bleu). **B** : Western-Blot des lysats cellulaires de BMDM provenant des trois génotypes mentionnés précédemment et stimulés avec du LPS. **C** : Quantification de la bioluminescence émise par la NLuc (A.U) dans des BMDM provenant des différents génotypes du modèle KI. N=1.

15.3.2. Maturation et libération de l'IL-1 β par les macrophages

La maturation du biosenseur de BRET de l'IL-1 β a également été étudiée sur des BMDM issus des trois génotypes. Les résultats obtenus en BRET (**figure 57A et B**) et en Western Blot (**figure 57C**) montrent que l'ATP (2mM) et la nigéricine (10 μ M) entraînent le clivage et la libération du biosenseur de façon similaire à celle de l'IL-1 β endogène. Par ailleurs, l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 par le MCC950, bloque la maturation de la cytokine. Cette inhibition est retrouvée sur les trois génotypes.

Les données obtenues en ELISA (**figure 57D**) confirment également une libération du biosenseur de BRET après une stimulation avec des DAMPs (Nigéricine ou ATP). Cependant cette libération semble réduite d'environ 50% sur les cellules de génotype homozygote. Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus en Western Blot, qui montrent une maturation similaire du biosenseur et de l'IL-1 β endogène et suggèrent que la fusion de la YPet en C-terminal de l'IL-1 β pourrait affecter la détection de la forme mature de la cytokine par les anticorps utilisés dans ce kit ELISA.

Toutes ces données suggèrent que les propriétés fonctionnelles du biosenseur exprimées dans la lignée homozygote (KI/KI) sont identiques à celles de l'IL-1 β endogène.

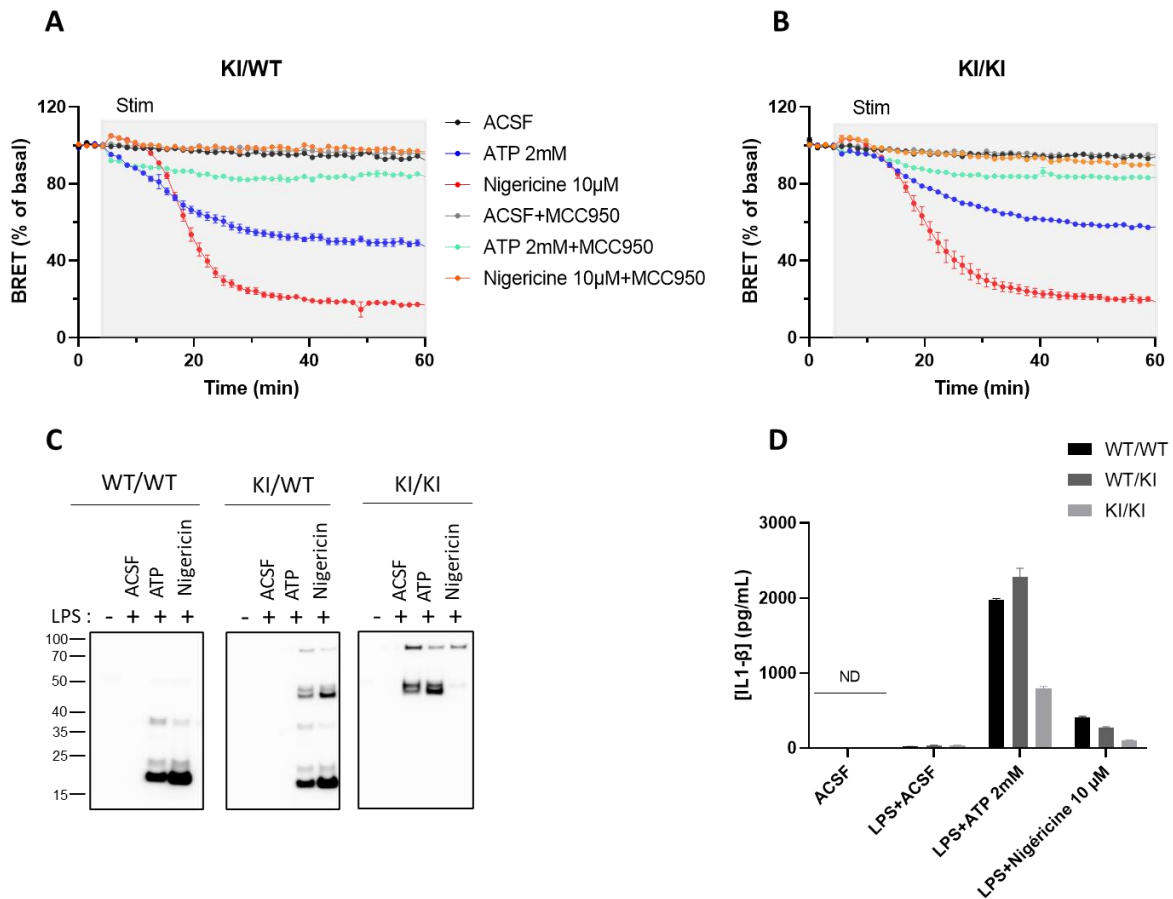


Figure 57 : Maturation du biosenseur de BRET de l'IL-1 β exprimé dans le modèle KI hétérozygote et homozygote

A-B : BRET en population au cours du temps sur des cultures primaires de BMDM provenant de lignée hétérozygote (KI/WT, **A**) ou homozygote (KI/KI, **B**) exprimant le biosenseur de BRET de l'IL-1 β , stimulées avec de l'ACSF (courbe noire), 5 μ M de nigéricine (courbe rouge), 2 mM d'ATP (courbe bleue), de l'ACSF + 10 μ M de MCC950 (courbe grise), 5 μ M de nigéricine + 10 μ M de MCC950 (courbe orange) ou 2 mM d'ATP + 10 μ M de MCC950 (courbe turquoise). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, N=1. **C** : Western-Blot des surnageants de BMDM provenant d'une lignée sauvage (WT/WT) ou de lignées hétérozygote (KI/WT) ou homozygote (KI/KI) pour l'expression du biosenseur de BRET de l'IL-1 β en fonction des différents traitements (ACSF, LPS 1 μ g/mL, LPS + ATP 2 mM ou LPS + nigéricine 10 μ M). **D** : Graphique représentant la concentration d'IL-1 β (en pg/mL) mesurée dans les surnageants des BMDM provenant de la même expérience présentée en **C**. ND : Non Détecté ; N=1.

15.4. Perspectives du modèle KI dans l'étude de l'IL-1 β neuronale

Ce modèle murin KI ouvre de nombreuses perspectives pour mieux comprendre le rôle de l'IL-1 β neuronale en condition physiologique. Premièrement, il nous permettrait d'étudier plus finement l'expression de la cytokine dans le cerveau. Grâce à l'expression de la YPet sur le biosenseur de BRET, nous pourrions transparer des cerveaux et amplifier la YPet par immunomarquage pour, *in fine*, réaliser une cartographie d'expression du biosenseur dans les différentes structures cérébrales. Cette cartographie pourrait être affinée, en déterminant le ou les types cellulaires exprimant le biosenseur avec des co-marquages de protéines de références permettant d'identifier les différents types cellulaires du SNC (GFAP pour les astrocytes, Iba1 pour la microglie, Olig2 pour les oligodendrocytes et MAP2 pour les neurones). Nous pourrions aussi étudier l'expression du biosenseur spécifiquement dans les neurones en culture ou sur tranches d'hippocampes, en condition basale, mais aussi après injection de composés pharmacologiques (KA, NMDA, DAMPs) ou encore après un protocole de stimulation de type LTP / LTD. Cette lignée n'étant pas un modèle de surexpression du biosenseur, elle nous permettrait une meilleure visualisation de la localisation subcellulaire de l'IL-1 β au sein des neurones. Ensuite, ce modèle murin apporterait une meilleure compréhension de la maturation de l'IL-1 β dans les neurones. En croisant le modèle KI avec un modèle murin exprimant une channel-rhodopsine dans l'hippocampe, nous pourrions envisager de préparer des tranches organotypiques de cette structure qui exprimeront alors de manière endogène, le canal sensible à la lumière ainsi que le biosenseur. Par stimulation lumineuse du réseau neuronal dans l'aire CA3, nous aurions la capacité de visualiser la maturation de l'IL-1 β au niveau de l'aire CA1 et même dans les autres aires de l'hippocampe. Dans la même optique, nous pourrions envisager des protocoles optogénétiques ou électrophysiologiques d'induction de la LTP et/ou de la LTD sur des tranches aigües d'hippocampe et visualiser le clivage de la cytokine en enregistrant le signal de BRET. De même, pour déterminer quel type de récepteur NMDA est impliqué dans la maturation de l'IL-1 β , nous pourrions croiser le modèle avec une lignée invalidée spécifiquement pour une sous-unité non obligatoire du récepteur NMDA, appliquer une stimulation chimique et enregistrer le signal de BRET du biosenseur. Ce modèle nous permet aussi d'envisager des études de BRET *in vivo*, dont la technique est en cours de développement au sein de l'institut. Lors de ces travaux *in vivo*, il serait possible de visualiser la maturation de l'IL-1 β en condition basale, ou après des stimulations chimiques ou optogénétiques sur animal éveillé. Enfin, la présence de sites LoxP dans la modèle KI nous permet d'envisager des études plus larges ou comprendre les rôles physiopathologiques de l'IL-1 β . Nous aurions la possibilité

d'invalider conditionnellement l'expression du biosenseur (cKO) dans les neurones et d'analyser l'impact de l'absence de cette cytokine sur la mémoire et l'apprentissage de la souris, en condition basale. En condition inflammatoire et/ou pathologique, nous pourrions envisager une invalidation conditionnelle de l'expression du biosenseur dans la microglie, mais aussi dans les astrocytes ou encore dans les neurones. Cette invalidation spécifique pour un type cellulaire donné nous permettrait de mieux comprendre les rôles de l'IL-1 β dans des affections traumatiques, lors d'inflammations stériles de type épileptiques, mais aussi dans des pathologies neurodégénératives telles que Alzheimer ou Parkinson par exemple.

En résumé, ce modèle murin KI/KO pour le biosenseur de BRET de l'IL-1 β offre de nombreuses ouvertures pour mieux comprendre les différents rôles physiologiques et inflammatoires de l'IL-1 β dans l'organisme, tant au niveau du modèle entier par des études *in vivo*, qu'*in vitro* pour caractériser les voies de synthèse, de maturation et de libération de l'IL-1 β dans les différents types cellulaires ; mécanismes encore mal-compris voir inconnus à ce jour.

16. Conclusion générale

En conclusion, cette étude est la première à caractériser en condition non inflammatoire la capacité des neurones excitateurs de l'hippocampe à synthétiser, maturer et libérer de l'IL-1 β suite à une activité neuronale soutenue. Ces travaux montrent que ce clivage s'effectue indépendamment de l'inflammasome et de la caspase-1 et s'opère après activation de récepteurs NMDA, vraisemblablement composés des sous-unités GluN2A et GluN2B. L'identification de la protéase et de la voie de signalisation impliquée dans la maturation de l'IL-1 β neuronale reste à découvrir mais les données obtenues par étude des interactomes de la cytokine au sein des neurones excitateurs corticaux ouvrent de nouveaux champs d'investigations pour essayer de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la production d'IL-1 β mature par les neurones.

Les premiers résultats obtenus au laboratoire concernant la caractérisation du modèle KI sont encourageants. Des expériences d'immunophénotypages de la souris ont été réalisées en parallèle par le CIPHE et les premiers résultats semblent valider cette lignée comme modèle d'étude de l'IL-1 β . A terme, cette lignée murine pourrait être un modèle de choix pour mieux comprendre les rôles de l'IL-1 β tant en condition physiologique que pathologique, dans le système périphérique comme dans le système nerveux central.

BIBLIOGRAPHIE

- Abderrazak, A., Syrovets, T., Couchie, D., El Hadri, K., Friguet, B., Simmet, T., & Rouis, M. (2015). NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biology*, *4*, 296–307. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.008>
- Acioglu, C., Heary, R. F., & Elkabes, S. (2022). Roles of neuronal toll-like receptors in neuropathic pain and central nervous system injuries and diseases. In *Brain, Behavior, and Immunity* (Vol. 102, pp. 163–178). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2022.02.016>
- Acker, G. R., Molineaux, C., & Orłowski, M. (1987). *Synaptosomal Membrane-Bound*. 284–292.
- Adamczak, S., Dale, G., De Rivero Vaccari, J. P., Bullock, M. R., Dietrich, W. D., & Keane, R. W. (2012). Inflammasome proteins in cerebrospinal fluid of brain-injured patients as biomarkers of functional outcome. *J Neurosurg*, *117*(December), 1119–1125.
- Adamczak, S. E., de Rivero Vaccari, J. P., Dale, G., Brand, F. J., Nonner, D., Bullock, M., Dahl, G. P., Dietrich, W. D., & Keane, R. W. (2014). Pyroptotic neuronal cell death mediated by the AIM2 inflammasome. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *34*(4), 621–629. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.236>
- Afonina, I. S., Müller, C., Martin, S. J., & Beyaert, R. (2015). Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity*, *42*(6), 991–1004. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.003>
- Ahn, H. J., Hernandez, C. M., Levenson, J. M., Lubin, F. D., Liou, H. C., & Sweatt, J. D. (2008). C-Rel, an NF- κ B family transcription factor, is required for hippocampal long-term synaptic plasticity and memory formation. *Learning and Memory*, *15*(7), 539–549. <https://doi.org/10.1101/lm.866408>
- Akira, S. (2003). Toll-like receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(40), 38105–38108. <https://doi.org/10.1074/jbc.R300028200>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). *Pathogen Recognition*. *3*, 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Aksentijevich, I., Masters, S. L., Ferguson, P. J., Dancy, P., Frenkel, J., van Royen-Kerkhoff, A., Laxer, R., Tedgård, U., Cowen, E. W., Pham, T.-H., Booty, M., Estes, J. D., Sandler, N. G., Plass, N., Stone, D. L., Turner, M. L., Hill, S., Butman, J. A., Schneider, R., ... Goldbach-Mansky, R. (2009). An Autoinflammatory Disease with Deficiency of the Interleukin-1–Receptor Antagonist. *New England Journal of Medicine*, *360*(23), 2426–2437. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0807865>
- Alexander, G. M., van Rijn, M. A., van Hilten, J. J., Perreault, M. J., & Schwartzman, R. J. (2005). Changes in cerebrospinal fluid levels of pro-inflammatory cytokines in CRPS. *Pain*, *116*(3), 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.04.013>
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., & Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, *413*(6857), 732–738. <https://doi.org/10.1038/35099560>
- Al-Hallaq, R. A., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., & Wenthold, R. J. (2007). NMDA di-heteromeric receptor populations and associated proteins in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *27*(31), 8334–8343. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2155-07.2007>
- Allen, N. J., & Eroglu, C. (2017). Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron*, *96*(3), 697–708. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.056>
- Amini, F., Kodadek, T., & Brown, K. C. (2002). Protein Affinity Labeling Mediated by Genetically Encoded Peptide Tags This work was supported by a grant from the National Institutes of Health

- (GM-58175) to T.K. We thank Professor Charles Craik for the expression vector for GGH-ecotin which was constru. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(2), 356. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020118\)41:2<356::aid-anie356>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020118)41:2<356::aid-anie356>3.0.co;2-m)
- Andrei, C., Dazzi, C., Lotti, L., Torrasi, M. R., Chimini, G., & Rubartelli, A. (1999). The secretory route of the leaderless protein interleukin 1 β involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Molecular Biology of the Cell*, 10(5), 1463–1475. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.5.1463>
- Andrei, C., Margiocco, P., Poggi, A., Lotti, L. V., Torrasi, M. R., & Rubartelli, A. (2004). Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 β secretion: Implications for inflammatory processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), 9745–9750. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308558101>
- Antonopoulos, C., Russo, H. M., Sanadi, C. El, Martin, B. N., Li, X., Kaiser, W. J., Mocarski, E. S., & Dubyak, G. R. (2015). Caspase-8 as an Effector and Regulator of NLRP3 Inflammasome Signaling *. *Journal of Biological Chemistry*, 290(33), 20167–20184. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.652321>
- Arend, W. P., Malyak, M., Guthridge, C. J., & Gabay, C. (1998). INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ANTAGONIST: Role in Biology. In *Annu. Rev. Immunol* (Vol. 16). www.annualreviews.org
- Ascher, B. Y. P., & Nowak, L. (1988). The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *Journal of Physiology*, 399, 247–266.
- Auron, P. E., Webb, A. C., Rosenwasser, L. J., Mucci, S. F., Rich, A., Wolff, S. M., & Dinarello, C. A. (1984). Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(24 I), 7907–7911. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.24.7907>
- Avital, A., Goshen, I., Kamsler, A., Segal, M., Iverfeldt, K., Richter-Levin, G., & Yirmiya, R. (2003). Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal memory processes and neural plasticity. *Hippocampus*, 13(7), 826–834. <https://doi.org/10.1002/hipo.10135>
- Bauer, R., & Rauch, I. (2020). The NAIP/NLRC4 inflammasome in infection and pathology. *Molecular Aspects of Medicine*, 76(February), 100863. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100863>
- Bauernfeind, F. G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, S., Macdonald, K., Speert, D., Wu, J., Monks, B. G., Fitzgerald, K. A., Hornung, V., Latz, E., Macdonald, K., Speert, D., Fernandes-alnemri, T., & Wu, J. (2022). *Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901363>
- Beattie, E. C., Carroll, R. C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., von Zastrow, M., & Malenka, R. C. (2000). Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nature Neuroscience*, 3(12), 1291–1300. <https://doi.org/10.1038/81823>
- Beckstead, R. M. (1978). Afferent connections of the entorhinal area in the rat as demonstrated by retrograde cell-labelling with horseradish peroxidase. *Brain Research*, 152, 249–264.
- Benke, T. A., Luthl, A., Isaac, J. T. R., & Collingridge, G. L. (1998). Modulation of ampa receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature*, 393(6687), 793–797. <https://doi.org/10.1038/31709>
- Ben-Sasson, S. Z., Hogg, A., Hu-Li, J., Wingfield, P., Chen, X., Crank, M., Caucheteux, S., Ratner-Hurevich, M., Berzofsky, J. A., Nir-Paz, R., & Paul, W. E. (2013). IL-1 enhances expansion,

- effector function, tissue localization, and memory response of antigen-specific CD8 T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 210(3), 491–502. <https://doi.org/10.1084/jem.20122006>
- Benveniste, B. Y. M., Clements, J., Jr, L. V., & Mayer, M. L. (1990). A kinetic analysis of the modulation of N-methyl-D-aspartic acid receptors by glycine in mouse cultured hippocampal neurons. *Journal of Physiology*, 428, 333–357.
- Beuscher, H. U., Nickells, M. W., & Colten, H. R. (1988). The precursor of interleukin-1 α is phosphorylated at residue serine 90. *Journal of Biological Chemistry*, 263(8), 4023–4028. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)69027-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)69027-1)
- Bhaskar, B., Immoos, C. E., Shimizu, H., Sulc, F., Farmer, P. J., & Poulos, T. L. (2003). A novel heme and peroxide-dependent tryptophan-tyrosine cross-link in a mutant of cytochrome c peroxidase. *Journal of Molecular Biology*, 328(1), 157–166. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00179-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00179-7)
- Bhattacharya, S., & Traynelis, S. F. (2018). Unique Biology and Single-Channel Properties of GluN2A- and GluN2C-Containing Triheteromeric N-Methyl-D-Aspartate Receptors. In *Journal of Experimental Neuroscience* (Vol. 12). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/1179069518810423>
- Bibo-verdugo, B., Snipas, S. J., Kolt, S., Poreba, M., & Salvesen, G. S. (2020). Extended subsite profiling of the pyroptosis effector protein gasdermin D reveals a region recognized by inflammatory. *Journal of Biological Chemistry*, 295(32), 11292–11302. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014259>
- Black, R. A., Kronheim, S. R., Cantrell, M., Deeley, M., March, C. J., Prickett, K. S., Wignall, J., Conlon, P. J., Cosman, D., Hopp, P., & Mochizuki, D. Y. (1988). Generation of Biologically Active Interleukin- 18 by Proteolytic Cleavage of the Inactive Precursor *. *Journal of Biological Chemistry*, 263(19), 9437–9442. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)76559-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)76559-4)
- Black, R. A., Kronheim, S. R., Merriam, J. E., March, C. J., & Hopp, T. P. (1989). A pre-aspartate-specific protease from human leukocytes that cleaves pro-interleukin-1 β . *Journal of Biological Chemistry*, 264(10), 5323–5326. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)83546-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)83546-3)
- Blander, J. M. (2014). REVIEWS A long-awaited merger of the pathways mediating host defence and programmed cell death. *Nature Publishing Group*, 14(9), 601–618. <https://doi.org/10.1038/nri3720>
- Bliss, T. V. P., & Gardner-Medwin, A. R. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232, 357–374.
- Bonaterra, G. A., Schwendler, A., Hüther, J., Schwarzbach, H., Schwarz, A., Kolb, C., Abdel-Aziz, H., & Kinscherf, R. (2018). Neurotrophic, cytoprotective, and anti-inflammatory effects of St. John's wort extract on differentiated mouse hippocampal HT-22 neurons. *Frontiers in Pharmacology*, 8(JAN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00955>
- Bonifacino, J. S., & Glick, B. S. (2004). The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell*, 116(2), 153–166. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01079-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01079-1)
- Boraschi, D., Italiani, P., Weil, S., & Martin, M. U. (2018). The family of the interleukin-1 receptors. *Immunological Reviews*, 281(1), 197–232. <https://doi.org/10.1111/imr.12606>
- Boraschi, D., & Tagliabue, A. (2006). *The Interleukin - 1 Receptor Family*. 74(06). [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(06\)74009-2](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(06)74009-2)

- Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M., & Hayashi, Y. (2014). Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron*, 82(2), 444–459. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.021>
- Botos, I., Segal, D. M., & Davies, D. R. (2011). Review The Structural Biology of Toll-like Receptors. *Structure/Folding and Design*, 19(4), 447–459. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.02.004>
- Breder, C. D., Dinarello, C. A., & Saper, C. B. (1988). *Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus*. 10, 8–11.
- Brennan, F. X., Beck, K. D., & Servatius, R. J. (2003). Low doses of interleukin-1 β improve the leverpress avoidance performance of Sprague-Dawley rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80(2), 168–171. [https://doi.org/10.1016/S1074-7427\(03\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7427(03)00060-1)
- Brody, D. T., & Durum, S. K. (1989). Membrane IL-1: IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 143(4), 1183–1187. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2787357>
- Brough, D., Le Feuvre, R. A., Wheeler, R. D., Solovyova, N., Hilfiker, S., Rothwell, N. J., & Verkhratsky, A. (2003). Ca²⁺ Stores and Ca²⁺ Entry Differentially Contribute to the Release of IL-1 β and IL-1 α from Murine Macrophages. *The Journal of Immunology*, 170(6), 3029–3036. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3029>
- Brough, D., & Rothwell, N. J. (2007). Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1 β is cytosolic and precedes cell death. *Journal of Cell Science*, 120(5), 772–781. <https://doi.org/10.1242/jcs.03377>
- Broz, P., & Dixit, V. M. (2016). Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews Immunology*, 16(7), 407–420. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.58>
- Bsibsi, M., Nomden, A., van Noort, J. M., & Baron, W. (2012). Toll-like receptors 2 and 3 agonists differentially affect oligodendrocyte survival, differentiation, and myelin membrane formation. *Journal of Neuroscience Research*, 90(2), 388–398. <https://doi.org/10.1002/jnr.22767>
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D., & Van Noort, J. M. (2002). Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 61(11), 1013–1021. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.11.1013>
- Burm, S. M., Zuiderwijk-Sick, E. A., T Jong, A. E. J., Van Der Putten, C., Veth, J., Kondova, I., & Bajramovic, J. J. (2015). Inflammasome-induced IL-1 β secretion in microglia is characterized by delayed kinetics and is only partially dependent on inflammatory caspases. *Journal of Neuroscience*, 35(2), 678–687. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2510-14.2015>
- Cameron, J. S., Alexopoulou, L., Sloane, J. A., DiBernardo, A. B., Ma, Y., Kosaras, B., Flavell, R., Strittmatter, S. M., Volpe, J., Sidman, R., & Vartanian, T. (2007). Toll-like receptor 3 is a potent negative regulator of axonal growth in mammals. *Journal of Neuroscience*, 27(47), 13033–13041. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4290-06.2007>
- Carreño, F. R., Goñi, C. N., Castro, L. M., & Ferro, E. S. (2005). 14-3-3 Epsilon Modulates the Stimulated Secretion of Endopeptidase 24.15. *Journal of Neurochemistry*, 93(1), 10–25. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02967.x>
- Carroll, R. C., Lissin, D. v., von Zastrow, M., Nicoll, R. A., & Malenka, R. C. (1999). Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. *Nature Neuroscience*, 2(5), 454–460. <https://doi.org/10.1038/8123>

- Chan, A. H., & Schroder, K. (2019). Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines. *The Journal of Experimental Medicine*, jem.20190314. <https://doi.org/10.1084/jem.20190314>
- Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. In *International Immunopharmacology* (Vol. 23, Issue 1, pp. 37–45). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>
- Chastagnier, Y., Moutin, E., Hemonnot, A. L., & Perroy, J. (2018). Image processing for bioluminescence resonance energy transfer measurement-BRET-Analyzer. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncom.2017.00118>
- Chavarría-Smith, J., & Vance, R. E. (2015). The NLRP1 inflammasomes. *Immunological Reviews*, 265(1), 22–34. <https://doi.org/10.1111/imr.12283>
- Chen, C. J., Kono, H., Golenbock, D., Reed, G., Akira, S., & Rock, K. L. (2007). Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nature Medicine*, 13(7), 851–856. <https://doi.org/10.1038/nm1603>
- Chen, K. W., Groß, C. J., Sotomayor, F. V., Stacey, K. J., Tschopp, J., Sweet, M. J., & Schroder, K. (2014). The Neutrophil NLRC4 Inflammasome Selectively Promotes IL-1 β Maturation without Pyroptosis during Acute Salmonella Challenge. *Cell Reports*, 8(2), 570–582. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.028>
- Cheriyian, J., Balsara, R. D., Hansen, K. B., & Castellino, F. J. (2016). Pharmacology of triheteromeric N-Methyl-d-Aspartate Receptors. *Neuroscience Letters*, 617, 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.032>
- Clausen, F., Hanell, A., Björk, M., Hillered, L., Mir, A. K., Gram, H., & Marklund, N. (2009). Neutralization of interleukin-1 β modifies the inflammatory response and improves histological and cognitive outcome following traumatic brain injury in mice. 30(March), 385–396. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06820.x>
- Claycomb, R. J., Hewett, S. J., & Hewett, J. A. (2012). Neuromodulatory role of endogenous interleukin-1 β in acute seizures: Possible contribution of cyclooxygenase-2. *Neurobiology of Disease*, 45(1), 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.08.007>
- Clements, J. D., & Westbrook, G. L. (1991). Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-d-aspartate receptor. *Neuron*, 7(4), 605–613. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90373-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90373-8)
- Collingridge, G. L., Kehl, S. J., & McLennan, H. (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, 334(1), 33–46. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1983.sp014478>
- Colombo, E., & Farina, C. (2016). Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends in Immunology*, 37(9), 608–620. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.06.006>
- Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Bertini, R., Polentarutti, N., Sironi, M., Giri, J. G., Dower, S. K., Sims, J. E., & Mantovani, A. (1992). Interleukin1 type 2 - a decoy target for IL1. 65(1985), 21–24.
- Compan, V., Baroja-Mazo, A., Bragg, L., Verkhratsky, A., Perroy, J., & Pelegrin, P. (2012). A Genetically Encoded IL-1 β Bioluminescence Resonance Energy Transfer Sensor To Monitor Inflammasome Activity. *The Journal of Immunology*, 189(5), 2131–2137. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201349>

- Compan, V., Baroja-Mazo, A., López-Castejón, G., Gomez, A. I., Martínez, C. M., Angosto, D., Montero, M. T., Herranz, A. S., Bazán, E., Reimers, D., Mulero, V., & Pelegrín, P. (2012). Cell Volume Regulation Modulates NLRP3 Inflammasome Activation. *Immunity*, *37*(3), 487–500. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.013>
- Conner, J. M., Franks, K. M., Titterness, A. K., Russell, K., Merrill, D. A., Christie, B. R., Sejnowski, T. J., & Tuszynski, M. H. (2009). NGF is essential for hippocampal plasticity and learning. *Journal of Neuroscience*, *29*(35), 10883–10889. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2594-09.2009>
- Copeland, N. G., Silan, C. M., Kingsley, D. M., Jenkins, N. A., Cannizzaro, L. A., Croce, C. M., Huebner, K., & Sims, J. E. (1991). Chromosomal location of murine and human IL-1 receptor genes. *Genomics*, *9*(1), 44–50. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90219-5](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90219-5)
- Cordiglieri, C., & Farina, C. (2010). Astrocytes Exert and Control Immune Responses in the Brain. *Current Immunology Reviews*, *6*(3), 150–159. <https://doi.org/10.2174/157339510791823655>
- Cottet, M., Faklaris, O., Maurel, D., Scholler, P., Doumazane, E., Trinquet, E., Pin, J. P., & Durroux, T. (2012). BRET and time-resolved FRET strategy to study GPCR oligomerization: From cell lines toward native tissues. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 3, Issue JUL). <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00092>
- Craft, J. M., Watterson, D. M., Hirsch, E., & Van Eldik, L. J. (2005). Interleukin 1 receptor antagonist knockout mice show enhanced microglial activation and neuronal damage induced by intracerebroventricular infusion of human β -amyloid. *Journal of Neuroinflammation*, *2*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-2-15>
- Cristina de Brito Toscano, E., Leandro Marciano Vieira, É., Boni Rocha Dias, B., Vidigal Caliari, M., Paula Gonçalves, A., Varela Giannetti, A., Maurício Siqueira, J., Kimie Suemoto, C., Elaine Paraizo Leite, R., Nitri, R., Alvarenga Rachid, M., & Lúcio Teixeira, A. (2021). NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are up-regulated in patients with mesial temporal lobe epilepsy and may contribute to overexpression of caspase-1 and IL- β in sclerotic hippocampi. *Brain Research*, *1752*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147230>
- Cunha, C., Brambilla, R., & Thomas, K. L. (2010). A simple role for BDNF in learning and memory? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *3*(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/neuro.02.001.2010>
- Czapla, V., Reiterer, P., & Funke, K. (2022). *Methodological comparison of different approaches to cultivate postnatal organotypic hippocampal cultures*. <https://doi.org/10.1101/2022.05.11.491471>
- Dale, B. Y. N., & Roberts, A. (1985). Dual-component amino-acid-mediator synaptic potentials: excitatory drive for swimming in xenopus embryos. *J Physiol*, *363*, 35–59.
- Dale, M., Hammond, D. W., Cox, A., & Nicklin, M. J. H. (1998). *The Human Gene Encoding the Interleukin-1 Receptor Accessory Protein (IL1RAP) Maps to Chromosome 3q28 by Fluorescence in Situ Hybridization and Radiation Hybrid Mapping*. 325–326.
- Dancourt, J., & Barlowe, C. (2010). Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annual Review of Biochemistry*, *79*, 777–802. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061608-091319>
- Davis, B. K., Wen, H., & Ting, J. P. Y. (2011). The Inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annual Review of Immunology*, *29*, 707–735. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101405>

- Dawson, M. R. L., Polito, A., Levine, J. M., & Reynolds, R. (2003). NG2-expressing glial progenitor cells: An abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *24*(2), 476–488. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00210-0](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00210-0)
- Delhaye, S., Paul, S., Blakqori, G., Minet, M., Weber, F., Staeheli, P., & Michiels, T. (2006). Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(20), 7835–7840. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602460103>
- Dempsey, C., Rubio Araiz, A., Bryson, K. J., Finucane, O., Larkin, C., Mills, E. L., Robertson, A. A. B., Cooper, M. A., O'Neill, L. A. J., & Lynch, M. A. (2017). Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 promotes non-phlogistic clearance of amyloid- β and cognitive function in APP/PS1 mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, *61*, 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.12.014>
- Depino, A. M., Alonso, M., Ferrari, C., del Rey, A., Anthony, D., Besedovsky, H., Medina, J. H., & Pitossi, F. (2004). Learning modulation by endogenous hippocampal IL-1: Blockade of endogenous IL-1 facilitates memory formation. *Hippocampus*, *14*(4), 526–535. <https://doi.org/10.1002/hipo.10164>
- Dinarello, C. A. (1989). Interleukin-1 and Its Biologically Related Cytokines. *Advances in Immunology*, *44*(C), 153–205. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60642-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60642-2)
- Dinarello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*, *27*, 519–550. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>
- Dinarello, C. A. (2015). The history of fever, leukocytic pyrogen and interleukin-1. *Temperature*, *2*(1), 8–16. <https://doi.org/10.1080/23328940.2015.1017086>
- Dinarello, C. A. (2018). *Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity*. *281*(1), 8–27. <https://doi.org/10.1111/imr.12621>. Overview
- Dinarello, C., Sims, J., Inflammation, N., Disease, T. A., Diseases, S., Diego, S., Humanitas, I. C., Boraschi, D., Rubartelli, A., Meer, J. van der, Diabetes, E., Lewis, E., Martin, M., & Frankfurt, P. (2010). *correspondence IL-1 family nomenclature*. *11*(11), 2010–2011. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.55>
- Dinarello, C., & van der Meer, J. W. M. (2013). *Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans*. *4*(164), 469–484. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.008>. Treating
- Dower, B. Y. S. K., Kronheim, S. R., March, C. J., Conlon, P. J., Hopp, T. P., Gillis, S., & Urdal, D. L. (1985). *Cell Preparations*. *162*(August), 501–515.
- Du, X., Li, J., Li, M., Yang, X., Qi, Z., Xu, B., Liu, W., Xu, Z., & Deng, Y. (2020). Research progress on the role of type i vesicular glutamate transporter (VGLUT1) in nervous system diseases. In *Cell and Bioscience* (Vol. 10, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00393-4>
- Dubé, C., Vezzani, A., Behrens, M., Bartfai, T., & Baram, T. Z. (2005). Interleukin-1 β contributes to the generation of experimental febrile seizures. *Annals of Neurology*, *57*(1), 152–155. <https://doi.org/10.1002/ana.20358>
- Dubovický, M. (2010). Neurobehavioral manifestations of developmental impairment of the brain. *Interdisciplinary Toxicology*, *3*(2), 59–67. <https://doi.org/10.2478/v10102-010-0012-4>
- Dudek, S. M., & Bear, M. F. (1992). Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, 89(10), 4363–4367.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4363>

- Dudek, S. M., & Bear, M. F. (1993). Bidirectional long-term modification of synaptic effectiveness in the adult and immature hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 13(7), 2910–2918. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.13-07-02910.1993>
- Dziewielewska, K. M., Møller, J. E., Potter, A. M., Ek, J., Lane, M. A., & Saunders, N. R. (2000). Acute-phase cytokines IL-1 β and TNF- α in brain development. *Cell and Tissue Research*, 299(3), 335–345. <https://doi.org/10.1007/s004410050032>
- Ebert, S., Zeretzke, M., Nau, R., & Michel, U. (2007). Microglial cells and peritoneal macrophages release activin A upon stimulation with Toll-like receptor agonists. *Neuroscience Letters*, 413(3), 241–244. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.11.065>
- Eisenberg, S. P., Evans, R. J., Arend, W. P., Verderber, E., Brewer, M. T., Hannum, C. H., & Thompson, R. C. (1990). Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature*, 343(6256), 341–346. <https://doi.org/10.1038/343341a0>
- Elevation, I. E. A. (1960). *Pathogenesis of Fever*.
- El-Hage, N., Podhaizer, E. M., Sturgill, J., & Hauser, K. F. (2011). Toll-like receptor expression and activation in astroglia: Differential regulation by HIV-1 Tat, gp120, and morphine. *Immunological Investigations*, 40(5), 498–522. <https://doi.org/10.3109/08820139.2011.561904>
- Elinav, E., Strowig, T., Kau, A. L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C. A., Booth, C. J., Peaper, D. R., Bertin, J., Eisenbarth, S. C., Gordon, J. I., & Flavell, R. A. (2011). NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*, 145(5), 745–757. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.022>
- Elliott, J. M., Rouge, L., Wiesmann, C., & Scheer, J. M. (2009). Crystal structure of procaspase-1 zymogen domain reveals insight into inflammatory caspase autoactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(10), 6546–6553. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806121200>
- Elnagar, M. R., Walls, A. B., Helal, G. K., Hamada, F. M., Thomsen, M. S., & Jensen, A. A. (2018). Functional characterization of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine and NMDA receptor signaling in SH-SY5Y neuroblastoma cells in an ERK phosphorylation assay. *European Journal of Pharmacology*, 826, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.02.047>
- England, C. G., Ehlerding, E. B., & Cai, W. (2016). NanoLuc : a small luciferase is brightening up the field of bioluminescence. *Bioconjug Chem*, 27(5), 1175–1187. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00112>
- Eroglu, C., & Barres, B. A. (2010). Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature*, 468(7321), 223–231. <https://doi.org/10.1038/nature09612>
- Evavold, C. L., Ruan, J., Tan, Y., Xia, S., Wu, H., & Kagan, J. C. (2018). The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity*, 48(1), 35–44.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.013>
- Facci, L., Barbierato, M., Zusso, M., Skaper, S. D., & Giusti, P. (2018). Serum amyloid A primes microglia for ATP-dependent interleukin-1 β release. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1205-6>
- Factor, B., Sapk, J. N. K., Upstream, A., Muzio, B. M., Natoli, G., Saccani, S., Levrero, M., & Mantovani, A. (1998). *The Human Toll Signaling Pathway : Divergence of Nuclear Necrosis Factor Receptor – associated Factor 6 (TRAF6)*. 187(12), 1–5.

- Fantuzzi, G., Sacco, S., Ghezzi, P., & Dinarello, C. A. (1997). Physiological and cytokine responses in IL-1 β -deficient mice after zymosan-induced inflammation. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 273(1), 42-1. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.1.r400>
- Faustin, B., Lartigue, L., Bruey, J. M., Luciano, F., Sergienko, E., Bailly-Maitre, B., Volkmann, N., Hanein, D., Rouiller, I., & Reed, J. C. (2007). Reconstituted NALP1 Inflammasome Reveals Two-Step Mechanism of Caspase-1 Activation. *Molecular Cell*, 25(5), 713–724. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.032>
- Fenton, M. J., Clark, B. D., Collins, K. L., Webb, A. C., Rich, A., & Auron, P. E. (1987). Transcriptional regulation of the human prointerleukin 1 beta gene. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 138(11), 3972–3979.
- Fenton, M. J., Vermeulen, M. W., Clark, B. D., Webb, A. C., & Auron, P. E. (1988). Human pro-IL-1 beta gene expression in monocytic cells is regulated by two distinct pathways. • Rapid Reviews! 30 days * from submission to initial decision Information about subscribing to The Journal of Immunology is online at : HUMAN PRO-IL-1 β GENE. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 140(7), 2267–2273.
- Fernandez-Castaneda, A., & Gaultier, A. (2016). Adult oligodendrocyte progenitor cells – Multifaceted regulators of the CNS in health and disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, 57, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.01.005>
- Ferro, E. S., Gewehr, M. C. F., & Navon, A. (2020). Thimet oligopeptidase biochemical and biological significances: Past, present, and future directions. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 9, pp. 1–30). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10091229>
- Fields, J. K., Günther, S., & Sundberg, E. J. (2019). Structural basis of IL-1 family cytokine signaling. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01412>
- Finch, D. M., Nowlin, N. L., & Babb, T. L. (1983). Demonstration of axonal projections of neurons in the rat hippocampus and subiculum by intracellular injection of HRP. *Brain Research*, 271(2), 201–216. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90283-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90283-4)
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2006). Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Journal of Immunology*, 202(7), 1913–1926. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2006.00751.x>
- Freeman, L., Guo, H., David, C. N., Brickey, W. J., Jha, S., & Ting, J. P. Y. (2017). NLR members NLRC4 and NLRP3 mediate sterile inflammasome activation in microglia and astrocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 214(5), 1351–1370. <https://doi.org/10.1084/jem.20150237>
- Freund, T. F., & Buzsaki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6, 347–470.
- Galozzi, P., Bindoli, S., Doria, A., & Sfriso, P. (2021). Autoimmunity Reviews The revisited role of interleukin-1 alpha and beta in autoimmune and inflammatory disorders and in comorbidities. *Autoimmunity Reviews*, 20(4), 102785. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2021.102785>
- Gao, B., Wu, Y., Yang, Y. J., Li, W. Z., Dong, K., Zhou, J., Yin, Y. Y., Huang, D. K., & Wu, W. N. (2018). Sinomenine exerts anticonvulsant profile and neuroprotective activity in pentylenetetrazole kindled rats: Involvement of inhibition of NLRP1 inflammasome. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1199-0>

- Gao, W., Xiong, Y., Li, Q., & Yang, H. (2017). *Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases : A Journey from Molecular to Nano Therapeutics*. 8(July). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00508>
- Gardoni, F., Boraso, M., Zianni, E., Corsini, E., Galli, C. L., Cattabeni, F., Marinovich, M., di Luca, M., & Viviani, B. (2011). Distribution of interleukin-1 receptor complex at the synaptic membrane driven by interleukin-1 β and NMDA stimulation. *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-14>
- Ge, W. P., Miyawaki, A., Gage, F. H., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2012). Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. *Nature*, 484(7394), 376–380. <https://doi.org/10.1038/nature10959>
- Gensini, G. F., Conti, A. A., & Carlo, F. D. (2004). *The evolution of the concept of ‘ fever ’ in the history of medicine : from pathological picture per se to clinical epiphenomenon (and vice versa)*. 85–87. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2003.11.003>
- Ghonime, M. G., Shamaa, O. R., Das, S., Eldomany, R. A., Fernandes-alnemri, T., Emad, S., Gavrilin, M. A., & Wewers, M. D. (2022). *Inflammasome Priming by Lipopolysaccharide Is Dependent upon ERK Signaling and Proteasome Function*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301974>
- Giulian, D., Young, D. G., Woodward, J., Brown, D. C., & Lachman, L. B. (1988). Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *Journal of Neuroscience*, 8(2), 709–714. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.08-02-00709.1988>
- Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., & Gage, F. H. (2010). Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell*, 140(6), 918–934. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.016>
- Goshen, I., Kreisel, T., Ounallah-Saad, H., Renbaum, P., Zalzstein, Y., Ben-Hur, T., Levy-Lahad, E., & Yirmiya, R. (2007). A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology*, 32(8–10), 1106–1115. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.09.004>
- Goyet, E., Bouquier, N., Ollendorff, V., & Perroy, J. (2016). Fast and high resolution single-cell BRET imaging. *Nature Publishing Group, June*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep28231>
- Graeber, M. B. (2010). Changing face of microglia. *Science*, 330(6005), 783–788. <https://doi.org/10.1126/science.1190929>
- Graves, B. J., Hatada, M. H., Hendrickson, W. A., Miller, J. K., Madison, V. S., & Satow, Y. (1990). Structure of interleukin 1 alpha at 2.7-Å resolution. *Biochemistry*, 29(11), 2679–2684.
- Greenfederu, S. A., Nunest, P., Kweell, L., Labown, M., & Chiezoniter, R. A. (1995). *Molecular Cloning and Characterization of a Second Subunit of the Interleukin 1 Receptor Complex **. 270(23), 13757–13765. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.23.13757>
- Griffin, W. S. T., Stanley, L. C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L. J., White, C. L., & Araoz, C. (1989). Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(19), 7611–7615. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.19.7611>
- Gritsenko, A., Yu, S., Martin-Sanchez, F., Diaz del Olmo, I., Nichols, E.-M., Davis, D. M., Brough, D., & Lopez-Castejon, G. (2020). Priming is dispensable for NLRP3 inflammasome activation in human monocytes. *Frontiers in Immunology*.

- Gu, Y., Wu, J., Faucheu, C., Lalanne, J. L., Diu, A., Livingston, D. J., & Su, M. S. S. (1995). Interleukin-1 β converting enzyme requires oligomerization for activity of processed forms in vivo. *EMBO Journal*, 14(9), 1923–1931. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07184.x>
- Guan, K., Wei, C., Zheng, Z., Song, T., Zhang, Y., Cao, Y., Chen, W., Xu, Q., Xia, W., Gu, J., He, X., Zhong, H., & Alerts, E. (2022). MAVS Promotes Inflammasome Activation by Targeting ASC for K63-Linked Ubiquitination via the E3 Ligase TRAF3. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402851>
- Gurley, C., Nichols, J., Liu, S., Phulwani, N. K., Esen, N., & Kielian, T. (2008). Microglia and astrocyte activation by Toll-like receptor ligands: Modulation by PPAR- γ agonists. *PPAR Research*, 2008. <https://doi.org/10.1155/2008/453120>
- Hagar, J. A., Powell, D. A., Aachoui, Y., Ernst, R. K., & Miao, E. A. (2013). Cytoplasmic LPS Activates Caspase-11: Implications in TLR4-Independent Endotoxic Shock. *September*, 1250–1254.
- Hall, M. P., Unch, J., Binkowski, B. F., Valley, M. P., Butler, B. L., Wood, M. G., Otto, P., Zimmerman, K., Vidugiris, G., MacHleidt, T., Robers, M. B., Benink, H. A., Eggers, C. T., Slater, M. R., Meisenheimer, P. L., Klaubert, D. H., Fan, F., Encell, L. P., & Wood, K. V. (2012). Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chemical Biology*, 7(11), 1848–1857. <https://doi.org/10.1021/cb3002478>
- Halle, A., Hornung, V., Petzold, G. C., Stewart, C. R., Monks, B. G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K. A., Latz, E., Moore, K. J., & Golenbock, D. T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nature Immunology*, 9(8), 857–865. <https://doi.org/10.1038/ni.1636>
- Hannum, C. H., Wilcox, C. J., Arend, W. P., Joslin, F. G., Dripps, D. J., Heimdal, P. L., Armes, L. G., Sommer, A., Eisenberg, S. P., & Thompson, R. C. (1990). Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature*, 343(6256), 336–340. <https://doi.org/10.1038/343336a0>
- Hansen, K. B., Ogden, K. K., Yuan, H., & Traynelis, S. F. (2014). Distinct functional and pharmacological properties of triheteromeric GluN1/GluN2A/GluN2B NMDA receptors. *Neuron*, 81(5), 1084–1096. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.035>
- Harton, J. A., Linhoff, M. W., Zhang, J., & Ting, J. P.-Y. (2002). Cutting Edge: CATERPILLER: A Large Family of Mammalian Genes Containing CARD, Pyrin, Nucleotide-Binding, and Leucine-Rich Repeat Domains. *The Journal of Immunology*, 169(8), 4088–4093. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.8.4088>
- Hazuda, J., & Simon, L. (1990). *Processing of Precursor 18 and Inflammatory Disease* *. 265(11), 6318–6322. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)39328-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)39328-7)
- He, M., Liu, J., Cheng, S., Xing, Y., & Suo, W. Z. (2013). Differentiation renders susceptibility to excitotoxicity in HT22 neurons. *Neural Regeneration Research*, 8(14), 1297–1306. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.121636>
- Heilig, R., & Broz, P. (2018). Function and mechanism of the pyrin inflammasome. *European Journal of Immunology*, 48(2), 230–238. <https://doi.org/10.1002/eji.201746947>
- Heilig, R., Dick, M. S., Sborgi, L., Meunier, E., Hiller, S., & Broz, P. (2018). The Gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1 β secretion in mice. *European Journal of Immunology*, 48(4), 584–592. <https://doi.org/10.1002/eji.201747404>
- Hein, A. M., Stasko, M. R., Matousek, S. B., Scott-McKean, J. J., Maier, S. F., Olschowka, J. A., Costa, A. C. S., & O'Banion, M. K. (2010). Sustained hippocampal IL-1 β overexpression impairs

- contextual and spatial memory in transgenic mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(2), 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.10.002>
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T. C., Gelpi, E., Halle, A., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*, 493(7434), 674–678. <https://doi.org/10.1038/nature11729>
- Hernandez-Martinez, J.-M., Forrest, C. M., Gail Darlington, L., Smith, R. A., & Stone, T. W. (2017). Quinolinic acid induces neuritogenesis in SH-SY5Y neuroblastoma cells independently of NMDA receptor activation. *Eur J Neurosci*, 38(1), 42–49. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Herring, B. E., & Nicoll, R. A. (2016). Long-Term Potentiation: From CaMKII to AMPA Receptor Trafficking. *Annual Review of Physiology*, 78, 351–365. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071753>
- Heynen, A. J., Quinlan, E. M., Bae, D. C., & Bear, M. F. (2000). Bidirectional, activity-dependent regulation of glutamate receptors in the adult hippocampus in vivo. *Neuron*, 28(2), 527–536. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00130-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00130-6)
- Hickman, S. E., Kingery, N. D., Ohsumi, T. K., Borowsky, M. L., Wang, L. C., Means, T. K., & el Khoury, J. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nature Neuroscience*, 16(12), 1896–1905. <https://doi.org/10.1038/nn.3554>
- Hochbaum, D. R., Zhao, Y., Farhi, S. L., Klapoetke, N., Werley, C. A., Kapoor, V., Zou, P., Kralj, J. M., Maclaurin, D., Smedemark-margulies, N., Saulnier, J. L., Boulting, G. L., Cho, Y. K., Melkonian, M., Wong, G. K., Jed, D., Murthy, V. N., Sabatini, B., Boyden, E. S., ... Cohen, A. E. (2014). All-optical electrophysiology in mammalian neurons using engineered microbial rhodopsins. *Nat Methods*, 11(8), 825–833. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3000>. All-optical
- Horai, R., Saijo, S., Tanioka, H., Nakae, S., Sudo, K., Okahara, A., Ikuse, T., Asano, M., & Iwakura, Y. (2000). Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*, 191(2), 313–320. <https://doi.org/10.1084/jem.191.2.313>
- Huang, Y., Smith, D. E., Ibáñez-Sandoval, O., Sims, J. E., & Friedman, W. J. (2011). Neuron-specific effects of interleukin-1 β are mediated by a novel isoform of the IL-1 receptor accessory protein. *Journal of Neuroscience*, 31(49), 18048–18059. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4067-11.2011>
- Hueston, C. M., O'Leary, J. D., Hoban, A. E., Kozareva, D. A., Pawley, L. C., O'Leary, O. F., Cryan, J. F., & Nolan, Y. M. (2018). Chronic interleukin-1 β in the dorsal hippocampus impairs behavioural pattern separation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 74, 252–264. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.09.015>
- Huganir, R. L., & Nicoll, R. A. (2013). AMPARs and synaptic plasticity: The last 25 years. *Neuron*, 80(3), 704–717. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.025>
- Hugh Perry, V. (1998). A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *Journal of Neuroimmunology*, 90(2), 113–121. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(98\)00145-3](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(98)00145-3)
- Hughes, V. (2012). *Microglia : The constant gardeners*. 485, 570–572.

- Humphries, F., Bergin, R., Jackson, R., Delagic, N., Wang, B., Yang, S., Dubois, A. V., Ingram, R. J., & Moynagh, P. N. (2018). The E3 ubiquitin ligase Pellino2 mediates priming of the NLRP3 inflammasome. *Nature Communications*, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03669-z>
- Hung, Y. F., Chen, C. Y., Li, W. C., Wang, T. F., & Hsueh, Y. P. (2018). Tlr7 deletion alters expression profiles of genes related to neural function and regulates mouse behaviors and contextual memory. *Brain, Behavior, and Immunity*, 72, 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.06.006>
- Hwang, E., Song, J., & Zhang, J. (2019). Integration of nanomaterials and bioluminescence resonance energy transfer techniques for sensing biomolecules. *Biosensors*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/bios9010042>
- Inohara, N., & Nuñez, G. (2001). The NOD: A signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene*, 20(44 REV. ISS. 5), 6473–6481. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204787>
- Irrera, N., Pizzino, G., Calò, M., Pallio, G., Mannino, F., Famà, F., Arcoraci, V., Fodale, V., David, A., Francesca, C., Minutoli, L., Mazzon, E., Bramanti, P., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Lack of the Nlrp3 Inflammasome Improves Mice Recovery Following Traumatic Brain Injury. 8(July), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00459>
- Ishizuka, N., Weber, J., & Amaral, D. G. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 295(4), 580–623. <https://doi.org/10.1002/cne.902950407>
- Iwawaki, T., Akai, R., Oikawa, D., Toyoshima, T., Yoshino, M., Suzuki, M., Takeda, N., Ishikawa, T. O., Kataoka, Y., & Yamamura, K. I. (2015). Transgenic mouse model for imaging of interleukin-1 β -related inflammation in vivo. *Scientific Reports*, 5, 6–7. <https://doi.org/10.1038/srep17205>
- Jack, C. S., Arbour, N., Manusow, J., Montgrain, V., Blain, M., McCrea, E., Shapiro, A., & Antel, J. P. (2005). TLR Signaling Tailors Innate Immune Responses in Human Microglia and Astrocytes. *The Journal of Immunology*, 175(7), 4320–4330. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.7.4320>
- Jamilloux, Y., Pierini, R., Querenet, M., Juruj, C., Fauchais, A. L., Jauberteau, M. O., Jarraud, S., Lina, G., Etienne, J., Roy, C. R., Henry, T., Davoust, N., & Ader, F. (2013). Inflammasome activation restricts Legionella pneumophila replication in primary microglial cells through flagellin detection. *Glia*, 61(4), 539–549. <https://doi.org/10.1002/glia.22454>
- Joeckel, L. T., Wallich, R., Metkar, S. S., Froelich, C. J., Simon, M. M., & Borner, C. (2012). Interleukin-1R Signaling Is Essential for Induction of Proapoptotic CD8 T Cells, Viral Clearance, and Pathology during Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection in Mice. *Journal of Virology*, 86(16), 8713–8719. <https://doi.org/10.1128/jvi.00682-12>
- Jorgensen, I., & Miao, E. A. (2015). *Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens*.
- Juliana, C., Fernandes-alnemri, T., Kang, S., Farias, A., Qin, F., & Alnemri, E. S. (2012). Non-transcriptional Priming and Deubiquitination Regulate. *Journal of Biological Chemistry*, 287(43), 36617–36622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.407130>
- Kannan, M., Vasan, G., Huang, C., Haziza, S., Li, J. Z., Inan, H., Schnitzer, M. J., & Pieribone, V. A. (2018). Fast, in vivo voltage imaging using a red fluorescent indicator. *Nature Methods*, 15(12), 1108–1116. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0188-7>
- Kauffman, M. A., Moron, D. G., Consalvo, D., Bello, R., & Kochen, S. (2008). Association study between interleukin 1 β gene and epileptic disorders: A HuGe review and meta-analysis. In

- Kaushal, V., Dye, R., Pakavathkumar, P., Foveau, B., Flores, J., Hyman, B., Ghetti, B., Koller, B. H., & LeBlanc, A. C. (2015). Neuronal NLRP1 inflammasome activation of Caspase-1 coordinately regulates inflammatory interleukin-1-beta production and axonal degeneration-associated Caspase-6 activation. *Cell Death and Differentiation*, 22(10), 1676–1686. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.16>
- Kawai, T., & Adachi, O. (1999). *Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin*. 11, 115–122.
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). review The role of pattern-recognition receptors in innate immunity : update on Toll-like receptors. *Nature Publishing Group*, 11(5), 373–384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). *Toll-like receptor signaling pathways*. 5(September), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>
- Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., Walle, L. Vande, Louie, S., & Dong, J. (2011). *Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11*. V. <https://doi.org/10.1038/nature10558>
- Kayagaki, N., Wong, M. T., Stowe, I. B., Ramani, S. R., Gonzalez, L. C., Akashi-takamura, S., Miyake, K., Zhang, J., Lee, W. P., Forsberg, L. S., Carlson, R. W., & Dixit, V. M. (2013). *Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4*. 130(September), 1246–1250. <https://doi.org/10.5061/dryad.bt51g>
- Kew, J. N. C., Richards, J. G., Mutel, V., & Kemp, J. A. (1998). *Developmental Changes in NMDA Receptor Glycine Affinity and Ifenprodil Sensitivity Reveal Three Distinct Populations of NMDA Receptors in Individual Rat Cortical Neurons*.
- Khare, S., Dorfleutner, A., Bryan, N. B., Yun, C., Radian, A. D., de Almeida, L., Rojanasakul, Y., & Stehlik, C. (2012). An NLRP7-Containing Inflammasome Mediates Recognition of Microbial Lipopeptides in Human Macrophages. *Immunity*, 36(3), 464–476. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.02.001>
- Khoury, G., Howard, B., Expres-, E. G., Kuman, A., Plenum, E., York, N., Sims, J. E., March, C. J., Cosman, D., Widmer, M. B., Macdonald, H. R., McMahan, C. J., Grubin, C. E., Wignall, J. M., Jackson, J. L., Call, S. M., Friend, D., Alpert, A. R., Gillis, S., ... Dower, S. K. (1988). *cDNA Expression Cloning of the IL-1 Receptor , a Member of the Immunoglobulin Superfamily S-----S*. 1475(1983), 585–589.
- Kleckner, N. W., & Dingleline, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA receptors expressed in xenopus oocytes. *Science, March*, 2–4.
- Krelin, Y., Voronov, E., Dotan, S., Elkabets, M., Reich, E., Fogel, M., Huszar, M., Iwakura, Y., Segal, S., Dinarello, C. A., & Apte, R. N. (2007). Interleukin-1 β -driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors. *Cancer Research*, 67(3), 1062–1071. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2956>
- Krey, K., Babnis, A. W., & Pichlmair, A. (2020). System-based approaches to delineate the antiviral innate immune landscape. In *Viruses* (Vol. 12, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v12101196>

- Kumar, S., & Kumar, S. S. (2021). A Model for Predicting Cation Selectivity and Permeability in AMPA and NMDA Receptors Based on Receptor Subunit Composition. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2021.779759>
- Kumawat, K., & Gosens, R. (2016). WNT-5A: Signaling and functions in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *73*(3), 567–587. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2076-y>
- Labrousse, V. F., Costes, L., Aubert, A., Darnaudéry, M., Ferreira, G., Amédée, T., & Layé, S. (2009). Impaired interleukin-1 β and c-Fos expression in the hippocampus is associated with a spatial memory deficit in P2X7 receptor-deficient mice. *PLoS ONE*, *4*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006006>
- Lam, S. S., Martell, J. D., Kamer, K. J., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Mootha, V. K., & Ting, A. Y. (2014). Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nature Methods*, *12*(1), 51–54. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3179>
- Lamkanfi, M. (2002). Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death and Differentiation*, *9*(4), 358–361. <https://doi.org/10.1038/sj/cdd/4400989>
- Lamkanfi, M., Denecker, G., Kalai, M., Kathleen, D., Meeus, A., Declercq, W., Saelens, X., & Vandenabeele, P. (2004). INCA , a Novel Human Caspase Recruitment Domain Protein That Inhibits Interleukin-1 β Generation *. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(50), 51729–51738. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407891200>
- Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2012). *Inflammasomes and Their Roles in Health and Disease*. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155745>
- Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, *157*(5), 1013–1022. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.007>
- Lammerding, L., Slowik, A., Johann, S., Beyer, C., & Zendedel, A. (2016). Poststroke inflammasome expression and regulation in the peri-infarct area by gonadal steroids after transient focal ischemia in the rat brain. *Neuroendocrinology*, *103*(5), 460–475. <https://doi.org/10.1159/000439435>
- Lang, D., Knop, J., Wesche, H., Raffetseder, U., Kurrle, R., Boraschi, D., & Martin, M. U. (1998). The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *161*(12), 6871–6877.
- Lathia, J. D., Okun, E., Tang, S. C., Griffioen, K., Cheng, A., Mughal, M. R., Laryea, G., Selvaraj, P. K., Ffrench-Constant, C., Magnus, T., Arumugam, T. v., & Mattson, M. P. (2008). Toll-like receptor 3 is a negative regulator of embryonic neural progenitor cell proliferation. *Journal of Neuroscience*, *28*(51), 13978–13984. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2140-08.2008>
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, *39*(1), 151–170. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90229-W](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90229-W)
- Lechan, R. M., Toni, R., Clark, B. D., Cannon, J. G., Shaw, A. R., Dinarello, C. A., & Reichlin, S. (1990). Immunoreactive interleukin-1 β localization in the rat forebrain. *Brain Research*, *514*(1), 135–140. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90445-H](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90445-H)
- Lee, J. G., & Heur, M. (2014). Interleukin-1 β -Induced Wnt5a Enhances Human Corneal Endothelial Cell Migration through Regulation of Cdc42 and RhoA. *Molecular and Cellular Biology*, *34*(18), 3535–3545. <https://doi.org/10.1128/mcb.01572-13>

- Lee, J., Liu, Z., Suzuki, P. H., Ahrens, J. F., Lai, S., & Lu, X. (2020). *Versatile phenotype-activated cell sorting*. *October*, 1–18.
- Lehmann, S. M., Krüger, C., Park, B., Derkow, K., Rosenberger, K., Baumgart, J., Trimbuch, T., Eom, G., Hinz, M., Kaul, D., Habel, P., Kälin, R., Franzoni, E., Rybak, A., Nguyen, D., Veh, R., Ninnemann, O., Peters, O., Nitsch, R., ... Lehnardt, S. (2012). An unconventional role for miRNA: Let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nature Neuroscience*, *15*(6), 827–835. <https://doi.org/10.1038/nn.3113>
- Lehmann, S. M., Rosenberger, K., Krüger, C., Habel, P., Derkow, K., Kaul, D., Rybak, A., Brandt, C., Schott, E., Wulczyn, F. G., & Lehnardt, S. (2012). Extracellularly Delivered Single-Stranded Viral RNA Causes Neurodegeneration Dependent on TLR7. *The Journal of Immunology*, *189*(3), 1448–1458. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201078>
- Li, P., Allen, H., Banerjee, S., Franklin, S., Herzog, L., Johnston, C., McDowell, J., Paskind, M., Rodman, L., Salfeld, J., Towne, E., Tracey, D., Wardwell, S., Wei, F., Wong, W., Kamen, R., & Seshadri, T. (1995). *Mice Deficient in IL-1p-Converting Enzyme Are Defective in Production of Mature IL-1p and Resistant to Endotoxic Shock*. *80*, 401–411.
- Libby, P., Ordovas, J. M., Auger, K. R., Robbins, A. H., Birinyi, L. K., & Dinarello, C. A. (1986). Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. *American Journal of Pathology*, *124*(2), 179–186.
- Libby, P., Ordovas, J. M., Birinyi, L. K., Auger, K. R., & Dinarello, C. A. (1986). Inducible interleukin-1 gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Journal of Clinical Investigation*, *78*(6), 1432–1438. <https://doi.org/10.1172/JCI112732>
- Liepinsh, E., Barbals, R., Dahl, E., Sharipo, A., Staub, E., & Otting, G. (2003). *The Death-domain Fold of the ASC PYRIN Domain , Presenting a Basis for PYRIN / PYRIN Recognition*. 1155–1163. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.07.007>
- Lindberg, C., Eriksson, C., Van Dam, A. M., Winblad, B., & Schultzberg, M. (2004). Neuronal expression of caspase-1 immunoreactivity in the rat central nervous system. *Journal of Neuroimmunology*, *146*(1–2), 99–113. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2003.10.047>
- Lisman, J., Yasuda, R., & Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(3), 169–182. <https://doi.org/10.1038/nrn3192>
- Liu, L., & Chan, C. (2014a). IPAF inflammasome is involved in IL-1 β production from astrocytes, induced by palmitate; implications for Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging*. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.08.016>.IPAF
- Liu, L., & Chan, C. (2014b). IPAF inflammasome is involved in interleukin-1 β production from astrocytes, induced by palmitate; implications for Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*, *35*(2), 309–321. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.08.016>
- Lu, A., Li, Y., Schmidt, F. I., Yin, Q., Chen, S., Fu, T., Tong, A. B., Ploegh, H. L., Mao, Y., & Wu, H. (2016). Molecular basis of caspase-1 polymerization and its inhibition by a new capping mechanism. *Nature Structural & Molecular Biology*, *November 2015*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3199>
- Lu, H. L., Yang, C. Y., Chen, H. C., Hung, C. S., Chiang, Y. C., & Ting, L. P. (2008). A novel alternatively spliced interleukin-1 receptor accessory protein mIL-1RAcP687. *Molecular Immunology*, *45*(5), 1374–1384. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.09.002>

- Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, *42*(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>
- Luk, W. P., Zhang, Y., White, T. D., Lue, F. A., Wu, C., Jiang, C.-G., Zhang, L., & Moldofsky, H. (1999). *Adenosine: a Mediator of Interleukin-1-Induced Hippocampal Synaptic Inhibition*.
- Luo, X. G., & Chen, S. Di. (2012). The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. *Translational Neurodegeneration*, *1*, 1–13. <https://doi.org/10.1186/2047-9158-1-9>
- Lynch, G., Larson, J., Kelso, S., Barrionuevo, G., & Schottler, F. (1983). Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature*, *305*.
- Ma, L., Li, X. wei, Zhang, S. jun, Yang, F., Zhu, G. min, Yuan, X. bing, & Jiang, W. (2014). Interleukin-1 beta guides the migration of cortical neurons. *Journal of Neuroinflammation*, *11*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-114>
- Macdermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J., & Barker, J. L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature*, *321*(6069), 519–522. <https://doi.org/10.1038/321519a0>
- MacKenzie, A., Wilson, H. L., Kiss-Toth, E., Dower, S. K., North, R. A., & Surprenant, A. (2001). Rapid secretion of interleukin-1 β by microvesicle shedding. *Immunity*, *15*(5), 825–835. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00229-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00229-1)
- Macvicar, B. A., & Newman, E. A. (2015). Astrocyte regulation of blood flow in the brain. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(5), 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020388>
- Madar, R., Rotter, A., Ben-Asher, H. W., Mughal, M. R., Arumugam, T. v., Wood, W. H., Becker, K. G., Mattson, M. P., & Okun, E. (2015). Postnatal TLR2 activation impairs learning and memory in adulthood. *Brain, Behavior, and Immunity*, *48*, 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.020>
- Madry, C., Kyrargyri, V., Arancibia-Cárcamo, I. L., Jolivet, R., Kohsaka, S., Bryan, R. M., & Attwell, D. (2018). Microglial Ramification, Surveillance, and Interleukin-1 β Release Are Regulated by the Two-Pore Domain K⁺ Channel THIK-1. *Neuron*, *97*(2), 299-312.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.002>
- Maelfait, J., Vercammen, E., Janssens, S., Schotte, P., Haegman, M., Magez, S., & Beyaert, R. (2008). *Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1 β maturation by caspase-8*. *205*(9), 1967–1973. <https://doi.org/10.1084/jem.20071632>
- Magistretti, P. J., & Allaman, I. (2018). Lactate in the brain: From metabolic end-product to signalling molecule. *Nature Reviews Neuroscience*, *19*(4), 235–249. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.19>
- Mambwe, B., Neo, K., Khameneh, H. J., Weng, K., Leong, K., Colantuoni, M., Vacca, M., & Muimo, R. (2019). *Tyrosine Dephosphorylation of ASC Modulates the Activation of the NLRP3 and AIM2 Inflammasomes*. *10*(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01556>
- Man, H. Y., Lin, J. W., Ju, W. H., Ahmadian, G., Liu, L., Becker, L. E., Sheng, M., & Wang, Y. T. (2000). Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron*, *25*(3), 649–662. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81067-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81067-3)
- Mantovani, A., Dinarello, C. A., Molgora, M., & Garlanda, C. (2019). Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity*, *50*(4), 778–795. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.012>

- Marcand-Sauvant, J. (2010). *Impact d'une neuroinflammation transitoire ou chronique à bas bruit sur le fonctionnement neuronal.*
- Martell, J. D., Deerinck, T. J., Sancak, Y., Poulos, T. L., Mootha, V. K., Sosinsky, G. E., Ellisman, M. H., & Ting, A. Y. (2012). Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. *Nature Biotechnology*, *30*(11), 1143–1148. <https://doi.org/10.1038/nbt.2375>
- Martinon, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Molecular Cell*, *10*(2), 417–426. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00599-3)
- Massarelli, E. E., Casatti, C. A., Kato, A., Camargo, A. C. M., Bauer, J. A., Glucksman, M. J., Roberts, J. L., Hirose, S., & Ferro, E. S. (1999). Differential subcellular distribution of neurolysin (EC 3.4.24.16) and thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) in the rat brain. *Brain Research*, *851*(1–2), 261–265. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02135-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02135-6)
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., & Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, *309*(5965), 261–263. <https://doi.org/10.1038/309261a0>
- McMahan, C. J., Slack, J. L., Mosley, B., Cosman, D., Lupton, S. D., Brunton, L. L., Grubin, C. E., Wignall, J. M., Jenkins, N. A., & Brannan, C. I. (1991). A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *The EMBO Journal*, *10*(10), 2821–2832. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07831.x>
- Meberg, P. J., Kinney, W. R., Valcourt, E. G., & Routtenberg, A. (1996). Gene expression of the transcription factor NF- κ B in hippocampus: Regulation by synaptic activity. *Molecular Brain Research*, *38*(2), 179–190. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00229-L](https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00229-L)
- Medzhitov, R., Preston-hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., & Janeway, C. A. (1998). *MyD88 Is an Adaptor Protein in the hToll / IL-1 Receptor Family Signaling Pathways*. *2*, 253–258.
- Meng, X. F., Tan, L., Tan, M. S., Jiang, T., Tan, C. C., Li, M. M., Wang, H. F., & Yu, J. T. (2014). Inhibition of the NLRP3 inflammasome provides neuroprotection in rats following amygdala kindling-induced status epilepticus. *Journal of Neuroinflammation*, *11*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0212-5>
- Merlo, E., Freudenthal, R., Maldonado, H., & Romano, A. (2005). Activation of the transcription factor NF- κ B by retrieval is required for long-term memory reconsolidation. *Learning and Memory*, *12*(1), 23–29. <https://doi.org/10.1101/lm.82705>
- Miller, L. G., Galpern, W. R., Dunlap, K., Dinarello, C. A., & Turner, T. J. (1991). *Interleukin-1 Augments γ -Aminobutyric ACC dA Receptor Function in Brain.*
- Minkiewicz, J., de Rivero Vaccari, J. P., & Keane, R. W. (2013). Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia*, *61*(7), 1113–1121. <https://doi.org/10.1002/glia.22499>
- Misumi, Y., Misumi, Y., Miki, K., Takatsuki, A., Tamura, G., & Ikehara, Y. (1986). Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *261*(24), 11398–11403. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)67398-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)67398-3)
- Miyamoto, A., Wake, H., Ishikawa, A. W., Eto, K., Shibata, K., Murakoshi, H., Koizumi, S., Moorhouse, A. J., Yoshimura, Y., & Nabekura, J. (2016). Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nature Communications*, *7*. <https://doi.org/10.1038/ncomms12540>

- Mohseni-Moghaddam, P., Roghani, M., Khaleghzadeh-Ahangar, H., Sadr, S. S., & Sala, C. (2021). A literature overview on epilepsy and inflammasome activation. *Brain Research Bulletin*, *172*(April), 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.05.001>
- Molineaux, C. J., Lasdun, A., Michaud, C., & Orłowski, M. (1988). Endopeptidase-24.15 Is the Primary Enzyme that Degrades Luteinizing Hormone Releasing Hormone Both In Vitro and In Vivo. *Journal of Neurochemistry*, *51*(2), 624–633. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb01084.x>
- Molofsky, A. V., & Deneen, B. (2015). Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *Glia*, *63*(8), 1320–1329. <https://doi.org/10.1002/glia.22836>
- Montero-Melendez, T. (2018). May Inflammation Be With You! *Frontiers for Young Minds*, *6*(September), 1–8. <https://doi.org/10.3389/frym.2018.00051>
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., & Seeburg, P. H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: Molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, *256*(5060), 1217–1221. <https://doi.org/10.1126/science.256.5060.1217>
- Moore, A. H., Wu, M., Shaftel, S. S., Graham, K. A., & O'Banion, M. K. (2009). Sustained expression of interleukin-1 β in mouse hippocampus impairs spatial memory. *Neuroscience*, *164*(4), 1484–1495. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.073>
- Mosser, C. A., Baptista, S., Arnoux, I., & Audinat, E. (2017). Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future. *Progress in Neurobiology*, *149–150*, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.01.002>
- Moutin, E., Hemmonnot, A.-L., Seube, V., Linck, N., Rassendren, F., Perroy, J., & Compan, V. (2020). Procedures for culturing and genetically manipulating murine hippocampal postnatal neurons. *Frontiers In Synaptic Neuroscience*, *in press*(April), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00019>
- Mukherjee, P., Winkler, C. W., Taylor, K. G., Woods, T. A., Nair, V., Khan, B. A., & Peterson, K. E. (2015). SARM1, Not MyD88, Mediates TLR7/TLR9-Induced Apoptosis in Neurons. *The Journal of Immunology*, *195*(10), 4913–4921. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500953>
- Nakahira, K., Haspel, J. A., Rathinam, V. A. K., Lee, S., Dolinay, T., Lam, H. C., Englert, J. A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H. P., Fitzgerald, K. A., Ryter, S. W., & Choi, A. M. K. (2011). Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *8*(3). <https://doi.org/10.1038/ni.1980>
- Neill, L. A. J. O., & Bowie, A. G. (2007). The family of five : TIR-domain- containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *7*(May), 353–364. <https://doi.org/10.1038/nri2079>
- Nguyen, A. W., & Daugherty, P. S. (2005). Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. *Nature Biotechnology*, *23*(3), 355–360. <https://doi.org/10.1038/nbt1066>
- Nicklin, M. J. H., Hughes, D. E., Barton, J. L., Ure, J. M., & Duff, G. W. (2000). Arterial inflammation in mice lacking the interleukin 1 receptor antagonist gene. *Journal of Experimental Medicine*, *191*(2), 303–311. <https://doi.org/10.1084/jem.191.2.303>
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbert, A., & Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, *307*(5950), 462–465. <https://doi.org/10.1038/307462a0>
- Nuñez, G., Benedict, M. A., Hu, Y., & Inohara, N. (1998). Caspases: The proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*, *17*(25), 3237–3245. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202581>

- O'Brien, J. S., & Sampson, E. L. (1965). Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. *Journal of Lipid Research*, 6(4), 537–544. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)39619-x](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)39619-x)
- Okun, E., Barak, B., Saada-Madar, R., Rothman, S. M., Griffioen, K. J., Roberts, N., Castro, K., Mughal, M. R., Pita, M. A., Stranahan, A. M., Arumugam, T. v., & Mattson, M. P. (2012). Evidence for a Developmental Role for TLR4 in Learning and Memory. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047522>
- Okun, E., Griffioen, K., Barak, B., Roberts, N. J., Castro, K., Pita, M. A., Cheng, A., Mughal, M. R., Wan, R., Ashery, U., & Mattson, M. P. (2010). Toll-like receptor 3 inhibits memory retention and constrains adult hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), 15625–15630. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005807107>
- Okun, E., Griffioen, K. J., Gen Son, T., Lee, J. H., Roberts, N. J., Mughal, M. R., Hutchison, E., Cheng, A., Arumugam, T. v., Lathia, J. D., van Praag, H., & Mattson, M. P. (2010). TLR2 activation inhibits embryonic neural progenitor cell proliferation. *Journal of Neurochemistry*, 114(2), 462–474. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06778.x>
- Okun, E., Griffioen, K. J., Lathia, J. D., Tang, S. C., Mattson, M. P., & Arumugam, T. V. (2009). Toll-like receptors in neurodegeneration. *Brain Research Reviews*, 59(2), 278–292. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.09.001>
- Oliveira, V., Garrido, P. A. G., Rodrigues, C. C., Colquhoun, A., Castro, L. M., Almeida, P. C., Shida, C. S., Juliano, M. A., Juliano, L., Camargo, A. C. M., Hyslop, S., Roberts, J. L., Grum-Tokars, V., Glucksman, M. J., & Ferro, E. S. (2005). Calcium modulates endopeptidase 24.15 (EC 3.4.24.15) membrane association, secondary structure and substrate specificity. *FEBS Journal*, 272(12), 2978–2992. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04692.x>
- Orlowski, M., Michaud, C., & Chu, T. G. (1983). A soluble metalloendopeptidase from rat brain: Purification of the enzyme and determination of specificity with synthetic and natural peptides. *European Journal of Biochemistry*, 135(1), 81–88. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07620.x>
- Otsu, Y., Darcq, E., Pietrajtis, K., Mátyás, F., Schwartz, E., Bessaih, T., Abi Gerges, S., Rousseau, C. v, Grand, T., Dieudonné, S., Paoletti, P., Acsády, L., Agulhon, C., Kieffer, B. L., & Diana, M. A. (2019). Control of aversion by glycine-gated GluN1/GluN3A NMDA receptors in the adult medial habenula. <http://science.sciencemag.org/>
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., & Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. <https://doi.org/10.1073/pnas.250476497>
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 383–400. <https://doi.org/10.1038/nrn3504>
- Park, S. Y., Kang, M. J., & Han, J. S. (2018). Interleukin-1 beta promotes neuronal differentiation through the Wnt5a/RhoA/JNK pathway in cortical neural precursor cells. *Molecular Brain*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0383-6>
- Patterson, M., & Yasuda, R. (2011). Signalling pathways underlying structural plasticity of dendritic spines. *British Journal of Pharmacology*, 163(8), 1626–1638. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01328.x>

- Pauff, S. M., & Miller, S. C. (2012). Toll-Like Receptor-4 Mediates Neuronal Apoptosis Induced by Amyloid β -Peptide and the Membrane Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynonenal. *Bone*, 78(2), 711–716. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.05.014>.Toll-Like
- Pawlowski, K., Pio, F., Chu, Z. L., Reed, J. C., & Godzik, A. (2001). PAAD - A new protein domain associated with apoptosis, cancer and autoimmune diseases. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(2), 85–87. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01729-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01729-1)
- Pelegrin, P., Barroso-Gutierrez, C., & Surprenant, A. (2008). P2X 7 Receptor Differentially Couples to Distinct Release Pathways for IL-1 β in Mouse Macrophage . *The Journal of Immunology*, 180(11), 7147–7157. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.11.7147>
- Pennypacker, K. R., Hong, J.-S., & McMillian, M. K. (1994). Pharmacological binding of AP-1 transcription factor DNA binding activity. *Faseb*, 8, 475–478.
- Pierotti, A., Glucksman, M. J., Roberts, J. L., Dong, K. W., Pierotti, A., & Orłowski, M. (1990). Molecular Cloning and Primary Structure of Rat Testes Metalloendopeptidase EC 3.4.24.15. *Biochemistry*, 29(45), 10323–10329. <https://doi.org/10.1021/bi00497a006>
- Pio Del Rio-hortega, B., & Oxf, Ds. (1939). Addresses and Original Articles the Microglia*. *Lancet*.
- Pizzirani, C., Ferrari, D., Chiozzi, P., Adinolfi, E., Sandonà, D., Savaglio, E., & Di Virgilio, F. (2007). Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1 β -loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood*, 109(9), 3856–3864. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-031377>
- Plog, B. A., & Nedergaard, M. (2018). The Glymphatic System in Central Nervous System Health and Disease: Past, Present, and Future. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 13(November 2017), 379–394. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-051217-111018>
- Poncer, J. C., Esteban, J. A., & Malinow, R. (2002). Multiple Mechanisms for the Potentiation of AMPA Receptor-Mediated Transmission by α -Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. *Journal of Neuroscience*, 22(11), 4406–4411. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-11-04406.2002>
- Poyet, J. L., Srinivasula, S. M., Tnani, M., Razmara, M., Fernandes-Alnemri, T., & Alnemri, E. S. (2001). Identification of Ipaf, a Human Caspase-1-activating Protein Related to Apaf-1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(30), 28309–28313. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100250200>
- Préhaud, C., Mégret, F., Lafage, M., & Lafon, M. (2005). Virus Infection Switches TLR-3-Positive Human Neurons To Become Strong Producers of Beta Interferon. *Journal of Virology*, 79(20), 12893–12904. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.20.12893-12904.2005>
- Priestle, J. P., Schär, H. P., & Grütter, M. G. (1988). Crystal structure of the cytokine interleukin-1 beta. *The EMBO Journal*, 7(2), 339–343. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb02818.x>
- Py, B. F., Kim, M.-S., Vakifahmetoglu-Norberg, H., & Yuan, J. (2013). Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 Critically Regulates Inflammasome Activity. 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.009>
- Qian, Y., Liu, C., Hartupee, J., Altuntas, C. Z., Gulen, M. F., Jane-Wit, D., Xiao, J., Lu, Y., Giltiay, N., Liu, J., Kordula, T., Zhang, Q. W., Vallance, B., Swaidani, S., Aronica, M., Tuohy, V. K., Hamilton, T., & Li, X. (2007). The adaptor Act1 is required for interleukin 17 - Dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nature Immunology*, 8(3), 247–256. <https://doi.org/10.1038/ni1439>
- Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G., & Dubyak, G. R. (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. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1913>
- Qu, Y., Ramachandra, L., Mohr, S., Franchi, L., Harding, C. V., Nunez, G., & Dubyak, G. R. (2009). P2X7 Receptor-Stimulated Secretion of MHC Class II-Containing Exosomes Requires the ASC/NLRP3 Inflammasome but Is Independent of Caspase-1. *The Journal of Immunology*, 182(8), 5052–5062. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802968>
- Rathinam, V. A. K., Zhao, Y., & Shao, F. (2019). Innate immunity to intracellular LPS. *Nature Immunology*, 20(May), 527–533. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0368-3>
- Rauner, C., & Köhr, G. (2011). Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B receptors constitute the major N-methyl-D-aspartate receptor population in adult hippocampal synapses. *Journal of Biological Chemistry*, 286(9), 7558–7566. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.182600>
- Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*, 290(1), 205–218. <https://doi.org/10.1042/bj2900205>
- Ray, K., Hines, C. S., Coll-Rodriguez, J., & Rodgers, D. W. (2004). Crystal Structure of Human Thimet Oligopeptidase Provides Insight into Substrate Recognition, Regulation, and Localization. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 20480–20489. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400795200>
- Reddy, S., Jia, S., Geoffrey, R., Lorier, R., Suchi, M., Broeckel, U., Hessner, M. J., & Verbsky, J. (2009). An Autoinflammatory Disease Due to Homozygous Deletion of the IL1RN Locus. *New England Journal of Medicine*, 360(23), 2438–2444. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0809568>
- Reemst, K., Noctor, S. C., Lucassen, P. J., & Hol, E. M. (2016). The indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development. *Frontiers in Human Neuroscience*, 10(NOV2016), 1–28. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00566>
- Rempe, R. G., Hartz, A. M. S., & Bauer, B. (2016). Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(9), 1481–1507. <https://doi.org/10.1177/0271678X16655551>
- Renaud, J., Thérien, H. M., Plouffe, M., & Martinoli, M. G. (2015). Neuro-inflammation: Dr Jekyll or Mr Hyde? In *Medecine/Sciences* (Vol. 31, Issue 11, pp. 979–988). Editions EDK. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153111012>
- Rhee, H. W., Zou, P., Udeshi, N. D., Martell, J. D., Mootha, V. K., Carr, S. A., & Ting, A. Y. (2013). Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science*, 339(6125), 1328–1331. <https://doi.org/10.1126/science.1230593>
- Rioli, V., Kato, A., Portaro, F. C. V., Cury, G. K., Kaat, K. Te, Vincent, B., Checler, F., Camargo, A. C. M., Glucksman, M. J., Roberts, J. L., Hirose, S., & Ferro, E. S. (1998). Neuropeptide specificity and inhibition of recombinant isoforms of the endopeptidase 3.4.24.16 family: Comparison with the related recombinant endopeptidase 3.4.24.15. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 250(1), 5–11. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8941>
- Rivera, C., Voipio, J., & Payne, J. A. (1999). The potassium chloride co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*, 397(January), 251–255.
- Robert, V. (2018). Hypothalamic control of hippocampal area CA2 activity. *Neurons and Cognition [q-Bio.NC]*, 1–177.
- Rodrigues, T. B., & Ballesteros, P. (2007). Journal of Neuroscience Research 85:3244–3253 (2007). *Journal of Neuroscience Research*, 3253(April), 3244–3253. <https://doi.org/10.1002/jnr>

- Rogers, M. S., Hurtado-Guerrero, R., Firbank, S. J., Halcrow, M. A., Dooley, D. M., Phillips, S. E. V., Knowles, P. F., & McPherson, M. J. (2008). Cross-link formation of the cysteine 228-tyrosine 272 catalytic cofactor of galactose oxidase does not require dioxygen. *Biochemistry*, *47*(39), 10428–10439. <https://doi.org/10.1021/bi8010835>
- Roona, H. E. K., Eimer, A. X. E. L. H. L., & Heronis, J. O. H. N. C. (1999). *Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor α and IL-1 β from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3*. *PNAS*, *96*(May), 6261–6266. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6261>
- Rosene, D. L., & Van Hoesen, G. W. (1977). Hippocampal efferents reach widespread areas of cerebral cortex and amygdala in the rhesus monkey. *Science*, *198*(4314), 315–317. <https://doi.org/10.1126/science.410102>
- Rosenwasser, L. J., Dinarello, C. A., & Rosenthal, A. S. (1979). Adherent cell function in murine T-lymphocyte antigen recognition: IV. Enhancement of Murine T-cell antigen recognition by human leukocytic pyrogen. *Journal of Experimental Medicine*, *150*(3), 709–714. <https://doi.org/10.1084/jem.150.3.709>
- Ross, C., Chan, A. H., Pein, J. Von, Boucher, D., & Schroder, K. (2018). *Dimerization and auto-processing induce caspase-11 protease activation within the non-canonical inflammasome*. *1*(6), 1–10. <https://doi.org/10.26508/lsa.201800237>
- Ross, F. M., Allan, S. M., Rothwell, N. J., & Verkhratsky, A. (2003). A dual role for interleukin-1 in LTP in mouse hippocampal slices. *Journal of Neuroimmunology*, *144*(1–2), 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2003.08.030>
- Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M., & Sitia, R. (1990). A novel secretory pathway for interleukin-1 β , a protein lacking a signal sequence. *EMBO Journal*, *9*(5), 1503–1510. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08268.x>
- Ruddiman, R. & Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J., Elliston, K. O., Ayala, J. M., Casano, F. J., Chin, J., Ding, G. J.-F., Egger, L. A., Gaffney, E. P., Limjuco, G., ... Tocci, M. J. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature*, *355*(6372), 242–244.
- Rutz, S., & Ouyang, W. (2016). Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases. *Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases, Advances in Experimental Medicine and Biology*, *941*(II), 89–116. <https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5>
- Sala Frigerio, C., & De Strooper, B. (2016). Alzheimer's Disease Mechanisms and Emerging Roads to Novel Therapeutics. *Annual Review of Neuroscience*, *39*(March), 57–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070815-014015>
- Santos, N. B., Franco, R. D., Camarini, R., Munhoz, C. D., Dale, C. S., Silva, V. R. O., Borges, V. F., Lima, B. H. F., Cunha, F. Q., Visniauskas, B., Chagas, J. R., Tufik, S., Peres, F. F., Abilio, V. C., Florio, J. C., Iwai, L. K., Rioli, V., & Presoto, B. C. (2019). *Thimet Oligopeptidase (EC 3.4.24.15) key functions suggested by knockout mice phenotype characterization*. 1–38.
- Saresella, M., La Rosa, F., Piancone, F., Zoppis, M., Marventano, I., Calabrese, E., Rainone, V., Nemni, R., Mancuso, R., & Clerici, M. (2016). The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, *11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0088-1>

- Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y. H., & Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 512–521. <https://doi.org/10.1111/epi.13709>
- Schneider, H., Pitossi, F., Balschun, D., Wagner, A., Del Rey, A., & Besedovsky, H. O. (1998). A neuromodulatory role of interleukin-1 β in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), 7778–7783. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7778>
- Scholz, H., & Eder, C. (2017). Lysophosphatidylcholine activates caspase-1 in microglia via a novel pathway involving two inflammasomes. *Journal of Neuroimmunology*, 310(May), 107–110. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.07.004>
- Schreuder, H. A., Rondeau, J. M., Tardif, C., Soffientini, A., Sarubbi, E., Akeson, A., Bowlin, T. L., Yanofsky, S., & Barrett, R. W. (1995). Refined Crystal Structure of the Interleukin-1 Receptor Antagonist: Presence of a Disulfide Link and a cis -Proline. *European Journal of Biochemistry*, 227(3), 838–847. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20209.x>
- Schreuder, H., Tardif, C., Sarubbi, E., Akeson, A., Bowlin, T., Yanofsky, S., & Barrethii, R. W. (1997). A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with an antagonist. *3861*(March), 194–200.
- Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). Review The Inflammasomes. 821–832. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>
- Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the hippocampal formation. *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*, 34, 6–17. <https://doi.org/10.1159/000360925>
- Schwartz, T. U. (2007). Origins and evolution of cotranslational transport to the ER. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 607, 52–60. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74021-8_4
- Sebastian, R., & Broz, P. (2015). Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K⁺ efflux. *Eur. J. Immunol.* <https://doi.org/10.1002/eji.201545772>
- Seckinger, P., Williamson, K., Balavoine, J. F., Mach, B., Mazzei, G., Shaw, A., & Dayer, J. M. (1987). A urine inhibitor of interleukin 1 activity affects both interleukin 1 alpha and 1 beta but not tumor necrosis factor alpha. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 139(5), 1541–1545. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3040855>
- Shaftel, S. S., Kyrkanides, S., Olschowka, J. A., Miller, J. N. H., Johnson, R. E., & O'Banion, M. K. (2007). Sustained hippocampal IL-1 β overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *Journal of Clinical Investigation*, 117(6), 1595–1604. <https://doi.org/10.1172/JCI31450>
- Sharif, H., Wang, L., Wang, W. L., Magupalli, V. G., Andreeva, L., Qiao, Q., Hauenstein, A. V., Wu, Z., Nunez, G., Mao, Y., & Wu, H. (2019). Structural mechanism for NEK7-licensed activation of NLRP3 inflammasome. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1295-z>
- Sharma, M., & De Alba, E. (2021). Structure, activation and regulation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1–37. <https://doi.org/10.3390/ijms22020872>
- Sharma, R., Shultz, S. R., Robinson, M. J., Belli, A., Hibbs, M. L., O'Brien, T. J., & Semple, B. D. (2019). Infections after a traumatic brain injury: The complex interplay between the immune and

- neurological systems. In *Brain, Behavior, and Immunity* (Vol. 79, pp. 63–74). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.04.034>
- Shen, K., Jiang, W., Zhang, C., Cai, L., Wang, Q., Yu, H., Tang, Z., Gu, Z., & Chen, B. (2021). Molecular Mechanism of a Specific NLRP3 Inhibitor to Alleviate Seizure Severity Induced by Pentylentetrazole. *Current Molecular Pharmacology*, *14*(4), 579–586. <https://doi.org/10.2174/1874467213666200810140749>
- Shen, K., Mao, Q., Yin, X., Zhang, C., Jin, Y., Deng, A., Gu, Z., & Chen, B. (2018). NLRP3 Inflammasome Activation Leads to Epileptic Neurona 1 Apoptosis. *Current Neurovascular Research*, *15*(4), 276–281. <https://doi.org/10.2174/1567202616666181122165540>
- Sherwood, L. (2015). *Physiologie Humaine* (de Boeck, Ed.; 3e edition).
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, Y., Gao, W., Ding, J., Li, P., Hu, L., & Shao, F. (2014). *Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS*. <https://doi.org/10.1038/nature13683>
- Shi, S., Man, Z., Li, W., Sun, S., & Zhang, W. (2016). Silencing of Wnt5a prevents interleukin-1 β -induced collagen type II degradation in rat chondrocytes. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *12*(5), 3161–3166. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3788>
- Shimada, K., Crother, T. R., Karlin, J., Dagvadorj, J., Chiba, N., Chen, S., Ramanujan, V. K., Wolf, A. J., Vergnes, L., Ojcius, D. M., Rentsendorj, A., Vargas, M., Guerrero, C., Wang, Y., Fitzgerald, K. A., Underhill, D. M., & Town, T. (2012). Article Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis. *Immunity*, *36*(3), 401–414. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.009>
- Shin, M., Wang, Y., Borgus, J. R., & Venton, B. J. (2019). Electrochemistry at the Synapse. *Annual Review of Analytical Chemistry*, *12*, 297–321. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061318-115434>
- Shintani, Y., Kapoor, A., Kaneko, M., Smolenski, R. T., D'Acquisto, F., Coppen, S. R., Harada-Shoji, N., Lee, H. J., Thiemermann, C., Takashima, S., Yashiro, K., & Suzuki, K. (2013). TLR9 mediates cellular protection by modulating energy metabolism in cardiomyocytes and neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(13), 5109–5114. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219243110>
- Shibley, M. M., Mangold, C. A., & Szpara, M. L. (2016). Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Journal of Visualized Experiments*, *2016*(108), 1–11. <https://doi.org/10.3791/53193>
- Silverman, W. R., de Rivero Vaccari, J. P., Locovei, S., Qiu, F., Carlsson, S. K., Scemes, E., Keane, R. W., & Dahl, G. (2009). The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(27), 18143–18151. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.004804>
- Sims, J. E., Acres, R. B., Grubin, C. E., McMahan, C. J., Wignall, J. M., March, C. J., & Dower, S. K. (1989). *Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells*. *86*(November), 8946–8950.
- Singer, I. I., Scott, S., Chin, J., Bayne, E. K., Limjoco, G., Weidner, J., Miller, D. K., Chapman, K., & Kostura, M. J. (1995). The interleukin- β -converting enzyme (ICE) is localized on the external cell surface membranes and in the cytoplasmic ground substance of human monocytes by immunoelectron microscopy. *Journal of Experimental Medicine*, *182*(5), 1447–1459. <https://doi.org/10.1084/jem.182.5.1447>

- Smith, B. L., Rajendiran, T. M., Kuffa, P., & Marti, G. (2013). *Article K + Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.016>
- Sofroniew, M. v. (2015). Astrogliosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020420>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Song, N., & Li, T. (2018). Regulation of NLRP3 inflammasome by phosphorylation. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue OCT). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02305>
- Spalinger, M. R., Rogler, G., Scharl, M., Spalinger, M. R., Kasper, S., Gottier, C., Lang, S., Atrott, K., Vavricka, S. R., Scharl, S., Gutte, P. M., Grütter, M. G., Beer, H., Contassot, E., Chan, A. C., Dai, X., Rawlings, D. J., Mair, F., Becher, B., ... Scharl, M. (2016). *NLRP3 tyrosine phosphorylation is controlled by protein tyrosine phosphatase PTPN22*. November. <https://doi.org/10.1172/JCI83669.products>
- Srimathi, T., Robbins, S. L., Dubas, R. L., Chang, H., Cheng, H., Roder, H., & Park, Y. C. (2008). Mapping of POP1-binding Site on Pysin Domain of ASC * □. *Journal of Biological Chemistry*, 283(22), 15390–15398. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801589200>
- Stack, J., Moynagh, P. N., Bowie, A. G., Carty, M., Goodbody, R., & Schro, M. (2006). *The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF – dependent Toll-like receptor signaling*. 7(10), 1074–1081. <https://doi.org/10.1038/ni1382>
- Stanifer, M. L., Pervolaraki, K., & Boulant, S. (2019). *Differential Regulation of Type I and Type III Interferon Signaling*. 1, 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms20061445>
- Stehlik, C., Krajewska, M., Welsh, K., Krajewski, S., Godzik, A., & Reed, J. C. (2003). *The PAAD / PYRIN-only protein POP1 / ASC2 is a modulator of ASC-mediated nuclear-factor- κ B and procaspase-1 regulation*. 113, 101–113.
- Steinkasserer, A., Spurr, N. K., Cox, S., Jeggo, P., & Sim, R. B. (1992). The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1 α and IL-1 β loci. *Genomics*, 13(3), 654–657. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90137-H](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90137-H)
- Stenkowski, P. L., Bukhanova-Schulz, N., Baldwin, T., de Chaves, E. P., & Smith, P. A. (2021). Are sensory neurons exquisitely sensitive to interleukin 1 β ? *Journal of Neuroimmunology*, 354(February), 577529. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2021.577529>
- Stevenson, F. T., Bursten, S. L., Fanton, C., Locksley, R. M., & Lovett, D. H. (1993). The 31-kDa precursor of interleukin 1 α is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propiece. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(15), 7245–7249. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.15.7245>
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10), 655–669. <https://doi.org/10.1038/nrn3785>
- Stroebel, D., Carvalho, S., Grand, T., Zhu, S., & Paoletti, P. (2014). Controlling NMDA receptor subunit composition using ectopic retention signals. *Journal of Neuroscience*, 34(50), 16630–16636. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2736-14.2014>

- Stutz, A., Kolbe, C. C., Stahl, R., Horvath, G. L., Franklin, B. S., Ray, O. van, Brinkschulte, R., Geyer, M., Meissner, F., & Latz, E. (2017). *NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain*. 1725–1736.
- Südhof, T. C. (2021). The cell biology of synapse formation. *Journal of Cell Biology*, 220(7), 1–18. <https://doi.org/10.1083/jcb.202103052>
- Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K. H. G., & Lavelle, E. C. (2006). A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine*, 203(7), 1685–1691. <https://doi.org/10.1084/jem.20060285>
- Suzuki, S., Mimuro, H., Kim, M., Ogawa, M., Ashida, H., & Toyotome, T. (2014). *glomulin and activates inflammasomes to demolish macrophages*. 4. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324021111>
- Symons, J. A., Young, P. R., & Duff, G. W. (1995). Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 β precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(5), 1714–1718. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1714>
- Taepavarapruk, P., & Song, C. (2010). Reductions of acetylcholine release and nerve growth factor expression are correlated with memory impairment induced by interleukin-1 β administrations: Effects of omega-3 fatty acid EPA treatment. *Journal of Neurochemistry*, 112(4), 1054–1064. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06524.x>
- Takemiya, T., Fumizawa, K., Yamagata, K., Iwakura, Y., & Kawakami, M. (2017). Brain interleukin-1 facilitates learning of a water maze spatial memory task in Young Mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 11(October), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00202>
- Takeuchi, O., Takeda, K., Hoshino, K., Adachi, O., Ogawa, T., & Akira, S. (2000). *Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades*. 12(1), 113–117.
- Tan, C. C., Zhang, J. G., Tan, M. S., Chen, H., Meng, D. W., Jiang, T., Meng, X. F., Li, Y., Sun, Z., Li, M. M., Yu, J. T., & Tan, L. (2015). NLRP1 inflammasome is activated in patients with medial temporal lobe epilepsy and contributes to neuronal pyroptosis in amygdala kindling-induced rat model. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0233-0>
- Tan, M. S., Tan, L., Jiang, T., Zhu, X. C., Wang, H. F., Jia, C. D., & Yu, J. T. (2014). Amyloid- β induces NLRP1-dependent neuronal pyroptosis in models of Alzheimer's disease. *Cell Death and Disease*, 5(8), 1–12. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.348>
- Tartakoff, A. M. (1983). Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin. *Cell*, 32(4), 1026–1028. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90286-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90286-6)
- Tovar, K. R., & Westbrook, G. L. (1999). *The Incorporation of NMDA Receptors with a Distinct Subunit Composition at Nascent Hippocampal Synapses In Vitro*.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J., & Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 405–496. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
- Tremblay, M. È., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., & Nimmerjahn, A. (2011). The role of microglia in the healthy brain. *Journal of Neuroscience*, 31(45), 16064–16069. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4158-11.2011>

- Ulbrich, M. H., & Isacoff, E. Y. (2008). Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(37), 14163–14168. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802075105>
- Vaccari, J. P. D. R., Lotocki, G., Marcillo, A. E., Dietrich, W. D., & Keane, R. W. (2008). A molecular platform in neurons regulates inflammation after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, *28*(13), 3404–3414. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0157-08.2008>
- Van Opendenbosch, N., & Lamkanfi, M. (2019). Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity*, *50*(6), 1352–1364. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.020>
- Verhoef, P. A., Kertesz, S. B., Lundberg, K., Kahlenberg, J. M., & Dubyak, G. R. (2005). Inhibitory Effects of Chloride on the Activation of Caspase-1, IL-1 β Secretion, and Cytolysis by the P2X7 Receptor. *The Journal of Immunology*, *175*(11), 7623–7634. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7623>
- Verkhratsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiological Reviews*, *98*(1), 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
- Vezzani, A., Conti, M., de Luigi, A., Ravizza, T., Moneta, D., Marchesi, F., & de Simoni, M. G. (1999). Interleukin-1 β immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: Functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *Journal of Neuroscience*, *19*(12), 5054–5065. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-12-05054.1999>
- Vezzani, A., Moneta, D., Conti, M., Richichi, C., Ravizza, T., de Luigi, A., de Simoni, M. G., Sperk, G., Andell-Jonsson, S., Lundkvist, J., Iverfeldt, K., Bartfai, T., & Dorris, H. L. (2000). Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. In *OJL* (Vol. 116). www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.190206797
- Vigers, G. P. A., Anderson, L. J., Caffes, P., & Brandhuber, B. J. (1997). Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1 β . In *Nature* (Vol. 386, Issue 6621, pp. 190–194). <https://doi.org/10.1038/386190a0>
- Vigers, G. P., Caffes, P., Evans, R. J., Thompson, R. C., Eisenberg, S. P., & Barbara, J. (1994). *X-ray Structure of Interleukin-1 Receptor Antagonist*. *269*(17), 12874–12879. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99957-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99957-6)
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M. M., Bartfai, T., Binaglia, M., Corsini, E., di Luca, M., Galli, C. L., & Marinovich, M. (2003). Interleukin-1 β enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *Journal of Neuroscience*, *23*(25), 8692–8700. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-25-08692.2003>
- Vladimer, G. I., Weng, D., Paquette, S. W. M., Vanaja, S. K., Rathinam, V. A. K., Aune, M. H., Conlon, J. E., Burbage, J. J., Proulx, M. K., Liu, Q., Reed, G., Meccas, J. C., Iwakura, Y., Bertin, J., Goguen, J. D., Fitzgerald, K. A., & Lien, E. (2012). The NLRP12 Inflammasome Recognizes *Yersinia pestis*. *Immunity*, *37*(1), 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.07.006>
- Voronov, E., Dinarello, C. A., & Apte, R. N. (2018). Interleukin-1 α as an intracellular alarmin in cancer biology. *Seminars in Immunology*, *38*(May), 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.10.006>
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., Lichnerova, K., Cerny, J., Krusek, J., Dittert, I., Horak, M., & Vyklicky, L. (2014). Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological Research*, *63*(SUPPL.). <https://doi.org/10.33549/physiolres.932678>

- Wadachi, R., & Hargreaves, K. M. (2006). Trigeminal nociceptors express TLR-4 and CD14: A mechanism for pain due to infection. *Journal of Dental Research*, 85(1), 49–53. <https://doi.org/10.1177/154405910608500108>
- Wake, H., Moorhouse, A. J., Jinno, S., Kohsaka, S., & Nabekura, J. (2009). Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *Journal of Neuroscience*, 29(13), 3974–3980. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009>
- Walker, N., Talanian, R., Brady, K., & Dang, L. (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 [beta]-converting enzyme: A {...}. *Cell*, 78, 343–352.
- Walle, L. Vande, Opdenbosch, N. Van, Dillon, P., Weinlich, R., Green, D. R., Opdenbosch, N. Van, Dillon, C. P., Weinlich, R., & Green, D. R. (2022). *FADD and Caspase-8 Mediate Priming and Activation of the Canonical and Noncanonical Nlrp3 Inflammasomes*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302839>
- Wallisch, J. S., Simon, D. W., Bayir, H., Bell, M. J., Kochanek, P. M., & Clark, R. S. B. (2017). Cerebrospinal Fluid NLRP3 is Increased After Severe Traumatic Brain Injury in Infants and Children. *Neurocrit Care*. <https://doi.org/10.1007/s12028-017-0378-7>
- Walsh, J. G., Muruve, D. A., & Power, C. (2014). Inflammasomes in the CNS. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(2), 84–97. <https://doi.org/10.1038/nrn3638>
- Walsh, J. G., Reinke, S. N., Mamik, M. K., McKenzie, B. A., Maingat, F., Branton, W. G., Broadhurst, D. I., & Power, C. (2014). Rapid inflammasome activation in microglia contributes to brain disease in HIV/AIDS. *Retrovirology*, 11(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-11-35>
- Wang, C., Chen, T., Zhang, J., Yang, M., Li, N., Xu, X., & Cao, X. (2009). The E3 ubiquitin ligase Nrdp1 ‘preferentially’ promotes TLR-mediated production of type I interferon. *Nature Publishing Group*, 10(7), 745–753. <https://doi.org/10.1038/ni.1742>
- Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L. C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H. T., Ma, X. J., & Luo, Y. (2012). RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Molecular Diagnostics*, 14(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.08.002>
- Watt, J. A., & Hobbs, N. K. (2000). Interleukin-1 β immunoreactivity in identified neurons of the rat magnocellular neurosecretory system: Evidence for activity-dependent release. *Journal of Neuroscience Research*, 60(4), 478–489. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(20000515\)60:4<478::AID-JNR6>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(20000515)60:4<478::AID-JNR6>3.0.CO;2-R)
- Wen, A. Q., Wang, J., Feng, K., Zhu, P. F., Wang, Z. G., & Jiang, J. X. (2006). Effects of haplotypes in the interleukin 1 β promoter on lipopolysaccharide-induced interleukin 1 β expression. *Shock*, 26(1), 25–30. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000223125.56888.c7>
- Werman, A., Werman-Venkert, R., White, R., Lee, J. K., Werman, B., Krelin, Y., Voronov, E., Dinarello, C. A., & Apte, R. N. (2004). The precursor form of IL-1 α is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8), 2434–2439. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308705101>
- Wessendorf, J. H. M., Garfinkel, S., Zhan, X., Brown, S., & Maciag, T. (1993). Identification of a nuclear localization sequence within the structure of the human interleukin-1 α precursor. *Journal of Biological Chemistry*, 268(29), 22100–22104. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)80653-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)80653-x)
- Wilson, K. P., Black, J. A. F., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A., Raybuck, S. A., & Livingston, D. J. (1994). Structure and

- mechanism of interleukin-1 β converting enzyme. In *Nature* (Vol. 370, Issue 6487, pp. 270–275). <https://doi.org/10.1038/370270a0>
- Wójtowicz, T., & Mozrzymas, J. W. (2014). Matrix metalloprotease activity shapes the magnitude of EPSPs and spike plasticity within the hippocampal CA3 network. *Hippocampus*, *24*(2), 135–153. <https://doi.org/10.1002/hipo.22205>
- Xia, S., Zhang, Z., Magupalli, V. G., Pablo, J. L., Dong, Y., Vora, S. M., Wang, L., Fu, T. M., Jacobson, M. P., Greka, A., Lieberman, J., Ruan, J., & Wu, H. (2021). Gasdermin D pore structure reveals preferential release of mature interleukin-1. *Nature*, *593*(7860), 607–611. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03478-3>
- Xie, Q., Soutto, M., Xu, X., Zhang, Y., & Johnson, C. H. (2011). Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging in plant seedlings and mammalian cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *680*, 3–28. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-901-7_1
- Xu, H. nan, Li, L. xia, Wang, Y. xiang, Wang, H. gang, An, D., Heng, B., & Liu, Y. qiang. (2019). Genistein inhibits A β 25–35 -induced SH-SY5Y cell damage by modulating the expression of apoptosis-related proteins and Ca²⁺ influx through ionotropic glutamate receptors. *Phytotherapy Research*, *33*(2), 431–441. <https://doi.org/10.1002/ptr.6239>
- Yang, X., Chang, H. Y., & Baltimore, D. (1998). Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Molecular Cell*, *1*(2), 319–325. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80032-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80032-5)
- Yap, J. K. Y., Pickard, B. S., Chan, E. W. L., & Gan, S. Y. (2019). The Role of Neuronal NLRP1 Inflammasome in Alzheimer’s Disease: Bringing Neurons into the Neuroinflammation Game. *Molecular Neurobiology*, *56*(11), 7741–7753. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1638-7>
- Yirmiya, R., Winocur, G., & Goshen, I. (2002). Brain interleukin-1 is involved in spatial memory and passive avoidance conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory*, *78*(2), 379–389. <https://doi.org/10.1006/nlme.2002.4072>
- Zhao, Z., Lu, R., Zhang, B., Shen, J., Yang, L., Xiao, S., Liu, J., & Suo, W. Z. (2012). Differentiation of HT22 neurons induces expression of NMDA receptor that mediates homocysteine cytotoxicity. *Neurological Research*, *34*(1), 38–43. <https://doi.org/10.1179/1743132811Y.0000000057>
- Zheng, H., Fletcher, D., Kozak, W., Jiang, M., Hofmann, K. J., Corn, C. A., Soszynski, D., Grabiec, C., Trumbauer, M. E., Shaw, A., Kostura, M. J., Stevens, K., Rosen, H., North, R. J., Chen, H. Y., Tocci, M. J., Kluger, M. J., & Van der Ploeg, L. H. T. (1995). Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1 β -deficient mice. *Immunity*, *3*(1), 9–19. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90154-X](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90154-X)
- Zhou, Y., Lu, M., Du, R. H., Qiao, C., Jiang, C. Y., Zhang, K. Z., Ding, J. H., & Hu, G. (2016). MicroRNA-7 targets Nod-like receptor protein 3 inflammasome to modulate neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson’s disease. *Molecular Neurodegeneration*, *11*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0094-3>

Résumé

L'interleukine-1 beta (IL-1 β) est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans l'initiation de l'inflammation. Dans les cellules immunitaires, cette cytokine est synthétisée sous la forme d'un précurseur immature (pro-IL-1 β) et nécessite un clivage enzymatique pour devenir biologiquement active. Pendant des décennies, il était admis que le rôle de l'IL-1 β se limitait à la régulation des processus inflammatoires. Cependant, un nombre croissant d'évidences supporte l'idée, qu'en condition homéostatique, des cellules non-immunitaires du système nerveux central (SNC) peuvent exprimer et/ou être réactives à l'IL-1 β . Entre autres, cette cytokine est capable de moduler l'activité synaptique et la plasticité des réseaux à la suite d'une activité neuronale soutenue. Ces effets sont médiés par les récepteurs à l'IL-1, exprimés au niveau des épines dendritiques, qui peuvent interagir physiquement et fonctionnellement avec les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Basé sur ces observations, nous avons cherché 1/ à caractériser le type cellulaire capable de produire de l'IL-1 β en condition homéostatique dans le SNC et 2/ à décrypter les mécanismes cellulaires impliqués dans la maturation et la libération de cette cytokine.

Dans cette étude, l'expression de l'IL-1 β a été analysée dans l'hippocampe de souris grâce au RNAscope, une technique d'hybridation *in situ*. L'ARNm de l'IL-1 β a été détecté dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe, et plus précisément au niveau du gyrus denté et de l'aire *Cornu Ammonis 1* (CA1). En condition homéostatique, environ 40% des neurones de l'aire CA1 expriment en moyenne 0.7 molécules d'ARNm codant pour l'IL-1 β . Nous avons également utilisé un biosenseur de BRET permettant de suivre dans le temps et dans l'espace la maturation de l'IL-1 β . Exprimé dans les neurones excitateurs de l'hippocampe en culture, cet outil nous a permis d'identifier qu'une activité neuronale soutenue conduit à la maturation et à la libération de cette cytokine par les neurones. Bien que nos données montrent également que l'IL-1 β neuronale est préférentiellement localisée dans les épines dendritiques, la détection des signaux de BRET en microscopie montre que le clivage de cette dernière peut avoir lieu indifféremment dans le corps cellulaire, les dendrites ou les épines dendritiques. La maturation de l'IL-1 β est gouvernée par l'activation des récepteurs NMDA et implique les sous-unités GluN2A et GluN2B. Enfin, en couplant la technologie de marquage de proximité par biotinylation à l'aide de l'enzyme APEX2 et une analyse par spectrométrie de masse, nous avons identifié des protéines associées à l'IL-1 β dans les neurones en condition basale et après l'activation des récepteurs NMDA. Nos travaux ont identifié une protéase potentiellement responsable de la maturation de l'IL-1 β neuronale et montrent un enrichissement en protéines impliquées dans le transport vésiculaire et les mécanismes d'exocytoses suite à la stimulation NMDA.

Ces résultats montrent que les neurones excitateurs de l'hippocampe sont capables de synthétiser, de maturer et de libérer de l'IL-1 β en condition non-inflammatoire dans le SNC. L'ensemble des outils développés durant cette thèse permettront de décrypter les mécanismes cellulaires associés aux fonctions de l'IL-1 β en conditions physiologiques dans le SNC mais pourront également servir pour mieux caractériser l'implication de cette cytokine dans différents processus physio-pathologiques à travers l'organisme.

Abstract

Interleukin-1 beta (IL-1 β) is a pro-inflammatory cytokine involved in the initiation of inflammation. In immune cells, this cytokine is synthesized as an immature precursor (pro-IL-1 β) and requires enzymatic cleavage to become biologically active. For decades, it was thought that the role of IL-1 β was limited to the regulation of inflammatory processes. However, a growing number of evidence supports the idea that, under homeostatic conditions, non-immune cells of the central nervous system (CNS) can express and/or be reactive to IL-1 β . Among other things, this cytokine can modulate synaptic activity and network plasticity following sustained neuronal activity. These effects are mediated by IL-1 receptors, expressed at dendritic spines, which can physically and functionally interact with N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. Based on these observations, we sought 1/ to characterize the cell type capable of producing IL-1 β under homeostatic conditions in the CNS and 2/ to decipher the cellular mechanisms involved in the maturation and release of this cytokine.

In this study, IL-1 β expression was analyzed in mouse hippocampus using RNAscope, an *in-situ* hybridization technique. IL-1 β mRNA was detected in hippocampal pyramidal neurons, specifically in the dentate gyrus and *Cornu Ammonis 1* (CA1) areas. Under homeostatic conditions, approximately 40% of CA1 neurons express on average 0.7 molecules of mRNA encoding IL-1 β . We also used a BRET biosensor to track IL-1 β maturation in time and space. Expressed in cultured hippocampal excitatory neurons, this tool allowed us to identify that sustained neuronal activity leads to the maturation and release of this cytokine from neurons. Even if our data also show that neuronal IL-1 β is preferentially localized in dendritic spines, the detection of BRET signals by microscopy shows that IL-1 β cleavage can also occur indifferently in the cell body, dendrites or dendritic spines. IL-1 β maturation is governed by NMDA receptor activation and involves the GluN2A and GluN2B subunits. Finally, by coupling biotinylation proximity labeling technology using the APEX2 enzyme and mass spectrometry analysis, we identified IL-1 β -associated proteins in neurons in basal condition and after NMDA receptor activation. Our results identified a protease potentially responsible for neuronal IL-1 β maturation and show an enrichment in proteins involved in vesicular transport and exocytosis mechanisms following NMDA stimulation.

These results show that hippocampal excitatory neurons can synthesize, mature and release IL-1 β under non-inflammatory conditions in the CNS. All the tools developed during this thesis will allow to decipher the cellular mechanisms associated with the functions of IL-1 β under physiological conditions in the CNS but can also be used to better characterize the involvement of this cytokine in various physio-pathological processes throughout the organism.